



Université Lille 1, Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Lille 1, Sciences et Technologies
Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par

Cécile BIRCK

Le 24 Septembre 2014

Conception et caractérisation de films antimicrobiens à base de
poly(alcool vinylique) pour l'emballage à contact alimentaire

Pr. Maryse BACQUET (UMET – Université Lille 1)

Directeur

Dr. Valérie MIRI (UMET – Université Lille 1)

Co-directeur

Membres du Jury :

Pr. Isabelle VROMAN (ESIREims – Université de Reims)

Rapporteur

Dr. Jean Marie RAQUEZ (LPCM – Université de Mons-Hainaut)

Rapporteur

Pr. Frédéric DEBEAUFORT (UMR PAM-PAPC - Université de Bourgogne)

Examineur

Dr. Stéphanie DEGOUTIN (UMET – Lille 1)

Membre invité



Université Lille 1, Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Lille 1, Sciences et Technologies
Molécules et Matière Condensée

Présentée et soutenue par

Cécile BIRCK

Le 24 Septembre 2014

Conception et caractérisation de films antimicrobiens à base de
poly(alcool vinylique) pour l'emballage à contact alimentaire

Pr. Maryse BACQUET (UMET – Université Lille 1)

Directeur

Dr. Valérie MIRI (UMET – Université Lille 1)

Co-directeur

Membres du Jury :

Pr. Isabelle VROMAN (ESIREims – Université de Reims)

Rapporteur

Dr. Jean Marie RAQUEZ (LPCM – Université de Mons-Hainaut)

Rapporteur

Pr. Frédéric DEBEAUFORT (UMR PAM-PAPC - Université de Bourgogne)

Examineur

Dr. Stéphanie DEGOUTIN (UMET – Lille 1)

Membre invité



Unité Matériaux Et Transformations (UMET)

CNRS UMR 8207 - Université Lille 1
Bâtiment C6
59655 Villeneuve d'Ascq

Design and characterization of polyvinyl alcohol-based
antimicrobial films for food contact packaging

*« La vie ce n'est pas d'attendre que l'orage passe,
c'est d'apprendre à danser sous la pluie. »*

Sénèque

REMERCIEMENTS

Je remercie le CNRS et la région Nord-Pas de Calais d'avoir soutenu ce travail par le financement de ma thèse.

Dans un premier temps, je tiens à remercier **Mme Isabelle VROMAN**, Professeur à l'ESIREims, et **M. Jean Marie RAQUEZ**, Chercheur à l'Université de Mons-Hainaut dans le Laboratoire de Polymères et Matériaux Composites, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également **M. Frédéric DEBEAUFORT**, Professeur à l'Université de Bourgogne, pour sa participation à mon jury de thèse.

Je n'aurais pas eu la chance d'accomplir ce travail sans l'accueil du **Pr. Alexandre LEGRIS**, Directeur de l'UMET, du **Dr. Jean-Marc LEFEBVRE**, Directeur de Recherche CNRS et Responsable de l'équipe ISP, et du **Pr. Bernard MARTEL** au sein de l'UMET et de ses différentes équipes. Je vous adresse toute ma reconnaissance pour la chance que vous m'avez offerte de travailler au sein de ce laboratoire et pour vos qualités humaines.

Je tiens tout particulièrement à remercier le **Pr. Maryse BACQUET**, ma Directrice de thèse, pour m'avoir permis de progresser dans le domaine de la Recherche Universitaire et ce depuis le commencement de mon Master. Je suis reconnaissante de la confiance que vous m'avez accordée tant en m'accompagnant dans mes travaux de recherches du Master à la Thèse qu'en me laissant l'opportunité de prendre des initiatives durant ces travaux. Ces années sous votre direction m'auront permis d'évoluer sur le plan technique mais aussi humain.

Mes remerciements s'adressent également au **Dr. Valérie MIRI**, co-Directrice de ma thèse, pour m'avoir fait confiance pour ce projet ainsi que pour son encadrement. Un grand merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et tes conseils, surtout dans le domaine de la physique des polymères qui a parfois été un monde obscur pour moi.

Ce projet doit également beaucoup au **Dr. Stéphanie DEGOUTIN** qui m'a encadré du Master à la Thèse. Un grand merci pour tes conseils, ta disponibilité, ton écoute et ta sympathie.

Je remercie **Marc BRIA**, Ingénieur de recherche, et **Bertrand REVEL**, Ingénieur d'études, pour leur aide, leur disponibilité et leur expertise en RMN liquide et solide.

Une collaboration avec l'ESIREims m'a permis de travailler avec le **Dr. Florence FRICOTEAUX** et **Mme Nathalie CHOISELLE**. Merci pour toutes ces manips de perméabilité sur mes films, qui n'ont pas toujours été coopératifs, votre disponibilité, votre patience et vos nombreux conseils.

Je remercie également le **Pr. Jean-Paul CORNARD** et **Mme Myriam MOREAU** de m'avoir permis d'utiliser le spectromètre Raman. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour leur aide, leurs conseils et leur disponibilité.

Mes remerciements vont également à **Mme Peggy GRUAU** pour m'avoir permis d'utiliser l'autoclave, et surtout pour sa gentillesse et sa disponibilité.

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble du laboratoire de bactériologie de Lille 2 pour leur accueil et leur sympathie. Je remercie tout particulièrement le **Dr. Christel NEUT** d'avoir accepté de m'accueillir et de me suivre. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour ses conseils, son expertise, son attention et son intérêt pour mes travaux.

Je ne peux pas oublier de citer **M. Mickael MATON**, qui a été ma référence pour la microbiologie tout au long de ma thèse. Merci pour ta pédagogie, ta disponibilité, ton engagement et ta bonne humeur sans faille. Tu sais comme personne rendre les manips de microbiologie ludiques et passionnantes. Un grand merci aussi pour tes initiatives et ton enthousiasme pour les activités hors labos, ainsi que tous tes « bons plans ». Comment oublier le meilleur pain de Lille ?

Je remercie également l'ensemble de l'équipe du GRB, et tout particulièrement le **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN**, pour leur accueil enthousiaste et leur gentillesse à chacun de mes passages en microbiologie ou lors de l'emprunt des Gerhardt.

Je voudrais remercier l'ensemble du laboratoire UMET pour leur sympathie et leur aide. Tout particulièrement, merci :

A **Adeline MARIN** pour son aide sur les appareillages de physique.

Au **Dr. Frédéric CAZAUX**, tout d'abord pour m'avoir permis de travailler avec la DSC, pour avoir toujours su me conseiller, pour ses nombreux coups de main et solutions parfois à la MacGyver. Je ne peux pas omettre tes nombreuses blagues qui illuminent toujours mes journées !

Au **Dr. Catherine FAVEN** pour ces heures passées en TP qui m'ont permis de réviser mes gammes tant musicales que chimiques. Je te remercie pour tes nombreux conseils et ton soutien.

A **Jean-Noël STAELENS**, pour ton aide, nos grandes discussions et ta bonne humeur que ce soit en TP ou au laboratoire.

A **Michel DERAEDT**, pour ton aide, ta disponibilité et ta gentillesse. Les discussions autour du premier café matinal ont toujours été agréables, les quelques fois où je suis tombée du lit !

Un petit mot spécial pour le **Dr. Nicolas TABARY**, collègue et aussi ami. Je te remercie pour ton expertise toujours d'une grande aide, ta disponibilité et ton soutien. Travailler et discuter avec toi est et sera toujours un plaisir. Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans ton renouvellement en blagues, nos échanges d'états d'âmes et nos diverses sorties plus ou moins culturelles. A bientôt pour de nouvelles aventures !

Une mention spéciale pour mes compagnons doctorants tout au long de ces années:

Hélène, même si le chevauchement fut court, ça a été un réel plaisir de te croiser.

Cédric, ta culture, ton ouverture d'esprit et nos conversations en tout genre ont su enrichir les journées de laboratoire et de rédaction.

Guillaume, ça a été un plaisir de partager ces quelques années au laboratoire et en dehors et ce depuis le début de mon Master.

François, à ton humour, ton brin de folie et ta gentillesse !

Jatupol, la relève du bureau 128 !

Aurélien, même isolé au P5, tu as su m'aider, m'écouter, me contredire et me faire rire !

Sans oublier Imen, Aurélie, Léna, Claudia, Camille, William, Khaled, Maria, Jacobo, Safa !

Un grand merci spécial au **Dr. Adeline Martin** pour l'ensemble du chemin parcouru. C'est parfois presque en binôme que l'on a vécu les pans transversaux de nos thèses respectives, comme le résume très bien ton expression « compagne d'infortune, colocataire de bureau, collègue de labo, camarade de conversations lunaires et amie ». Beaucoup de goûts communs, quelques différences et quelques difficultés administratives ont permis l'émergence d'une belle amitié. Merci beaucoup pour ton écoute, ton soutien et tes théories optimistes. Comme tu le disais, mon tour est venu ! Et surtout *rose forever* !

Au **Dr. Alexandra PEREZ-ANES**, un grand merci pour ces quelques mois où tu as partagé notre bureau et y as semé ta bonne humeur, ta sensibilité et ton énergie.

Je n'oublie pas l'ensemble des stagiaires et techniciens qui m'a accompagné tout au long de ce travail - *Nour, Adrien, les deux Nicolas, Déborah, Aurélie* - mais aussi tous ceux que j'ai pu côtoyer dans les différents laboratoires où je suis passée.

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes qui ont contribué à faire de l'enseignement en TP une expérience enrichissante et passionnante. J'adresse tout particulièrement ma reconnaissance au Dr. Stéphane LEBRUN, au Dr. Till BOUSQUET, à Malika SOLTANE, Tracy DONNE et Léa-Marie BERNARD.

La thèse est une expérience professionnelle et étudiante mais c'est également une expérience humaine et personnelle. Je ne peux donc pas oublier dans ces remerciements l'ensemble des personnes qui m'ont entourée tout au long de ces années.

Tout d'abord, un grand merci à **mes parents** qui ont su développer et cultiver ma curiosité et m'ont toujours donné les moyens de poursuivre chacun de mes projets. Vous avez été bien courageux de rechercher les dernières coquilles cachées dans ces quelques 200 pages, merci ! Une pensée également à ma famille qui a toujours eu un œil sur mon avancée dans cette grande épopée. Une dédicace spéciale à **ma grand-mère** parfois un peu perdue dans l'évolution de ma thèse, à **Christine & Jacky** pour leurs conseils en champagne et à **Romain** qui a partagé quelques mois avec moi au laboratoire.

Sandrine, à nos retrouvailles et à nos digressions ! Un grand merci pour ton soutien tout au long de ma thèse, ton aide précieuse et d'être toujours disponible pour une visite en coup de vent ! Petite mention spéciale pour la gestion à distance du buffet de thèse, merci ! Je tiens également à remercier **Sébastien** et **Aurélie** pour m'avoir accueilli sans condition et pour avoir toujours suivi du coin de l'œil mes pérégrinations.

A **Éric**, pour m'avoir soutenu quels que soient mes choix et pour avoir supporté mes états d'âmes depuis 8 ans, particulièrement ces derniers mois. Merci à toi de m'avoir permis de suivre mon petit bonhomme de chemin qu'il m'ait mené à Montréal ou bien à Lille. Je n'oublie pas bien sûr **Sophie, David** et **tes parents** qui m'ont accueilli à bras ouvert et soutenu tout du long.

Sybille, à ton soutien sans faille, à ta nouvelle vocation de coach personnel (surtout le mien), à tes horaires de nuit, à nos coups de gueule, à nos fous rires ! Toi, qui a toujours une oreille attentive, ton téléphone dans la poche en cas de crise, MERCI de savoir trouver les mots pour désamorcer toute situation qui part sur le mauvais chemin et merci de le faire sans compter. A toutes les fois où on refait le monde jusqu'au petit matin, pourvu que ça dure ! Une pensée pour **Manu** qui est arrivé parmi nous au milieu de cette rédaction.

Baptiste, coach de présentations power point, merci pour ces heures de discussion sur tout et n'importe quoi, merci d'avoir toujours une pensée, parfois maladroite mais la plupart du temps tellement juste et reconfortante. Tu es précieux !

Mylène, l'autre chimiste du groupe, de nos premiers pas en licence à Amiens à ma soutenance en passant par la découverte de la chimie canadienne, tu as été celle qui partage les états d'âmes de chimiste. Une grande reconnaissance à ton œil de lynx qui a trouvé les coquilles les plus camouflées lors de la relecture finale ! Après ta soutenance, on lance notre série ! **Damien**, tu as été le premier du groupe à pousser la grande porte et voilà que je viens te rejoindre du côté des docteurs ! Merci à toi pour tes conseils tout au long de ma thèse, tes blagues parfois vaseuses et ton oreille dans les moments difficiles. Ta théorie de la sinusoïdale m'a bien aidée et s'est avérée juste !

A **Zoé**, celle sans qui rien n'aurait été possible ! Je ne me souviens pas d'une étape où tu n'as pas été à mes côtés et notamment durant le déroulement de cette thèse. A tous ces verres, ces sorties, ces discussions et digressions durant ces 5 années sur Lille ! Un merci spécial à toi et **Gilles** pour m'avoir

accueilli chaque fois qu'il vous l'était possible pour cette dernière année de thèse. Merci d'avoir rendu les choses plus douces.

Marie, les nouvelles ne sont pas toujours notre fort mais tu as toujours été là et le sera toujours. Merci pour ta bienveillance et nos petits apartés.

Je tiens tout particulièrement à remercier **Isaline** et **Olivier** d'avoir été l'autre pendant logistique pour cette transition Lille-Amiens. Merci à tous les deux pour cette dernière année de thèse où vous aurez été ma bouffée d'oxygène. Merci de m'avoir autant de fois nourrie, et quand on me connaît, on sait la valeur que ça a ! Merci d'avoir pris soin de moi chaque jour à travers des gestes simples (et ça depuis bien longtemps pour Isa). Une mention spéciale à Isa pour sa ténacité lors de la lecture de ma thèse. Tu es la reine de la virgule !

Céline, on en a fait du chemin depuis notre première année de chimie ! Je n'en serais sûrement pas là sans tes coups de pied dans la fourmilière et sans ton regard critique. Merci d'avoir contribué à faire de moi quelqu'un de meilleur et de plus fort. Merci de toujours être là, même si les nouvelles n'ont jamais été notre fort. Merci aussi à toi, **Laurent**, de m'avoir toujours si bien accueillie, de m'avoir fait profiter de ton expérience en matière de doctorat et pour tes mots de soutien. Une dédicace spéciale à **Gabriel** qui a pointé le bout de son nez pendant mes dernières corrections.

Florent, à ton année de concours qui nous a permis de nous retrouver et de partager des sacrés moments et des sacrés repas ! Merci pour ton soutien et ton intérêt tout au long de ce projet.

Guich, à notre rencontre en Master 1 et à notre chemin commun jusqu'en thèse ! Il n'y a pas à dire les petites pauses au C3 ont fait du bien. Tu sais râler avec moi comme personne !

J.C., comme quoi les heures que tu as passées à me faire réviser en Master 2 n'auront pas servi à rien ! Merci pour ton aide et ton soutien jusqu'au bout.

Carla & Julien, vous êtes et resterez une de mes plus belles rencontres lilloises ! A notre amour des chats et d'Ikea ainsi qu'aux cours d'anglais de Carla qui m'ont bien aidée ! Je vous attends au bled !

Merci à **Kévin & Oriane, Vincent & Claire, Hubert** pour avoir suivi les tumultes de mes études et de cette dernière étape ainsi que pour m'avoir souvent passionnée et bien fait rire. Un grand merci tout particulièrement à Vincent d'être venu assister à la soutenance et déguster des chouquettes et de l'houmous !

Jean-Michel, compagnon d'assos, de musique et de soirées, tu m'as accueilli dès mes débuts dans la vie étudiante. Merci d'avoir veillé sur moi et pour les fous rires ! **Melissa & Hubert**, merci à vous deux pour les petites ou grosses soirées, les coups de fils et les mots d'encouragements. Ça fait toujours un bien fou de vous voir ! **Camille**, petite padawan, merci pour tes histoires à dormir debout, d'être une inspiration permanente de blagues et pour ton amitié. Tu es dépaysante !

Je tiens à remercier tout particulièrement **la famille Rongéot** car même si je vous ai rencontrés sur la fin de la rédaction, votre soutien, vos encouragements et les petites parenthèses en dehors de ma thèse ont joué un rôle clef lors de la dernière ligne droite !

Un grand merci à l'ensemble des personnes rencontrées au **Festival de Confolens**, et tout particulièrement **Louise, Anaik, Solène, Paulo, Charles, Greetje, Laetitia, Adeline, Céline, Anne, Cathy, Pierre, Fanfan & Pascal, Zoran & Christelle, Manu, Karine, Didi, Benjamin, Nikola, Sophie, Loïc, Hélène, Yoann...** Une dédicace spéciale à la représentante du Festival de Confolens lors de la soutenance, **Louise** !

Il est difficile de citer tout le monde mais j'adresse une pensée spéciale et un grand merci à toutes les personnes qui ont parcouru un petit bout de chemin avec moi !

TABLE DES MATIERES

Remerciements	1
Principales abréviations utilisées	12
Introduction Générale	17
Première partie : Etude Bibliographique	20
Chapitre I : Emballages à contact alimentaire	21
I. Les Emballages à contact alimentaire	22
I.1 Généralités	22
I.2 Législation et migration de substances composant les emballages alimentaires	25
I.3 Emballage alimentaire : lutte contre les contaminations	27
I.4 Emergence des emballages actifs et intelligents.....	28
I.4.1 Les préparateurs.....	30
I.4.2 Les indicateurs.....	30
I.4.3 Les interactifs	31
II. Causes, conséquences et lutte contre les contaminations microbiennes des aliments.....	32
II.1 Contaminations alimentaires : causes et conséquences.....	32
II.1.1 Qualité des aliments.....	32
II.1.2 Sources des contaminations microbiennes.....	32
II.1.3 Conséquences des contaminations microbiennes	33
II.2 Solutions contre les contaminations	34
II.2.1 Les conditions de stockage des aliments	35
II.2.2 La décontamination par voie physique	36
II.2.3 La décontamination par les agents antimicrobiens	38
III. Les emballages antimicrobiens	40
III.1 Les emballages antimicrobiens : Généralités.....	40
III.2 Films à libération prolongée d'agents antimicrobiens	45

Chapitre II : Le poly(alcool vinylique)	53
I. Caractéristiques du PVOH	54
I. 1 Synthèse du PVOH.....	54
I.2 Structure semi-cristalline du PVOH.....	55
I.3 Biodégradabilité et toxicité du PVOH.....	56
I.4 Solubilité/Comportement en solution du PVOH	57
I.5 Elaboration et propriétés des films de PVOH.....	59
I.6. Applications du PVOH.....	64
II. PVOH et polymères naturels : Mélanges et applications.....	66
II.1 PVOH et Chitosane	66
II.2 PVOH et Amidon.....	68
II.3 PVOH et Cellulose et autres	69
III. Insolubilisation du PVOH par réticulation	70
III.1 Daldéhydes	70
III.2 Acides polycarboxyliques et dérivés	72
III.3 Autres méthodes de réticulation	76
Chapitre III : Les cyclodextrines, vecteurs d'agents antimicrobiens	77
I. Caractéristiques des cyclodextrines	78
I.1 Structure des CDs	78
I.2 Toxicité des CDs.....	80
I.3 Complexe d'inclusion des CDs.....	80
I.4 Applications des CDs	82
II. Cyclodextrines et domaine alimentaire	83
Chapitre IV : Films à propriétés antimicrobiennes à base de PVOH	87
I. Films antimicrobiens à base de PVOH dans le domaine médical.....	88
II. Films antimicrobiens à base de PVOH dans le domaine alimentaire	89
III. Association du PVOH et des cyclodextrines dans les domaines médical et alimentaire	93
Synthèse de l'étude bibliographique et stratégie	96

Deuxième Partie : Partie Expérimentale	100
Chapitre V : Produits, Matériels et Elaboration des Films	101
I. Tableau récapitulatif des produits utilisés	102
II. Détermination de la composition chimique du PVOH par Résonance Magnétique Nucléaire.....	102
III. Elaboration du Complexe HP β CD-NaBz.....	105
IV. Préparation des films	106
IV.1 Elaboration des films de PVOH	106
IV.2 Elaboration des films de PVOH réticulés.....	107
IV.2.1 Cas des films non chargés	109
IV.2.2 Cas des films chargés en agent antimicrobien	109
IV.2.3 Réticulation des films	110
Chapitre VI : Techniques de caractérisation	111
I. Conditionnement préalable des films	112
II. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	112
III. Spectroscopie Raman	113
IV. Dosage des fonctions carboxyliques	113
V. Analyses thermiques	114
V.1 Analyse thermogravimétrique (ATG)	114
V.2 Analyse enthalpique différentielle à balayage (DSC)	114
VI. Diffraction des rayons X	115
VII. Caractérisations Mécaniques	115
VII.1 Analyse Mécanique Dynamique (DMA)	115
VII.2 Traction uniaxiale.....	116
VIII. Mesures de Perméabilité	117
VIII.1 Perméabilité à la vapeur d'eau	118
VIII.2 Perméabilité à l'oxygène.....	119
IX. Cinétique de libération du NaBz par Spectroscopie.....	120
X. Activité antimicrobienne des films.....	120
X.1 Entretien des souches et préparation de l'inoculum	121
X.2 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	121
X.3 Test de Kirby-Bauer (diffusion sur gélose)	122

Troisième partie : Résultats et Discussion	126
Chapitre VII : Elaboration et étude des films non chargés en NaBz	127
I. Elaboration des films PVOH non réticulés : Effet de la dilution	128
II. Etude de la réaction de réticulation des films de PVOH par le CTR	134
II.1 Mise en évidence de la réaction par RMN	135
II.2 Cinétique de réticulation	136
II.3 Effet de la réaction de réticulation sur l'organisation structurale et les propriétés physiques des films	141
II.4 Influence de l'ajout d'HP β CD sur la réaction de réticulation	145
II.5 Optimisation du procédé de réticulation des films.....	149
III. Etude des films de composition en CTR intermédiaire	151
III.1 Identification des réactifs non réagis	152
III.2 Etude de la réticulation et des caractéristiques mécaniques	153
III.3 Influence de la température de réticulation sur les caractéristiques des films	155
IV. Effet de la composition et de la réticulation sur la perméabilité des films	158
Chapitre VIII : Etude des films chargés en NaBz	161
I. Etude par RMN du complexe entre le NaBz et l'HP β CD.....	162
II. Mise en évidence du NaBz dans les films	165
III. Etude de la libération du NaBz	168
III.1 Influence des paramètres de réticulation	168
III.2 Influence du complexe [HP β CD : NaBz].....	170
III.3 Influence de la quantité de NaBz	172
III.4 Influence de la température de libération	174
IV. Etude de l'activité antimicrobienne	176
IV.1 Concentration minimale inhibitrice des composants des films	176
IV.2 Etude de l'activité des films réticulés, par la méthode Kirby Bauer	177
IV.2.1 Influence de la quantité de NaBz et de la présence d'HP β CD	178
IV.2.2 Influence de la quantité de COOH résiduels	184
IV.2.3 Comparaison avec un autre agent antimicrobien : la nisine.....	185

Conclusion Générale	189
Références bibliographiques	192
Annexes	I
Annexe 1.....	I
Liste des microorganismes dans les denrées alimentaires	I
Annexe 2.....	III
Etude RMN des produits initiaux.....	III
L'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD)	III
La maltodextrine (MX).....	IV
L'acide citrique (CTR).....	V
L'hypophosphite de sodium (NaH ₂ PO ₂)	V
Le benzoate de sodium (NaBz)	VI
Annexe 3.....	VII
Courbe d'étalonnage du NaBz dans l'eau	VII
Annexe 4.....	VII
Spectres RMN des films PVOH/CTR -90/10 et PVOH/CTR-60/40 entre 5 et 9 ppm.....	VII
Annexe 5.....	VIII
Calcul pour la détermination de la masse molaire entre les nœuds de réticulation.....	VIII
Annexe 6.....	IX
Thermogrammes ATG des réactifs et des films PVOH, PVOH/CTR et PVOH/HP β CD/CTR	IX
Annexe 7.....	X
Spectres RMN des réactifs résiduels pour les films de compositions intermédiaires	X
Annexe 8.....	XI
Zoom sur les taches de corrélation du spectre ROESY 2D du mélange [HP β CD : NaBz].....	XI
Annexe 9.....	XII
Tableau récapitulatif des résultats de libération du NaBz	XII
Annexe 10.....	XIII
Communications.....	XIII

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

Composés initiaux

β CD : β -cyclodextrine

CD : Cyclodextrine

CTR : Acide citrique

HP β CD : Hydroxypropyl- β -cyclodextrine

[HP β CD : NaBz] : complexe de HP β CD et de NaBz

MX : Maltodextrine

NaBz : Benzoate de sodium

PCA : Poly (acide carboxylique)

Poly-HP β CD-CTR = Polymère d'HP β CD et de CTR

PVOH : Poly (alcool vinylique)

PVOH88: Poly (alcool vinylique) hydrolysé à 87-89%

PVOH99: Poly (alcool vinylique) hydrolysé à 99%

PVAc : Poly (acétate de vinyle)

VOH : Alcool vinylique

VAc : Acétate de vinyle

Films

PVOH/CTR-tmin : Film de PVOH réticulé par le CTR pendant un temps t.

PVOH/HP β CD/CTR -tmin : Film de PVOH et HP β CD réticulé par le CTR pendant un temps t.

PVOH/NaBz/CTR -tmin : Film de PVOH chargé en NaBz réticulé par le CTR pendant un temps t.

PVOH/HP β CD/NaBz/CTR-tmin : Film de PVOH et HP β CD chargé en NaBz, non complexé préalablement, réticulé par le CTR pendant un temps t.

PVOH/[HP β CD-NaBz]/CTR-tmin : Film de PVOH et HP β CD chargé en NaBz, préalablement complexé par l'HP β CD, réticulé par le CTR pendant un temps t.

Techniques de caractérisation

ATG : Analyse ThermoGravimétrique

DMA : Analyse Mécanique Dynamique (Dynamic Mechanical Analysis)

DRX : Diffraction des Rayons X

DSC : Analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry)

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)

IR(TF) : Spectroscopie InfraRouge (à Transformée de Fourier)

Méthode de JOB : Méthode des variations continues

OP : Perméabilité à l'oxygène

OTR : Vitesse de transmission de l'oxygène (Oxygen Transmission Rate)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROESY 2D : Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy en 2 dimensions

UV-Vis : Ultra-Violet Visible

WAXS : Wide Angle X-ray Scattering

WVP : Perméabilité à la vapeur d'eau

WVTR = Vitesse de transmission de la vapeur d'eau (Water Vapour Transmission Rate)

Produits chimiques cités

AA : Acide Acrylique

α CD : α -cyclodextrine

AITC : Allyl isothiocyanate

CaO : Oxyde de calcium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DS : Degré de substitution

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EVAc : Copolymère d'éthylène et d'acétate de vinylique

EVOH : Copolymère d'éthylène et d'alcool vinylique

GA : Glutaraldéhyde

γ CD : γ -cyclodextrine

HDPE : Polyéthylène haute densité

HCl : Acide chlorhydrique

HPMC = Hydroxypropylméthyl-cellulose

HTCC : N-(2-hydroxy)propyl-3-triméthylammonium chitosane chloride

LDPE : Polyéthylène basse densité

MC = Méthyl-cellulose

Me β CD : Méthyl- β -cyclodextrine

MEOH : Méthanol

MFC : cellulose microfibrillée

PA : Polyamide

PAA : Poly(acide acrylique)

PAN : Polyacrylonitrile

PA6 : Polyamide 6

PA66 : Polyamide 6.6

PA11 : Polyamide 11
PE : Polyéthylène
PEG : Polyéthylène glycol
PEMA : Poly(éthylène-co-acide méthacrylique)
PET : Polyéthylène téréphtalate
PLA : Poly(acide lactique)
PP : Polypropylène
PPG : Polypropylène glycol
PS : Polystyrène
PVC : Polychlorure de vinyle
PVDC : Polychlorure de vinylidène
TEOS : Orthosilicate de tétraéthyle
TP : Polyphénol de thé

Autres abréviations

BH : Brain-Heart, non sélectif
CGTase : Cyclodextrine glycosyltransférase
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
Cp = Capacité calorifique
DH : Degré dHydrolyse
DL₅₀ : Dose Létale Médiane
DP : Degré de Polymérisation
E. coli : *Escherichia coli*
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority)
FDA : Food and Drug Administration
Gram- : Gram negative
Gram+ : Gram positif
GTR : Régénération tissulaire guidée
HE = Huile essentielle
H.R. : Humidité relative
JECFA : Comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires FAO/WHO (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
LCST : Température de solubilité critique minimale (Lower Critical Solution Temperature)
MH(A) : Mueller Hinton (Agar)
MS = Molar Substitution

NOAEL: Dose sans effet toxique observable (No Observable Adverse Effect Level)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RC : Ringer Cystéiné

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

T_c : Température de cristallisation

T_f : Température de fusion

T_g : Température de transition vitreuse

t_{rét} : temps de réticulation

T₊ : Témoin positif

T₋ : Témoin négatif

χ_c : degré de cristallinité

INTRODUCTION GENERALE

Les microorganismes sont les principaux responsables de l'altération des aliments. Ils sont classés en trois catégories : bactéries, levures et moisissures. Dès lors, maîtriser leur prolifération par l'emballage permet d'augmenter la durée de vie de l'aliment et, grâce à un apport localisé, de diminuer les conservateurs inclus dans la denrée. Un nouveau type d'emballage plastique émerge depuis quelques années dans le domaine alimentaire : les emballages actifs [1]. Ils modifient les caractéristiques du produit emballé pour augmenter sa durée de vie tout en préservant ses propriétés organoleptiques. Au sein des emballages actifs, on distingue 3 catégories. Les indicateurs informent sur l'histoire et la qualité du produit, les préparateurs agissent sur la préparation de l'aliment pour faciliter sa consommation ou son utilisation et les interactifs agissent sur l'aliment et son environnement pour prolonger la durée de conservation ou améliorer la qualité. Nous axons notre recherche sur un type d'emballage interactif, l'antimicrobien [2;3]. Un emballage peut être rendu antimicrobien par le contrôle de l'atmosphère (absorbants d'oxygène, d'humidité ou d'éthylène ; libérateurs de CO₂ ou d'éthanol) ou par action directe sur le produit (utilisation d'enzymes, de polymères naturellement antimicrobiens ou d'agents antimicrobiens). Mon sujet de thèse se focalisera sur ce deuxième mode d'action.

En effet, ma thèse a pour objectif de développer un nouveau concept permettant de rendre antimicrobien des films à base de poly(alcool vinylique)(PVOH), avec effet immédiat et effet retard conjugués. La démarche choisie consiste à incorporer dans le polymère un agent antimicrobien (acide citrique et/ou benzoate de sodium) qui, en synergie avec une molécule cage de type cyclodextrine (CD) (molécule biosourcée issue de l'hydrolyse de l'amidon), lui confèrera une « bioactivité ». Ce travail a permis de développer une nouvelle thématique au laboratoire « Emballages antimicrobiens » qui a été soutenue par la région Nord - Pas de Calais et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Le PVOH est couramment utilisé dans le domaine de l'emballage alimentaire pour ses bonnes propriétés barrière à l'oxygène et au dioxyde de carbone. Cependant sa haute solubilité dans l'eau implique qu'il doit être inséré dans des films multicouches de mise en œuvre « complexe ». Pour contourner cet inconvénient et éviter les multicouches, la voie consistant à réticuler le PVOH pour le rendre insoluble a été envisagée. Au laboratoire, nous connaissons déjà l'utilisation des poly(acides carboxyliques) (PCAs) pour réticuler la cellulose et les CDs [4;5]. Nous avons donc souhaité transposer cette réaction à notre système PVOH/CD. Le PCA choisi pour mener ce travail est l'acide citrique (CTR) qui est utilisé en alimentaire (E330) comme

acidifiant et présente des activités antifongique et antibactérienne. Le CTR va pouvoir, en outre, réagir avec les fonctions hydroxyles du PVOH et de la CD afin de former un réseau tridimensionnel dans lequel on incorporera un conservateur alimentaire. Nous avons choisi le benzoate de sodium (NaBz) (E 211). Au sein du réseau, le NaBz pourra être seul ou sous forme de complexe avec la CD. En effet, la β -cyclodextrine (β CD) est déjà utilisée comme additif alimentaire (E 459) mais nous avons choisi de travailler avec l'un de ses dérivés plus hydrosoluble, l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD). La combinaison des fonctions résiduelles du CTR greffées sur le polymère et du NaBz sous forme de complexe, donc disponible, permet d'envisager des effets antimicrobiens immédiats par contact et retard par diffusion.

Nous avons parallèlement tenu compte des critères écologiques et de biodégradation des films obtenus en faisant les choix d'une mise en œuvre dans l'eau et de l'utilisation de composés biodégradables.

La première partie de ce manuscrit sera donc consacrée à l'état de l'art afin de contextualiser le sujet de l'étude. Dans un premier temps, le développement des emballages alimentaires ainsi que l'émergence des emballages actifs seront présentés. Les sources, les conséquences et les solutions actuelles contre la prolifération des microorganismes en alimentaire seront développées afin de faire le point sur les innovations dans le domaine des emballages antimicrobiens. Les caractéristiques et applications du PVOH et des CDs seront détaillées dans un deuxième temps. Enfin un recensement des films de PVOH antimicrobiens dans la littérature sera proposé.

La deuxième partie concernera la présentation des réactifs et produits, des méthodes d'élaboration des films ainsi que les méthodes de caractérisation utilisées pour ce travail.

La troisième partie de ce document sera dédiée à la présentation et l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude. Tout d'abord les paramètres influençant la réaction de réticulation des films de PVOH par le CTR seront étudiés de manière approfondie afin d'optimiser les protocoles d'élaboration. Parallèlement, l'effet de la réticulation sur les propriétés physiques et sur la perméabilité des films sera analysé. Puis la bioactivité des films, par des tests simulant la libération du NaBz et l'étude de leur activité antimicrobienne ciblée, sera discutée. L'objectif sera de corréliser l'activité de ces films à leur structure physico-chimique.

Pour clore cette étude, nous formulerons une conclusion générale tenant compte des bilans de chaque partie et qui permettra de dégager les perspectives de ce travail.

Première partie :
Etude Bibliographique

Chapitre I :
Emballages à contact alimentaire

I. LES EMBALLAGES A CONTACT ALIMENTAIRE

I.1 Généralités

En 2013, l'emballage, tous secteurs confondus, a un poids économique en France de 19 milliards d'euros, dont 12,5 milliards d'euros pour l'emballage agroalimentaire [6]. La directive 94/62/CE définit l'emballage tel que tout produit constitué de matériaux de toute nature, destiné à contenir et à protéger des marchandises données, allant des matières premières aux produits finis, à permettre leur manutention et leur acheminement du producteur au consommateur ou à l'utilisateur et à assurer leur présentation [7]. Le rôle de l'emballage dans la conservation des aliments est avant tout un rôle de barrière entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Le type de protection à adopter sera fonction de la sensibilité du produit à tel ou tel type d'agression, dépendant des facteurs d'altération intrinsèques des aliments (activité de l'eau, pH, état physique, etc.) et des facteurs extrinsèques (humidité ambiante, température de stockage, etc.) responsables des risques de mauvaise conservation. Selon l'ouvrage du Pr. Nathalie Gontard, les deux principales caractéristiques de l'emballage alimentaire sont de protéger l'aliment par effet barrière (vis-à-vis des gaz, de la vapeur d'eau, des microorganismes, des chocs etc.) et d'être inerte vis-à-vis de celui-ci [1]. En effet, la directive 89/109/CEE indique que les matériaux et objets qui sont destinés à être mis en contact ou sont mis en contact, conformément à leur destination, avec des denrées alimentaires, que ce contact soit direct ou indirect, doivent être suffisamment inertes pour ne pas céder à ces denrées des constituants en une quantité susceptible de présenter un danger pour la santé humaine, d'entraîner une modification inacceptable de la composition des aliments ou d'altérer leurs caractères organoleptiques [8].

Le succès des matériaux polymères dans le domaine de l'emballage s'explique par leur diversité et leurs propriétés. Ils sont résistants mécaniquement et de faible densité. De plus il est possible de les colorer ou de les imprimer et d'y incorporer facilement des charges [9]. Depuis plus de cinquante ans, les polymères ont été la solution la plus pratique et économique pour les applications en emballage en raison de leur faible coût, leur disponibilité, leurs excellentes propriétés optiques, mécaniques et thermiques, leur aptitude d'adhésion à chaud et leur résistance à l'eau et aux graisses [10]. La Figure I.I. 1 illustre l'importance du secteur emballage pour les matières plastiques qui est leur principale application, juste avant le secteur du BTP.

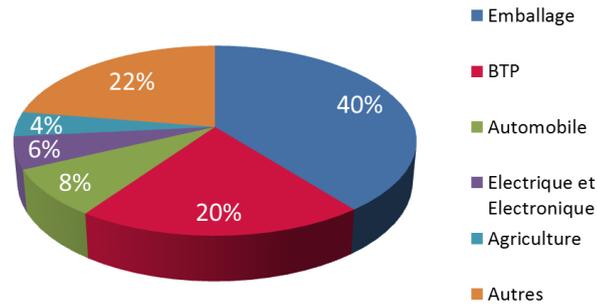


Figure I.I. 1. Répartition de la production des matières plastiques en fonction des applications [11]

Les matériaux polymères ont été utilisés pour l'emballage alimentaire à partir du XX^{ème} siècle, après la 2^{nde} Guerre Mondiale. Le polyéthylène (PE) est un des premiers plastiques largement utilisés pour l'emballage alimentaire. Le polymère le plus utilisé pour la réalisation de films d'emballages est le polyéthylène basse densité (LDPE). Ensuite vient le polyéthylène haute densité (HDPE), puis le polypropylène (PP). A eux trois, ils représentent environ 97 % du marché des films d'emballage. Le reste est constitué par une grande variété de polymères parmi lesquels on retrouve le polystyrène (PS), le polychlorure de vinyle (PVC), le polyéthylène téréphtalate (PET), le polyamide 6 (PA 6) et le copolymère d'éthylène et d'alcool vinylique (EVOH) [12]. Ces polymères sont choisis pour leurs propriétés spécifiques. Par exemple, le PET et l'EVOH sont utilisés pour leurs propriétés barrière aux gaz et aux odeurs. Le PS apporte sous sa forme rigide, une bonne résistance au froid et possède une facilité de mise en forme. Sous forme expansée, il permet une bonne isolation thermique et une protection aux chocs. En ce qui concerne le PVC, il est notamment utilisé pour sa faible perméabilité à l'eau. Le PA6 est, quant à lui, choisi pour sa résistance mécanique, à la perforation et à l'abrasion ainsi que son aptitude au thermoformage souple. Le coût varie d'un polymère à l'autre. A titre indicatif, le prix moyen en 2013 des principaux polymères utilisés dans l'emballage alimentaire par ordre croissant est le suivant : PET : ~1,20 €/kg < PS~1,30 €/kg < HDPE ~1,40 €/kg < LDPE : ~1,50 €/kg < PA 6 : ~2,50 €/kg < EVOH : ~5 €/kg. Cependant, ces matériaux présentent des inconvénients : ils ne sont pas toujours entièrement recyclables ni biodégradables. Parallèlement, un autre inconvénient est l'épuisement des ressources pétrolières. Tous ces paramètres conduisent à trouver des solutions de substitution : polymères naturels (la cellulose, le chitosane, l'amidon, le poly (acide lactique) (PLA), gélatine etc.) et/ou utilisation d'additifs biosourcés. Des nanocomposites, comme les argiles, peuvent être par exemple utilisés afin d'améliorer les propriétés thermiques, mécaniques et barrière des polymères d'emballage [13]. Notamment, Re et *al.* combinent l'ajout de nanoargiles à la stéréocomplexation du PLA pour améliorer ses propriétés de rigidité, thermiques et barrière à l'oxygène pour des applications longue durée, tel que l'emballage alimentaire [14]. Citons également l'application industrielle du polyamide MXD6

associé à des nanocharges, sous la marque Imperm® (développée par Nanocor® en partenariat avec Mitsubishi Gas Chemical), pour l'amélioration des propriétés barrière aux gaz pour des flacons de ketchup [15;16].

Les procédés de mise en œuvre des polymères contribuent également à leur importance dans l'emballage. Un certain nombre de méthodes existe pour mettre en œuvre les films polymères tels que l'injection, le thermoformage, l'extrusion ou le moulage. Ces méthodes sont optimisées pour que la mise en œuvre emploie un minimum de matière et permettent de réaliser des multicouches polymères afin d'obtenir les propriétés recherchées. Chaque couche a des caractéristiques bien précises (perméabilité, résistance mécanique, imprimabilité, aspect visuel etc.). Les couches sont reliées par des matériaux additionnels (colles, cires etc.) utilisés sous forme liquide ou semi-visqueuse pour l'enduction ou la lamination. Le nombre de couches varie en fonction des propriétés recherchées. Un exemple d'emballage est un système comportant 3 couches de PP/EVOH/PP thermo-soudées permettant de combiner les protections à l'humidité du PP et à l'oxygène de l'EVOH pour le conditionnement d'aliments « prêt à consommer » [17]. Un autre cas est un emballage de 7 couches, obtenu par extrusion, pour le conditionnement de jambon, saucisson ou fromage (Figure I.I. 2) [18].

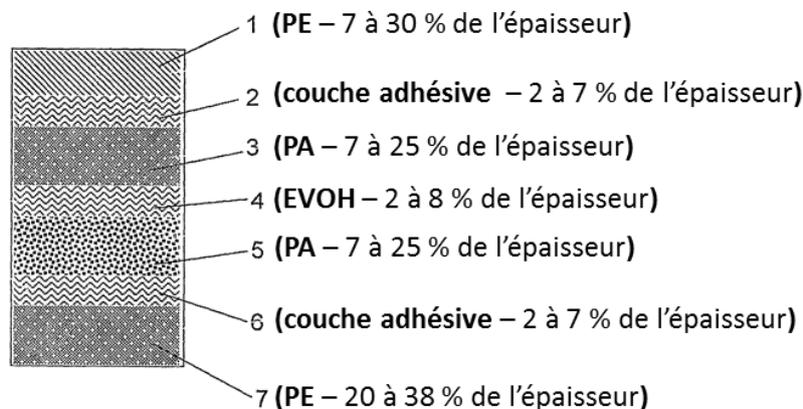


Figure I.I. 2. Représentation schématique d'un emballage multicouche pour le conditionnement de jambon, saucisson ou fromage [18]

Le matériau obtenu est totalement symétrique en termes de nature des couches et a une épaisseur variant entre 40 et 65 μm . Les couches de PE apportent l'imperméabilité à la vapeur d'eau et une bonne résistance mécanique, les couches de polyamide (PA) ajoutent des propriétés de résistance et de barrière mécanique requises dans un environnement gazeux et la couche d'EVOH permet d'améliorer les propriétés barrière aux gaz de la structure.

Ces emballages étant au contact de l'aliment, il est important de s'assurer de leur inertie vis-à-vis de celui-ci et de leur innocuité.

I.2 Législation et migration de substances composant les emballages alimentaires

Un certain nombre de directives existe pour encadrer le développement d'emballages en matière plastique pour le contact alimentaire. Les directives 82/711/CEE et 85/572/CEE sur les matériaux plastiques destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires visent à protéger de l'éventuelle migration de composants de l'emballage vers l'aliment [19;20]. Pour évaluer cette migration, les directives ont fait le choix de simulants à utiliser pour ces tests (Tableau I.I. 1).

Tableau I.I. 1. Simulants pour les tests de migration en fonction de la denrée alimentaire, selon les directives 82/711/CEE et 85/572/CEE

Type d'aliment	Aliments aqueux (pH > 4,5)	Aliments acides (pH ≤ 4,5)	Aliments alcoolisés	Aliments gras*
Simulant d'aliment	Eau distillée ou eau de qualité équivalente	Acide acétique à 3 % (p/v)	Ethanol à 10 % (v/v). Cette concentration doit être adaptée au pourcentage d'alcool réel de l'aliment s'il dépasse 10 % (v/v)	Huile d'olive raffinée ou autres simulants d'aliments gras (mélanges synthétiques de triglycérides, huile de tournesol, huile de maïs).

* Si le test n'est pas réalisable avec les simulants d'aliments gras, il peut être réalisé dans les 3 milieux d'essais suivants : isooctane, éthanol 95% et oxyde de polyphénylène modifié. Un nouvel échantillon doit être utilisé pour chaque milieu.

Ces directives précisent également les paramètres des essais avec les simulants en fonction des conditions d'utilisation de l'emballage. Par exemple, pour un contact de l'emballage avec la denrée alimentaire supérieur à 24h, l'essai doit durer 10 jours. Le test est réalisé à la température maximale d'utilisation. La directive 93/8/CEE précise que le test doit être effectué dans un four conventionnel si le matériau ou objet est destiné à être utilisé dans un four micro-onde [21]. Les conditions imposées par les directives sont donc plus exigeantes que celles de l'utilisation réelle.

A l'issue de ce test, la migration globale est chiffrée. La limite de migration pour des matériaux et objets en matière plastique est fixée par la directive 90/128/CEE à **10 mg/dm²** de surface du matériau dans le cas de feuilles, films, objets ne pouvant pas être remplis ou objets dont on peut facilement mesurer la surface ; ou à **60 mg/kg** de denrées alimentaires pour les objets pour lesquels il n'est pas possible d'estimer la surface qui est en contact avec les denrées alimentaires, tels que certains objets creux, capsules, joints, bouchons ou autres dispositifs de fermeture [22]. Elle répertorie également les précurseurs de départ autorisés pour la fabrication des matériaux et objets en matière plastique. La directive 2002/72/CE, plus récente, harmonise les directives précédentes et actualise les substances autorisées pour la fabrication de matières plastiques

destinées à entrer en contact avec les denrées alimentaires [23]. Notons par exemple que les substances suivantes sont référencées dans cette liste : acétate de vinyle (VAc), acide citrique (CTR), β -cyclodextrine (β CD) et acide hypophosphoreux, incluant également ses sels tel que l'hypophosphite de sodium. Le benzoate de sodium (NaBz) n'apparaît pas dans la liste contrairement à l'acide benzoïque. Une évolution de la directive 2002/72/CE par rapport aux précédentes est qu'elle donne des limites de migration spécifiques pour certaines de ces substances (Exemple : VAc a une limite de migration spécifique de 12 mg/kg) [23].

La directive 2007/19/CE, qui est une modification de la directive 2002/72/CE, introduit la notion de « barrière plastique fonctionnelle » qui limite la migration des substances au sein de la denrée alimentaire [24]. Celle-ci apporte la possibilité d'utiliser des substances non autorisées pour la conception des matériaux d'emballage à condition que leur migration dans la denrée alimentaire soit inférieure ou égale à 0,01 mg/kg. De plus, dans cette directive, le simulant alimentaire des produits laitiers qui était jusqu'alors l'eau distillée est remplacée par l'éthanol 50 %, qui simule mieux leur caractère gras.

Pour terminer, le règlement 1935/2004/CE, actuellement en vigueur pour les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires, permet une avancée sur l'influence des Etats membres, de la Communauté européenne et de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) [25]. En effet, des procédures législatives, réglementaires et administratives sont mises en place au niveau communautaire et non plus menées indépendamment par chaque pays membre. Le règlement 10/2011/CE est une mesure spécifique de ce dernier concernant les matériaux et objets en matière plastique et abroge la directive 2002/72/CE [26]. Dans ce règlement, les simulants alimentaires ont été mis à jour et sont présentés dans le Tableau I.I. 2.

Tableau I.I. 2. Simulants pour les tests de migration en fonction de la denrée alimentaire, selon le règlement 10/2011/CE [26]

Type d'aliment		Simulant d'aliment
<i>Denrées alimentaires à caractère hydrophile pouvant extraire des substances hydrophiles</i>	-	Ethanol à 10 % (v/v)
	pH < 4,5	Acide acétique à 3 % (m/v)
<i>Denrées alimentaires à caractère lipophile pouvant extraire des substances lipophiles</i>	Denrées alimentaires alcooliques (max 20 % (v/v)) ou contenant une quantité significative d'ingrédients organiques qui les rendent davantage lipophiles	Ethanol à 20% (v/v)
	Denrées alimentaires alcooliques (min 20 % (v/v)) et huile dans les émulsions aqueuses	Ethanol à 50 % (v/v)
<i>Denrées alimentaires sèches</i>	Denrées alimentaires contenant des matières grasses libres en surface	Huile végétale
		Oxyde de poly(2,6-diphényl-p-phénylène), taille des particules 60 – 80 mesh, taille des pores 200 nm

Notons que l'eau distillée ne fait plus partie des simulants alimentaires pour les tests de migration mais qu'elle est toutefois utilisée pour l'évaluation de la migration globale lorsque l'application vise tous les types de denrées alimentaires. Il est également important de souligner que ce règlement introduit un simulant pour les aliments secs. Plusieurs points, non spécifiés dans les précédentes directives, sont dorénavant encadrés par ce dernier règlement. Notamment dans le cas des catalyseurs, il est indiqué que n'étant pas destinés à rester dans le polymère final, ils ne doivent pas être soumis à la procédure d'autorisation au niveau de l'Union Européenne mais sont la responsabilité du fabricant selon les principes scientifiques d'évaluation des risques connus à l'échelle internationale.

I.3 Emballage alimentaire : lutte contre les contaminations

Les aliments sont emballés pour prévenir des contaminations : rôles de protection, conservation et stockage. Aujourd'hui on distingue trois catégories d'emballages. La première étant l'emballage passif qui protège le produit emballé contre les altérations de l'environnement sans en modifier la composition et les propriétés. La deuxième étant l'emballage intelligent qui fournit une information sur l'état des denrées alimentaires ou sur leur environnement sans libérer de constituants [25]. La troisième catégorie est l'emballage actif qui modifie la composition ou les propriétés organoleptiques de la denrée alimentaire par libération ou absorptions de substances dans l'aliment ou dans l'environnement afin de maintenir ou améliorer son état, ou encore de prolonger sa durée de conservation [25]. Les emballages dits passifs peuvent réduire l'adsorption, la désorption et la diffusion de gaz et liquides par une barrière inerte pour maintenir la qualité de l'aliment [27]. Les polymères possèdent ces caractéristiques qui se manifestent par des propriétés barrière aux gaz (Tableau I.I. 3).

Tableau I.I. 3. Présentation des propriétés d'imperméabilité de divers polymères [28]

Polymères	H ₂ O	O ₂	CO ₂	N ₂
PE et PP	Imperméabilité excellente	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité faible
PVOH et EVOH	Imperméabilité excellente	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité faible
PVDC	Imperméabilité excellente	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité faible
PS	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
PAN	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
PET non-orienté	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
PET-bi-orienté	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
PA-66	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
PA-11	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité moyenne
	Imperméabilité excellente	Imperméabilité moyenne	Imperméabilité faible	Imperméabilité faible

La perméabilité aux gaz est influencée par la structure du polymère. La perméabilité diminue avec les liaisons hydrogène pouvant exister dans le polymère. En effet, les polymères ayant des groupements favorisant les liaisons hydrogène (hydroxyles, amines, amides etc.) ont une

imperméabilité moyenne à forte à l'O₂, au N₂ et au CO₂. Par exemple, la perméabilité à l'O₂ du PVOH (0,0025 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.) est inférieure à celle de l'EVOH (0,004 à 0,06 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.) qui est bien inférieure à celle du HDPE (53 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.) [29]. Un autre paramètre structural qui peut diminuer la perméabilité aux gaz est la cristallinité. Notons le cas du poly(chlorure de vinylidène) (PVDC) qui ne forme pas de liaisons hydrogène mais qui a pourtant une faible perméabilité aux gaz, par exemple sa valeur de perméabilité à l'O₂ est de 0,015 à 0,25 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.. Cette propriété de barrière est due à sa forte cristallinité. L'étirage des films polymères est également une solution pouvant augmenter les propriétés barrière aux gaz. En effet, celui-ci favorise la formation de cristallites. Lorsque l'on compare la perméabilité à l'O₂ d'un PP non-orienté (81 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.) à un PP bi-orienté (41 cm³.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 23 °C et 0 %H.R.), on observe une diminution de la perméabilité à O₂ avec l'orientation. Parallèlement, l'étirement du film permet d'améliorer la transparence et la rigidité des films [30]. Dans le cas du PS, sa non-cristallinité est à l'origine de sa faible imperméabilité aux gaz.

La perméabilité à la vapeur d'eau est très faible pour les polymères hydrophobes. Par exemple, le PP (0,26 g.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 38 °C et 90 %H.R.) a une perméabilité à la vapeur d'eau nettement plus faible que celle du PVOH (750 g.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 38 °C et 90 %H.R.), qui est un polymère hydrophile. La cristallinité joue également un rôle dans la diminution de la perméabilité à la vapeur d'eau. En effet, on observe une diminution de perméabilité pour le PP bi-orienté (0,16 g.mm.m⁻².j⁻¹.bar⁻¹ à 38 °C et 90 %H.R.).

Les emballages passifs permettent de diminuer l'impact des gaz sur la dégradation des aliments, cependant, le développement des emballages actifs permet d'aller plus loin dans le rôle de l'emballage pour la conservation.

I.4 Emergence des emballages actifs et intelligents

Le domaine des emballages actifs et intelligents est en pleine expansion. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement à l'emballage actif qui est défini comme suit « Un emballage actif offre plus qu'une simple protection. Il interagit avec le produit et dans certains cas répond à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même. » [1].

Le premier à avoir utilisé en 1984 le terme « emballage actif » a été le professeur Ted Labuza, professeur des sciences et technologies des aliments (Université du Minnesota, USA)

[31]. Michael Rooney est le premier à publier sur le sujet en 1995 [32]. Depuis, les travaux portant sur la conservation des denrées par l'intermédiaire de l'emballage sont en plein essor et tentent d'associer emballage biodégradable et emballage actif.

A partir de 2004, les directives commencent à encadrer l'utilisation d'emballages actifs et intelligents. Le règlement 1935/2004/CE, relatif aux matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, introduit les notions et définitions d'emballages actifs et intelligents [25]. Le règlement 450/2009/CE, qui est la mesure réglementaire européenne spécifique relative aux emballages actifs et intelligents, notifie l'obligation de solliciter l'évaluation de la substance ou du mélange de substances par l'EFSA (European Food Safety Authority) [33]. Contrairement aux emballages passifs et intelligents, dans les emballages actifs, la migration des substances actives est volontaire. Pour ces dernières, la teneur maximale acceptable doit correspondre à celle autorisée par la législation sur les additifs et enzymes dans les aliments, ce qui sous-entend que la fonction active d'un matériau n'est pas considérée comme une caractéristique inhérente au matériau passif et donc que la substance active ne doit pas être prise en compte dans le calcul de la migration globale [33].

La mise en œuvre d'un emballage actif, est différente selon que le produit emballé est vivant ou inerte. Dans le cas d'aliments dit « inertes », les conditions optimales de conservation pourront être établies dès la fermeture de l'emballage et ne seront perturbées que par les transferts s'opérant au travers de l'emballage s'il n'est pas assez « barrière ». Les produits dits « vivants », par définition, ont des activités métaboliques qui engendrent en continu la production et la consommation de composés de type gaz par exemple. C'est le cas des fruits et légumes, produits de la mer, produits contenant une flore microbienne (fromage, saucisson etc.). Le maintien de conditions optimales de conservation sera donc plus complexe et nécessitera une action permanente de l'emballage au cours du stockage pour satisfaire les besoins respiratoires de ces produits. La mise en œuvre de systèmes actifs peut, dans ces cas, être d'un grand secours aux problèmes de conservation de ces produits qui ne s'accommodent pas d'un simple mélange gazeux et d'un film barrière.

Nous venons de voir que la classification européenne distingue les emballages intelligents des emballages actifs. Il existe toutefois une autre classification qui classe ces nouveaux emballages en trois catégories : les préparateurs, les indicateurs et les interactifs [1].

I.4.1 Les préparateurs

Les préparateurs agissent sur les conditions de préparation de l'aliment afin de faciliter sa consommation ou son utilisation, notamment par la transformation ou production d'un composé. On retrouve les emballages auto-chauffants et auto-refroidissants. Les emballages auto-chauffants emploient de l'oxyde de calcium ou magnésium et de l'eau pour générer une réaction exothermique. Ils sont utilisés pour les boîtes de café, les rations militaires, les plateaux repas instantanés [27]. On retrouve également des emballages libérant des composés lors de la préparation comme l'exemple, développé dans le brevet WO/1997/036799, d'un emballage libérant un arôme de fumée lors de la cuisson d'un poulet [34].

I.4.2 Les indicateurs

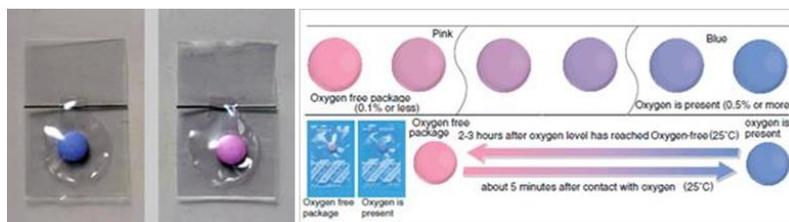


Figure I.I. 3. Photographie du système Ageless eye Oxygen detector, développé par la société Mitsubishi gas chemical company, Inc

Les indicateurs réagissent aux conditions de conservation et aux caractéristiques de l'aliment afin d'informer sur l'histoire et sur la qualité du produit. Les plus connus sont les indicateurs temps/température pour les

produits frais. Les TTI « Time Temperature Indicator » sont basés sur des réactions souvent enzymatiques dont la vitesse de réaction est dépendante de la température [35]. Il existe également des capteurs qui changent de couleur par l'oxydation du bleu de méthylène ou de pigments au cours du temps ou sous l'effet d'une fluctuation de température.

Aujourd'hui sur le marché, il existe plusieurs applications de ces technologies, comme les Ageless eye Oxygen detector (Figure I.I. 3) qui détectent l'exposition à l'oxygène par le passage du rose au bleu d'une

pastille [36;37]. Une autre application est TRACEO® (Figure I.I. 4) qui est un indicateur à base de croissance de microorganismes qui trace les ruptures de la chaîne du froid [38]. C'est un film transparent qui se colle sur le code-barres et détecte automatiquement les produits ayant subi

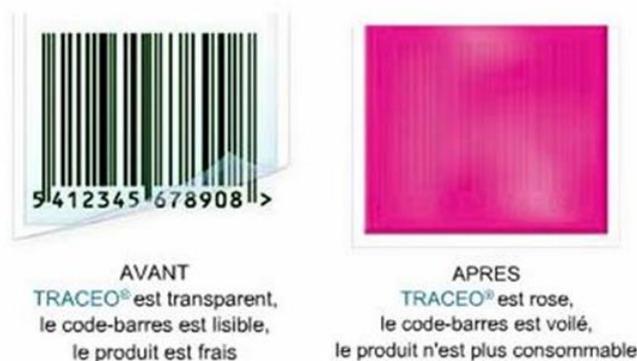


Figure I.I. 4. Représentation schématique du système TRACEO®



Repérez la couleur

Figure I.I. 5. Photographie du système Ripense®

une accumulation critique de ruptures de chaîne du froid. Le « film intelligent », en se colorant, rend impossible la lecture du code-barres et notamment le passage en caisse du produit et ce de façon irréversible. Un dernier exemple est Ripensense® (Figure I.I. 5), un capteur d'arôme inclus dans une étiquette permettant d'indiquer le degré de maturation du fruit, grâce à un indicateur coloré qui évolue de la couleur rouge à la couleur jaune [39].

I.4.3 Les interactifs

Les interactifs agissent sur l'aliment et son environnement afin de prolonger la durée de conservation ou d'améliorer la qualité. L'emballage s'adapte aux phénomènes de détériorations naturelles des aliments : oxydation, dégradation des vitamines, brunissement, perte d'arômes, prolifération de micro-organismes indésirables etc. Ils pourront par exemple absorber l'oxygène, limiter la perméabilité à la vapeur d'eau, laisser diffuser des molécules nutritionnelles préalablement encapsulées, absorber l'éthylène (hormone de croissance de certains fruits et légumes) etc. Dans cette catégorie, on rencontre notamment des emballages destinés à inhiber le développement des microorganismes, ce sont les emballages antimicrobiens. Ces emballages seront développés dans le paragraphe III de ce chapitre (page 40).

II. CAUSES, CONSEQUENCES ET LUTTE CONTRE LES CONTAMINATIONS MICROBIENNES DES ALIMENTS

II.1 Contaminations alimentaires : causes et conséquences

Le coût d'un seul cas de maladie microbienne d'origine alimentaire (perte de productivité, soins médicaux) a été globalement estimé aux environs de 1000 €. Ces maladies d'origine alimentaire ayant des conséquences significatives sur la santé et l'économie, il est intéressant d'en comprendre les mécanismes afin de pouvoir trouver des solutions plus efficaces que celles en vigueur actuellement.

II.1.1 Qualité des aliments

La qualité d'un aliment dans le commerce est définie selon deux critères, la qualité marchande et la qualité hygiénique.

La qualité marchande concerne les caractéristiques organoleptiques du produit. Ce sont l'aspect, l'odeur et la texture de l'aliment qui poussent le consommateur à acheter ou non un produit. Les altérations, issues du développement des microorganismes, influent sur la qualité marchande.

La qualité hygiénique/sanitaire concerne l'innocuité de l'aliment pour le consommateur. Cette innocuité correspond à une qualité seuil. La norme zéro défaut doit être atteinte pour certains systèmes aliment-microorganisme, en particulier à partir du moment où la présence du microorganisme dans le produit risque d'avoir une incidence défavorable et parfois très grave sur la santé du consommateur.

II.1.2 Sources des contaminations microbiennes

Tout d'abord, il apparaît nécessaire de définir la nature des microorganismes à l'origine des contaminations alimentaires qui sont classés en trois catégories : bactéries, levures et moisissures. Les bactéries sont divisées en deux groupes : gram négatif (gram-) et gram positif (gram+). On parle de microorganismes aérobies, s'ils se développent en présence d'oxygène et anaérobies, s'ils se développent sans oxygène.

Les contaminations des aliments sont **d'origine intrinsèque**, comme les microorganismes normalement associés aux plantes et aux animaux utilisés pour les aliments, et **d'origine extrinsèque** (environnement, manipulation du produit).

La préparation des produits alimentaires est un des facteurs de contaminations extrinsèques. Au niveau industriel, la plupart des toxi-infections résultent de la contamination des matières premières ou de défauts de traitements et d'emballage. Les contaminations peuvent également avoir lieu lors de la conservation et à l'entreposage. Parmi les nombreux facteurs qui sont à prendre en considération au cours de cette opération, c'est la température qui joue le rôle le plus important. Ainsi, il faut que les produits alimentaires soient conservés à des températures pour lesquelles le développement des microorganismes est ralenti, voire impossible.

II.1.3 Conséquences des contaminations microbiennes

La conséquence directe de ces contaminations est la modification des propriétés organoleptiques liée à des réactions chimiques au sein de l'aliment. Les origines et conséquences de ces modifications sont détaillées dans le Tableau I.II. 1.

Tableau I.II. 1. Modifications et conséquences sur les aliments en fonction de leur composition

Composition de l'aliment		Modifications	Conséquences sur l'aliment
Glucides et dérivés	Polymères (amidon, cellulose)	Hydrolyse	Modification de la texture
	Dimères et monomères (saccharose, maltose, lactose, glucose, fructose, etc.)	Fermentations : formation d'acides et de composés carbonylés etc.	Modification du goût et de l'arôme
Protides et dérivés	Polymères (protéines)	Hydrolyse	Modification de la texture
	Acides aminés	Décarboxylation, désamination, désulfuration etc.	Modifications du goût, de l'odeur Formation de catabolites toxiques
Lipides et dérivés		Oxydation et lipolyse	Modification du goût

Le Tableau A. 1 en Annexe 1 répertorie en détail les microorganismes en fonction des produits alimentaires dans lesquels ils se développent préférentiellement. Les microorganismes aérobies présentent le métabolisme le plus actif et par conséquent sont responsables de la plupart des pertes de qualité. **Les bactéries gram-** les plus répandues sont celles de type *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* et *Shigella*. Les autres types se développent dans des aliments ciblés ; par exemple celles de type *Pseudomonas* se

développent dans le lait, les œufs et la viande. **Les bactéries gram+** les plus répandues sont celles de type *Corynebacterium*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Les autres types se développent dans des aliments ciblés ; par exemple celles de type *Bacillus* se développent dans la viande et les conserves. **Les levures et moisissures** se développent dans des aliments ciblés tels que viandes et margarine pour *Candida* ; ou riz, céréales, fruits, œufs, huiles, tourteaux, arachides et sucre de canne pour *Aspergillus*.

Les aliments sont potentiellement capables de provoquer diverses affections chez le consommateur que l'on peut classer en trois catégories : les maladies infectieuses, les toxi-infections et les intoxications.

Les **maladies infectieuses**, d'origine alimentaire, les plus fréquentes résultent de l'ingestion des microorganismes suivants : *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Vibrio* et de l'ingestion de virus. Ces microorganismes se comportent vis-à-vis de l'organisme comme des parasites et se multiplient en utilisant des composants de l'organisme comme nutriments. La présence de ces microorganismes n'est pas tolérée dans les aliments en raison du risque qu'ils font courir au consommateur.

Les **toxi-infections** correspondent à l'ingestion d'un produit alimentaire dans lequel la concentration des microorganismes a déjà atteint 10^6 à 10^7 germes par gramme. Parmi les germes à l'origine de toxi-infections, on peut citer de nombreuses espèces de *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus faecalis*, de nombreuses entérobactéries, etc. Pour garder une marge de sécurité, la quantité de ces microorganismes tolérée dans les produits alimentaires contaminés est d'environ 10^2 germes par gramme.

Les **intoxications** résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications *botuliniques*, *staphylococciques* et à *Bacillus cereus*.

II.2 Solutions contre les contaminations

Différentes mesures sont prises afin d'éviter la prolifération, voire d'éliminer les microorganismes des aliments : la démarche qualité (normes et méthodes), que nous ne détaillerons pas ici, les conditions de stockage améliorées, les techniques physiques de décontamination et l'utilisation d'agents antimicrobiens.

II.2.1 Les conditions de stockage des aliments

Les conditions de stockage sont une des voies principales permettant de lutter contre les contaminations. La diminution de **l'activité de l'eau**, la **température de stockage**, **l'atmosphère contrôlée** et la **conservation sous pression** sont les paramètres utilisés pour éviter la prolifération des microorganismes.

En effet, pour se multiplier, les microorganismes ont besoin **d'eau** disponible. **La disponibilité de l'eau** est caractérisée par son activité qui correspond au rapport de pression partielle entre l'eau dans l'aliment et celle de l'eau pure ($a_{\text{eau}} = P_{\text{eau aliment}} / P_{\text{eau pure}}$). Afin d'éviter la prolifération des microorganismes, abaisser l'activité de l'eau est une solution. Les moyens d'abaisser l'activité de l'eau sont nombreux : physiques (congélation, déshydratation) ou additifs (salage, sucrage...).

La température de stockage est un autre facteur qui peut permettre d'éviter la croissance microbienne. Il existe une température optimale de croissance pour chaque catégorie de microorganisme. Pour des températures inférieures à la température optimale de croissance, le taux de croissance des microorganismes diminue jusqu'à être totalement inhibé à température très basse. Ce phénomène n'est pas irréversible car la croissance des microorganismes reprend quand la température atteint des valeurs qui se rapprochent de la température optimale de croissance. En revanche, bien au-dessus de la température optimale, les microorganismes sont détruits.

Si nous nous plaçons dans les conditions idéales, les courbes de croissance (Figure I.II. 1) permettent de classer les germes en trois catégories principales :

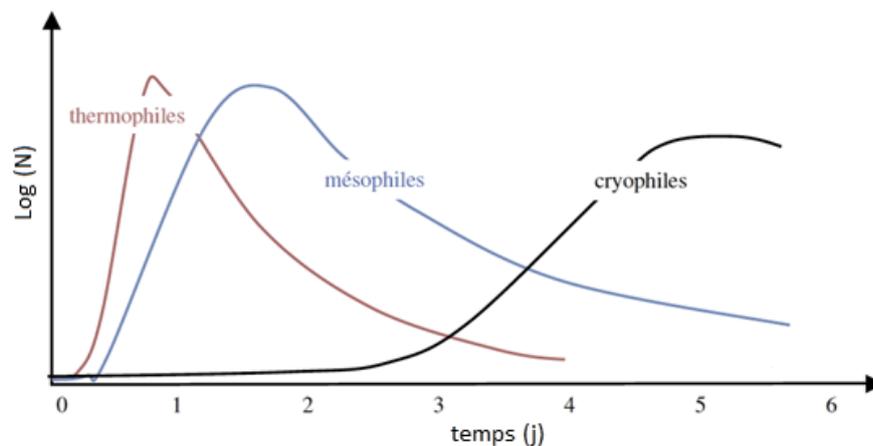


Figure I.II. 1. Allures des courbes de croissance (variations du nombre de germes en fonction du temps dans un milieu favorable et dans des conditions physicochimiques optimales) pour les différents types de germes : thermophiles, mésophiles et cryophiles

- Les thermophiles qui ont une phase de latence très courte, une phase exponentielle très rapide suivie d'une phase de dégénérescence. Dans cette catégorie, on rencontre des microorganismes capables de se multiplier entre 38 et 66 °C (température optimale de croissance 55 °C) (*Lactobacillus*, *Propionibacterium shermanii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Bacillus stearothermophilus*).
- Les mésophiles, qui comprennent la majorité des microorganismes, se développent entre 15 et 45 °C (température optimale de croissance 37 °C). La plupart des germes pathogènes font partie de cette catégorie.
- Les cryophiles se développent au-dessous de 20°C (température optimale de croissance autour de 15 °C). Parmi les germes dangereux en alimentaire capables de proliférer entre 0 et 10 °C, on peut citer: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* ...

Le froid est donc un moyen utilisé pour contrôler la vitesse de croissance des microorganismes. **La congélation à -18 °C** stabilise totalement l'aliment au sein duquel aucune croissance de microorganisme ne peut intervenir.

L'atmosphère contrôlée permet aussi d'améliorer la conservation. Une augmentation de la teneur en dioxyde de carbone, une diminution de la teneur en oxygène, une atmosphère sous azote ou un conditionnement sous vide permettent d'éviter des contaminations par des microorganismes aérobies.

La conservation sous pression est une voie intéressante car la plupart des microorganismes sont sensibles aux hautes pressions qui causent des déstructurations irréversibles des structures cellulaires.

II.2.2 La décontamination par voie physique

La décontamination par voie physique des aliments est une autre voie courante pour détruire les microorganismes ou éviter leur prolifération. Différents types de décontamination sont utilisés : la décontamination thermique, la décontamination par rayonnement et la filtration ou centrifugation.

La décontamination thermique peut se faire par la chaleur humide (autoclave) ou sèche (four), elle est décrite en termes de couple temps/température. Les différents traitements thermiques sont :

- **La thermisation** (63-65 °C / 15-20 s) : C'est un traitement spécifique au lait.
- **La pasteurisation** (Basse = 63 °C / 30 min, Haute = 72 °C / 15 s ; avant ou après conditionnement de l'aliment) : elle diminue le nombre de microorganismes pathogènes et/ou responsables de l'altération des aliments. Elle conduit ainsi à la « destruction » des moisissures, levures et bactéries gram-. Le produit reste périssable et doit être conservé à basse température. **La tyndallisation** est un traitement thermique équivalent à des pasteurisations répétitives séparées par des passages à des températures voisines de 30 à 40 °C de l'ordre de 10 à 24 h.
- **La stérilisation** (120 à 140 °C dans un récipient hermétique pendant quelques secondes pour le lait et plus de 30 min pour les conserves) : elle détruit toutes les bactéries et surtout les formes résistantes (spores). Les conserves alimentaires stérilisées présentent donc une très grande stabilité.

La deuxième méthode de décontamination physique se fait par l'utilisation d'un rayonnement. **La décontamination par rayonnement** des aliments, du matériel ou de l'environnement alimentaire peut se faire par **Ultra-Violet (UV)** ou autres radiations ionisantes (**rayons X et γ et bombardement électronique**). Ces rayonnements sont considérés comme des moyens de stérilisation à froid. Leur effet est principalement dû à des modifications de l'ADN et de l'ARN des microorganismes, entraînant une inhibition de leur croissance ou leur destruction. Les effets ionisants de ces rayonnements entraînent parallèlement la formation d'ozone, à partir d'oxygène, qui est antimicrobien. Les rayonnements UV sont moins efficaces et de faible coût, leur utilisation permet la décontamination de salles ou des aliments plutôt que leur stérilisation. Les rayons X, γ et le bombardement électronique ont un coût élevé, ils sont donc surtout utilisés pour stériliser du matériel médico-chirurgical, des emballages et matières premières employées dans les industries pharmaceutiques ou en cosmétologie mais aussi certains aliments.

La dernière méthode dite physique est basée sur la **filtration** en utilisant des supports poreux organiques (dérivés de la cellulose, polyamide, téflon, etc.) ou minéraux (filtres d'alumine, de porcelaine, de verre fritté, etc.) dont les pores ont une taille parfaitement contrôlée et de dimension inférieure à celle de la plupart des microorganismes à diminuer (0,5 μm). Ces méthodes restent néanmoins limitées aux liquides peu chargés en matières organiques en suspension (boissons type bière, vin et certains jus de fruits). Ponctuellement, **la centrifugation** à haute vitesse (au-dessus de 5000 g) permet de diminuer la charge microbienne (bactofugation en industrie laitière) avant la pasteurisation de certains liquides tels que le lait, la bière, l'eau ou autres boissons non alcoolisées.

II.2.3 La décontamination par les agents antimicrobiens

L'utilisation d'agents antimicrobiens dans les aliments permet d'empêcher ou inhiber le développement des microorganismes pathogènes et/ou responsables des phénomènes de dégradation des produits alimentaires. Ces substances comptent les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux et les antiparasitaires. Notre étude se focalise sur les antibactériens et les antifongiques. **Les antibactériens** se divisent en deux groupes : **les bactériostatiques** qui inhibent la croissance et la reproduction des bactéries mais ne les tuent pas et **les bactéricides** qui tuent les bactéries. **Les antifongiques** se divisent également en deux groupes : **les fongicides** qui détruisent les champignons (moisissures et levures) et **les fongistatiques** qui suspendent la croissance et le développement des champignons.

La plupart des agents antimicrobiens utilisés en emballage alimentaire sont reportés dans le Tableau I.II. 2.

Tableau I.II. 2. Liste des conservateurs alimentaires [40]

N°	Nom(s)	N°	Nom(s)
E200	Acide sorbique	E237	Formiate de sodium
E201	Sorbate de sodium	E238	Formiate de calcium
E202	Sorbate de potassium	E239	Hexaméthylènetétramine
E203	Sorbate de calcium	E240	Formaldéhyde
E209	Parahydroxybenzoate d'heptyle	E241	Gomme gaïac
E210	Acide benzoïque	E242	Dicarbonate de diméthyle
E211	Benzoate de sodium	E243	Arginate d'éthyle laurique
E212	Benzoate de potassium	E249	Nitrite de potassium
E213	Benzoate de calcium	E250	Nitrite de sodium
E214	4-hydroxybenzoate d'éthyle ou éthylparabène	E251	Nitrate de sodium
E215	Dérivé sodique du 4-hydroxybenzoate d'éthyle	E252	Nitrate de potassium
E216	4-hydroxybenzoate de propyle ou propylparabène	E260	Acide acétique
E217	Dérivé sodique du 4-hydroxybenzoate de propyle	E261	Acétates de potassium
E218	4-hydroxybenzoate de méthyle ou méthylparabène	E261(i)	Acétate de potassium
E219	Dérivé sodique du 4-hydroxybenzoate de méthyle	E261(ii)	Diacétate de potassium
E220	Anhydride sulfureux	E262(i)	Acétate de sodium
E221	Sulfite de sodium	E262(ii)	Diacétate de sodium
E222	Bisulfite de sodium (sulfite acide de sodium)	E263	Acétate de calcium
E223	Disulfite de sodium, métabisulfite de sodium	E264	Acétate d'ammonium
E224	Disulfite de potassium, pyrosulfite / métabisulfite de potassium	E265	Acide déhydroacétique
E225	Disulfite de calcium, pyrosulfite de calcium, ou métasulfite	E266	Déhydroacétate de sodium
E226	Sulfite de calcium	E270	Acide lactique
E227	Sulfite acide de calcium, bisulfite de calcium	E280	Acide propanoïque
E228	Sulfite acide de potassium, bisulfite de potassium	E281	Propanoate de sodium
E230	Diphényle	E282	Propanoate de calcium
E231	Orthophénylphénol, 2-hydroxybiphényle	E283	Propanoate de potassium
E232	Orthophénylphénate de sodium, sodium diphényl 2 yl	E284	Acide borique
E233	Thiabenzazole ou 2-(4-thiazolyl)benzimidazole	E285	Tétraborate de sodium (borax)
E234	Nisine	E290	Dioxyde de carbone, anhydride carbonique
E235	Natamycine (pimaricine)	E296	Acide malique (DL- ou L-)
E236	Acide formique	E297	Acide fumarique

Les antimicrobiens agissent soit en altérant une structure fondamentale et vitale de la bactérie (par exemple la paroi), soit en inhibant son activité métabolique. D'autres moyens chimiques

tels que l'acidification et l'ajout d'antioxydants sont également utilisés pour lutter contre la prolifération des microorganismes. Dans ce cas, l'environnement est modifié et devient peu ou non favorable à la prolifération.

Pour notre étude, nous avons choisi le **benzoate de sodium (NaBz)** qui est un agent antimicrobien couramment utilisé en alimentaire sous le code E211. En effet, l'acide benzoïque et ses sels sont classifiés comme conservateurs. Notons qu'ils présentent également l'avantage de former des complexes d'inclusion avec la β CD et ses dérivés, choisis pour l'élaboration de nos films et présentés dans le Chapitre III [41-45]. L'acide benzoïque étant peu soluble dans l'eau (2,9 g/L à 25 °C), il est souvent remplacé par ses sels. Ainsi, le NaBz est choisi comme modèle pour notre étude. La Figure I.II. 2 illustre l'équilibre entre l'acide benzoïque et le NaBz.

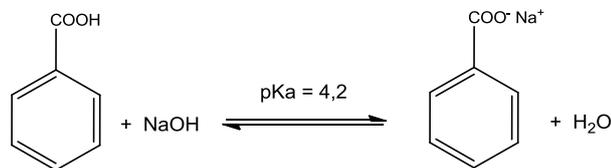


Figure I.II. 2. Equilibre entre l'acide benzoïque et le benzoate de sodium

Le NaBz est présent naturellement dans certains fruits (airelles, canneberges) ou peut être synthétisé. Il est utilisé comme conservateur contre les levures, les moisissures et les bactéries. Il est couramment utilisé comme antimicrobien dans plusieurs sortes d'aliments, tels que le poisson mariné, des garnitures à base de fruit, la confiture, la mayonnaise, des boissons non-alcoolisées et des bières. Le comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires FAO/WHO (JECFA) alloue un apport quotidien en NaBz de 0-5 mg/kg de poids corporel. La directive 95/2/CE donne quelques exemples de limitation pour le NaBz en fonction de la denrée alimentaire [46]:

- 150 mg/L pour les boissons aromatisées sans alcool
- 500 mg/kg pour les confitures, gelées, marmelades à faible teneur en sucre ainsi que les produits similaires à valeur énergétique réduite ou sans sucre et autres pâtes à tartiner à base de fruits.

Une étude récente sur la génotoxicité du NaBz a été réalisée et nécessite confirmation [47].

Pour tous ces conservateurs alimentaires, leur introduction se fait en fonction de la formulation de l'aliment considéré, soit par incorporation dans sa masse si l'aliment le permet (yaourt, soda etc.) (Figure I.II. 3 (a)), soit par pulvérisation sur sa surface (viande) (Figure I.II. 3(b)).

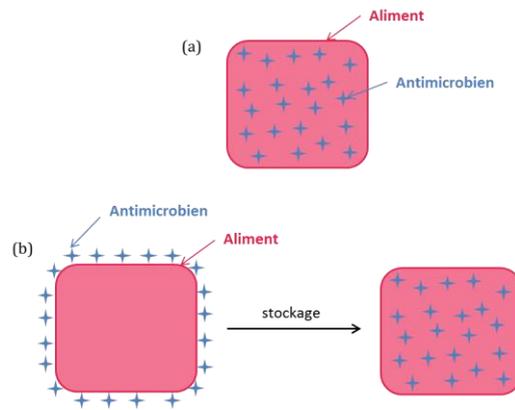


Figure I.II. 3. Représentation schématique de l'incorporation d'agents antimicrobiens dans l'aliment

Dans le cas de la pulvérisation, la cinétique de migration du conservateur n'est pas maîtrisée. L'antimicrobien migre rapidement au sein de l'aliment au détriment d'une présence en surface. Malheureusement c'est la surface qui est la zone la plus exposée aux contaminations. Pour les deux procédés, une grande quantité de conservateur est nécessaire pour être actif en tout point de l'aliment. C'est pour cette raison que, dans le cas des aliments emballés, de nouveaux systèmes se sont développés ; ils consistent à incorporer l'agent antimicrobien dans l'emballage de manière à diminuer son incorporation dans l'aliment. Cette problématique définit le défi des emballages antimicrobiens.

III. LES EMBALLAGES ANTIMICROBIENS

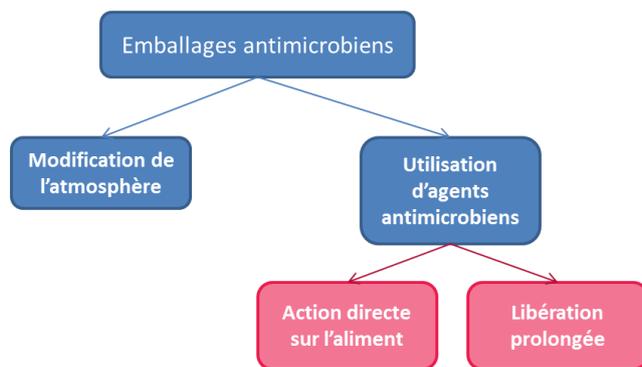


Figure I.III. 1. Catégories des différents emballages antimicrobiens

Deux voies sont rencontrées dans le domaine des emballages antimicrobiens: la modification de l'atmosphère et l'utilisation d'agents antimicrobiens (Figure I.III. 1). Dans le cas de l'utilisation d'agents antimicrobiens, on distingue deux modes d'actions qui sont l'action directe sur l'aliment et la libération prolongée.

III.1 Les emballages antimicrobiens : Généralités

Une première voie pour les emballages antimicrobiens est par modification de l'atmosphère de l'aliment, afin d'inhiber le développement des microorganismes ou de ralentir la dégradation de l'aliment, recensée dans le Tableau I.III. 1.

Tableau I.III. 1. Recensement des différents formes et procédés d’emballages antimicrobiens par modification de l’atmosphère

Absorption ou émission de substances gazeuses au sein du produit alimentaire	Exemples
Humidité : encourage le développement des microorganismes, surtout moisissures.	Absorbants d’humidité Utilisation de silica gel, oxyde de calcium (CaO), argile <i>Exemple industriel : Supasorb® par Thermarite® [48].</i>
Ethanol : inhibe la croissance de micro-organismes.	Libération d’éthanol Gel libérateur d’éthanol : <i>Exemple industriel : Ethicap® [49;50]</i>
Ethylène : produit par les plantes lors du mûrissement, l’absorber permet de ralentir le mûrissement des fruits et légumes.	Absorbants d’éthylène Sachet avec permanganate de potassium [51]
Oxygène : participe au développement des microorganismes aérobies.	Privation d’oxygène <u>Absorbant d’oxygène</u> : poudre de fer, acide ascorbique <i>Exemple industriel : ATCO® Standa Industrie (France) [52], Oxbar® [53]</i> <u>Films contenant des microorganismes aérobies capables de consommer l’O₂</u> [54]
CO₂ : effets bactériostatique et fongistatique contre les microorganismes aérobies	Générateur de CO₂ <u>Absorption d’eau couplée au relargage de gaz carbonique</u> : <i>Exemple industriel : Emballage « verifrais » de la société Codimer (France) [1].</i>

La Figure I.III. 2 présente des exemples d’applications commercialisées, cités dans le Tableau I.III. 1.

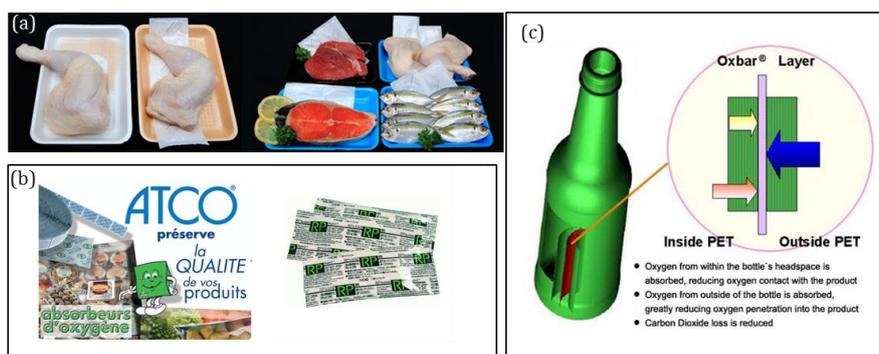


Figure I.III. 2. Exemples d’applications commercialisées : (a) Supasorb® Thermarite® [48] (b) ATCO® Standa Industrie [52] (c) Oxbar® [53]

Supasorb® est un système de sachet qui se positionne dans le fond de la barquette, développé par Thermarite® afin d’absorber l’humidité [48]. ATCO® est un sachet à disposer dans l’emballage, développé par Standa Industrie, qui absorbe l’oxygène dans un emballage barrière en fixant l’oxygène de façon irréversible [52]. Quant à Oxbar®, c’est un système multicouches pour bouteille à base de PET développé par Constar® [53]. Les couches interne et externe de la

bouteille sont à base de PET qui est un polymère barrière à l'oxygène. La couche centrale est composée d'un absorbeur actif d'oxygène.

Pour l'emballage d'aliments à forte humidité, on note également le développement de films contenant des microorganismes aérobies capables de consommer l'O₂. Citons par exemple l'étude menée par Altieri et *al.* sur l'élaboration de film à base d'hydroxyéthyl-cellulose ou de poly(alcool vinylique) (PVOH) piégeant les bactéries *Kocuria varians* et *Pichia subpelliculosa* [54]. Le film permet d'éliminer l'oxygène présent dans l'espace vide et ainsi inhiber la croissance des organismes aérobies.

Un système d'absorption d'eau couplée au relargage de gaz carbonique est développé dans l'emballage « verifrais » de la société Codimer [1]. Au fond de la barquette, l'eau est drainée vers un sachet contenant du bicarbonate de sodium et de l'acide ascorbique pour piéger l'O₂ et dégager du gaz carbonique. La conservation des viandes prédécoupées passe de 10-15 jours à 21 jours et celle du poisson passe de 4-5 jours à 10 jours.

Enfin, des sachets avec du permanganate de potassium absorbant l'éthylène sont utilisés pour conserver les tomates, les kiwis et les bananes [1].

La deuxième voie possible consiste à incorporer des agents antimicrobiens dans la matrice du matériau d'emballage. Les composants actifs peuvent être incorporés dans les parois de l'emballage, ou en surface par des procédés divers comme l'enduction ou la fonctionnalisation de la surface du film. Les emballages antimicrobiens agissent par deux modes d'action : la **libération prolongée d'agents antimicrobiens**, qui sera développée dans le paragraphe suivant (page 45), et le **contact direct** avec l'aliment. On rencontre dans la littérature différents types d'emballages antimicrobiens fonctionnant sur ce dernier principe et qui sont résumés dans le Tableau I.III. 2. Ces emballages agissent sur la surface qui est la zone la plus exposée. Nous avons recensé des articles qui traitent de systèmes où le principe actif est immobilisé en surface indépendamment du type d'interaction (covalente, ionique etc.) et indépendamment des procédés (dans la masse du polymère ou par modification de la surface etc.) et qui ne mentionnent ni de propriétés ni de résultats de libération prolongée.

Tableau I.III. 2. Recensement de l'état de l'art d'emballages antimicrobiens avec action directe sur l'aliment

Mode d'action	Par utilisation de
Incorporation d'agents antimicrobiens : - dans la masse du matériau polymère - sur la surface du matériau polymère en contact avec l'aliment - par liaisons ioniques ou covalentes sur la chaîne du polymère du matériau d'emballage	Ions métalliques Ag ⁺ [55] , Zéolithe avec ions Ag, Cu. <i>Exemple industriel : AgION™ Silver Ion Technology autorisé par FDA (9 juin 2000) [56]</i>
	Enzymes Lysozyme [57;58], lactoperoxydase [59], glucose oxydase [60]
	Enduction par AM PE enduit de cellulose contenant de la nisine [61] ; PVC, LDPE ou nylon enduit par nisine/EDTA/CTR/Tween 80 [62]
Utilisation de polymères naturellement antimicrobiens	Films à base de chitosane utilisés pour leurs propriétés antifongiques [63;64].
Modification de surface de polymère	Traitement UV : Nylon traité par UV [65] Adsorption de la nisine sur la surface du polymère [66]

Dans le cadre de **l'incorporation d'agents antimicrobiens** :

- Une première possibilité est l'utilisation **d'ions métalliques**. On rencontre des films antimicrobiens à base d'ions Ag⁺ qui ont été élaborés par Del Nobile et *al.* pour inhiber la croissance d'*Alicyclobacillus acidoterristris* [55]. Pour cela un polyéthylèneoxyde contenant Ag⁺ est déposé par plasma sur un film de PE. Ces films ont été testés sur deux milieux : extrait de malt acidifié et jus de pomme. Le film actif inhibe la croissance d'*Alicyclobacillus acidoterristris* dans les deux milieux. Un exemple d'application commerciale est le système AgION™ Silver Ion Technology qui intègre de l'argent, du cuivre ou d'autres ions élémentaires dans un support de zéolite [56]. Les ions s'échangent avec d'autres ions positifs (souvent sodium) grâce à l'humidité de l'environnement, effectuant une libération des éléments antimicrobiens "sur demande" (Figure I.III. 3).

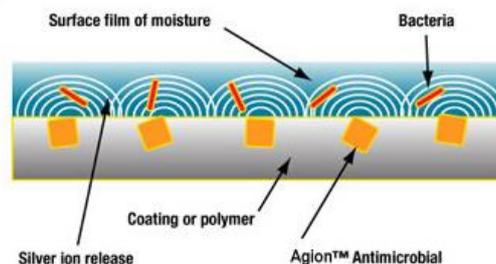


Figure I.III. 3. Représentation schématique de l'action du système AgION™ Silver Ion Technology [56]

- Une deuxième possibilité est l'utilisation **d'enzymes**. Min et *al.* développent des films à base d'isolat de protéines sériques contenant le système lactoperoxydase (lactoperoxydase, thiocyanate, percarbonate) qui ont un effet bactéricide contre *Salmonella enterica* et *E. coli* [59]. Une autre étude, menée par Vartiainen et *al.*, immobilise du glucose oxydase de façon covalente sur un film de PP activé par plasma portant des fonctions COOH et NH₂ [60]. Deux agents de couplage ont été utilisés : le glutaraldéhyde (GA) et des carbodiimides. L'immobilisation par le GA donne les films qui ont la meilleure activité enzymatique (30 jours de stockage). Les films ont complètement inhibé la croissance d'*E. coli* et fortement celle de *Bacillus subtilis*. Une autre étude est celle de Mecitoğlu et *al.* qui incorporent du lysozyme dans des films à base de zéine pour une activité par libération et par contact grâce au lysozyme retenu par le film [57]. Ces films ont montré une activité antimicrobienne contre deux bactéries gram+ : *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus plantarum*. Une dernière étude, menée par Conte et *al.*, élabore des films de PVOH réticulés sur lesquels le lysozyme est immobilisé de façon covalente sur la surface du film avec du GA [58]. Les films montrent une activité antibactérienne contre *Micrococcus lysodeikticus* et l'activité augmente avec la quantité de lysozyme fixée. L'activité est uniquement attribuée au lysozyme immobilisé sur la surface du film.
- La dernière possibilité rencontrée est **l'induction par des agents antimicrobiens**. Franklin et *al.* ont notamment développé un film PE enduit par un revêtement méthylcellulose et hydroxypropyl-cellulose contenant de la nisine pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* sur un hot dog [61]. Les deux plus fortes concentrations en nisine dans l'enduit ont entraîné une diminution significative du nombre de colonies de *L. monocytogenes* après 60 jours de stockage à 4 °C. Parallèlement, Natrajan et *al.* ont développé des films de PVC, LDPE et nylon enduits avec une solution contenant de la nisine, acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), CTR et Tween 80 [62]. Ces films montrent une activité contre *Salmonella Typhimurium* (gram-) inoculée sur une peau de poulet.

Dans le cadre de l'utilisation de **polymère possédant naturellement une activité antimicrobienne**, le chitosane est fréquemment rencontré. Notamment, Coma et *al.* élaborent un revêtement comestible à base de chitosane qui montre une inhibition totale de *Listeria monocytogenes* [63]. Ils observent une diminution de l'effet antibactérien avec le temps, qu'ils attribuent à une diminution des fonctions amines du chitosane disponibles. Un test sur une matrice alimentaire (emmental inoculé avec *L. innocua*) est réalisé. En présence du revêtement chitosane, il n'y a pas de colonies de *L. innocua* détectées après 84 et 132 h de stockage à 37 °C, contrairement au cas des fromages sans revêtement chitosane. Une autre étude, menée par

Möller et *al.*, associe le chitosane à l'hydroxypropylméthyl-cellulose pour la réalisation de films [64]. Ces films inhibent totalement la croissance de *Listeria monocytogenes*. L'activité est apportée par les fonctions amines du chitosane. En effet, les films réticulés par CTR ont une moins bonne activité suite à la réaction avec les amines du chitosane.

Le dernier procédé rencontré est basé sur la **modification de surface**. Shearer et *al.* irradient par UV un nylon 66, l'irradiation entraîne la formation de fonctions amines en surface [65]. Le film montre une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* mais n'en a pas contre *Pseudomonas fluorescens* et *Enterococcus faecalis*. Une autre étude, menée par Karam et *al.*, présente l'adsorption de nisine sur des surfaces LDPE traitées par différents traitements plasma puis fonctionnalisées par la nisine [66]. Aucune inhibition n'est observée contre *L. innocua* quels que soient les films, sans adsorption de la nisine. Les résultats montrent que la nisine a une meilleure activité lorsqu'elle est adsorbée sur une surface hydrophile, en lien avec une plus grande quantité adsorbée.

Les méthodes décrites ci-dessus ont en commun un mécanisme d'action par contact qui n'est pas celui envisagé pour notre étude. La méthode que nous avons choisie est la libération prolongée d'antimicrobiens qui est développée dans la partie suivante.

III.2 Films à libération prolongée d'agents antimicrobiens

Le principe de la libération prolongée est intéressant car la migration retardée de l'agent antimicrobien de l'emballage vers l'aliment permet de maintenir une concentration suffisante à la surface de l'aliment, c'est-à-dire là où le conservateur est particulièrement nécessaire pour réduire le développement superficiel de microorganismes, ralentir les phénomènes d'oxydation etc., comme l'illustre la Figure I.III. 4. La libération prolongée permet donc de diminuer l'incorporation directe des agents antimicrobiens dans l'aliment, et donc de diminuer leur quantité totale ingérée par le consommateur [1].

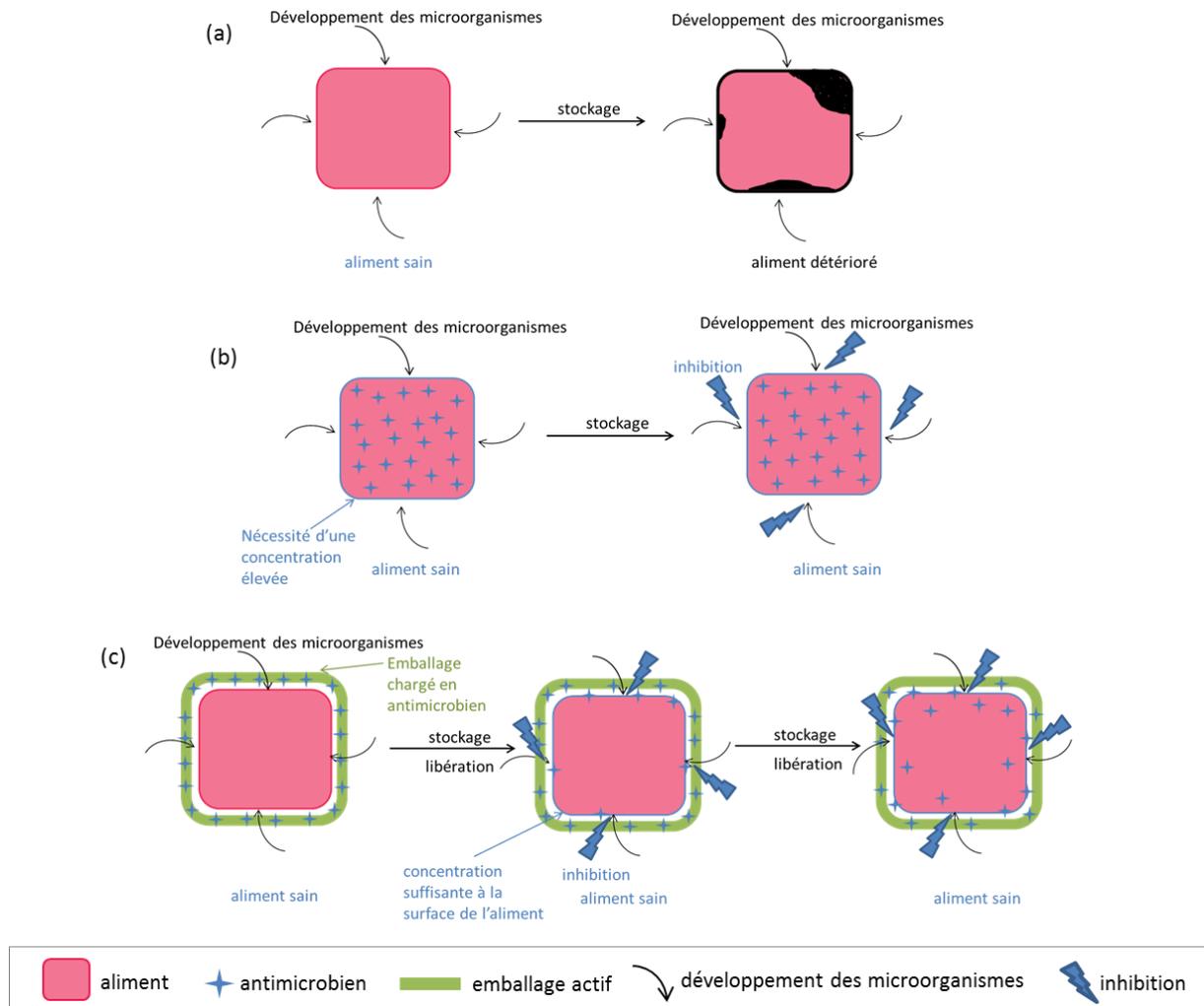


Figure I.III. 4. Comparaison : (a) aliment seul (b) incorporation des antimicrobiens dans la masse de l'aliment (c) action des emballages actifs par libération d'antimicrobiens

Pour que l'emballage puisse libérer l'agent antimicrobien, il est nécessaire que le matériau soit suffisamment perméable à celui-ci pour permettre la diffusion vers l'aliment au cours du stockage [1]. L'association aliment/emballage peut être présentée de deux façons différentes (Figure I.III. 5). *Le système emballage/aliment* correspond à un aliment solide en contact avec le matériau d'emballage, ou un aliment de faible viscosité ou liquide sans espace vide. L'agent antimicrobien peut être inclus dans l'emballage et agir sur la surface de l'aliment par diffusion. Ce phénomène peut être couplé à une action par contact direct avec l'aliment si la surface de l'emballage est fonctionnalisée (cf. paragraphe précédent). *Le système emballage/espace vide/aliment* correspond à des aliments emballés dans des emballages flexibles, bols et cartons. L'agent antimicrobien est diffusé par évaporation ou par un équilibre de la substance entre l'espace vide, l'emballage et/ou l'aliment. Une substance volatile est utilisée pour ce système, elle peut migrer à travers l'espace vide entre l'emballage et l'aliment.

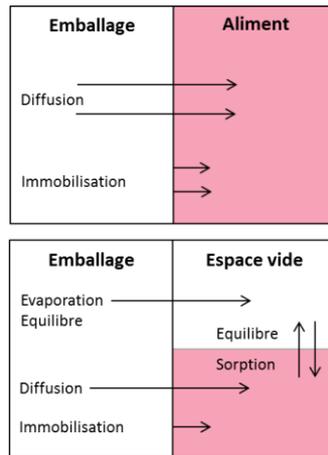


Figure I.III. 5. Représentation schématique des systèmes emballage/aliment (haut) et emballage/espace vide/aliment (bas) [67]

De nombreux systèmes à libération d'antimicrobiens sont étudiés dans la littérature. Plusieurs travaux portent sur des films à base **d'isolat de protéines sériques**. Dans ce contexte :

- Cagri et *al.* développent des films à libération **d'acide sorbique et/ou p-aminobenzoïque** pour la conservation du saucisson [68]. Les films sont réalisés par casting avec du glycérol comme plastifiant. Des tests antimicrobiens sont effectués sur des tranches de saucisson inoculées avec *L. monocytogenes*, *E. coli* et *Salmonella Typhimurium*. Les films chargés en acide sorbique ou acide p-aminobenzoïque inhibent la croissance des 3 bactéries après 21 jours à 4 °C. Notons qu'à propos des propriétés mécaniques des films, les auteurs ont observé une nette diminution de leur contrainte nominale et une augmentation de l'allongement à la rupture suite à 72 h de contact avec l'aliment.
- Deux études sur des films contenant de l'isolat de protéines sériques et **d'huiles essentielles (HE)** élaborés par casting avec du glycérol comme plastifiant ont été réalisées [69;70]. Dans les deux études, c'est l'HE d'origan qui montre la meilleure activité antibactérienne.

D'autres groupes développent des emballages à base de **protéines de soja** :

- Dawson et *al.* réalisent des films pour la libération de **nisine et/ou d'acide laurique** pour la conservation du saucisson de dinde [71]. Les films sont obtenus par thermocompression avec du glycérol comme plastifiant. Des tests antibactériens à la fois en milieu liquide (bouillon de culture) et sur la surface de saucisson de dinde inoculée avec *L. monocytogenes* sont réalisés (Figure I.III. 6). Ils ont montré que le type de test influence le résultat.

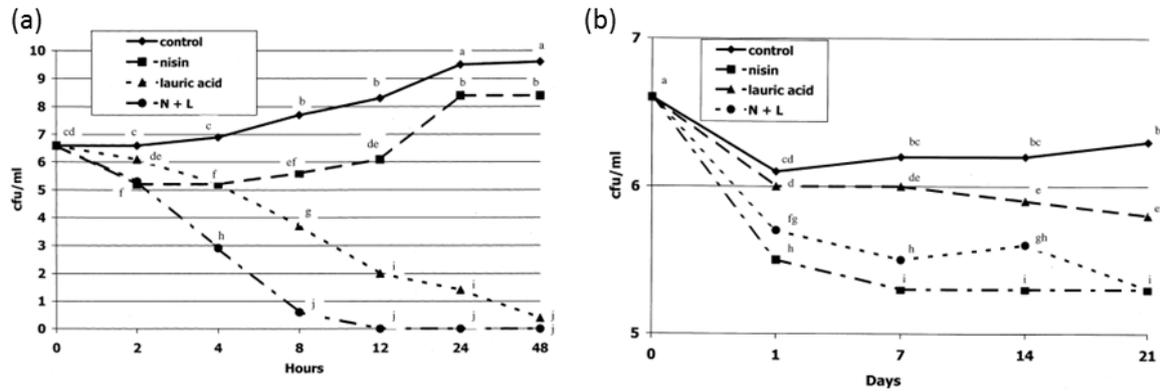


Figure I.III. 6. Comparaison de nombre de cellules de *L. monocytogenes* dans le bouillon de culture (a) et sur la surface de saucisson de dinde inoculée (b) au contact des différents films [71]

- Un autre groupe, Eswaranandam et *al.*, a élaboré des films par casting avec du glycérol ou glycérol/acide organique à base de protéine de soja pour la libération de **nisine** pour la conservation de la viande, volaille ou légumes etc. [72]. Des tests antimicrobiens sur gélose contre *E. coli*, *L. monocytogenes* et *Salmonella gaminara* ont été menés. Un remplacement partiel du glycérol par les acides permet d'obtenir des films de bonne tenue mécanique. Pour les 3 bactéries considérées, la présence d'acides organiques, en particulier le CTR, permet d'améliorer l'activité antimicrobienne.

Une autre gamme d'articles utilise des **polysaccharides** comme matériaux. Plusieurs études s'intéressent notamment à l'élaboration de films à **base de chitosane** :

- Une étude sur des films de chitosane seul, réalisés par casting, est menée par Ouattara et *al.* pour la libération d'**acide acétique** ou **propionique** et d'**acide laurique** ou de **cinnamaldéhyde** pour la conservation de viandes [73]. Des tests de libération sont effectués sur des matrices de charcuterie. Pour les 4 molécules, la libération est d'abord rapide, puis un ralentissement est observé. La croissance des bactéries *Enterobacteriaceae*, de *Serratia liquefaciens* et *Lactobacillus sakei* est différée ou complètement inhibée. La plus forte inhibition est observée pour des surfaces séchées de saucisson, sur lesquelles la libération de l'acide est plus lente, et pour des films contenant du cinnamaldéhyde. Le chitosane n'a pas d'activité sur la croissance de ces bactéries, dans ces conditions. Les films n'ont aucune activité sur les bactéries lactiques.
- Kurek et *al.*, quant à eux, observent que l'augmentation d'humidité et/ou de la température accélère la libération du carvacrol (antimicrobien extrait des huiles de thym et d'origan) dans le cadre de films de chitosane réalisés par casting (Figure I.III. 7) [74].

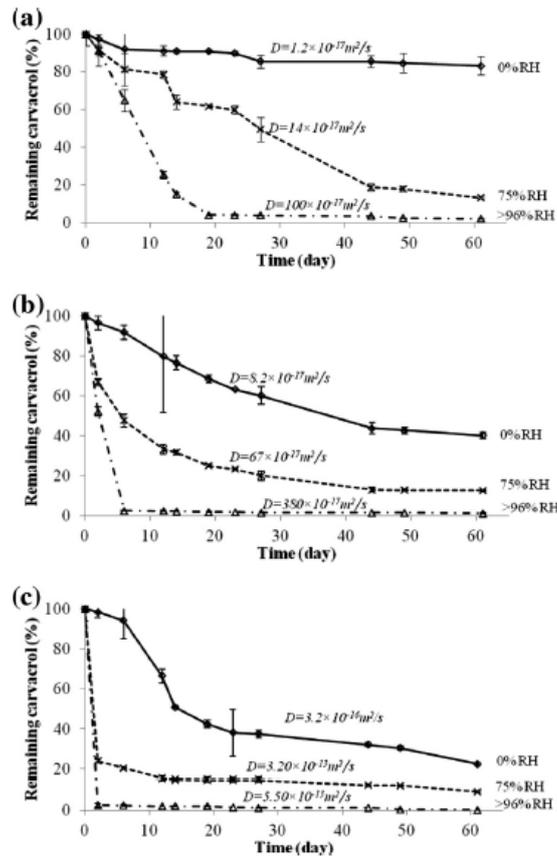


Figure I.III. 7. Cinétique de libération du carvacrol par un film à base de chitosane influencée par l'humidité relative (0, 75 et >96 % H.R) et la température (a) 4°C, (b) 20 °C et (c) 37 °C [74]

De plus dans un article antérieur, les auteurs ont montré une activité antimicrobienne de films à base de chitosane contenant du carvacrol contre *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Listeria innocua* et *Salmonella enteritidis* [75].

- Fernandez-Saiz et *al.* développent des films à base d'EVOH et chitosane pour la libération d'**acide acétique** pour la conservation d'aliment en milieu humide [76]. Les films sont réalisés par casting dans un mélange isopropanol/eau. La résistance et les propriétés barrière à l'eau du chitosane sont améliorées en le mélangeant à l'EVOH. L'effet antimicrobien de ces films EVOH/chitosane contre *S. aureus* est attribué au chitosane et à l'acide acétique et celui contre *Salmonella spp.* est attribué uniquement à l'acide acétique.
- Chen et *al.* élaborent un film à base de méthyl-cellulose et de chitosane pour la libération de **benzoate de sodium** ou de **sorbate de potassium** dans une solution eau/glycérol [77]. Les conservateurs introduits ne sont pas libérés en totalité et la quantité chute avec la diminution de la température (Tableau I.III. 3).

Tableau I.III. 3. Quantité de conservateur libéré en fonction de la température

	Quantité libérée après 30 min (%)	Maximum libéré (%)
25 °C	43 - 45	57 - 65
4 °C	38 - 39	49

Les films ont une activité antifongique. L'incorporation des conservateurs n'a pas affecté les propriétés mécaniques des films.

- Cha et *al.* développent des films à base de méthyl-cellulose (MC), d'hydroxypropylméthyl-cellulose (HPMC), de κ -carrageenan ou de chitosane pour la libération de **nisine** [78]. Les films sont réalisés soit par pressage à chaud d'un mélange des polymères naturels avec du PE ou par casting comme enduit d'un film de PE, en présence de polyéthylène glycol (PEG) comme plastifiant. Les films obtenus par casting ont montré une meilleure activité que les films pressés à chaud contre *Micrococcus luteus*. Une étude de l'impact de la composition des films sur la cinétique libération de la nisine a été menée.

Dans la littérature, nous trouvons aussi des études pour des films avec des **polymères synthétiques** :

- Par exemple, Suppakul et *al.* développent un film à base de **LDPE et d'un copolymère d'acétate de vinyle (EVAc)** obtenu par extrusion pour la libération de **linalol** ou de **methylchavicol** pour la conservation de fromages à pâte dure [79]. Des tests de libération sont réalisés dans l'isooctane qui est un simulant des aliments gras. Une perte d'agent actif durant l'extrusion est observée. A 4°C, une libération quasi-complète pour les 2 agents est observée après 30 min. L'étude antimicrobienne n'a pas été réalisée.
- Weng et *al.*, quant à eux, élaborent des films de **poly(éthylène-co-acide méthacrylique) (PEMA)** par pressage à chaud pour la libération d'**acide benzoïque et/ou acide sorbique** [80]. Les films de PEMA subissent un post-traitement par NaOH ou HCl avant d'être immergés dans une solution de conservateurs. La libération des acides benzoïque et sorbique pour les films traités par NaOH atteint un plateau au bout d'environ 10 jours et la quantité libérée est nettement supérieure à celles des deux autres films (Figure I.III. 8).

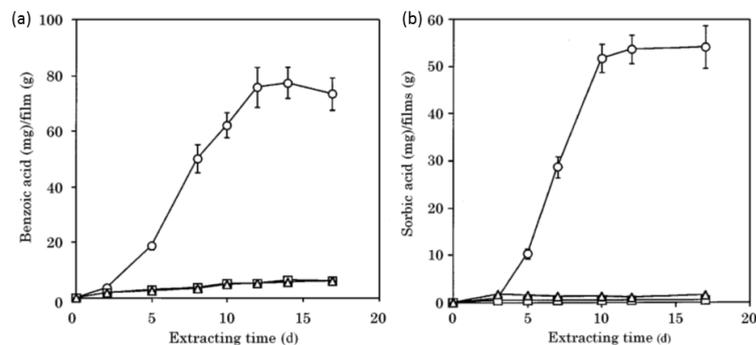


Figure I.III. 8. Cinétique de libération dans un tampon phosphate de l'acide benzoïque (a) et de l'acide sorbique (b) par les films de PEMA selon les différents traitements (○) = NaOH, (□) = HCl et (△) = contrôle [80]

En accord avec la quantité libérée, les films traités au NaOH contenant de l'acide benzoïque ou sorbique montrent la meilleure inhibition contre *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* lors de tests sur gélose.

Par ailleurs, un état de l'art sur l'incorporation d'HE ou de leurs molécules actives, comme agents antimicrobiens, dans des matrices thermoplastiques (LDPE, HDPE, chitosane, PP, EVOH, zéine etc.) est réalisé par Sadaka et *al.* [81]. Les auteurs s'intéressent à la migration globale et spécifique des différents constituants des emballages dans les simulants alimentaires présentés précédemment (page 25). L'étude conclue que les systèmes emballage/HE ont une activité antimicrobienne notable et permettent une augmentation de la durée de conservation des aliments.

Ces différentes études confirment qu'il est possible de réaliser des emballages libérant de façon prolongée un ou plusieurs agents antimicrobiens. L'activité antimicrobienne a été confirmée sur des matrices alimentaires pour certaines études. Ces différents travaux mènent à la conclusion que de nombreux facteurs influencent la libération et l'activité antimicrobienne (type de polymère, mise en œuvre, interactions polymères et molécules actives, type de milieu de libération, conditions de stockage, type de micro-organismes visés etc.). Le film à libération prolongée est un système complexe qui nécessite un compromis entre les propriétés de libération, propriétés antimicrobiennes et propriétés mécaniques. De nombreux polymères ont été utilisés pour ces travaux. On peut noter que la mise en œuvre la plus utilisée est le casting, qu'un plastifiant est souvent introduit dans la formulation et qu'il s'agit majoritairement du glycérol. Eswaranandam et *al.* proposent notamment de remplacer partiellement le glycérol par des acides organiques, en particulier le CTR, qui ont l'avantage d'être antimicrobiens [72]. Dans la plupart des travaux ci-dessus, le conservateur est introduit dans la solution de casting ou au mélange pour le pressage à chaud. Seule une étude introduit le conservateur par absorption par le film [80].

Dans la littérature le PVOH a également été un polymère envisagé pour des films antimicrobiens par libération prolongée. Nous avons choisi de développer l'état de l'art sur les films de PVOH antimicrobiens dans le Chapitre IV.

Chapitre II :
Le poly(alcool vinylique)

Ce chapitre est consacré au polymère sélectionné pour notre étude comme matrice du film d'emballage antimicrobien, le poly(alcool vinylique) (PVOH). Tout d'abord les caractéristiques du PVOH (synthèse, structure et propriétés physiques, biodégradabilité et toxicité) seront abordées. Ensuite, nous nous intéresserons aux solutions et aux films de PVOH. Un recensement des applications du PVOH seul ou sous forme de mélange avec des polymères naturels sera présenté. Pour finir, un état de l'art des méthodes de réticulation du PVOH sera proposé.

I. CARACTERISTIQUES DU PVOH

I. 1 Synthèse du PVOH [82]

Le poly(alcool vinylique) PVOH est utilisé depuis environ 1930 pour différentes applications industrielles, médicales et alimentaires [83]. Le PVOH est un polymère synthétique. Sa première préparation par Herrmann et Haehnel date de 1924. Le PVOH ne peut pas être élaboré à partir de l'alcool vinylique (VOH) qui est instable. Il se réarrange immédiatement en acétaldéhyde tautomérique (ratio tautomérique $\text{CH}_2=\text{CHOH} : \text{CH}_3\text{CHO}$ 1 :30000). En revanche, l'acétate de vinyle (VAc) $\text{CH}_2=\text{CHOAc}$ est parfaitement isolable et polymérisable par voie radicalaire. Le PVOH est donc obtenu par l'hydrolyse, plus ou moins complète, du poly(acétate de vinyle) (PVAc) (Figure II.I. 1).

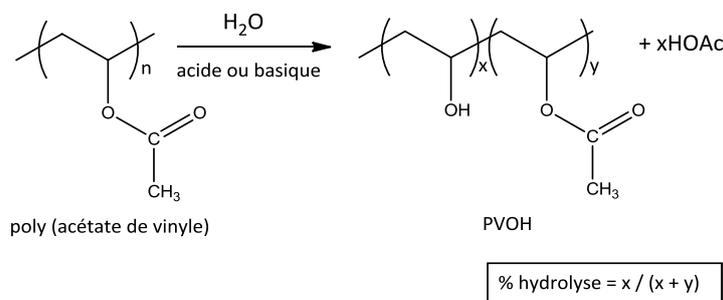
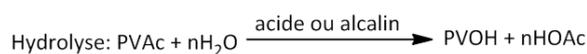
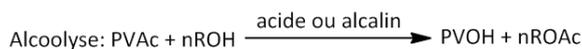


Figure II.I. 1. Schéma général de l'hydrolyse du PVAc

Différentes voies sont possibles pour l'hydrolyse du PVAc :



Parmi ces méthodes, la procédure de fabrication industrielle du PVOH est obtenue par alcoolyse alcaline où l'alcool est le méthanol (MeOH). Cette voie n'est pas stéréospécifique, le PVOH obtenu est alors atactique.

En général, il est difficile de contrôler la distribution du degré d'hydrolyse dans la gamme désirée. Noro a montré que le PVOH, obtenu par alcoolyse en présence d'acétate de méthyle, a une large distribution de DH (Figure II.I. 2) [84].

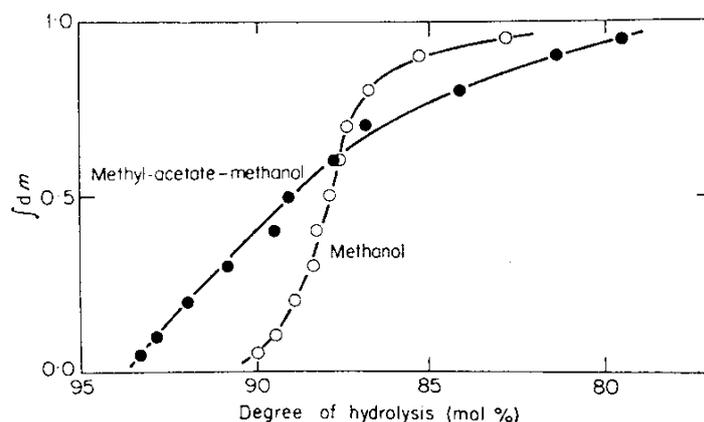


Figure II.I. 2. Distribution du D.H. du PVOH hydrolysé dans le méthanol et dans un mélange d'acétate de méthyl/méthanol (75 % d'acétate de vinyle) [84]

I.2 Structure semi-cristalline du PVOH [82]

Le degré d'hydrolyse (DH), la masse molaire, les liaisons hydrogène entre les groupements OH et la structure du PVOH influencent les propriétés physiques du PVOH [83].

Bien que le PVOH obtenu à partir d'acétate de vinyle soit atactique, il reste cristallisable et fait donc partie des polymères semi-cristallins. On note un degré de cristallinité (χ_c) d'environ 50 %. Cette cristallinité pour un PVOH atactique peut être attribuée au fait que les atomes d'hydrogène et les groupes -OH n'ont pas une taille suffisamment différente pour gêner l'assemblage régulier des chaînes. De plus, les liaisons hydrogène entre les groupes -OH de chaînes voisines ont tendance à maintenir une structure régulière malgré l'absence de stéréorégularité. La phase cristalline stable est de type monoclinique dont une représentation est donnée sur la Figure II.I. 3 [85;86].

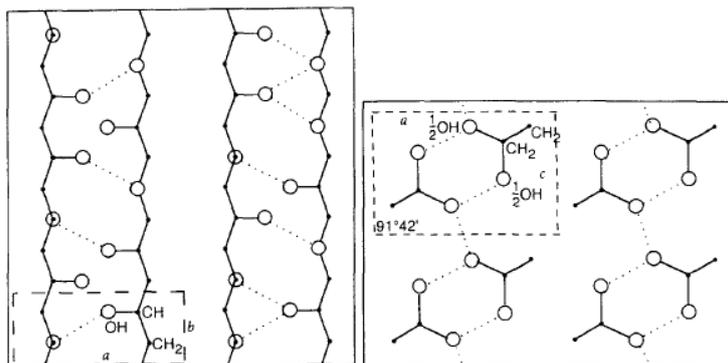


Figure II.1. 3. Modèle de cristal du PVOH atactique proposé par Bunn [86]

Il n'y a pas de différence de structure cristalline entre un PVOH fortement syndiotactique et un PVOH atactique. Dans les conditions normales de pression, la température de cristallisation est située aux alentours de 100 – 180°C. En fonction de la tacticité, la cristallisation est favorisée dans cet ordre : syndiotactique, atactique, isotactique. La cristallinité diminue avec le DH. En effet, Wang et *al.* ont déterminé par RX une cristallinité de 38 % pour un PVOH de DH = 87-88% alors qu'il est de 50 % pour un PVOH 99 % [87].

La température de fusion (T_f), quant à elle, varie avec la quantité et la distribution de motifs acétate de vinyle et la stéréorégularité. La T_f diminue avec la diminution du DH. Dans le cas de PVOH atactique, la T_f passe de 230 – 250 °C à 180 - 190 °C pour un PVOH totalement hydrolysé et partiellement hydrolysé, respectivement [88]. La T_f du PVOH diminue fortement avec l'augmentation de VAc distribués aléatoirement. Pour les hauts DH, T_f dépend aussi de la tacticité du polymère : Syndiotactique (230 – 267°C) > atactique (228 – 249°C) > isotactique (212 – 235°C).

Concernant la phase amorphe du PVOH, elle est caractérisée par une transition vitreuse (T_g), comprise entre 70 et 80°C pour le PVOH sec. Celle-ci est fortement influencée par l'humidité (T_g entre 30 et 40 °C pour 50 %H.R. [89]). La tacticité du polymère et le degré de polymérisation (DP) ont, quant à eux, une faible influence sur la T_g . En revanche, l'introduction d'unités comonomères dans le PVOH fait chuter la T_g : PVOH 99% hydrolysé (70 – 80 °C) > PVOH 88% hydrolysé (58 °C) > PVAc (28 -31 °C) [90;91].

I.3 Biodégradabilité et toxicité du PVOH

La plupart des microorganismes identifiés pour la dégradation du PVOH sont des bactéries aérobies appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Bacillus* [92]. La biodégradation du PVOH se fait en présence d'enzymes spécifiques de type oxydase et déshydrogénase produites par ces bactéries [92]. La dégradation du PVOH ne semble pas être

affectée par les caractéristiques structurales du polymère, comme le DP ou le DH, tant que ce dernier est compris entre 80 et 100%. Cependant, une influence positive du caractère hydrophobe (contenu en groupe acétate) sur l'activité de l'enzyme PVOH-déshydrogénase spécifique est constatée. L'activité des autres enzymes clivant les chaînes de PVOH, comme le PVOH-oxydase, montre aussi une dépendance de la microstructure macromoléculaire. L'effet de la tacticité du PVOH sur sa biodégradation est attribué à la sensibilité de l'enzyme PVOH-oxydase aux contraintes stéréochimiques, ce qui est courant lors de réaction enzymatique. Une esterase endocellulaire spécifique capable d'hydrolyser les groupes acétates résiduels apparaît dans le dernier métabolisme microbien des échantillons de PVOH partiellement hydrolysé.

Peu d'études s'intéressent à la dégradation fongique du PVOH, les principales reportent l'activité d'espèces ligninolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium* [92]. Les enzymes produites par ces espèces sont la lignine peroxydase, le manganèse peroxydase et la laccase.

L'activité des enzymes spécifiques de la dégradation du PVOH est en général affectée lorsque le PVOH est mélangé à un autre polymère, tels que les polysaccharides [92].

L'administration orale du PVOH est quasi-inoffensive. A titre indicatif, sa toxicité aiguë par voie orale est très faible avec une dose létale médiane (DL_{50}) de l'ordre de 15-20 g/kg. La toxicité augmente avec l'augmentation de motifs acétate de vinyle et de la masse molaire. Selon une étude de l'EFSA, l'administration orale du PVOH est sûre et adaptée à l'usage prévu comme agent enrobant pour complément alimentaire et pour comprimés ou capsules pharmaceutiques [83;93]. La FDA (Food and Drug Administration) autorise le PVOH pour des utilisations comme additif alimentaire indirect dans les produits qui sont en contact avec l'aliment.

I.4 Solubilité/Comportement en solution du PVOH

L'eau est le meilleur solvant du PVOH. Il est toutefois également soluble dans le phénol, le DMSO et le 1,3-butanediol mais nous nous intéresserons ici uniquement à l'eau. La solubilité du PVOH dépend de son DP, mais surtout de son DH. De façon générale, une agitation mécanique et un traitement thermique sont nécessaires pour le solubiliser.

Quel que soit son DH, le PVOH est introduit lentement dans l'eau à température ambiante (15 – 25 °C) sous agitation pour limiter la formation d'agglomérats. Ensuite, la température est augmentée jusqu'à 95 – 98 °C en fonction du DH. Cependant, des PVOH avec un faible DP seront dissous à plus basse température [82]. Dans la littérature, des méthodes de solubilisation par autoclave sont également mentionnées [54;58;94].

Le PVOH a une forte affinité avec l'eau qui est due à la présence de nombreux groupes hydroxyles. Toutefois, une densité trop importante de liaisons hydrogène entre les OH intra- et intermoléculaires peuvent gêner sa solubilité. Ainsi les résidus acétate de vinyle, hydrophobes, permettent de diminuer la densité de liaisons hydrogène et, par voie de conséquence, augmentent la solubilité du PVOH. Par exemple, il faut chauffer jusqu'à 80 °C pour dissoudre un PVOH totalement hydrolysé alors qu'à partir de 3 - 4 % d'acétate de vinyle, il est soluble entre 40 °C et 60 °C. Une étude plus approfondie sur la solubilité dans l'eau de différents PVOH est illustrée sur la Figure II.I. 4.

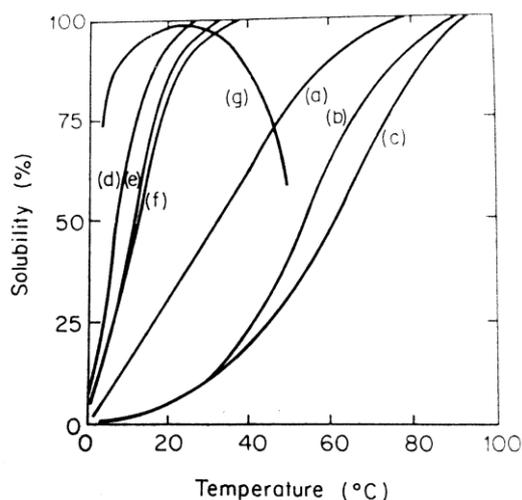


Figure II.I. 4. Solubilité dans l'eau de différents PVOH en fonction de la température [82]

DH = 98-99: (a) DP = 500-600, (b) DP = 1700-1800, (c) DP = 2400-2500

DH = 87-89: (d) DP = 500-600, (e) DP = 1700-1800, (f) DP = 2400-2500

DH = 78-81: (g) DP = 2000-2100

Pour les DH élevés, plus la température augmente, plus la solubilité augmente. A 80 °C, les PVOH avec un DH élevé sont tous solubilisés. La Figure II.I. 4 met en évidence une augmentation de la température de solubilité avec le DP, particulièrement pour les DH élevés. **Avec la diminution de DH**, un phénomène de séparation de phase a lieu. En effet, les PVOH avec un DH compris entre 70 et 90 % sont caractérisés par une température de solubilité critique minimale (ou Lower Critical Solution Temperature (LCST)) qui conduit à un trouble de la solution de polymère lors du chauffage [95;96]. A ce point, une séparation de phases a lieu avec une phase riche en polymère et une autre riche en eau. Cette précipitation est causée par la rupture des liaisons hydrogène PVOH-eau au profit de celles inter- et intra-PVOH [97]. La Figure II.I. 4(g) met en évidence ce phénomène vers 25 °C pour un PVOH de DH = 78 - 81 % et de DP = 2000 - 2100.

Le PVOH partiellement hydrolysé disponible dans le commerce est généralement hydrolysé à 88 % car c'est un bon compromis entre la solubilité en eau froide et la stabilité en solution aux températures élevées.

De façon générale, le comportement en solution des polymères dépend aussi de la concentration et peut être mis en évidence par une étude de la viscosité. L'étude de la viscosité, dans l'eau, du PVOH **totalemment hydrolysé** révèle deux points critiques aux concentrations de 2-4 % et 10-12 % [82]:

- Solution diluée (concentration inférieure à 2-4%) : molécules individuelles dispersées dans l'eau sous forme de pelote statistique contenant beaucoup d'eau. Il n'y a aucun enchevêtrement.
- Solution semi-diluée (concentration entre 2-4% et 10-12%) : interactions (enchevêtrements) entre les pelotes. Quand la concentration augmente, les enchevêtrements augmentent.
- Solution concentrée (concentration supérieure à 10-12 %) : La structure du réseau, en raison des enchevêtrements, est similaire à celle du polymère à l'état fondu.

Les PVOH partiellement hydrolysés peuvent par ailleurs se comporter comme des tensioactifs de part leur propriété amphiphile liée aux caractères hydrophobe et hydrophile différents pour VAc et VOH. Cette propriété est accentuée en cas de répartition des motifs en bloc [82].

1.5 Elaboration et propriétés des films de PVOH

Le comportement du PVOH en solution ayant été abordé, nous allons nous intéresser aux aspects particuliers liés à son élaboration en tant que film. Pour cela, tout d'abord les méthodes de mise en œuvre des films seront présentées et ensuite leurs propriétés mécaniques et de perméabilité seront discutées.

A l'échelle industrielle, il existe deux méthodes de préparation de films de PVOH [82] :

- **La méthode dite de « casting »** : Une solution plus ou moins diluée de PVOH est réalisée. Le solvant est ensuite évaporé. Cette méthode convient à la production d'une gamme de films en petite quantité. Les films ont une faible orientation, peu de résistance à l'eau et ils ne peuvent pas être utilisés sans un traitement additionnel. Un traitement thermique entraîne une augmentation de la cristallinité qui confère aux films la résistance à l'eau et prévient les défauts de planéité (« curl ») qui sont causés par une cristallisation irrégulière de chaque côté du film durant le séchage.
- **La méthode par extrusion** : Le PVOH sous forme de granules est complètement dissous sous forme d'une solution aqueuse très concentrée sans bulle qui est extrudée.

A l'échelle du laboratoire, les films sont réalisés par des méthodes similaires : micro-extrusion ou casting [98;99]. Le casting se fait par le dépôt d'une solution dans un moule. Un exemple de micro-extrusion est l'étude de Fishman et *al.* qui extrudent le PVOH mélangé à des polysaccharides et un plastifiant [87].

On trouve aussi ponctuellement des méthodes par électrospinning, telles que des membranes non tissées en PVOH [100].

Concernant les propriétés mécaniques résultantes, les facteurs les influençant sont le taux d'humidité, le DH et le DP. De manière générale, à température ambiante, les films de PVOH sont généralement rigides et fragiles à l'état sec mais souples et résistants en présence d'humidité. On observe différents comportements en fonction des caractéristiques des PVOH que l'on peut simplifier en juxtaposant les contraintes au seuil et allongements à la rupture (Tableau II.I. 1) :

Tableau II.I. 1. Contrainte au seuil et allongement à la rupture par traction uniaxiale de PVOH en fonction du DH et de la masse molaire à 25 °C et 50 % H.R. [101]

Masse molaire (g/mol)	% hydrolysé	Contrainte au seuil (MPa)	Allongement à la rupture (%)
22000 - 27000	98 - 99	13	283
75000 - 80000		20	410
112000 - 120000		25	445
27000 - 32000	86-89	7	176
84000 - 89000		12	375
124000 - 130000		15	359

- La contrainte au seuil et l'allongement à la rupture augmentent globalement avec la masse molaire. Ce phénomène peut être attribué à une augmentation du nombre d'enchevêtrements avec la masse molaire.
- La contrainte au seuil des PVOH partiellement hydrolysés est inférieure à celle des PVOH complètement hydrolysés. Ce phénomène peut être attribué à une diminution de la cristallinité et de la Tg avec l'augmentation des motifs acétate.
- L'allongement à la rupture des PVOH partiellement hydrolysés est inférieur à ceux des PVOH complètement hydrolysés, probablement lié à une diminution de la cristallinité.

Un traitement thermique de post-cristallisation permet d'améliorer les propriétés mécaniques des films, dans une certaine mesure [82]. En effet, suite au traitement thermique à une température ne dépassant pas 140 °C, une augmentation de la contrainte au seuil et de l'allongement à la rupture est observée, liée à une augmentation de la cristallinité. En revanche, s'il est réalisé à une température supérieure à 160°C, il entraîne une diminution de l'allongement à la rupture, liée à l'apparition de défauts dans le film suite au chauffage à une température trop élevée.

Avec l'augmentation de l'humidité, la contrainte au seuil diminue. En effet à température ambiante, un PVOH (99 % hydrolysé, ~77000 g/mol) présente à 75 %H.R., une contrainte au seuil de 14 MPa alors qu'à 50 %H.R., la contrainte au seuil d'un PVOH de masse molaire similaire est de 20 MPa [102]. Le même phénomène est observé pour un PVOH partiellement hydrolysé (Figure II.I. 5).

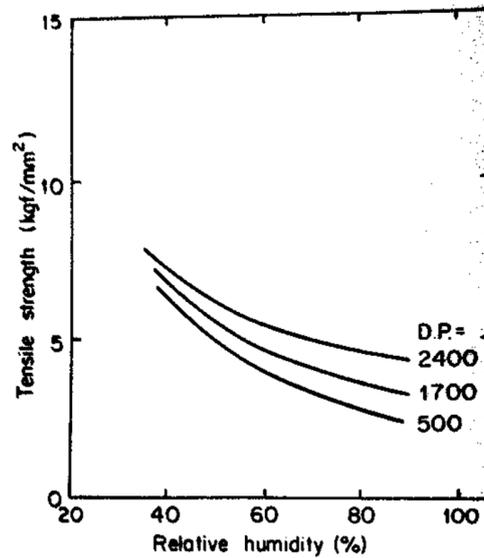


Figure II.I. 5. Contrainte au seuil en fonction de l'humidité pour des films de PVOH 88 % hydrolysés [82]

La Figure II.I. 6 rapporte le spectre viscoélastique dynamique du PVOH obtenu par Garrett et *al.*. Ce spectre met en évidence trois relaxations : α , β et γ .

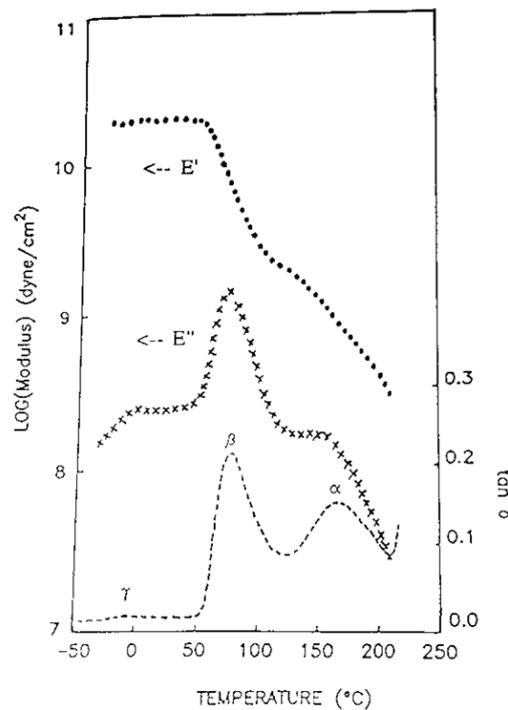


Figure II.I. 6. Spectre viscoélastique dynamique du PVOH (DH non précisé) [103]

La relaxation α , située entre 120 et 160 °C, correspond à des mobilités moléculaires dans le cristal. La relaxation β au voisinage de 60 – 85 °C est associée à des mouvements micro-browniens de segments des chaînes principales de la phase amorphe. La chute importante de E' observée sur le graphique montre que cette transition induit des mouvements coopératifs le long des chaînes amorphes. Il est à souligner que la température de cette transition chute en présence d'eau : les molécules d'eau permettent la rupture des ponts hydrogène et l'atténuation des interactions inter-chaîne, ce qui contribue à favoriser la mobilité moléculaire des chaînes amorphes. La relaxation γ , aux environs de -20 – 0 °C, est attribuée à des mobilités locales dans la phase amorphe. En présence d'eau, elle se déplace vers les basses températures et son amplitude augmente.

Concernant la perméabilité des matériaux, elle résulte du produit des coefficients de diffusion et de solubilité ($P = D \times S$). Le coefficient de diffusion (D) diminue lorsque la tortuosité augmente. Par ailleurs, le coefficient de solubilité (S) diminue lorsque le nombre et/ou la taille des volumes exclus aux gaz augmentent. Ces deux paramètres vont être fortement dépendant de la morphologie cristalline. Notons que, dans le cas d'un PVOH réticulé, le coefficient de solubilité dépend aussi du taux de réticulation, des interactions hydrogène et de la mobilité moléculaire.

Les films de PVOH ont une des plus faibles perméabilités au CO_2 ($0,01 \cdot 10^{-11} \text{ mL.cm/cm}^2\text{s.cmHg}$ cf. Tableau II.I. 2) et la plus faible perméabilité à l'oxygène ($6,24 \cdot 10^{-17} \text{ mL.cm/cm}^2\text{s.cmHg}$ cf. Tableau II.I. 3) parmi les polymères conventionnels.

Tableau II.I. 2. Coefficient de perméabilité au CO_2 pour différents films polymères [82]

Film polymère	Coefficient de perméabilité CO_2 ($\text{mL.cm/cm}^2\text{s.cmHg}$)
PVOH	$0,01 \cdot 10^{-11}$
PVC	$2 \cdot 10^{-11}$
Caoutchouc naturel	$1030 \cdot 10^{-11}$
HDPE	$20 \cdot 10^{-11}$
LDPE	$120 \cdot 10^{-11}$
PET	$1,6 \cdot 10^{-11}$

Tableau II.I. 3. Coefficient de perméabilité à O_2 pour différents films polymères [82]

Film polymère	Coefficient de perméabilité O_2 ($\text{mL.cm/cm}^2\text{s.cmHg}$)
PVOH	$6,24 \cdot 10^{-17}$
Cellulose	$8,94 \cdot 10^{-14}$
Nylon 6	$6,17 \cdot 10^{-13}$
HDPE	$6,13 \cdot 10^{-11}$
PP	$1,37 \cdot 10^{-10}$
LDPE	$3,07 \cdot 10^{-10}$

Ito et *al.* ont mesuré l'influence du %H.R. sur la perméabilité du PVOH et ont montré que la perméabilité à CO₂ et N₂ augmente de façon exponentielle à partir de 50 %H.R. (Figure II.I. 7) [104;105].

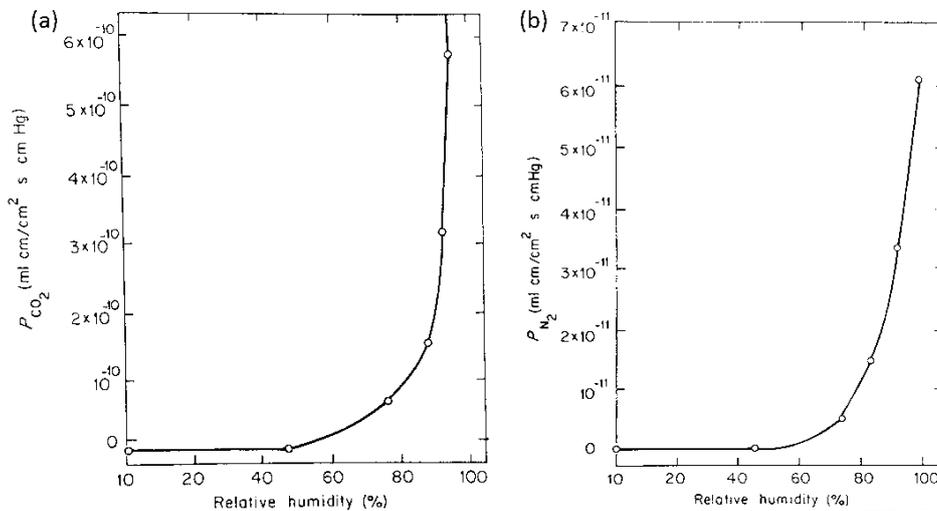


Figure II.I. 7. Coefficients de perméabilité du PVOH (DH et DP non précisé) à CO₂ (a) et à N₂ (b) en fonction de l'humidité à 15 °C [104;105]

Toyoshima et Ogino, quant à eux, observent que pour des films de PVOH (DH = 99,9 % et DP = 1750) à faible humidité, la perméabilité à O₂ augmente avec l'augmentation de la température [82]. Cependant, la valeur est proche de 10^{-14} mL.cm/cm².s.cmHg (valeur proche de la perméabilité de la cellulose qui est peu perméable à O₂). Au-delà d'une certaine humidité, les auteurs font le même constat qu'Ito et *al.* pour le CO₂ et le N₂, soit une large augmentation de la perméabilité à O₂. Ces tendances peuvent être reliées à la structure du PVOH. En effet, l'eau absorbée dans le PVOH est liée aux groupes OH de la phase non cristalline et la quantité de cette eau liée augmente avec l'augmentation de l'humidité relative (H.R.). A haute humidité, l'eau en excès n'est plus directement liée aux chaînes. Il y a alors moins d'interactions entre les chaînes, soit une plastification du film (diminution de la T_g). Or, au-dessus de T_g, les chaînes ayant plus de mobilité, les molécules de gaz traversent le film plus facilement donc la perméabilité augmente. A l'inverse, en dessous de T_g, les chaînes ont peu de mobilité donc la perméabilité est faible.

Dans le cas de **PVOH partiellement hydrolysés**, les coefficients de perméabilité augmentent lorsque le DH diminue. La Figure II.I. 8 illustre ce phénomène pour la perméabilité à l'oxygène.

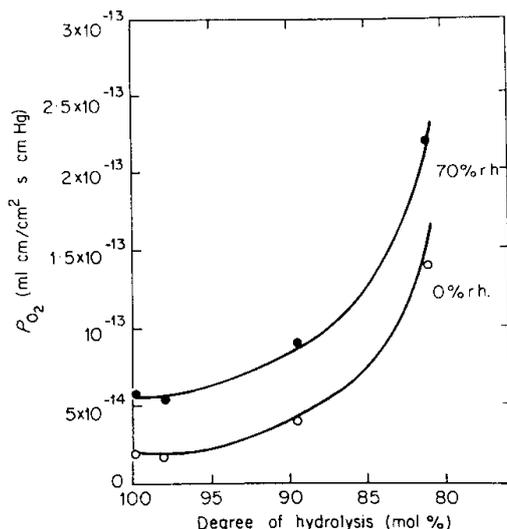


Figure II.I. 8. Coefficient de perméabilité à l’oxygène en fonction du DH du PVOH [82]

Concernant la perméabilité à la vapeur d’eau, le PVOH se distingue des autres polymères par sa forte sensibilité à l’eau, comme l’illustre le Tableau II.I. 4.

Tableau II.I. 4. Coefficient de perméabilité à la vapeur d’eau pour différents films polymères

Film polymère	Coefficient de perméabilité à la vapeur d’eau (g.0,1mm/10h.m ² .cmHg)
PVOH	270
Cellulose acétate	200
PVAc	50
Cellulose nitrate	35
PE	0,4

I.6. Applications du PVOH

Les différentes possibilités de mise en forme du PVOH ainsi que ses caractéristiques physicochimiques permettent un large panel d’applications (film, hydrogel, fibre, enduit ou émulsifiant).

Les forces des liaisons que peut engager le PVOH avec différents supports lui confèrent de bonnes propriétés d’adhésion. Le PVOH partiellement hydrolysé peut être utilisé comme **adhésif ou colle**. Il a une adhésion très forte sur les matériaux celluloses, utilisés pour les sacs en papier, les cartons [82]. Zia et *al.* ont observé qu’un enduit de PVOH sur des surfaces de tissus en coton ou en mélange coton/polyester permet d’améliorer la rigidité et la résistance au boulochage des fibres et apporte une résistance au lavage [106;107].

Par ailleurs, l’hydrophilie, les propriétés filmogènes et de perméabilité du PVOH en font un bon candidat pour des **membranes de pervaporation**. Par exemple, des membranes de

PVOH réticulées par l'acide malique ont été décrites pour la séparation d'un mélange eau/acide acétique [108].

De part sa richesse en groupements OH et sa forte hygroscopie, le PVOH est faiblement électrostatique, ce qui est une propriété utile pour les **films protecteur de téléviseur** [82].

Sa biocompatibilité permet des applications dans le **domaine médical et pharmaceutique**, sous forme d'hydrogels ou de micelles. Un exemple est l'utilisation d'un hydrogel de PVOH réticulé par l'acide maléique comme système de libération de médicaments ciblée pour le colon [109].

Enfin, les caractéristiques du PVOH sont très intéressantes pour **l'emballage**. Son hygroscopie évite la formation de rosée sur la surface interne de l'emballage et il a d'excellentes propriétés pour préserver les arômes. De plus sa faible perméabilité à l'O₂ et au CO₂ est un atout pour l'amélioration de la durée de conservation des aliments. Il est donc approprié pour **l'emballage alimentaire**. Néanmoins, en présence d'humidité, ces propriétés barrière sont diminuées. Afin de surpasser ce problème, deux voies sont classiquement rencontrées : l'utilisation de nanocharges et les systèmes multicouches.

La première voie consiste à **dispenser des nanocharges** de type montmorillonite/graphène pour améliorer l'imperméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz en augmentant le chemin de diffusion. Un exemple, développé par Huang et *al.*, est un film PVOH nanocomposites à base de nanofeuilles d'oxyde de graphène améliorant les propriétés barrière du film grâce à leur imperméabilité, leur forte orientation et les fortes interactions entre elles et le PVOH. (Figure II.I. 9) [110].

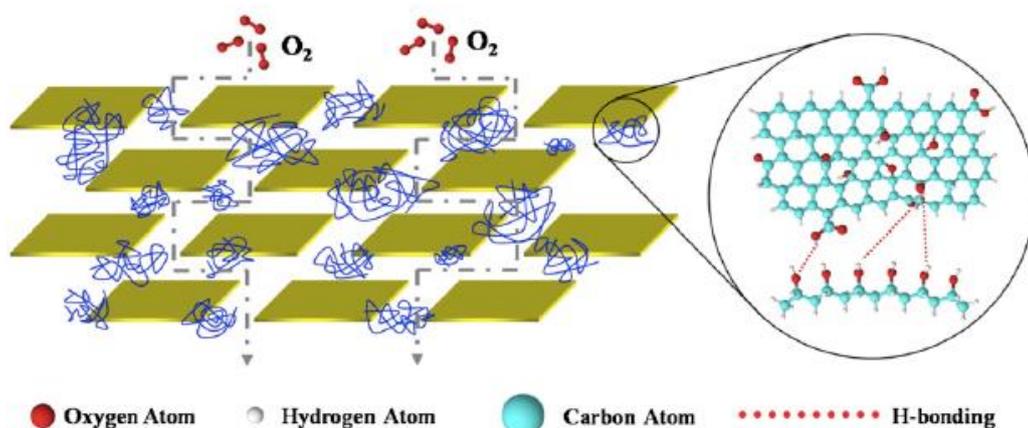


Figure II.I. 9. Représentation schématique de la pénétration d'O₂ à travers un film PVOH nanocomposite à base de nanofeuilles d'oxyde de graphène pour obtenir un emballage hautement barrière [110]

La deuxième voie est l'utilisation de **multicouches** dans lesquelles le PVOH est inséré entre des couches de polymères plus résistants à l'eau. Diverses applications d'emballages multicouches sont rencontrées dans la littérature [111-114]. Dans ces systèmes multicouches, le PVOH n'est pas en contact direct avec l'aliment, il est utilisé comme couche barrière aux gaz. La Figure II.I. 10 présente un exemple d'emballage multicouches contenant du PVOH [111].

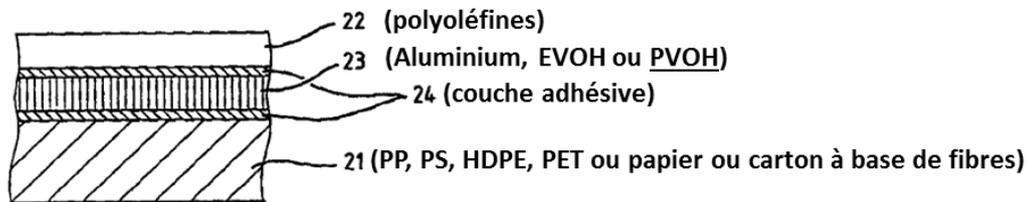


Figure II.I. 10. Représentation schématique d'un emballage multicouches contenant du PVOH [111]

Cet emballage est réalisé dans le but d'avoir d'excellentes propriétés de décollement vis-à-vis des produits alimentaires solides ou semi-solides, tels que les différents types de fromages.

Notons qu'il existe quelques cas particuliers où le PVOH est en **contact avec l'aliment**. Nous pouvons citer l'exemple faisant l'objet du brevet WO/1997/036799 qui concerne un film mono- ou multicouche avec une couche à base de PVOH réticulé en contact avec l'aliment afin de transférer un agent modifiant dans la denrée (arôme, antioxydant, agent antimicrobien etc.) [34]. Un autre exemple concerne son utilisation comme absorbeur d'humidité. Dans ce cas, le film de PVOH est utilisé comme feuille externe dans un système multicouche (feuilles « Pichit » de la Showa Denco. (Japon) [1]).

II. PVOH ET POLYMERES NATURELS : MELANGES ET APPLICATIONS

Dans la littérature, on rencontre souvent le PVOH combiné avec un autre polymère, la plupart du temps soluble dans l'eau. Les polymères naturels en font partie car ils sont souvent non-toxiques, biocompatibles et biodégradables.

II.1 PVOH et Chitosane

Le **chitosane** (Figure II.II. 1) est souvent utilisé pour son activité antimicrobienne dans les domaines alimentaire et médical, et pour ses charges cationiques qui permettent de libérer ou de capter des molécules. Beaucoup d'études **le combinent au PVOH** dans le but de coupler les propriétés antimicrobiennes du chitosane aux propriétés filmogènes et de ductilité du PVOH.

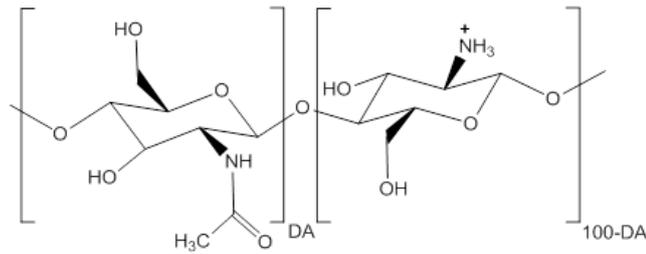


Figure II.II. 1. Structure chimique du chitosane (DA = degré d'acétylation)

Différents auteurs ont réalisé des films PVOH/chitosane par casting. Mucha et *al.* montrent une bonne compatibilité entre le chitosane et le PVOH résultant de la présence de liaisons hydrogène entre les groupements spécifiques (NH₂ et OH) du chitosane et du PVOH [115]. Park et *al.* développent des films par la méthode de casting par mélange de chitosane et de PVOH (74800-79200 – 99%) dans différents solvants (acide acétique, acide citrique, acide malique et acide lactique) afin de mesurer les propriétés barrière et mécaniques des films dans l'optique d'une **utilisation en alimentaire** [116].

Ce mélange est très utilisé pour le **domaine biomédical**. Dans la conception de membrane PVOH/chitosane par casting, développée par Zhuang et *al.*, le PVOH est utilisé pour surmonter les inconvénients du chitosane, que sont la rigidité et la surface hydrophobe, pour une application en technologie de la régénération tissulaire guidée (GTR) [117]. Zu et *al.* développent un hydrogel pour l'administration transdermique de médicament comme l'insuline et Costa-Junior et *al.* un hydrogel comme système de libération de médicament ou pour une application en ingénierie tissulaire [118;119]. Rodrigues et *al.* utilisent le PVOH pour améliorer les propriétés filmogènes et de gonflement du chitosane dans un système PVOH/chitosane réticulé par le GA pour la réalisation d'hydrogels électrolytes pour la libération de médicaments [120]. Enfin, des nanofibres de PVOH/chitosane chargées en nanoparticules d'argent sont réalisées par Abdelgawad et *al.* pour la réalisation de pansements avec activité antimicrobienne [121].

Par ailleurs, le mélange PVOH/chitosane est également rencontré dans **d'autres domaines** comme l'élaboration d'adsorbants pour la dépollution sous forme de billes ou de film possédant des fonctions OH et NH₂ [122;123]. Dans ces systèmes, le PVOH améliore la ductilité du chitosane. Il est aussi un bon candidat pour développer des membranes électrolytes pour une application comme pile à combustible [124].

II.2 PVOH et Amidon

L'**amidon** (Figure II.II. 2) est un polysaccharide de faible coût, abondant, renouvelable et biodégradable. L'amidon est couramment **ajouté au PVOH** afin de diminuer le coût et d'améliorer la biodégradabilité du PVOH [125].

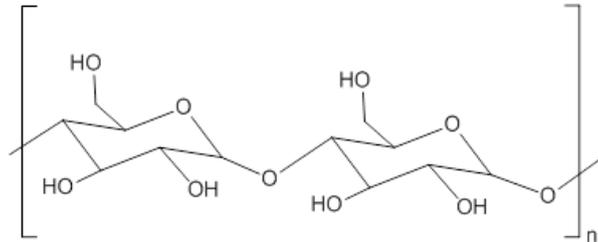


Figure II.II. 2. Enchaînement glucosidique de l'amidon

Le mélange PVOH/amidon est notamment approprié pour l'emballage biodégradable car il peut être complètement consommé par les microorganismes sans libérer de polluants nocifs dans l'environnement [126]. Il est également rencontré pour des applications biomédicales ou pour la perméation de solvants organiques [127;128]. Dans ces deux études, le PVOH est ajouté à l'amidon afin d'améliorer certaines propriétés mécaniques (ductilité, résistance à la traction).

De nombreuses études sur des films **PVOH (DH =99%)/amidon** préparés par casting ont montré une bonne compatibilité entre les deux polymères. Dans le cadre d'une étude sur le développement d'un support en ingénierie tissulaire, Sin et *al.* observent un mélange compatible et stable attribué à la formation de liaisons hydrogène entre les OH de l'amidon et du PVOH [129].

Concernant le procédé d'élaboration, une majorité d'articles portent sur des films réalisés par casting. Des plastifiants sont souvent ajoutés au mélange. Rahman et *al.* montrent que le glycérol plastifie le mélange et permet une meilleure résistance thermique [126]. Ils choisissent notamment le PVOH pour améliorer la résistance à la traction de l'amidon. Une autre étude, menée par Yoon et *al.*, montre que l'allongement à la rupture, la résistance à la traction et la solubilité des films sont meilleurs avec du CTR plutôt qu'avec du glycérol comme additif [130]. Ils expliquent ce phénomène par la présence de fonctions OH et COOH pour le CTR qui augmente les interactions moléculaires entre l'amidon, le PVOH et les additifs. Luo et *al.* observent que l'utilisation de glycérol et d'urée comme plastifiants permet de favoriser l'homogénéité du mélange [131]. Jiang et *al.*, quant à eux, montrent que le CaCl_2 peut interagir avec les molécules d'amidon et PVOH et permet d'augmenter la quantité d'eau dans les films [132]. Par conséquent, il détruit les cristaux d'amidon et de PVOH et joue le rôle de plastifiant en rendant les films plus ductiles.

Par ailleurs, les études sur des films pour l'emballage réalisés par **extrusion** sont moins nombreuses. Par exemple, Wang et *al.* montrent une bonne compatibilité pour des films extrudés bi-orientés. Majdzadeh-Ardakani et *al.*, quant à eux, utilisent le PVOH pour améliorer la résistance à la traction de l'amidon dans des nanocomposites contenant du kaolin [87;133].

II.3 PVOH et Cellulose et autres

La cellulose (Figure II.II. 3) et ses dérivés sont aussi utilisés en association avec le PVOH. Par exemple, El-Sayed et *al.* ont montré que le PVOH et la carboxymethyl cellulose sont compatibles et que la stabilité thermique du PVOH augmente avec la quantité de carboxymethyl cellulose [134].

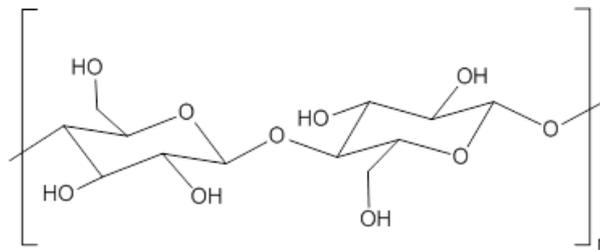


Figure II.II. 3. Enchaînement glucosidique de la cellulose

Qui et *al.* réalisent un mélange homogène de PVOH et de cellulose microfibrillée réticulée avec du glyoxal pour une application comme composite biodégradable pour l'emballage [135]. Les films, réalisés par casting, ont des propriétés de traction améliorées par la réticulation. La cellulose microfibrillée améliore en plus la stabilité thermique des composites.

Des films composites à base de PVOH/cellulose (d'origine bactérienne) ont été réalisés par casting pour une application en emballage alimentaire par Stoica-Guzun et *al.* [136]. Ces films montrent une haute résistance mécanique. La cellulose améliore la résistance à l'irradiation gamma du PVOH, utilisée pour améliorer la sécurité microbiologique d'aliments pré-emballés.

Sont également développés, par Uddin et *al.*, des fibres nanocomposites à partir de gel de PVOH/whiskers de cellulose (cellulose traitée par hydrolyse acide afin d'éliminer les zones amorphes) [137]. Les auteurs mettent en évidence un mélange homogène, une forte orientation des whiskers de cellulose dans le sens parallèle à l'axe de la fibre et des interactions favorables entre le PVOH et les whiskers de cellulose qui améliorent les propriétés mécaniques des fibres.

Il existe aussi dans la littérature des mélanges avec **d'autres polymères naturels** tels que la gomme d'acacia, l'hydrolysate de collagène, l'agar, le κ -carrageenan ou le polyphénol de thé [138-143]. Un mélange PVOH/gomme gellane est notamment envisagé pour des emballages alimentaires comestibles [144]. Un mélange PVOH/alginat de sodium est décrit comme emballage actif pour la protection des arômes [145]. Deux études sur un mélange PVOH/protéine myofibrillaire pour le développement d'emballage alimentaire ont été relevées [101;146].

III. INSOLUBILISATION DU PVOH PAR RETICULATION

Comme vu précédemment, le PVOH est un polymère hydrosoluble. Pour des applications nécessitant une utilisation en milieu humide ou au contact de l'eau, notamment l'emballage alimentaire, le PVOH doit donc être utilisé en multicouches, inséré entre des polymères plus résistants à l'eau. Une autre voie pour améliorer sa résistance à l'eau serait de rendre le PVOH insoluble par la réticulation, c'est la voie que nous avons choisie. Nous avons donc voulu faire l'inventaire des méthodes répertoriées dans la littérature. La réticulation peut se faire par l'ajout d'un agent réticulant chimique ou par irradiation. La première méthode est la plus présente dans la littérature avec principalement l'utilisation de dialdéhydes ou d'acides polycarboxyliques comme agents réticulants.

III.1 Dialdéhydes

Le cas le plus fréquemment rencontré dans la littérature est l'utilisation de dialdéhydes, notamment le glyoxal (Figure II.III. 1 (a)) et le glutaraldéhyde (GA) (Figure II.III. 1 (b)).

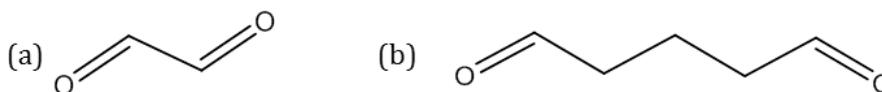


Figure II.III. 1. Formules chimiques du glyoxal (a) et du glutaraldéhyde (b)

On rencontre des méthodes de réticulation en solution et en surface [147;148]. La méthode en solution implique que le dialdéhyde soit mélangé à une solution de PVOH avant de réaliser le film. Au contraire, pour la méthode en surface, un film de PVOH déjà formé est plongé dans une solution de dialdéhyde.

L'utilisation du GA est très répandue pour réticuler le PVOH, notamment dans le cas de microsphères, de films, de membranes, ou d'hydrogel [118;149-151]. Mansur *et al.* proposent et mettent en évidence par infrarouge la formation de ponts acétals entre les fonctions OH et

aldéhydes lors de la réaction de réticulation du PVOH par le GA en milieu acide (Figure II.III. 2) [147].

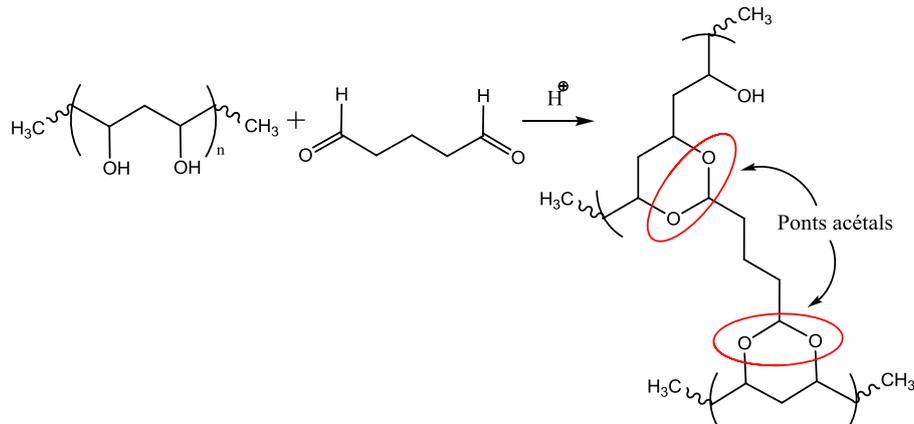


Figure II.III. 2. Mécanisme de réticulation du PVOH par le GA en milieu acide proposé par Mansur [147]

Yeom et *al.* mettent en évidence par infrarouge la formation de trois produits, soit deux groupes acétals cycliques (a et b) et un groupe porteur d'aldéhyde (c) (Figure II.III. 3) [148]. Ce dernier est formé si la réaction n'a lieu que sur l'une des deux fonctions aldéhydes du GA.

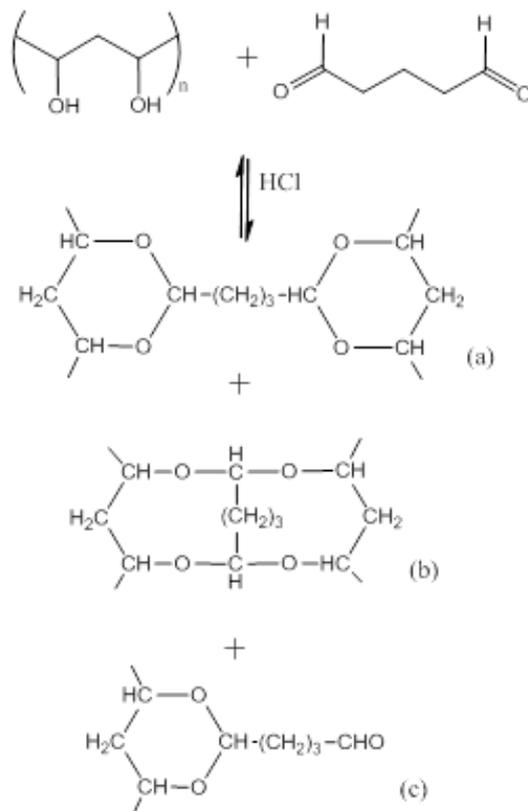


Figure II.III. 3. Mécanisme de réticulation du PVOH par le GA en milieu acide proposé par Yeom [148]

L'autre dialdéhyde, le glyoxal, a été utilisé par Buonocore et *al.* pour réticuler le PVOH dans le cadre d'un film antimicrobien à base de lysozyme [152]. Qui et *al.* mettent en évidence par infrarouge la formation de ponts acétals entre les fonctions OH et aldéhydes lors de la

réaction de réticulation du PVOH et de la cellulose microfibrillée par le glyoxal en milieu acide (Figure II.III. 4) [135].

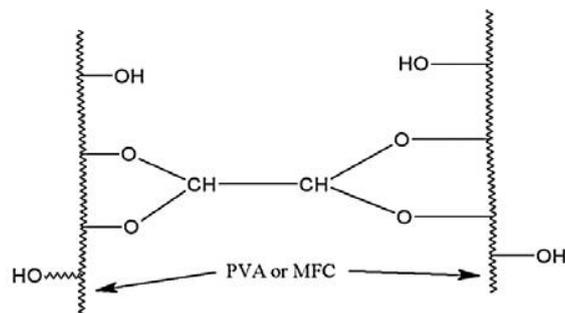


Figure II.III. 4. Mécanisme de réticulation du PVOH et de la cellulose microfibrillée (MFC) par le glyoxal proposé par Qui [135]

III.2 Acides polycarboxyliques et dérivés

Plus récemment, dans le souci de trouver une alternative aux dialdéhydes qui sont suspectés d'être toxiques, la réticulation par des acides polycarboxyliques (PCAs) est de plus en plus utilisée (Figure II.III. 5). Dans ce cas, la réticulation a lieu par la formation de liaisons esters.

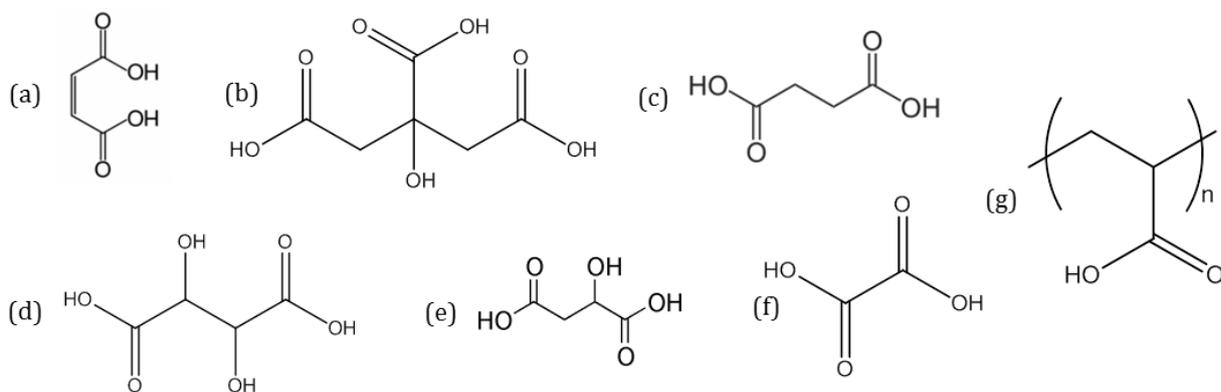


Figure II.III. 5. Formules chimiques des acides carboxyliques : (a) acide maléique, (b) acide citrique, (c) acide succinique, (d) acide tartrique, (e) acide malique, (f) acide oxalique, (g) poly (acide acrylique)

Les différents articles concernant la réticulation par des PCAs sont résumés dans le Tableau II.III. 1.

Tableau II.III. 1. Présentation des acides polycarboxyliques pour la réticulation du PVOH

PVOH	Agent réticulant	Préparation de la solution	Post-traitement	Applications	Ref.	
/	Acide maléique	Eau	2h à 70 °C	Détecteur de saveur	[153]	
M = 100000 g/mol		Eau, H ₂ SO ₄ comme catalyseur	2h à 60 °C	Libération de médicaments	[109]	
DH =87% mélange avec caoutchouc naturel epoxydé		Eau	1h à 120 °C	Réseau polymère semi-interpénétré	[154]	
M = 77000 g/mol DH = 99,5%		Eau, H ₂ SO ₄ comme catalyseur	2h à 120 °C	/	[155]	
DH = 99% M = 75kD		Eau	Evaporation de l'eau à 30°C 1h à 150 °C	Sorption et perméation	[156]	
M = 89000-98000 g/mol DH = 99%	Acide citrique	Eau, HCl comme catalyseur Solution chauffée 10 min à 80°C	7 jours à T°C ambiante	Hydrogel pour cartilage artificiel	[157]	
M = 72000 g/mol		Eau	Irradiation γ	Absorbant, séparation	[158]	
Mélange avec amidon DP = 1750 DH = 99%		Eau	Eau évaporée à 140°C, 1h	Biomédical	[127]	
Mélange avec chitosane M=30000-70000 DH = 87-90%		Eau, NaH ₂ PO ₂ comme catalyseur	Solution évaporée 2h, 90°C 2 jours à T°C ambiante	Absorbant pour suppression de Cr ³⁺	[122]	
M = 14000 g/mol		Eau	2 jours, 120°C	Sol-gel pour des particules de cobalt-ferrite	[159]	
DH = 99% M = 75kD		Eau	Evaporation de l'eau à 30°C 1h à 150 °C	Sorption et perméation	[156]	
Mélange avec xylan M = 14600-18600 DH = 99%		Eau 30 min à température ambiante 1h à 95 °C	Evaporation de l'eau à 50 °C 2h30min à 110°C	Emballage alimentaire	[160]	
DH = 99% M = 89000-98000		Eau, <i>p</i> -toluène sulphonique comme catalyseur 60-80°C et 130°C/3h	Distillation de l'eau Evaporation de l'eau à 70 °C	Ingénierie tissulaire pour ledomaine vasculaire	[161]	
M = 72000 g/mol		Acide succinique	Eau	Irradiation γ	Absorbant, séparation	[158]
M=89000 -98000 g/mol DH = 99%		Acide sulfo-succinique	Eau	16h, T°C ambiante	Membrane conductrice de protons pour une cellule à combustible	[162]
DH = 99% M = 72000 g/mol	Acide tartrique	Eau	Séchage 50°C, 1nuit 150h, 1h	Pervaporation, séparation	[163]	
DH=98% M=2000 à 65000 g/mol	Acide malique		Réticulation en surface suivie d'un traitement thermique	Osiose inverse	[164]	
M = 72000 g/mol DH < 98%		Eau	1h, 150°C	Séparation acide acétique/eau par pervaporation	[108]	
M = 125000 g/mol DP = 98-99%	Acide oxalique	Eau	T°C ambiante, 24h 110°C, 3h	Pervaporation	[165]	
M = 31000 g/mol	Poly(acide acrylique)	Eau 60°C, 36h	Evaporation, Traitement thermique	/	[166]	

Basak et *al.* mettent en évidence par IRTF deux cas de figures pour la réaction du PVOH avec **l'acide maléique** : soit les deux COOH ont réagi pour former un pont de réticulation, soit il reste un COOH libre (Figure II.III. 6) [109]. L'étude précise que la double liaison de l'acide maléique est intacte après la réaction.

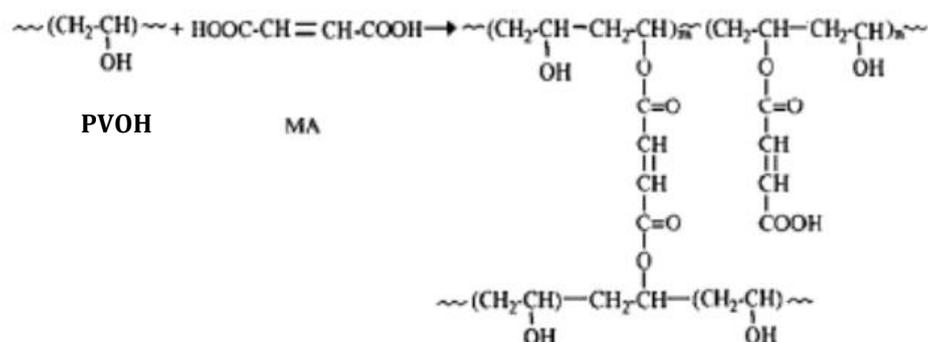


Figure II.III. 6. Mécanisme de la réticulation du PVOH par l'acide maléique proposé par Basak [109]

Riyajan et *al.*, quant à eux, démontrent avec le même acide maléique les deux possibilités de ponts de réticulation intra- ou intermoléculaire (Figure II.III. 7) [154].

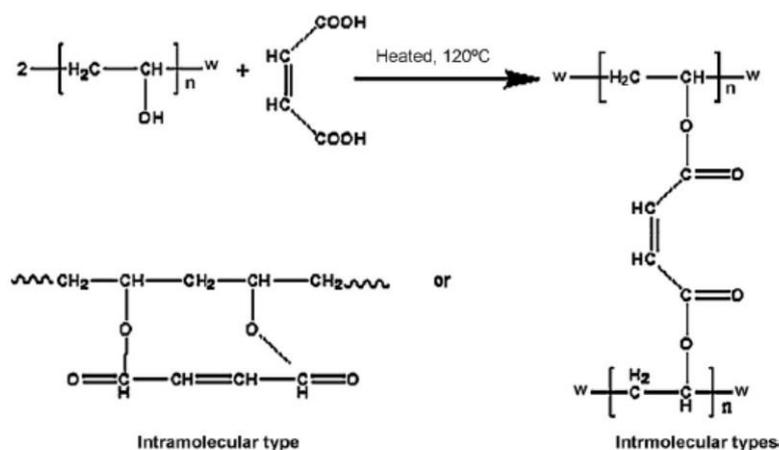


Figure II.III. 7. Mécanisme de la réticulation du PVOH par l'acide maléique proposé par Riyajan [154]

De même, Sivakumar et *al.* proposent le mécanisme présenté sur la Figure II.III. 8 pour la réticulation du PVOH par **l'acide citrique** avec la formation de ponts intra- et intermoléculaires [159].

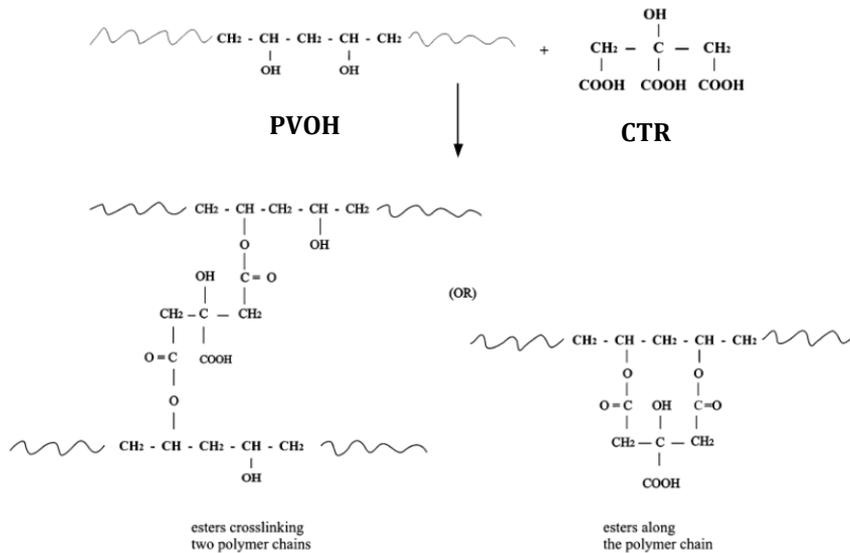


Figure II.III. 8. Mécanisme de la réticulation du PVOH par le CTR proposé par Sivakumar [159]

Pour un dérivé de **l'acide succinique** (acide sulfo-succinique), **l'acide malique** et **l'acide oxalique** des mécanismes intermoléculaires sont proposés par Morancho et *al.*, Isiklan et *al.* et Das et *al.* respectivement [108;162;165]. Le mécanisme pour l'acide sulfo-succinique est présenté sur la Figure II.III. 9 [162].

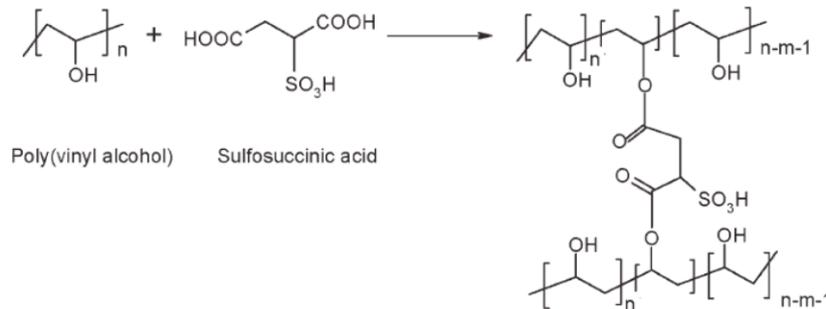


Figure II.III. 9. Mécanisme de la réticulation du PVOH par l'acide sulfo-succinique proposé par Morancho [162]

Les dernières études présentées concernent un mélange PVOH et **poly (acide acrylique) (PAA)** réalisés à partir du polymère PAA ou du monomère acide acrylique (AA) [166;167]. Une réaction d'estérification a lieu entre les fonctions acides du PAA et les fonctions alcool du PVOH [166;167]. Notons que, dans le cas du mélange avec AA, le monomère polymérise pour former du PAA dans la solution de PVOH. Le mélange est ensuite extrudé, puis chauffé à 100 °C durant 1 h pour procéder à la réaction d'estérification entre PAA et PVOH [167].

Pour terminer, on rencontre dans la littérature des polyesters issus d'autres dérivés, tels que les anhydrides et les chlorures d'acyle avec du PVOH [168;169].

III.3 Autres méthodes de réticulation

D'autres méthodes de réticulation chimique sont également rencontrées dans la littérature mais leur utilisation se fait plus rare. On peut citer notamment l'utilisation du diméthyl urée, formant des liaisons éther par condensation avec le PVOH, ou de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) pour la réticulation de membranes de PVOH pour la pervaporation [165]. TEOS est hydrolysé en présence d'acide pour former des groupes silanol réagissant avec les groupes hydroxyles du PVOH pour former des liaisons -O-siloxane. L'épichlorhydrine est également utilisée pour réticuler des hydrogels hyperabsorbants à base de PVOH et de xanthan [170]. Une autre alternative de réticulation est le borate et ses dérivés qui sont régulièrement utilisés comme réticulant du PVOH, comme pour obtenir des gels de PVOH ou de PVOH/Chitosane [171;172]. Un dérivé du borate, le tetrahydroxyborate est utilisé pour un système hydrogel pour la libération de médicaments [173]. Un cas particulier de réticulation du PVOH consiste en une déshydratation catalysée par l'acide sulfurique qui conduit à des liens éther entre les chaînes de PVOH mais des doubles liaisons sont aussi formées à haute température [174]. Un dernier exemple concerne le diisocyanate d'hexaméthylène qui réagit avec le PVOH pour former des liaisons uréthanes [175].

Par ailleurs, des voies physiques par irradiation ont aussi été abordées, notamment par le bombardement électronique ou par irradiation gamma en présence d'ions Ag⁺ [157;176]. La réticulation a lieu par la recombinaison de radicaux formés sur le PVOH.

Comme nous venons de le voir, il existe de nombreux moyens chimiques pour réticuler le PVOH. Le CTR en fait partie. Au laboratoire, cet acide a beaucoup été étudié et utilisé pour son aptitude à réticuler des dérivés hydroxyles dérivés de polysaccharides, en particulier les cyclodextrines [5]. Ces dernières ont une qualité de molécule cage qui permet d'encapsuler notamment les antimicrobiens. Aussi, nous avons envisagé de procéder à une réticulation d'un mélange PVOH et CD par le CTR.

Chapitre III :
Les cyclodextrines, vecteurs d'agents
antimicrobiens

I. CARACTERISTIQUES DES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines (CDs) ont été isolées en 1891 par Villiers, ce sont des oligosaccharides cycliques issus de la dégradation enzymatique de l'amidon par la cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) provenant de la bactérie *Bacillus macerans*. Elles ont la particularité de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules organiques, par exemple avec certains conservateurs alimentaires. Cette propriété est donc intéressante pour notre projet d'emballage à libération d'agent antimicrobien.

I.1 Structure des CDs

Les CDs sont composées d'unités glucopyranoses et forment des cycles de n unités (6 à 12) reliées par des liaisons α -1,4. Les CDs ont une structure conique tronquée en forme de godet imposée par le manque de libre rotation des motifs glucose. Pour différencier les différentes CDs, on utilise une lettre grecque indiquant le nombre d'unités glucopyranose composant la CD. On utilise ainsi α pour 6, β pour 7 et γ pour 8 unités glucopyranose.

La structure en cône tronqué des CDs et la disposition des atomes sur celui-ci donnent des caractères différents aux parties externe et interne des CDs. La présence d'atomes d'oxygène (constituant les liaisons glucosidiques), de carbone et d'hydrogène à l'intérieur de la cavité est à l'origine d'une forte densité électronique, qui lui confère un caractère hydrophobe. La partie externe des CDs est marquée par la présence de 3 fonctions hydroxyles par unité glucopyranose (1 primaire et 2 secondaires) donnant un caractère hydrophile. Les CDs ont une structure cristalline.

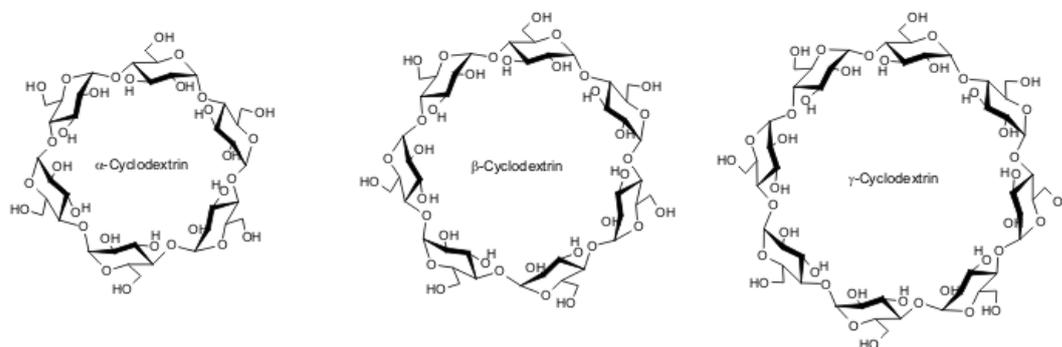


Figure III.I. 1. Formules chimiques des cyclodextrines natives

Les trois CDs dites « natives » les plus utilisées sont α CD, β CD, γ CD (Figure III.I. 1). A partir de ces CDs natives, de nombreux dérivés peuvent être obtenus car les hydroxyles primaires et secondaires peuvent subir des réactions d'amination, de méthylation,

d'estérification et d'étherification. On connaît notamment l'hydroxypropyl-β-CD (HPβCD) (Figure III.I. 2), obtenue par substitution des groupements hydroxyles par des groupements hydroxypropyles. Les masses molaires de ces dérivés dépendent de leur degré de substitution, noté DS. (Un DS de 0,5 signifiant par exemple que la moitié des groupes hydroxyles est substituée).

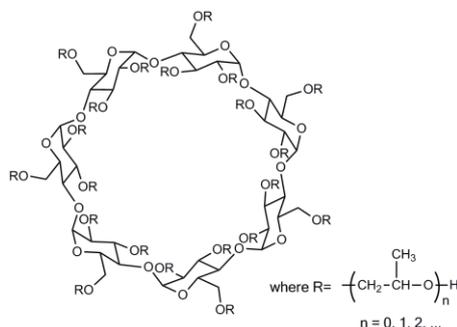


Figure III.I. 2. Formule chimique de l'HPβCD

Le tableau suivant récapitule les caractéristiques des trois plus courantes CDs « natives » et de l'HPβCD.

Tableau III.I. 1. Caractéristiques des cyclodextrines

	αCD	βCD	γCD	HPβCD
Formule brute	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ ·(C ₃ H ₆ O) _n
Nombre d'unités glucose	6	7	8	7
Masse molaire en g/mol	972	1135	1297	1399
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L)	145	18,5	232	> 1000
Diamètre interne de la cavité (Å)	5,0	6,3	7,9	6,3
Hauteur du Tore (Å)	7,9	7,9	7,9	7,9
Volume de la cavité (Å³)	174	262	427	262

Par ailleurs, la dégradation enzymatique de l'amidon par la CGTase peut aussi aboutir à la formation d'un oligomère linéaire appelé **maltodextrine (MX)**. Cet oligomère de l'amidon correspond à l'équivalent non cyclique de la CD (Figure III.I. 3).

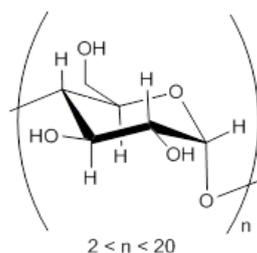


Figure III.I. 3. Formule chimique de la maltodextrine

I.2 Toxicité des CDs

De nombreuses études ont été effectuées afin d'évaluer la toxicité des cyclodextrines et de ses dérivés. Elles sont basées principalement sur des tests d'ingestion (chez le chien et le rat) mais aussi sur des tests par injection intraveineuse et des tests de cancérogénicité chez le rat. Chez le chien, des doses d' α CD administrées par ingestion atteignant 10,4 g/kg/jour n'ont pas montré de toxicité [177]. Des tests équivalents ont été réalisés pour la β CD et la γ CD chez le rat. L'ingestion de 12,7 g/kg/jour chez le rat de γ CD n'a pas montré d'effet toxique [178]. L'ingestion allant jusqu'à 3,6 g/kg/jour de β CD chez le rat n'a pas induit de mortalité mais a montré une altération des cellules du foie [179]. Même si la toxicité de la β CD semble être supérieure à celle des deux autres cyclodextrines natives, mais à des doses très élevées, ces études ont prouvé la quasi-innocuité des CDs par administration orale, ce qui s'explique par la faible diffusion de ces molécules au travers des membranes biologiques et de leur non absorption lors du transit intestinal.

Pour la β CD, un rapport d'experts de l'organisation mondiale de la santé (OMS) a autorisé en 1995 son incorporation dans l'alimentation humaine à hauteur de 5 mg/kg/jour (soit des doses jusqu'à 700 fois plus faibles que les doses jugées toxiques dans les études précédentes). Ces études ont été effectuées pour l'utilisation des CDs comme produit alimentaire, ce qui rentre dans le cadre de notre projet. Les tests de cancérogénicité et d'utilisation intraveineuse se sont également révélés négatifs [180;181]. De la même façon, aucune toxicité n'a été observée pour l'HP β CD [182].

I.3 Complexe d'inclusion des CDs

Le caractère amphiphile des CDs (intérieur de la cavité hydrophobe et extérieur hydrophile) leur confère la propriété de former des complexes d'inclusion réversibles de type hôte-invité avec de nombreuses molécules organiques (Figure III.I. 4). Les complexes formés entre les CDs et les molécules organiques peuvent être complets ou partiels. La formation des

complexes peut se faire soit en solution (nécessitant parfois le chauffage de la solution et l'utilisation d'un co-solvant), soit à l'état solide.

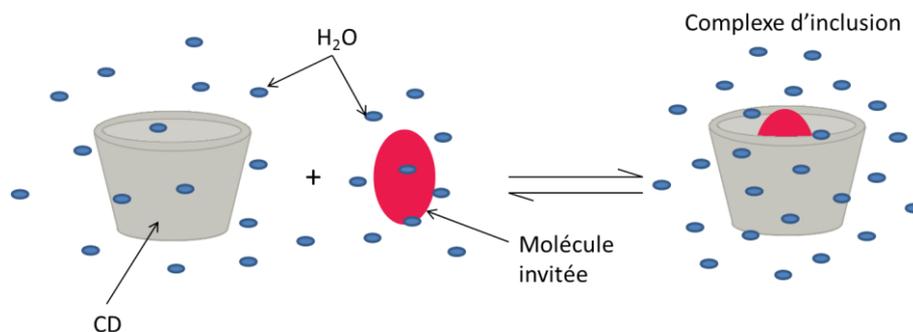
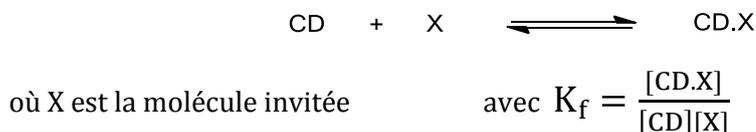


Figure III.I. 4. Inclusion d'une molécule invitée dans une cavité de CD

En solution aqueuse, la cavité apolaire de la CD est occupée par des molécules d'eau dans un état défavorable (état énergétiquement instable dû aux interactions polaire-apolaire) qui peuvent alors être substituées par des « molécules invitées » appropriées, soit moins polaires que l'eau. En ajoutant à la solution une molécule ayant une forte affinité avec la CD, les molécules d'eau sont chassées au profit de cette molécule et le complexe hôte-invité se forme. Il se crée un équilibre thermodynamique dissociation/association (mettant en jeu des liaisons de Van der Waals ou des ponts hydrogène), dépendant des concentrations en CD, molécule invitée et eau, et défini par une constante de formation K_f :



Il existe de nombreuses molécules pouvant interagir avec des CDs : des molécules aliphatiques avec ou sans branchements, des alcools, des aldéhydes, des cétones, des acides gras, des acides organiques, des groupements aromatiques, groupements polaires halogénés, amines, etc.

Les proportions molaires hôte-invité sont surtout déterminées par l'accessibilité de la molécule invitée vers la cavité de la CD (dépendant de la géométrie, de la taille de la molécule invitée et de la taille de la cavité de la CD), la nature de la solution et l'importance de la force motrice thermodynamique. En effet, une molécule trop grosse ne pourra pas être complètement incluse dans la cavité de la CD. Certaines molécules peuvent être incluses dans les plus grosses CDs (γ CD par exemple) mais pas dans les plus petites (α CD). Inversement, certaines molécules de petite dimension ne formeront pas de complexe avec une CD dont la cavité serait trop grande pour permettre des interactions entre la molécule et la paroi interne de la cavité. Par exemple, les phényles forment des complexes stables avec la β CD alors qu'une molécule plus volumineuse

comme le naphthalène ne pourra pas y pénétrer. En revanche le naphthalène forme un complexe très stable avec la γ CD. La constante d'association reflète la force d'interaction entre les deux espèces moléculaires mises en jeu. Le rapport hôte-invité 1 :1 est le plus fréquent mais il peut aussi exister d'autres associations types 2 :1, 1 :2 ou autres en coexistence. La formation d'un complexe d'inclusion s'accompagne d'un gain d'enthalpie et d'une perte d'entropie. Les complexes se forment généralement assez rapidement. Toutefois, pour les substances extrêmement insolubles dans l'eau, le véritable équilibre n'est pas atteint avant des heures, voire des jours.

I.4 Applications des CDs

La production mondiale de CD est estimée à 10000 tonnes/an. On les retrouve dans des domaines divers et variés, tels que les industries agroalimentaire, pharmaceutique, chimique, cosmétique, textile et dans l'ingénierie environnementale.

Dans l'industrie pharmaceutique, les CDs sont utilisés comme système de transport de médicaments grâce à leur capacité de complexation qui permet, dans ce cas, de stabiliser les principes actifs, d'augmenter leur solubilité, leur biodisponibilité et diminuer les effets secondaires [183;184].

Dans l'industrie chimique, on retrouve les CDs dans le domaine de la chimie catalytique (les CDs permettent d'obtenir une meilleure solubilisation des substrats, améliorant ainsi la réaction) et de la séparation par chromatographie (pour séparer des énantiomères).

La capacité de complexation des CDs ainsi que leur faible toxicité sont utiles **aux traitements de milieux pollués**. Dans ce cas, les CDs sont notamment immobilisées sur des supports et servent à l'adsorption de polluants organiques. Par exemple, un polymère de β CD et de PVOH réticulé par le CTR est développé en ce sens pour l'adsorption de phénol et de bleu de méthylène [185].

L'industrie cosmétique utilise les CDs pour libérer des parfums, protéger des molécules de la dégradation par l'oxygène, la lumière (déodorants, parfums, crèmes, lessives et dentifrices) [186].

L'industrie textile, quant à elle, utilise les CDs pour pour libérer des parfums, colorer des textiles ou encore encapsuler de mauvaises odeurs [186]. Les produits de la marque Febreze® fonctionnent sur ce concept, ils permettent de capter des molécules odorantes telle que la fumée de cigarette. Les CDs peuvent également être fixées aux fibres textiles pour modifier les

propriétés de mouillabilité des textiles, augmenter leur aptitude à la teinture, ou piéger sur le textile des molécules actives (notamment antimicrobiennes [187]) ou des molécules à éliminer.

Notre laboratoire, par l'intermédiaire du professeur Martel, a notamment développé et breveté une technique permettant de fixer des CDs sur textile, par liaisons covalentes ou par interactions physiques, en utilisant des acides polycarboxyliques [188]. La réaction mise en jeu est représentée sur la Figure III.I. 5 :

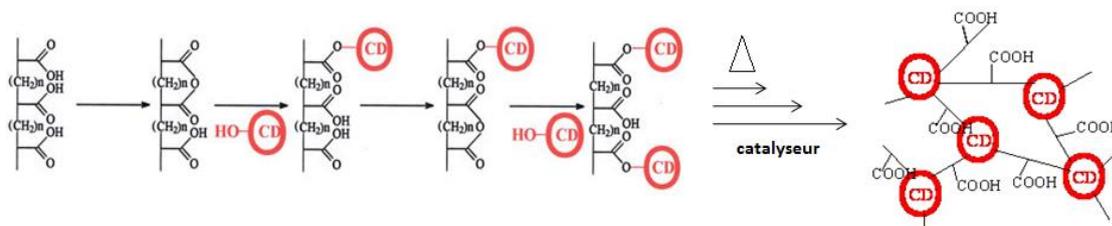


Figure III.I. 5. Réaction entre les cyclodextrines et les polyacides

Dans ce cas, un polyacide est utilisé pour former des fonctions ester avec les fonctions hydroxyles des cyclodextrines et de la fibre textile si elle en possède (cas des fibres naturelles telle que la cellulose). Dans le cas de fibres sans OH, souvent synthétiques, la fixation a lieu grâce à des interactions physiques et à l'adhésion mécanique (enrobage, insertion dans la porosité du matériau). Le mécanisme est une réaction d'estérification par la formation d'un anhydride sous l'effet de la chaleur et d'un catalyseur (par exemple l'hypophosphite de sodium) [189-191]. Le réseau réticulé obtenu présente à la fois les cavités des CDs ainsi que des fonctions acides libres n'ayant pas réagi.

Il est possible de transposer cette réaction à d'autres molécules portant des OH, comme par exemple l'amidon [192;193]. Dans notre cas, nous avons trouvé intéressant d'utiliser cette réaction pour la réticulation du PVOH par un polyacide, le CTR.

II. CYCLODEXTRINES ET DOMAINE ALIMENTAIRE

Les CDs sont couramment utilisées dans l'industrie alimentaire, soit comme ingrédient de l'aliment soit comme constituant de l'emballage.

La β CD rentre notamment dans la classification des additifs alimentaires sous le code E459. Les CDs forment des complexes d'inclusion avec une grande variété de molécules comprenant des arômes, des graisses, des colorants et des conservateurs. En lien avec notre travail, aucune étude n'a été relevée sur la complexation de l'acide benzoïque, du NaBz ou de la

nisine (conservateur E234) pour une application alimentaire. Notons toutefois qu'il a été montré dans la littérature par diffraction des rayons X, par spectroscopie UV-Vis et par RMN que la β CD et l'acide benzoïque (conservateur E210) forment un complexe d'inclusion 1:1 [41-43]. Par ailleurs, un complexe entre la β CD et le NaBz (conservateur E211) a été mis en évidence par mesures calorimétriques sans détermination de la stœchiométrie [44]. Il a également été montré que l'HP β CD et l'acide benzoïque forment un complexe 1:1 [45]. En revanche, à notre connaissance, aucune complexation entre l'HP β CD et le NaBz d'une part, et la nisine d'autre part n'a été évoquée.

Les CDs **dans les aliments** peuvent être utilisées seules pour capturer les composants indésirables (cholestérols) ou sous forme **de complexe** pour protéger et/ou libérer avec le temps les constituants désirés (huiles ou liquides volatils) [194]. Hill et *al.* montrent une augmentation de l'activité antimicrobienne de l'eugénol et du trans-cinnamaldéhyde (deux antimicrobiens naturels) par complexation par différentes CDs [195]. Une démarche similaire, menée par Li et *al.*, permet d'obtenir une libération améliorée de l'allyl isothiocyanate (AITC) (antimicrobien naturel) par α - et β -cyclodextrine sur une période de 75 h pour 98 %H.R. [196]. La diminution de l'humidité conduit à une cinétique plus lente et à une quantité libérée plus faible. Wang et *al.* en complexant de l'huile d'ail (antibactérien et antioxydant) par la β CD obtiennent une diminution de sa volatilité et une augmentation de sa stabilité physicochimique [197]. Ils notent une libération de 50 % sur 32 h à 37 °C mais aucune libération à 25 °C. La complexation de l'acide chlorogénique par la β CD pour une activité antimicrobienne, étudiée par Zhao et *al.*, conduit à un complexe stable pendant 20 semaines [198].

Par ailleurs, les propriétés des CDs font d'elles de bons candidats pour **l'élaboration d'emballages actifs**. López-de-Dicastillo et *al.* élaborent, en ce sens, un emballage alimentaire à base d'EVOH et β CD qui a pour but d'**absorber** les composants alimentaires apolaires indésirables, comme l'hexanal ou le cholestérol [199]. Les films sont préparés par l'extrusion du mélange EVOH et β CD (10 à 30 %), contenant du glycérol comme plastifiant, et présentent une bonne capacité d'absorption. En revanche, la perméabilité aux gaz (O_2 , CO_2 , vapeur d'eau) augmente en présence de β CD.

Les CDs permettent également de conférer à l'emballage la propriété de **libération** contrôlée de principes actifs. Des nanofibres pour l'emballage alimentaire à base de protéine de soja/poly(oxyde d'éthylène) obtenue par électrospinning pour la libération contrôlée d'AITC complexé par la β CD sont décrites par Vega-Lugo et *al.* [200]. Les fibres permettent une libération prolongée et augmentée en milieu humide (50 et 75 %H.R.), mais la complexation par la β CD ne permet pas de la retarder davantage. En revanche, la présence de β CD permet de libérer une plus grande quantité d'AITC. Les auteurs attribuent cette augmentation au fait que la β CD

protège de l'évaporation d'AITC pendant le procédé d'electrospinning. Un autre exemple est un brevet sur un matériau libérant progressivement de l'hinokitiol, agent antimicrobien à forte odeur et à faible solubilité, développé par la société Seiwa Chemical (Japon) [201].

L'encapsulation d'agents antimicrobiens dans les CDs permet également de les **protéger** des températures élevées durant les procédés d'élaboration de l'emballage. Un exemple est l'étude menée par Raouche et *al.* sur un film de PLA utilisant l'encapsulation d'AITC par la β CD pour le protéger de la dégradation lors de l'extrusion (190 °C) et de la thermocompression [202]. La complexation par la β CD d'AITC permet de diviser par deux la quantité d'AITC pour une même activité antimicrobienne.

Chapitre IV :
Films à propriétés antimicrobiennes à
base de PVOH

Notre travail visant à développer un film de PVOH antimicrobien, il apparaît important de réaliser un recensement dans la littérature des films de PVOH antimicrobiens existant ou en cours de développement. Les deux grands domaines de développement de ces films sont le domaine médical et le domaine alimentaire. Ce chapitre présente l'état de l'art des différents films de PVOH, seul ou avec un autre polymère, possédant des propriétés antimicrobiennes dans ces deux domaines.

I. FILMS ANTIMICROBIENS A BASE DE PVOH DANS LE DOMAINE MEDICAL

Le PVOH dans le domaine médical a surtout été étudié pour des systèmes de libération de médicaments ou pour des pansements actifs. Cinq articles principaux présentés ci-dessous portent sur ces problématiques (Tableau IV.I. 1).

Tableau IV.I. 1. Films de PVOH antimicrobien pour le domaine médical

Matrice	Action antimicrobienne	Application	Références
PVOH/ N-(2-hydroxy)propyl-3-triméthylammonium chitosan chloride	Activité par contact direct: Chitosane	Pansements Système à libération de médicaments	Yu <i>et al.</i> , 2011 [203]
PVOH	Activité par contact direct: Polyphénols de thé	Biomédical	Xu <i>et al.</i> , 2009 [143]
PVOH réticulé/acrylamide	Libération de médicaments	Système à libération de médicaments	Rihawy <i>et al.</i> , 2011 [204]
PVOH/amidon	Libération de médicaments	Biomédical	Bursali <i>et al.</i> , 2011 [205]
PVOH/gellane	Libération ions Ag ⁺	Pansements	Cencetti <i>et al.</i> , 2012 [206]

La première étude concerne des films à base de PVOH et d'un dérivé de chitosane (N-(2-hydroxy)propyl-3-triméthylammonium chitosane chloride (HTCC)) réticulés par du GA pour une application comme pansement ou encore pour la libération de médicament [203]. Yu *et al.* ont choisi ce dérivé car l'introduction de groupes ammonium quaternaire N-triméthylé améliore la solubilité dans l'eau et l'activité antibactérienne du chitosane. Les films PVOH/HTCC (90/10) développés montrent de bonnes propriétés antibactériennes contre *S. aureus* et *E. coli*, qui sont légèrement affaiblies par la réticulation, mais restent importantes. Ce résultat montre que le GA ne réagit pas seulement avec PVOH mais aussi avec les groupes amines libres du chitosane. Aucun antimicrobien étant ajouté à la formulation des films, l'activité est uniquement due à HTCC et agit donc par contact.

Un film de PVOH contenant du polyphénol de thé (TP) (5 à 40 wt%) a été développé par Xu et *al.* [143]. L'application visée n'est pas précisée, toutefois l'introduction de l'article est orientée vers une application biomédicale. TP est un polymère naturel biodégradable et biocompatible. Les films obtenus montrent une forte activité antibactérienne contre *S. aureus*, *E. coli* et *Proteus vulgaris*. L'activité des films augmente avec la quantité de TP jusqu'à 20 wt% de TP.

Des films à base de PVOH et d'acrylamide réticulés sont étudiés par Rihawy et *al.* pour une libération dans l'eau du chloramphénicol [204]. Dans un premier temps, l'augmentation de la réticulation entraîne une diminution de la diffusion du chloramphénicol. Cependant, cette diffusion augmente de nouveau à forte concentration d'acrylamide. Cette augmentation est attribuée à une augmentation de la longueur des chaînes polyacrylamide au détriment de la réticulation. La libération a lieu sur une période d'au moins 6 h.

Bursali et *al.*, quant à eux, élaborent des films de PVOH et d'amidon avec des complexes de bore, réticulés par le GA pour une application potentielle en biomédical [205]. L'incorporation de complexes de bore a pour but d'apporter des propriétés antibactériennes et antifongiques aux films. Les films ont montré une activité modérée contre *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Candida albicans*.

La dernière étude est un peu en marge de la problématique film. Elle concerne des textiles non tissés à base de gellane, enrobés d'un système PVOH/borax chargé en ions Ag⁺, développés par Cencetti et *al.* pour une application comme pansements antimicrobiens [206]. Le borax joue également le rôle de réticulant entre les chaînes polysaccharides de la gellane et le PVOH. La réticulation par le borax permet de diminuer la cinétique de libération des ions Ag⁺. Tous les échantillons montrent une forte activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, indépendamment de la quantité d'Ag⁺. En revanche, la présence de PVOH et la réticulation par le borax semble améliorer l'activité antimicrobienne.

II. FILMS ANTIMICROBIENS A BASE DE PVOH DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE

Des recherches sont aujourd'hui réalisées pour développer des emballages actifs à base de PVOH, qui présentent l'avantage des propriétés intrinsèques du PVOH auxquelles s'ajoute une activité antimicrobienne. Les études réalisées au cours des dix dernières années avec le PVOH sont répertoriées dans le Tableau IV.II. 1.

Tableau IV.II. 1. Films de PVOH antimicrobien dans le domaine alimentaire

Matrice	Elaboration	Réticulation	Mode d'action	Agent actif	Références
PVOH	casting	glyoxal	Libération d'antimicrobiens	Lysozyme Nisine NaBz	Buonocore et al., 2003 [152]
PVOH	casting de mono- et de multicouche	glyoxal	Libération d'antimicrobiens	Lysozyme	Buonocore et al., 2005 [94]
PVOH/cellulose bactérienne	casting de mono- et de multicouche	aucune	Libération d'antimicrobiens	Acide sorbique Vaniline	Jipa et al., 2003 [207] Stroescu et al., 2013 [208]
PVOH/chitosane	casting bicouche	GA	Action par contact direct	Chitosane	Tripathi et al., 2009 [209]
PVOH	casting	glyoxal	Action par contact direct	Lysozyme immobilisée	Conte et al., 2007 [58]
PVOH/caséine	enrobage sur une carotte, puis évaporation	aucune	Revêtement consommable	Curcuma	Jagannath et al., 2006 [210]
PVOH	casting	aucune	Consommation de l'oxygène	Microorganismes <i>Kocuria varians</i> et <i>Pichia subpelliculosa</i>	Altieri et al., 2004 [54].
PVOH/chitosane	Membrane de nanofibres obtenues par électrospinning	aucune	Synergie entre contact direct et consommation de l'oxygène	Chitosane Extrait de thé Glucose oxydase	Ge et al., 2012 [211]

Pour les systèmes agissant en **modifiant l'environnement de l'aliment**, Altieri et al. développent des films d'emballage pour aliments à forte humidité [54]. Ces films, présentés dans le Chapitre I, contiennent des microorganismes aérobies capables de consommer l'O₂ : *Kocuria varians* et *Pichia subpelliculosa*. Il montre que le PVOH est plus adapté que l'hydroxyéthyl cellulose pour piéger des microorganismes, grâce à sa forte mobilité moléculaire.

Une deuxième étude, menée par Ge et al., utilise l'immobilisation du glucose oxydase sur une membrane à base de nanofibres de PVOH et de chitosane pour l'emballage alimentaire [211]. Le glucose oxydase permet la consommation de l'oxygène et ainsi l'inhibition de la croissance bactérienne, des gram+ et gram-. Cette membrane contient également de l'extrait de thé qui est connu pour son activité antimicrobienne. Le PVOH est sélectionné pour apporter au mélange de bonnes propriétés pour la formation de fibre et ses propriétés barrière aux gaz. Dans cette étude ce sont l'addition de l'activité antimicrobienne du chitosane et de l'extrait de thé couplé à la consommation de l'O₂ par le glucose oxydase qui confèrent à la membrane son efficacité.

La littérature fait également état de films à base de PVOH actifs **par contact direct avec l'aliment**. Tripathi et al. utilisent des films bicouches associant le PVOH, pour ses propriétés filmogène et son innocuité, au chitosane pour son caractère antimicrobien [209]. Le film de

chitosane est préparé par casting, puis une solution de PVOH est versée sur ce film. Une fois le film de PVOH formé, l'ensemble est réticulé par le GA. Les films ont montré une bonne activité antimicrobienne par contact contre *E. coli*, *S. aureus*, et *Bacillus subtilis*.

Une autre alternative par contact direct est de fonctionnaliser la surface des films pour leur conférer une activité. Le groupe de Buonocore, Conte et *al.*, élabore des films de PVOH obtenus par casting réticulés par le glyoxal et procède à l'immobilisation covalente du lysozyme sur la surface du film avec du GA [58]. Les films montrent une activité antibactérienne contre *Micrococcus lysodeikticus* et l'activité est améliorée avec l'augmentation de lysozyme fixé.

Différents auteurs mentionnent enfin des résultats concernant des films de PVOH qui agissent par **libération prolongée d'antimicrobiens**. Buonocore et *al.* développent des films de PVOH obtenus par casting réticulés par le glyoxal pour la libération prolongée de trois types d'antimicrobiens : NaBz, nisine ou lysozyme [152]. Ils montrent que la quantité d'agent antimicrobien libérée à l'équilibre diminue avec l'augmentation du degré de réticulation de la matrice polymère (Figure IV.II. 1).

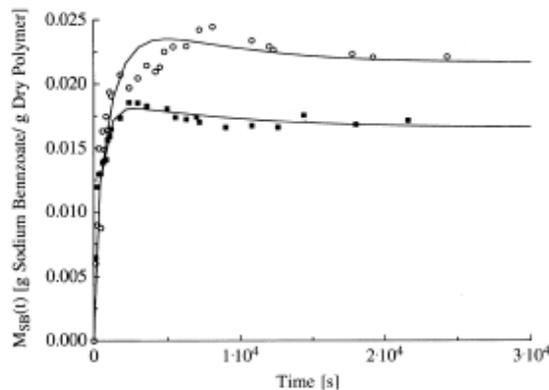


Figure IV.II. 1. Quantité de NaBz libéré en fonction du temps (○) = 2,0 % de glyoxal (■) = 7,7 % de glyoxal [152]

Par ailleurs, les auteurs ont montré qu'un assemblage en multicouche entraîne une diminution de la cinétique de libération et une diminution de la quantité de lysozyme libérée à l'équilibre [94]. Le film multicouche est composé de : 1) une couche de PVOH réticulé par le glyoxal 2) une couche de PVOH réticulé ou non contenant le lysozyme 3) une couche de PVOH réticulé par le glyoxal (Figure IV.II. 2).

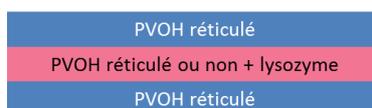


Figure IV.II. 2. Représentation schématique du film multicouche élaboré par Buonocore et *al.* [94]

La réticulation de la couche intermédiaire contenant le lysozyme entraîne une diminution de la quantité de lysozyme libérée à l'équilibre (Figure IV.II. 3).

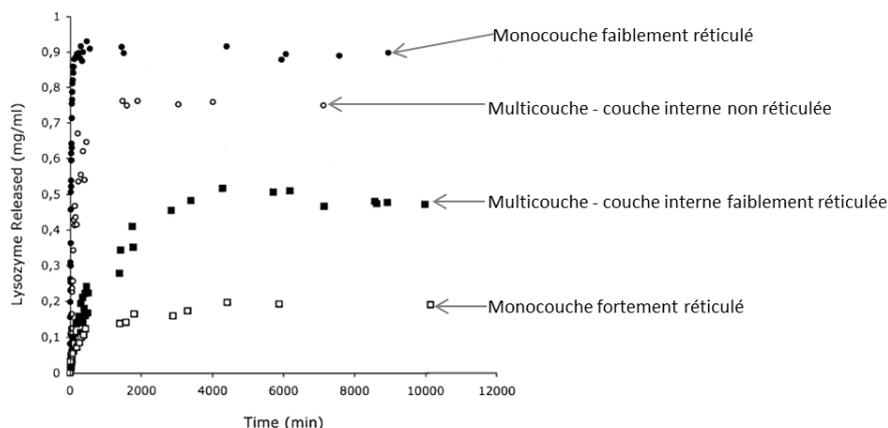


Figure IV.II. 3. Cinétique de libération dans l'eau du lysozyme en fonction du temps pour 4 films différents - faiblement réticulé = 0,077 wt% glyoxal et fortement réticulé = 7,7 wt% glyoxal [94]

Ils posent l'hypothèse que l'agent réticulant réagit avec l'agent antimicrobien et ainsi le lie de façon covalente à la matrice. Parallèlement, la réticulation de la couche interne permet de ralentir la cinétique de libération. Les résultats montrent que l'incorporation du lysozyme dans le PVOH n'altère pas l'activité de l'enzyme vis-à-vis de la bactérie gram+ *Micrococcus lysodeikticus*.

Une autre équipe, Jipa et *al.*, a réalisé des films multicouches à base de PVOH et cellulose d'origine bactérienne par casting. Un film de PVOH/cellulose (chargé ou non avec un agent antimicrobien) est inséré entre 2 membranes de cellulose d'origine bactérienne (Figure IV.II. 4).

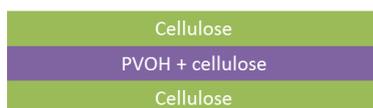


Figure IV.II. 4. Représentation schématique des films multicouches élaborés par Jipa et *al.* [207;208]

Dans une première étude, l'antimicrobien choisi pour la libération prolongée dans l'eau est l'acide sorbique [207]. Les films multicouches permettent une diminution de la cinétique de libération de l'acide sorbique par rapport au film monocouche mais au plateau la quantité libérée est identique (Figure IV.II. 5).

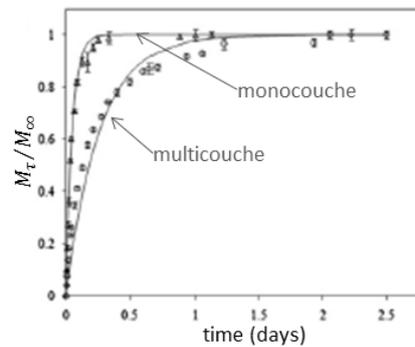


Figure IV.II. 5. Libération de l'acide sorbique en fonction du temps et de la composition du film [207]

L'augmentation de cellulose dans la composition de la couche interne accélère la cinétique de libération. Les films montrent une activité antimicrobienne contre *E. coli*. La deuxième étude transpose les travaux précédents à la vanilline, les films n'ont pas encore été testés pour leur activité antibactérienne mais la libération prolongée a été mesurée pour ces assemblages [208].

Dans l'article de Jagannath et *al.*, beaucoup plus appliqué, il a été montré qu'un film à base de PVOH et d'un mélange de curcuma et caséine augmente de 7 jours la durée de conservation des carottes [210]. Dans ce cas, le PVOH, ainsi que du polypropylène glycol (PPG), sont présents en petite quantité pour la formation du film.

III. ASSOCIATION DU PVOH ET DES CYCLODEXTRINES DANS LES DOMAINES MEDICAL ET ALIMENTAIRE

L'association du PVOH avec les CDs, qui nous intéresse particulièrement, est aussi étudiée dans la littérature. Dans toutes ces études de nombreuses techniques ont été utilisées pour montrer leur compatibilité : la microscopie optique, l'analyse du comportement rhéologique, la spectroscopie infrarouge, l'analyse enthalpique différentielle (DSC) etc. Un exemple est une étude menée par Păduraru et *al.* sur des films obtenus par casting à partir de solution aqueuse de PVOH (DP = 1600 et DH = 95,8 %) et β CD (variation de la composition de 7 à 91 %) [212]. Les films obtenus sont transparents et une bonne compatibilité entre PVOH et β CD a été mise en évidence. Le comportement rhéologique en particulier a montré de fortes interactions entre les deux composés. Notons que l'association des CDs et leurs dérivés avec le PVOH ouvre la possibilité à diverses applications.

Nous nous intéressons ici à leurs applications dans les domaines médical et alimentaire (Tableau IV.III. 1). Cette partie est un peu en marge des deux précédentes car, en effet, les études présentées ne concernent pas uniquement des films antimicrobiens. Notons que, dans chacun

des deux domaines présentés, nous n'avons rencontré que deux articles associant PVOH et CD sous forme de film et à caractère antimicrobien (encadrés en gras dans le tableau).

Tableau IV.III. 1. Systèmes PVOH/CD dans les domaines médical et alimentaire

Matrice	Elaboration	Domaine / Principe actif	Réf.
PVOH/βCD	Hydrogel obtenu par casting Réticulation : GA	Libération de médicaments / acide salicylique	Sreenivasan et al., 1997 [213]
PVOH/βCD	Nanofibres obtenues par electrospinning	Libération de médicaments / curcumin	Sun et al., 2013 [214]
PVOH/α,β,γ-CD	Microsphères Réticulation : GA	Libération de médicaments / antidouleurs	Constantin et al., 2004 [215]
PVOH/PEG/βCD	Chaînes de PVOH portant des PEG et des β CD cationiques	Traitement de maladies génétiques / ADN	Kulkarni et al., 2012 [216]
PVOH/βCD	Film obtenu par casting Réticulation : glyoxal	Capter le cholestérol	López-de-Dicastillo et al., 2001 [217]
PVOH/α, β, γ-CD	Nanofibres obtenues par electrospinning	Emballage antimicrobien par libération / vanilline	Kayaci et al., 2012 [218]
PVOH/α, β, γ-CD	Nanofibres obtenues par electrospinning	Emballage antimicrobien par libération / eugénol	Kayaci et al., 2013 [219]
PVOH/βCD	Information non disponible	Emballage antimicrobien par libération / huile de clou de girofle	Jiang et al., 2013 [220]

Les CDs couplées au PVOH sont très utilisées dans le **domaine biomédical** pour des systèmes de libération de médicaments. Ainsi, Sreenivasan et al. ont montré un ralentissement de la cinétique de libération de l'acide salicylique par l'ajout de β CD dans un hydrogel de PVOH/ β CD (29 wt%) [213]. Par ailleurs, Sun et al. mettent en évidence une amélioration de la stabilité et de la solubilité du curcumin ainsi qu'une libération de ce dernier jusqu'à 5h lorsqu'il est complexé par la β CD dans des nanofibres de PVOH/ β CD (20 à 50 wt%) [214]. Une autre étude par HPLC, menée par Constantin et al., a mis en évidence la capacité de rétention de microsphères de PVOH et de α,β,γ -CD réticulées par le GA. Une large affinité pour les médicaments antidouleur est constatée [215]. Un autre groupe, Kulkarni et al., a étudié des chaînes de PVOH portant des PEG et des β CD cationiques comme vecteur d'ADN dans le traitement de maladies génétiques [216].

Dans le **domaine alimentaire** visé par notre étude, peu d'articles existent. A notre connaissance, la littérature mentionne deux types d'emballage actif à base de **PVOH/CD**, absorbeur et libérateur. López-de-Dicastillo et al. élaborent un emballage actif à base de PVOH/ β CD (50/50) pour **piéger** les composants alimentaires indésirables, comme le cholestérol [217]. Les auteurs ont diminué jusqu'à 15 % la concentration en cholestérol dans des échantillons de lait. Un autre groupe, Kayaci et al., réalise une première étude sur la fabrication de nanofibres de PVOH contenant de la vanilline, utilisée comme arôme et comme conservateur

alimentaire et antioxydant [218]. Dans cette étude, parmi les 3 CDs α , β , γ -CD (32, 37 et 43 wt% respectivement), la γ CD s'est révélée être la plus efficace en matière de stabilité. Lors d'une deuxième étude, Kayaci et *al.* transposent le système précédent à l'encapsulation de l'eugénole, qui est un parfum naturel extrait du clou de girofle ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes [219]. Une illustration de l'élaboration est présentée sur la Figure III.III. 1. La **libération** la plus lente est obtenue avec γ CD qui est identifié comme le meilleur hôte pour l'eugénole.

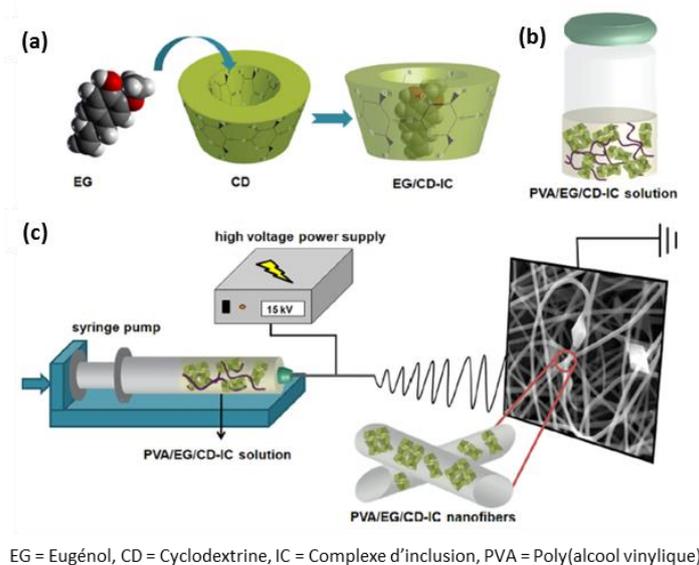


Figure III.III. 1. Représentation schématique de l'élaboration de nanofibres PVOH/[CD-eugénole] (a) formation du complexe entre la CD et l'eugénole (b) solution de PVOH/[CD-eugénole] (c) electrospinning des fibres à partir de la solution PVOH/[CD-eugénole] [219]

Un dernier article, de Jiang et *al.*, complète le précédent par l'étude de la **libération** prolongée d'huile de clou de girofle dans différents simulants [220]. Les résultats mettent en évidence une libération plus lente dans les milieux simulants les aliments alcoolisés (eau/éthanol-50/50) ou les aliments gras (eau/glycérine-40/60 ou n-hexane) que dans les milieux riches en eau (eau/éthanol-90/10). L'étude conclut que ce film peut être utilisé pour des systèmes d'aliments avec une faible teneur en eau, pour une action antibactérienne sur le long terme.

Le système PVOH/CD, mélange compatible et non toxique, est utilisé dans divers domaines ; notamment dans le domaine visé par notre étude, l'alimentaire. Les CDs confèrent au PVOH de meilleures propriétés de libération ou d'absorption de molécules. C'est un système intéressant en adéquation avec l'objectif de notre travail : l'élaboration d'un film de PVOH antimicrobien par libération prolongée d'un conservateur, le NaBz, qui pourrait être inclus dans la CD. Pour cela, nous avons envisagé d'élaborer un film de PVOH contenant un dérivé de la β CD, l'HP β CD.

SYNTHESE DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET STRATEGIE

Cet état de l'art confirme l'intérêt du PVOH pour la réalisation de films antimicrobiens, notamment dans le domaine de l'emballage alimentaire. Notons que, dans ce domaine, la réticulation par les acides carboxyliques, qui offrent une voie non toxique comparée aux dialdéhydes, est peu exposée. En effet, une seule publication sur du PVOH réticulé par l'acide citrique (CTR) a été reportée [160]. De plus, l'utilisation des CDs, qui apportent la possibilité de complexer les antimicrobiens afin de les stabiliser, les protéger ou de retarder leur libération, est peu exploitée. En effet, seule une étude couplant les CDs et le PVOH a été développée [220].

Le but de notre travail est donc de réaliser un film à contact alimentaire antimicrobien à la fois par libération d'un conservateur et par contact direct, tel que présenté en Figure S. 1.

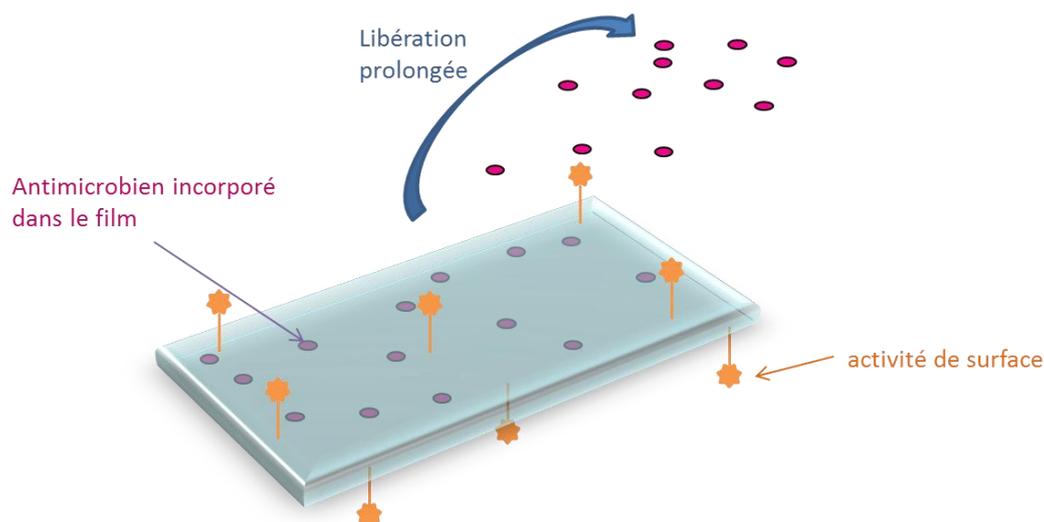


Figure S. 1. Représentation schématique d'un film à libération d'antimicrobien et possédant une activité de surface

La stratégie que nous avons adoptée tient compte des contraintes et cahiers des charges imposés par l'emballage alimentaire, du caractère innovant par rapport à la littérature et de la prise en compte des critères écologiques et économiques. La problématique du travail, ainsi que les critères de choix des réactifs sélectionnés pour cette étude sont résumés sur la Figure S. 2.

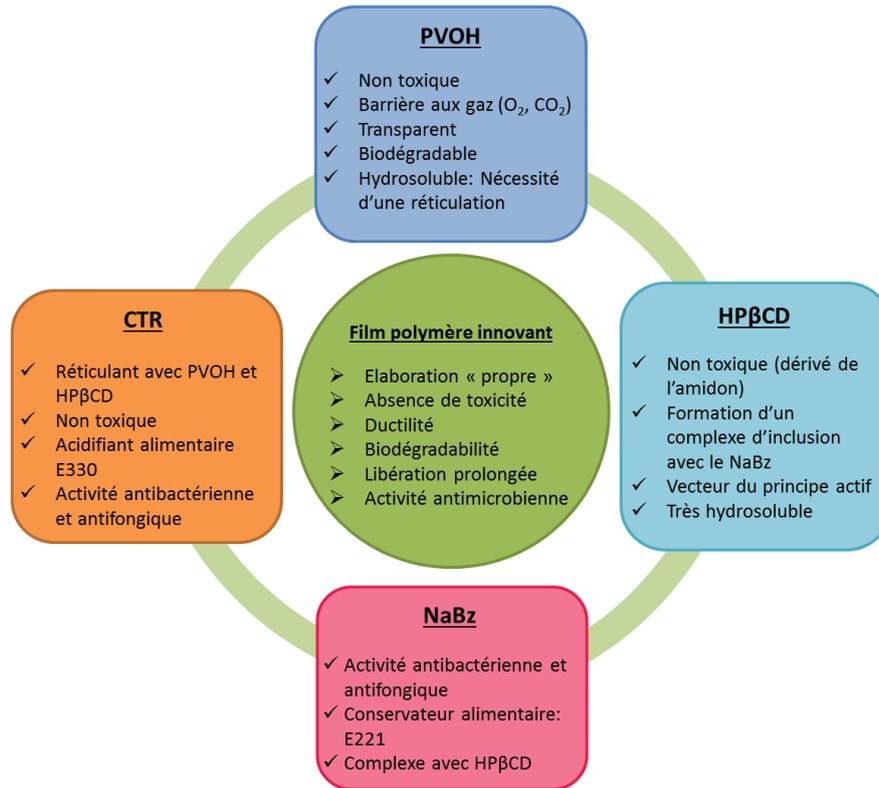


Figure S. 2. Propriétés des réactifs choisis pour l'élaboration d'un film polymère à libération prolongée d'agent antimicrobien pour l'emballage alimentaire

La matrice polymère choisie est le PVOH qui possède des caractéristiques favorables à la fabrication d'emballage alimentaire : bonnes propriétés barrière à l'O₂ et au CO₂, hygroscopie, transparence, non-toxicité et biodégradabilité. Cependant, en raison de son hydrosolubilité, il ne peut pas être au contact direct des aliments hydratés. Cette caractéristique est à l'origine de son utilisation insérée dans des systèmes multicouches. Pour contourner cet inconvénient, la voie envisagée est la réticulation. Le CTR est un candidat intéressant pour la réticulation du PVOH : il est non toxique et autorisé en alimentaire (E330). Il a également montré son efficacité dans la réticulation des cyclodextrines, qui en plus grâce à leur cavité hydrophobe permettent la complexation d'un grand nombre d'agents antimicrobiens. L'association PVOH/CD semble une voie prometteuse, aujourd'hui peu explorée, pour la libération prolongée d'un antimicrobien. La CD choisie pour l'étude est l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPβCD) qui est un dérivé de la βCD autorisée comme additif alimentaire (E459). Elle a une hydrosolubilité environ 50 fois supérieure à celle de la βCD, ce qui en fait un composé idéal pour la préparation par voie aqueuse. La Figure S. 3 présente le mécanisme envisagé pour la formation d'un réseau tridimensionnel entre PVOH et HPβCD via la réticulation par le CTR.

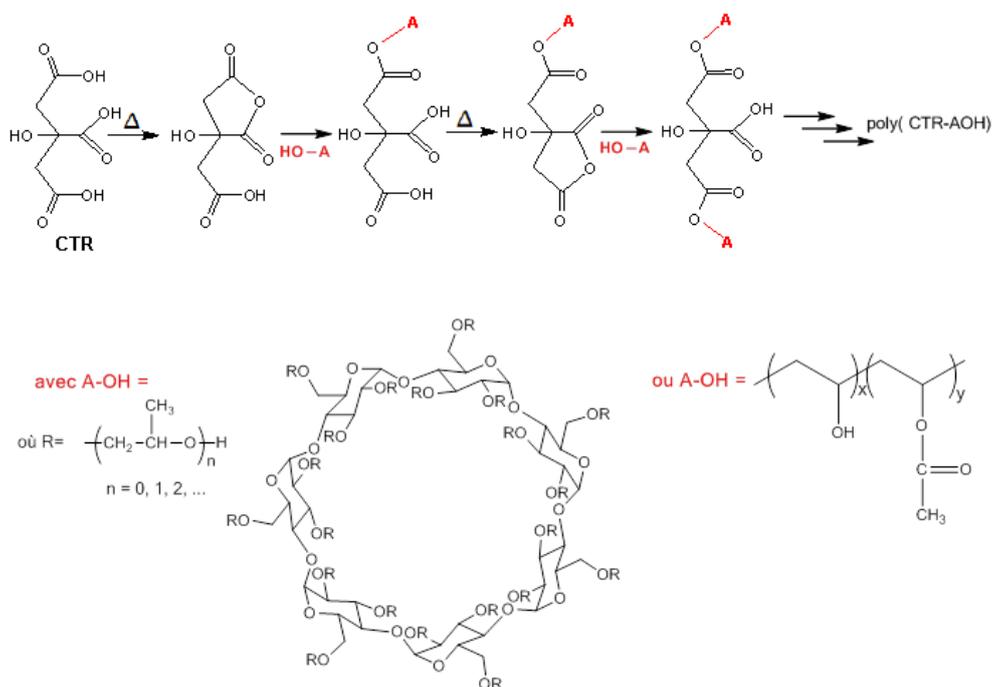


Figure S. 3. Mécanisme général de polyestérification entre des CTR et des composés hydroxylés

Le CTR présente l'avantage d'être actif contre les bactéries, levures et moisissures. Son utilisation dans le procédé de réticulation engendre des fonctions carboxyliques résiduelles greffées qui permettent d'envisager une activité par contact direct avec l'aliment, complémentaire de la libération d'agent antimicrobien. La température de réticulation de 130 °C a été choisie sur la base de travaux précédents, réalisés au laboratoire, portant sur la réticulation de la β CD par le CTR [5].

Pour la propriété de libération des films, l'agent antimicrobien choisi pour l'étude est le benzoate de sodium (NaBz), conservateur alimentaire sous le code E211. Le NaBz est un sel de l'acide benzoïque et a une solubilité dans l'eau supérieure à celui-ci. L'acide benzoïque étant connu pour sa capacité à former des complexes avec la β CD et HP β CD, la formation d'un complexe entre NaBz et HP β CD est envisageable. De plus le NaBz absorbant dans l'UV, il est un bon modèle pour le suivi de la libération par les films. Notons que des films de PVOH avec ou sans HP β CD seront étudiés. Un autre antimicrobien, la nisine (peptide bactériocine), sera utilisé à titre de comparaison pour les tests antimicrobiens sur gélose. La Figure S. 4 modélise les deux voies et les étapes envisagées pour la réalisation des films.

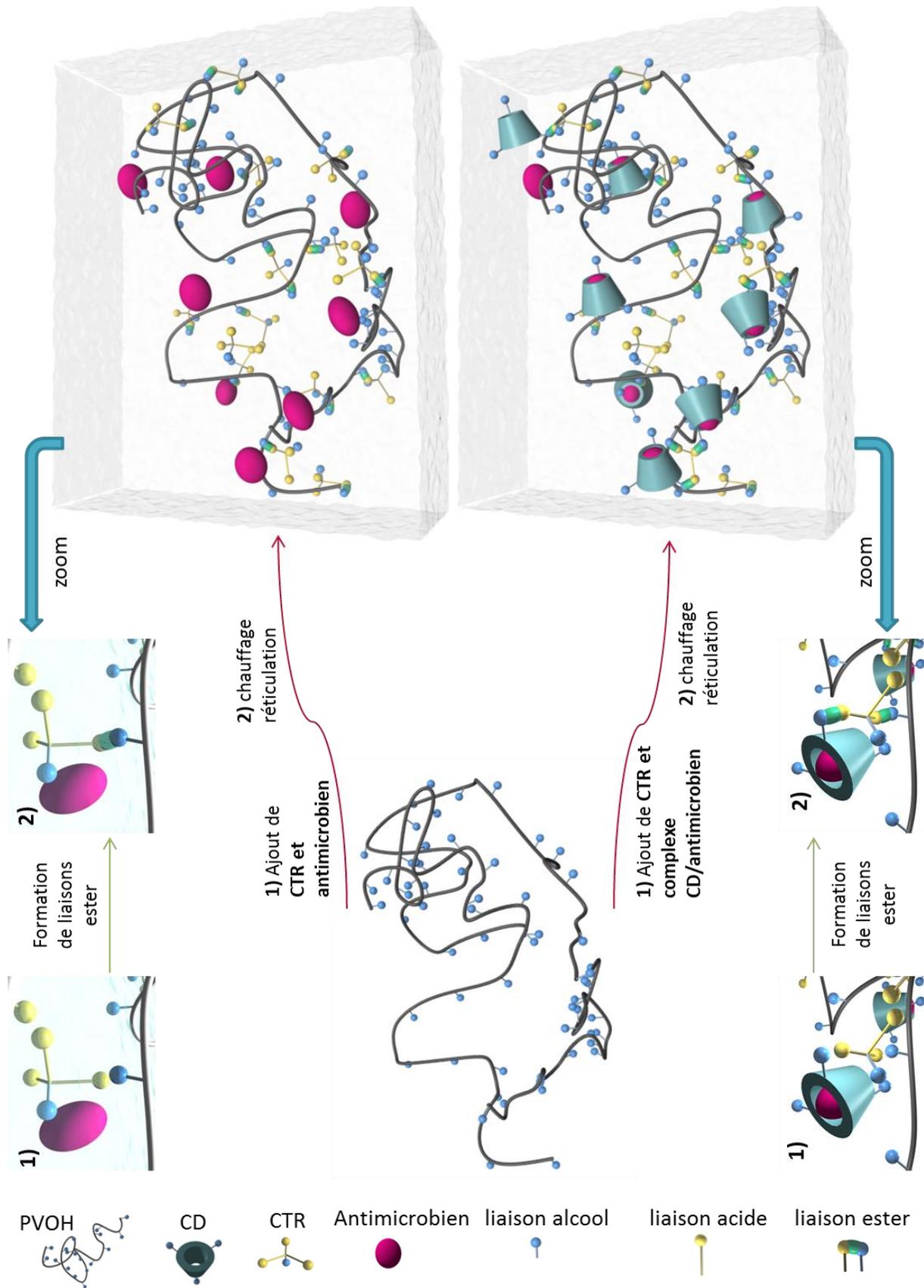


Figure S. 4. Modélisation des étapes pour la réalisation de films chargés avec ou sans CD

Deuxième Partie : Partie Expérimentale

Chapitre V :
Produits, Matériels et Elaboration des
Films

I. TABLEAU RECAPITULATIF DES PRODUITS UTILISES

Les caractéristiques des produits utilisés dans cette étude sont détaillées dans le Tableau V.I. 1. Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) des produits sont présentées en Annexe 2 (Figure A. 1 à Figure A. 7).

Tableau V.I. 1. Présentation et caractéristiques des produits utilisés

Produit	Formule	Fournisseur	N° CAS	Masse Molaire (g.mol ⁻¹)	Spécificité	Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹)	Forme
Poly(alcool vinylique) (PVOH88)	[CH ₂ CH(OH)] _n -[CH ₂ CH(OOCCH ₃)] _m	Aldrich Chemical Company, Inc.	9002-89-5	31000 – 50000	87-89% hydrolysé	> 25 (90 °C)	Poudre de petits granulés blancs
Hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPβCD) Kleptose® HPB	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ .(C ₃ H ₆ O) ₇ *MS	Roquette	128446-35-5	1399	MS* = 0,65 Teneur en humidité : 5 % max	> 1000 (25 °C)	Poudre blanche
Maltodextrine (MX)	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n avec 2<n<20	Roquette	9050-36-6	1100	/	N/A	Poudre blanche
Acide citrique monohydraté (CTR)	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	Aldrich Chemical Company, Inc.	5949- 29-1	210	/	592 (20 °C)	Poudre blanche
Hypophosphite de sodium monohydraté	NaH ₂ PO ₂ .H ₂ O	Aldrich Chemical Company, Inc.	10039-56-2	106	/	1000 (20 °C)	Poudre blanche
Benzoate de sodium (NaBz)**	C ₇ H ₅ NaO ₂	Prolabo	532-32-1	144	pKa = 4,2	650 (25 °C)	Poudre blanche
Nisine** de <i>Lactococcus lactis</i>	C ₁₄₃ H ₂₃₀ N ₄₂ O ₃₇ S ₇	Aldrich Chemical Company, Inc.	1414-45-5	3354	/	[221] : pH 2 : 57 pH 3-7 : diminution avec pH [^] pH 8-12 : 0,25 (25°C)	Poudre jaune clair

*MS = molar substitution : nombre moyen de groupes hydroxypropyles par unité glucose anhydre.

**Les charges utilisées (lignes roses du tableau) pour l'élaboration des films sont le NaBz et la nisine (peptide), classés comme conservateurs alimentaires sous les codes E211 et E234 respectivement.

II. DETERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DU PVOH PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Le polymère utilisé pour l'élaboration des films est un copolymère d'alcool vinylique et d'acétate de vinyle. Afin de vérifier sa structure chimique et en particulier quantifier son taux d'hydrolyse, une étude RMN ¹H a été réalisée sur ce copolymère (PVOH88), un PVOH hydrolysé à

99% (PVOH99, Aldrich Chemical Company, Inc., \overline{M}_w : 31000 – 50000 g.mol⁻¹) et un poly(acétate de vinyle) (PVAc, Janssen Chimica, \overline{M}_w : 170000 g.mol⁻¹) ayant été pris comme référence. L'étude a été réalisée dans le DMSO, un solvant de ces trois polymères. Les spectres sont présentés en Figure V.II. 1.

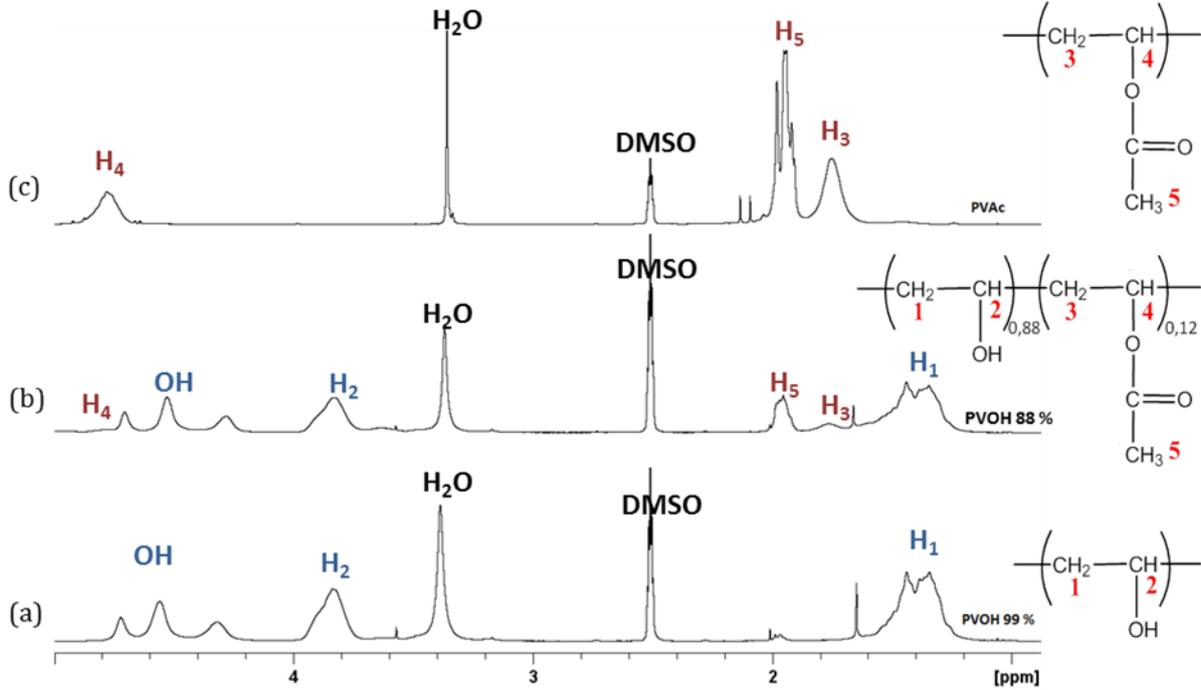


Figure V.II. 1. Spectres RMN ¹H liquide de PVOH99 (a), PVOH88 (b) et PVAc (c) dans DMSO

L'attribution des pics observés par RMN ¹H liquide est résumée dans le Tableau V.II. 1.

Tableau V.II. 1. Attribution des pics observés par RMN ¹H liquide pour le PVOH99, le PVAc et le PVOH88

DMSO ¹ H liquide	δ (ppm)	Intégration	attribution
PVOH99[222]	4,72 - 4,32	1	OH
	3,84	0,97	H ₂ (CH)
	1,65 - 1,34	2,07	H ₁ (CH ₂)
PVAc[222]	4,78	1	H ₄ (CH)
	2,13 - 1,91	2,9	H ₅ (CH ₃)
	1,75	1,9	H ₃ (CH ₂)
PVOH88	4,8	-	H ₄ (CH)
	4,70 - 4,29	1	OH
	3,83	0,92	H ₂ (CH)
	1,97	0,53	H ₅ (CH ₃)
	1,77	0,10	H ₃ (CH ₂)
	1,66 - 1,35	2,16	H ₁ (CH ₂)

Deuxième partie : Partie expérimentale

L'étude RMN ^1H du PVOH88 permet de calculer son taux d'hydrolyse pour le confronter à celui indiqué par le fournisseur. Le taux d'hydrolyse est calculé par le rapport des aires sous la courbe, selon l'expression suivante :

$$\text{Taux Hydrolyse} = \frac{\text{Aire}(H_{\text{VOH}})}{\text{Aire}(H_{\text{VOH}}) + \text{Aire}(H_{\text{Vac}})} \times 100$$

Dans notre cas, nous choisissons le proton H_1 pour le motif alcool vinylique et le proton H_5 pour le motif acétate de vinyle.

$$\text{Taux Hydrolyse} = \frac{\frac{\text{Aire}(H_1)}{2}}{\frac{\text{Aire}(H_1)}{2} + \frac{\text{Aire}(H_5)}{3}} \times 100$$

$$\text{Taux Hydrolyse} = \frac{\frac{2,16}{2}}{\frac{2,16}{2} + \frac{0,53}{3}} \times 100 = 86\%$$

Le taux d'hydrolyse obtenu par cette technique est proche de celui indiqué par le fournisseur, à savoir 87 – 89 %.

Lors d'études RMN exposées ultérieurement, d'autres conditions telles que des analyses dans le D_2O ou à l'état solide seront nécessaires. Les spectres du PVOH88 obtenus dans ces deux conditions sont donnés ci-après (Figure V.II. 2 et Figure V.II. 3).

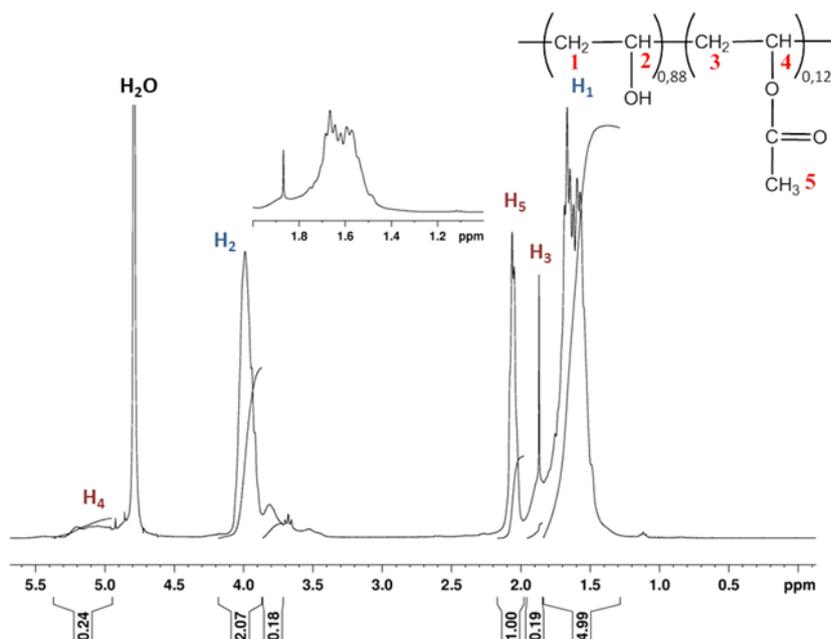


Figure V.II. 2. Spectre RMN ^1H liquide du PVOH88 dans D_2O

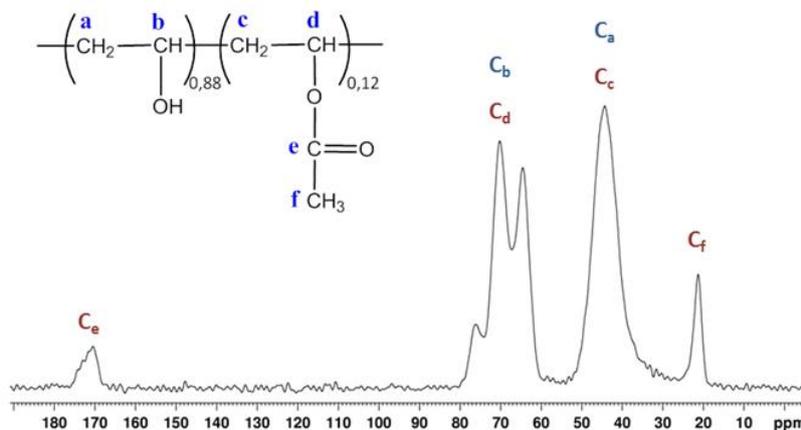


Figure V.II. 3. Spectre RMN ^{13}C solide du PVOH88

Les attributions des pics observés par RMN ^1H liquide et ^{13}C solide sont présentées dans le Tableau V.II. 2.

Tableau V.II. 2. Attribution des pics observés par RMN ^1H liquide et ^{13}C solide pour le PVOH88

^1H liquide (D_2O)			^{13}C solide	
δ (ppm)	Multiplicité	attribution	δ (ppm)	Attribution [223-228]
5,06	Multiplet	H ₄ (CH)	170	C _e
3,99	Multiplet	H ₂ (CH)	76 - 65	C _b , C _d caché sous le massif vers 67 ppm [225]
2,06	Multiplet	H ₅ (CH ₃)	44	C _a , C _c
1,87	Multiplet	H ₃ (CH ₂)	21	C _f
1,87 - 1,57	Multiplet	H ₁ (CH ₂)		

III. ELABORATION DU COMPLEXE HPBCD-NABZ

Un complexe d'HP β CD et de NaBz est préparé afin d'être incorporé ultérieurement dans certains films. Dans la littérature, il a été montré que l'acide benzoïque forme avec l'HP β CD un complexe d'inclusion de stœchiométrie 1:1 (Figure V.III. 1) [45]. Aucun résultat n'ayant été rapporté entre l'HP β CD et le NaBz, une étude RMN sera réalisée afin de comprendre la nature des interactions entre l'HP β CD et le NaBz et exposée au Chapitre VIII (page 162).

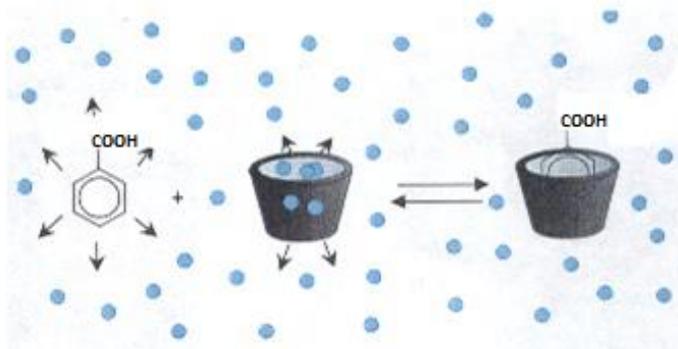


Figure V.III. 1. Représentation schématique de la formation d'un complexe [HPβCD : acide benzoïque]

Pour citer le complexe, on utilise la notation suivante: [HPβCD : NaBz] $x : y$, où x et y correspondent à la proportion molaire en HPβCD et en NaBz respectivement. Pour notre étude, nous avons préparé des complexes [HPβCD : NaBz] 1 :1. Pour cela, l'HPβCD et le NaBz sont dissous dans l'eau distillée dans des proportions équimolaires (concentration = 0,158 mol/L). Le mélange est agité une nuit à température ambiante, puis mis au congélateur pendant 24h. Afin d'obtenir le complexe sous forme de poudre, le mélange congelé est lyophilisé pendant au moins 24h.

IV. PREPARATION DES FILMS

Pour la suite de l'étude le terme PVOH se rapportera au PVOH88.

IV.1 Elaboration des films de PVOH

Des films réalisés par casting ont été comparés à un film moulé sous presse choisi comme référence. Le film moulé est obtenu par thermocompression de la poudre de PVOH à 220 °C et 50 bars durant 5 minutes. Il est refroidi jusqu'à température ambiante à une vitesse de 1 °C/min.

Les films de PVOH non réticulés préparés par la méthode dite de « casting » sont obtenus par dissolution du PVOH dans l'eau distillée. Afin d'étudier l'impact de la dilution de la solution de PVOH sur les propriétés thermomécaniques des films, différentes concentrations de PVOH (1, 5 et 17 wt%) ont été préparées. Les concentrations des solutions de PVOH sont exprimées en masse de PVOH par rapport à la masse totale de la solution. Deux méthodes : autoclave (120°C - 30min) ou agitation mécanique (75°C à 90°C - 150 rpm - 3h à 5h) ont été utilisées. La solution homogène est ensuite refroidie lentement à température ambiante et sur banc oscillant, puis

versée dans un moule en silicone et séchée sous hotte durant une nuit. Le volume versé détermine l'épaisseur des films, qui est de $120 \pm 20 \mu\text{m}$.

IV.2 Elaboration des films de PVOH réticulés

Afin d'étudier la réaction de réticulation du PVOH par le CTR, avec ou sans dextrine, des films de différentes compositions ont été formulés et réticulés à des temps croissants et à 130°C . Dans certains cas, le NaBz, qui ne participe pas à la réaction de réticulation, sera ajouté en tant que charge. La Figure V.IV. 1 illustre le principe d'élaboration des films.

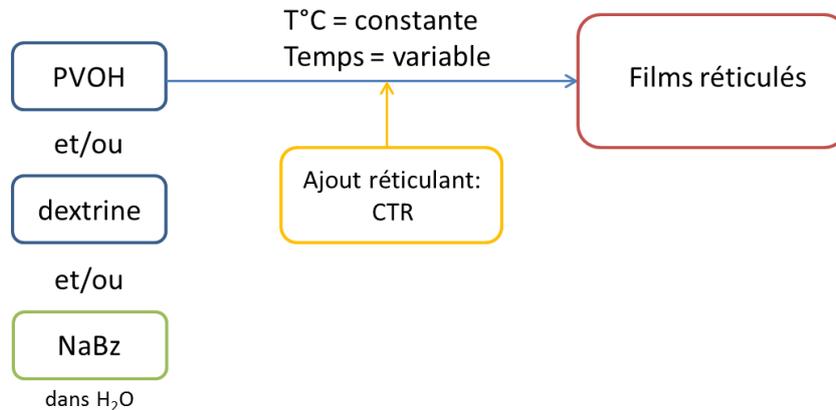


Figure V.IV. 1. Diagramme général pour l'élaboration des films

Les sept types de films réalisés sont présentés dans le Tableau V.IV. 1.

Tableau V.IV. 1. Différents types de films réalisés

Films non chargés	Films chargés
PVOH/CTR	PVOH/NaBz/CTR
PVOH/HP β CD/CTR	PVOH/[HP β CD-NaBz]/CTR*
	PVOH/HP β CD/NaBz/CTR**
PVOH/MX/CTR	PVOH/[MX-NaBz]/CTR***

*La notation [HP β CD-NaBz] correspond au complexe, préalablement élaboré, incorporé dans le film.

**Mélange physique

***La notation [MX-NaBz] correspond à un mélange maltodextrine et NaBz réalisé selon le même protocole que le complexe.

Nous avons envisagé 2 procédés de dissolution ainsi que 3 montages pour la réticulation lors de l'élaboration des films par casting. Ils sont regroupés et schématisés sur la Figure V.IV. 2.

Deuxième partie : Partie expérimentale

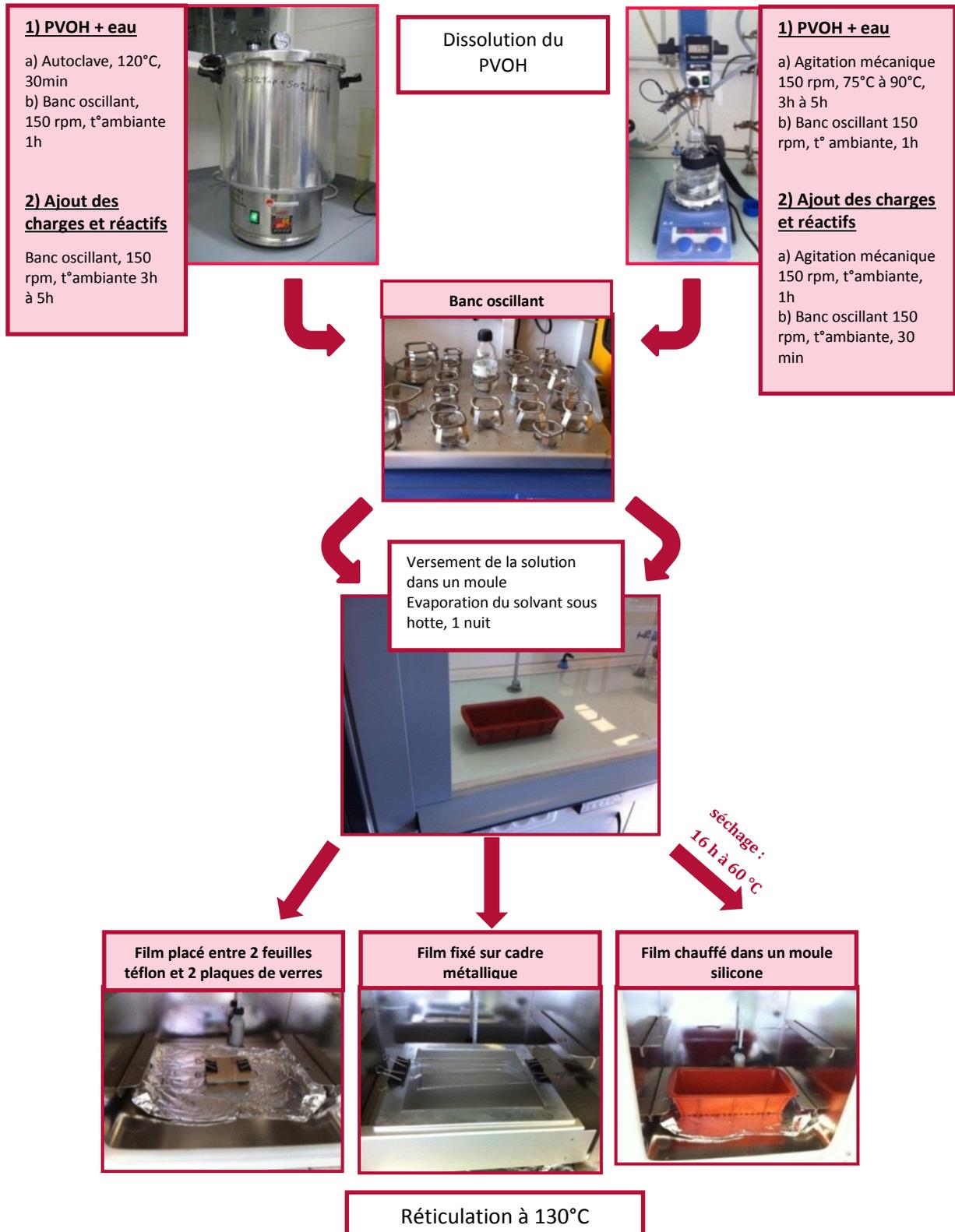


Figure V.IV. 2. Schéma de l'ensemble des protocoles utilisés pour préparer les films par casting

IV.2.1 Cas des films non chargés

Les films **PVOH/CTR** réticulés sont préparés en ajoutant du CTR et le catalyseur ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à 6 g.L^{-1}) à une solution de PVOH homogène à température ambiante. La concentration finale en produits est égale à 5 wt%. Après agitation, la solution homogène est versée dans un moule en silicone et séchée sous hotte durant une nuit. Afin d'étudier l'influence de la réticulation, plusieurs formulations de PVOH/CTR sont préparées, 90/10, 80/20, 70/30 et 60/40. Les pourcentages sont exprimés en masse des produits dans le film sec.

Les films **PVOH/Dextrine/CTR** réticulés sont préparés en suivant le même protocole que pour les films sans dextrine. Dans le cas d'HP β CD, sa quantité découle directement de la quantité de charge NaBz à incorporer. En effet, dans un premier temps afin d'avoir un ordre de grandeur, la quantité de conservateur a été fixée selon la directive européenne donnant la limite pour la migration des constituants pour les emballages alimentaires à 10 mg/dm^2 [20]. En prenant en compte une libération totale du NaBz, celui-ci serait limité à 0,7 wt% dans le film. Par conséquent, dans le cas d'un complexe équimolaire entre HP β CD (1399 g.mol^{-1}) et NaBz (144 g.mol^{-1}), la quantité nécessaire d'HP β CD serait de 7 wt%. Pour l'étude, la proportion a été arrondie à la dizaine supérieure, soit une composition de PVOH/HP β CD/CTR de 80/10/10. Afin d'étudier l'impact de l'HP β CD sur les propriétés des films, d'autres compositions seront également étudiées.

Remarque : Notons toutefois que dans notre cas, en qualité de substance active, le NaBz est en réalité régi par la législation sur les additifs et enzymes dans les aliments (cf Chapitre I – I.4), notamment par la directive 95/2/CE [46].

IV.2.2 Cas des films chargés en agent antimicrobien

Pour les films chargés en NaBz, le même protocole que précédemment est suivi. Pour les films sans HP β CD, le NaBz seul est ajouté à la solution de PVOH avec le CTR. Pour les films avec l'HP β CD, un complexe [HP β CD : NaBz] 1 :1 préparé préalablement (protocole page 106) ou un mélange physique HP β CD/NaBz 1 :1 est ajouté. Pour les films avec la MX, un mélange équimolaire [MX-NaBz], préparé préalablement, est ajouté.

Des films chargés en nisine avec ou sans HP β CD ont également été réalisés. Dans le cas des films avec HP β CD, un mélange de même rapport massique qu'avec le NaBz (1/10) a été préalablement réalisé selon le même protocole que pour le complexe avec le NaBz.

Pour les différentes études, des films d'une épaisseur de $120 \pm 20 \mu\text{m}$ ont été réalisés, sauf pour l'étude microbiologique qui a nécessité des films plus épais ($500 \pm 150 \mu\text{m}$).

IV.2.3 Réticulation des films

La réaction de réticulation attendue est présentée en Figure V.IV. 3.

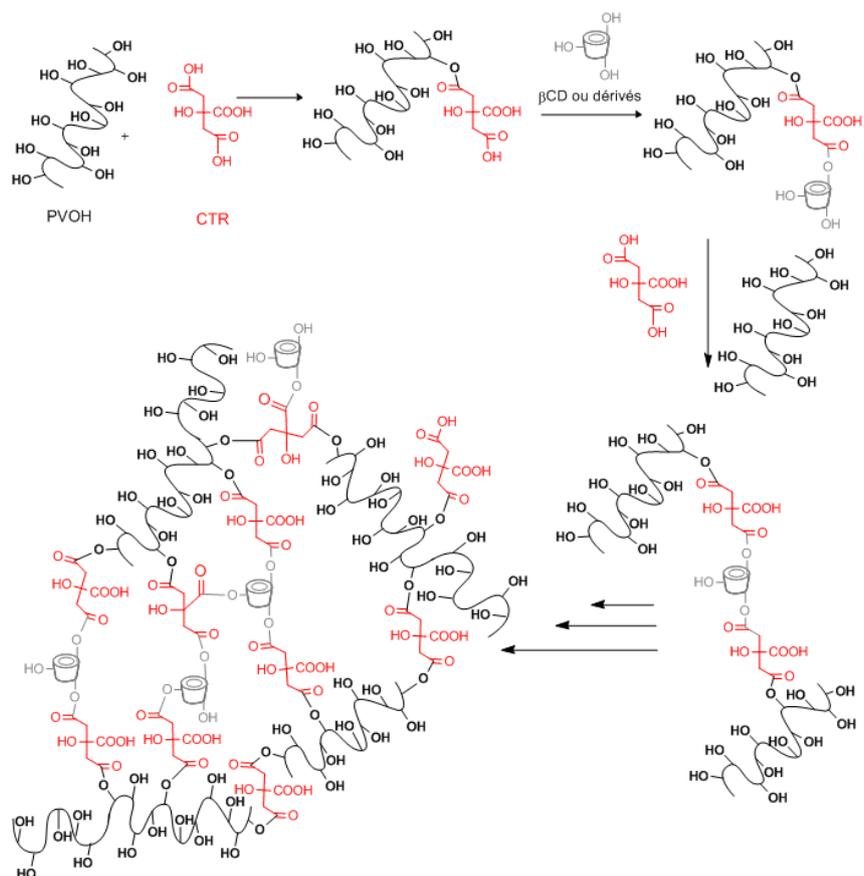


Figure V.IV. 3. Formation du réseau PVOH/HPβCD par la réaction de réticulation avec le CTR

Le traitement thermique permet de réticuler les films grâce à la formation de liaisons esters entre les fonctions hydroxyles du PVOH et/ou de l'HPβCD et les fonctions acides du CTR.

Après évaporation dans le moule, une fois le film formé, on procède à un traitement thermique (130°C - 0 à 1440 min) en étuve afin de réticuler le film. Trois procédés sont utilisés pour la réticulation comme schématisé sur la Figure V.IV. 2.

- Le film est placé entre deux feuilles de téflon, elles-mêmes placées entre deux plaques de verre.
- Le film est chauffé directement dans le moule en silicone (après un séchage préalable de 16 h à 60 °C).
- Le film est placé sur un cadre métallique.

Chapitre VI :
Techniques de caractérisation

Les films réalisés sont caractérisés afin de comprendre la réaction de réticulation mise en jeu et d'identifier l'influence de celle-ci sur les propriétés mécaniques et structurales. De plus, en vue de l'application en tant que films antimicrobiens, la cinétique de libération du NaBz dans des simulants alimentaires et leur activité antimicrobienne sont étudiées.

I. CONDITIONNEMENT PREALABLE DES FILMS

Afin de maîtriser la quantité d'eau contenue dans les films caractérisés, on leur fait subir un traitement préalable avant de les analyser. Deux types de séchage seront réalisés, soit sous vide à température ambiante durant 2-3 jours pour les tests mécaniques, soit à 60°C durant 16h pour tous les autres tests (films dits « séchés »). Par ailleurs, un conditionnement dans un milieu d'humidité contrôlée (58% H.R. ou 98% H.R.) est réalisé à température ambiante pendant 3-4 jours. Les milieux d'humidité contrôlée sont obtenus par l'utilisation d'une solution aqueuse saturée en sel placée dans un dessiccateur : NaBr pour un milieu à 58% H.R. et KNO₃ pour un milieu à 98% H.R. Le PVOH étant hygroscopique, l'étudier selon ces trois conditionnements différents permet de comprendre l'influence de l'humidité sur les propriétés des films. De plus, 58 % H.R. et 98 % H.R. permettent de simuler les conditions réelles d'utilisation des emballages. En effet, 58 % H.R. est proche de l'atmosphère ambiante et 98 % H.R. simule l'emballage d'aliments hydratés. Les films séchés sont choisis comme référence.

II. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est utilisée pour caractériser les films, le complexe [HPβCD : NaBz] et la réaction de réticulation. Les analyses ont été effectuées au centre commun de RMN de l'Université Lille 1.

La RMN (CPMAS) du ¹³C des films à l'état solide a été réalisée afin de vérifier qualitativement leur composition. Les spectres RMN solide du carbone ¹³C ont été enregistrés sur un spectromètre de 400 MHz Bruker Advance™ 400. Les films non conditionnés sont transformés en poudre par broyage dans un mortier à l'aide d'un pilon après immersion dans de l'azote liquide. Les spectres des produits initiaux, pour comparaison, sont présentés sur les Figure V.II. 3 (cf. Chapitre V), et en Annexe 2 (Figure A. 2, Figure A. 4(b), et Figure A. 7).

La RMN ¹H en milieu liquide a été choisie pour mettre en évidence la présence éventuelle de réactifs résiduels en fonction du temps de réticulation. Pour cela, un échantillon de film (0,2 g) est immergé dans 20 mL d'eau distillée sous agitation durant 3 jours. Une fois le film ôté, la

solution est mise au congélateur pendant 24h puis lyophilisée. La poudre obtenue est solubilisée à nouveau dans l'eau deutérée (D_2O), congelée et lyophilisée une deuxième fois. La poudre obtenue est ensuite analysée par RMN afin d'identifier les composés libérés par le film. Les spectres RMN liquide du proton 1H ont été réalisés sur un spectromètre de 300 MHz Bruker Advance™ 300. Les spectres RMN 1H des produits initiaux, ont été présentés sur la Figure V.II. 2 (cf. Chapitre V) et en Annexe 2 (Figure A. 1, Figure A. 3, Figure A. 4(a), Figure A. 5 et Figure A. 6).

La RMN liquide du proton 1H a également été utilisée pour étudier les complexes [HP β CD : NaBz]. Les spectres RMN liquide du proton 1H dans D_2O du complexe ont été réalisés sur un spectromètre de 400 MHz Bruker Advance™ 400.

Une séquence ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) a été réalisée sur un mélange équimolaire (15 mM) de l'HP β CD et du NaBz, de façon à mettre en évidence l'existence d'un complexe.

La stœchiométrie du complexe a été déterminée à partir de données RMN par la méthode des variations continues (méthode de JOB) [229].

III. SPECTROSCOPIE RAMAN

La spectroscopie Raman est une spectroscopie vibrationnelle. Elle permet d'obtenir des renseignements différents et complémentaires de ceux obtenus par infrarouge. Pour notre étude, la spectroscopie infrarouge n'étant pas assez sensible, la spectroscopie Raman a été choisie pour mettre en évidence la présence du NaBz dans les films, en particulier sa répartition spatiale. Les films sont analysés avec un microspectromètre Raman (LabRam, Horiba scientific), équipé d'un laser HeNe émettant à 632,8 mW (microscope optique avec un objectif 100X), entre 200 et 3200 cm^{-1} . Pour la répartition spatiale, on réalise une cartographie sur 1 cm^2 de la bande à 1000 cm^{-1} , correspondant aux CH du cycle aromatique du NaBz, avec un pas de 200 μm . Les analyses ont été effectuées au laboratoire LASIR de l'Université Lille 1.

IV. DOSAGE DES FONCTIONS CARBOXYLIQUES

Les fonctions acides carboxyliques résiduelles présentes dans les films renseignent sur l'avancement de la réaction de réticulation. Pour cela, les fonctions sont dosées par la méthode de titration par l'acétate de calcium [230]. Cette méthode consiste à immerger un échantillon de film séché (0,1 g) dans 100 mL d'une solution aqueuse d'acétate de calcium (2 wt%) sous agitation sur un banc oscillant durant 2h. La réaction mise en jeu est présentée sur la Figure VI.IV. 1.

Deuxième partie : Partie expérimentale



Figure VI.IV. 1. Formation de l'acide acétique par la méthode à l'acétate de calcium

L'acide acétique formé est titré avec de la soude 0,025 N par pHmétrie. Trois réplicats sont réalisés pour chaque film.

Le nombre de fonctions carboxyliques dosées est ramené à la masse de film séché selon la relation suivante :

$$COOH \text{ (mol/g)} = \frac{[NaOH] \times V_{eq}}{m_{\text{echantillon}}}$$

V. ANALYSES THERMIQUES

V.1 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) permet de suivre la variation de la masse d'un produit en fonction de la température. Dans notre cas, cette technique permettra de déterminer la teneur en eau et la température de dégradation des films. Les mesures sont réalisées avec un appareil (TGA Q50 TA Instruments), équipé d'un four EGA (Evolved Gaz Analyser), à une vitesse de 5°C/min de la température ambiante à 650°C, sous azote (50mL/min dans le four et 10mL/min dans la balance).

V.2 Analyse enthalpique différentielle à balayage (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle (DSC) est basée sur la mesure de la différence de flux de chaleur nécessaire pour maintenir une référence et un échantillon à la même température. Elle renseigne sur la température de transition vitreuse (T_g), la température de fusion (T_f) et le taux de cristallinité massique de nos échantillons. Les mesures sont faites avec un appareil TA Instruments Q100 sous azote ultra pur à 10°C/min.

L'ensemble des films est analysé lors du premier passage, entre 0 °C et 220 °C pour les films de PVOH séchés et entre -70°C et 220°C pour les films de PVOH conditionnés à 58 %H.R. et 98 %H.R. Les films de PVOH/CTR, avec ou sans HPβCD, séchés sont analysés entre 0°C et 150°C. Les mêmes films de PVOH/CTR, avec ou sans HPβCD, conditionnés à 58% H.R. sont analysés entre -70°C et 150°C. La température de transition vitreuse (T_g) est choisie à l'onset du saut de

Cp (capacité calorifique) et la température de fusion (T_f) au maximum du pic endothermique. La cristallinité massique est calculée en utilisant la valeur de 162 J/g pour la valeur d'enthalpie de fusion standard d'un cristal parfait de PVOH [231-233]. Trois réplicats sont effectués pour chaque film.

VI. DIFFRACTION DES RAYONS X

La diffraction des rayons X aux grands angles ou WAXS (Wide Angle X-ray Scattering) est utilisée pour identifier la structure cristalline des films et son évolution en fonction de leur formulation.

Les analyses ont été effectuées sur un diffractomètre équipé d'une anode tournante Rigaku, en travaillant à une tension d'accélération de 50 kV et une intensité de 100 mA. Le faisceau produit, de longueur d'onde $K\alpha = 1,54 \text{ \AA}$, est collimaté à l'aide de miroirs Osmic et les clichés sont collectés sur un détecteur imaging plate MAR345. Pour obtenir les spectres d'intensité intégrée $I = f(2\theta)$, les images ont été intégrées à l'aide du logiciel FIT2D.

Les expériences sont réalisées en transmission à température ambiante avec un temps d'exposition de 5 minutes.

VII. CARACTERISATIONS MECANIQUES

Le comportement mécanique est un critère important pour la mise en forme et la qualité d'un emballage. Il a été évalué par analyse mécanique dynamique (DMA) et en traction uniaxiale.

VII.1 Analyse Mécanique Dynamique (DMA)

Le comportement mécanique dynamique des matériaux est étudié afin de déterminer leurs relaxations mécaniques.

L'échantillon est soumis à une déformation sinusoïdale de la forme : $\varepsilon(t) = \varepsilon_0 \cdot \sin(\omega t)$ avec $\varepsilon(t)$ l'amplitude du cycle de déformation, ω la pulsation (rad/s) et t le temps en secondes. La réponse de l'échantillon est mesurée simultanément. Elle est également sinusoïdale mais déphasée d'un angle δ . Elle est de la forme : $\sigma(t) = \sigma_0 \cdot \sin(\omega t + \delta)$. Le rapport entre la réponse et la déformation définit le module dynamique complexe d'Young E^* défini par :

$$E^* = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)} = E' + iE''$$

avec E' (module de conservation) qui caractérise la rigidité du matériau et E'' (module de perte visqueuse) qui est proportionnel à l'énergie dissipée dans le matériau sous forme de frottements visqueux. On définit également $\tan \delta = E''/E'$ qui est le facteur de perte visqueuse ou d'amortissement (ce facteur de perte correspond à la dissipation d'énergie lors de la sollicitation).

Cette technique permet de déterminer la température de relaxation principale associée à la transition vitreuse ($T\alpha$), qui correspond à la transition entre le plateau vitreux et le plateau caoutchoutique. L'expérimentation est réalisée à l'aide d'un viscoanalyseur TA RSA3 à une fréquence de 1 Hz utilisant une amplitude de déformation dynamique $\varepsilon_0 = 0,05 \%$ entre -50°C et 150°C . Les échantillons sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce. La géométrie des échantillons est un rectangle de 6 mm de largeur et de 10 mm de longueur utile. La température $T\alpha$ est choisie au maximum du pic de la courbe $\tan\delta = f(T^\circ\text{C})$.

VII.2 Traction uniaxiale

Les propriétés mécaniques ont été déterminées en traction uniaxiale qui consiste à mesurer la contrainte uniaxiale en fonction de la déformation de l'éprouvette à une vitesse d'allongement fixée. La déformation nominale (ε) est l'allongement relatif du film, soit $\varepsilon = \frac{L-L_0}{L_0}$ où L est la longueur du film étiré et L_0 sa longueur initiale. La contrainte nominale (σ) correspond au rapport de la force appliquée F à la section droite initiale S_0 du film, soit $\sigma = \frac{F}{S_0}$. On parle de comportement fragile lorsque la rupture de l'échantillon a lieu dans le domaine élastique et de comportement ductile lorsque la rupture est précédée par une déformation plastique.

Les essais ont été réalisés sur une machine de traction de type Instron - 4466. Les éprouvettes de traction uniaxiale, découpées avec un emporte-pièce, sont en forme d'haltères de 24 mm de longueur utile et de 6 mm de largeur. Ces éprouvettes sont étirées à une température de 22°C , à une vitesse de traverse constante de $14,44 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, soit une vitesse de déformation initiale de $0,01 \text{ s}^{-1}$. Trois répliqués sont analysés pour chaque film.

VIII. MESURES DE PERMEABILITE

La perméabilité des emballages est un critère important pour la conservation des aliments et le développement des microorganismes. En effet, la connaissance de la perméabilité permet de déterminer dans des conditions fixées, la quantité de gaz i pouvant être échangée au travers d'un matériau de surface A et d'épaisseur l sous l'effet d'une différence de pression, notée ΔP , de part et d'autre de l'emballage. Le PVOH est connu pour ses bonnes propriétés barrière aux gaz (O_2 , N_2 , CO_2) et moins bonnes à la vapeur d'eau. Dans ce travail, la perméabilité des films à la vapeur d'eau et à l'oxygène a été évaluée. Les mesures ont été réalisées au sein du laboratoire GRESPI EA 4694 de l'ESIREims.



Figure VI.VIII. 1.
Echantillon de
perméabilité

Pour la réalisation des mesures de perméabilité, il est nécessaire d'avoir un matériau homogène (en épaisseur et composition) sur une surface suffisante (généralement 50 cm^2). La méthode de réalisation des films permet d'obtenir un matériau homogène de $4 \times 4,5 \text{ cm}^2$ (surface inférieure à 50 cm^2). Afin de pouvoir être inséré dans la cellule, il a donc été nécessaire d'utiliser un système de « cache » en aluminium, permettant de fixer le matériau dans la cellule malgré la plus faible surface disponible (Figure VI.VIII. 1). Le film ($4 \text{ cm} \times 4,5 \text{ cm}$) est placé entre deux feuilles d'aluminium trouées laissant apparaître, en leur centre, un cercle de film d'une aire de 5 cm^2 (Figure VI.VIII. 1). La colle epoxy (Araldite® + durcisseur), utilisée couramment dans les mesures de perméabilité, réagit avec les films réticulés par le CTR. Notre choix s'est finalement porté sur une colle cyanoacrylate à prise lente (Loctite® gel power easy).

Le principe général d'une mesure de perméabilité est le suivant. Le matériau de surface et d'épaisseur connue, est placé dans une cellule constituée de deux compartiments à température contrôlée. Les deux compartiments sont séparés par ledit matériau. Un des compartiments est balayé avec le gaz i et l'autre est balayé avec un gaz neutre (le tout contrôlés en H.R.), ainsi il existe une différence de pression de part et d'autre du matériau. La mesure consiste à suivre au cours du temps l'évolution de la quantité de gaz i dans le compartiment contenant le gaz neutre grâce à un détecteur étalonné spécifique du gaz étudié. La mesure est effectuée lorsque l'état stationnaire est atteint (soit lorsque la quantité d'oxygène ou d'eau traversant le film est constante). La circulation de gaz étant continue, la méthode utilisée est dynamique.

VIII.1 Perméabilité à la vapeur d'eau

Les mesures de perméabilité à la vapeur d'eau (WVP) sont réalisées sur un appareil PERMATRAN W@3/33 (MOCON, USA) muni d'un détecteur IR. C'est un système de mesure relative de la vitesse de transmission de la vapeur d'eau (WVTR = Water Vapour Transmission Rate). L'un des compartiments contient l'atmosphère humide obtenue grâce à un balayage d'azote humide ($35\% \leq HR \leq 90\%$) ou bien 100 % grâce à une éponge humide, et l'autre compartiment est balayé par de l'azote préalablement séché (Figure VI.VIII. 2). Lorsque la vapeur d'eau traverse le film, elle est emportée par le gaz sec à un débit déterminé vers le détecteur IR. Ce dernier émet un signal directement proportionnel à la quantité de vapeur d'eau arrivant au détecteur.

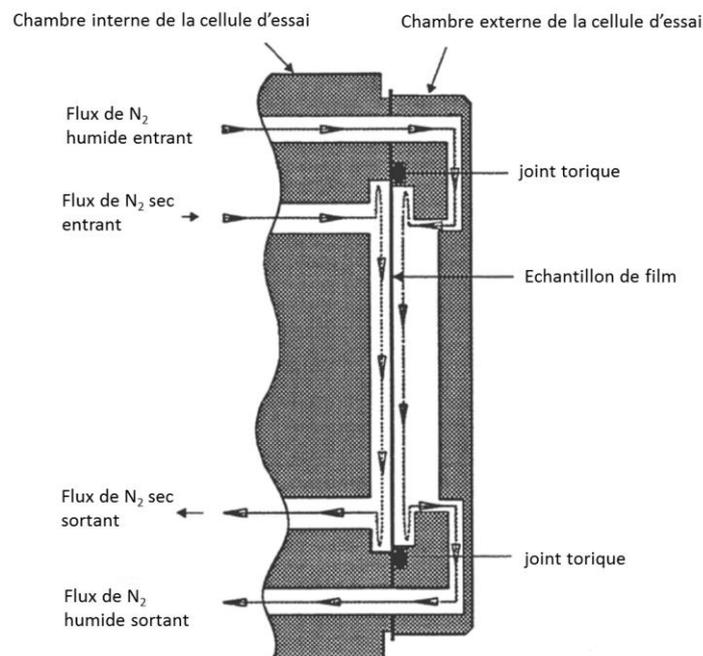


Figure VI.VIII. 2. Schéma de mesure de la perméabilité à la vapeur d'eau

L'humidité relative a été fixée à 50 % H.R. à 23 °C et le débit d'azote à 50 cm³/min (Norme ASTM F1249-90) [234]. L'échantillon est stocké 24h aux conditions atmosphériques, puis mis en équilibre 30 minutes dans l'appareil avant de recueillir les données. La perméabilité à la vapeur d'eau (WVP) est obtenue par l'équation:

$$WVP \text{ (g. mm. m}^{-2}. \text{j}^{-1}. \text{bar}^{-1}\text{)} = \frac{WVTR}{P_1 - P_2} \times l$$

où:

- $WVTR = Q/(A.t) =$ masse d'eau (Q) traversant le matériau de surface A pendant un temps t (g.m⁻².j⁻¹).

- l = épaisseur du film testé (mm).
- $P_1 - P_2$ = différence de pression de vapeur d'eau (bar) à température T de part et d'autre du film à tester.

VIII.2 Perméabilité à l'oxygène

Les mesures de perméabilité à l'oxygène (OP) sont réalisées sur un appareil OXTRAN® 2/21 MH (MOCON, USA) muni d'un détecteur coulométrique (limite de détection $10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$). C'est un système de mesure relative de la vitesse de transmission de l'oxygène (OTR = Oxygen Transmission Rate). L'un des compartiments contient l'oxygène et l'autre compartiment est balayé par de l'azote (Figure VI.VIII. 3).

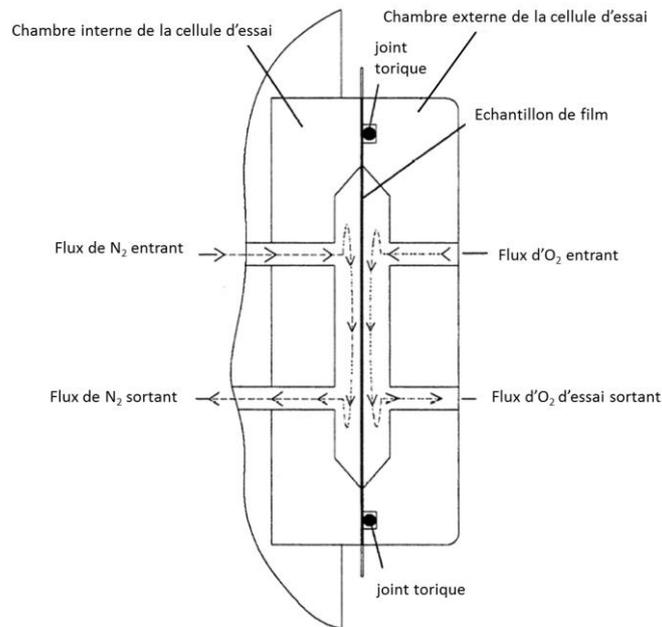


Figure VI.VIII. 3. Schéma de mesure de la perméabilité à l'O₂

L'humidité relative a été fixée à 0 % H.R. et 50 % H.R. à 23°C et le débit d'azote à 10 cm³/min (Norme ASTM F1249-90) [234]. L'étude est réalisée à 0 % H.R. afin de comparer aux valeurs connues pour le PVOH et à 50 % H.R. pour simuler les conditions d'utilisation [29]. L'échantillon est mis en équilibre 10h dans l'appareil avant de recueillir les données. La perméabilité à l'oxygène (OP) est obtenue par l'équation:

$$OP (\text{cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}) = \frac{OTR}{P_1 - P_2} \times l$$

où:

- $OTR = Q/(A.t) =$ volume d'oxygène (Q) traversant le matériau de surface A pendant un temps t ($\text{cm}^3.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}$).
- l = épaisseur du film testé (mm).
- $P_1 - P_2 =$ différence de pression d'oxygène (bar) à température T de part et d'autre du film à tester.

IX. CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DU NABZ PAR SPECTROSCOPIE

La directive 85/572/CEE préconise quatre types de simulants pour étudier la libération de charges contenues dans les emballages alimentaires, qui sont l'eau distillée, l'acide acétique à 3%, l'éthanol à 15% et l'huile rectifiée [20]. De plus, selon le règlement 10/2011/CE, l'eau distillée est utilisée pour l'évaluation de la migration globale lorsque l'application vise tous les types de denrées alimentaires [26]. Nous nous appuyons sur ces directives pour réaliser les tests de libération prolongée. N'ayant pas déterminé d'aliment cible, nous avons réalisé nos essais dans l'eau distillée, qui s'avère être un système simple nous permettant d'étudier les différents phénomènes mis en jeu.

Un échantillon de film est immergé dans 60 mL d'eau distillée. La solution est agitée à 100 rpm dans un agitateur thermostaté (Gerhardt) à 37, 25 ou 4 °C. Les températures choisies simulent deux températures rencontrées à l'ambiante (25 et 37 °C) et un stockage au réfrigérateur (4 °C). La cinétique de libération du NaBz a été suivie par spectroscopie UV sur un spectrophotomètre Nicolet evolution 300 à pH 5-6 ($\text{pK}_{a \text{ NaBz}} = 4,2$). L'absorbance du NaBz est mesurée en fonction du temps de contact du film avec l'eau. On obtient la concentration en NaBz grâce à une courbe d'étalonnage $A = f(C)$ à $\lambda = 224 \text{ nm}$, donnée en Annexe 3 (Figure A. 8). Pour chaque mesure, le volume de prélèvement est remis dans le volume initial.

Un gonflement dépendant du temps de réticulation est observé. Pour les faibles $t_{\text{rét}}$, le gonflement est important, alors qu'à partir de 360 min, les films sont quasiment identiques avant et après immersion.

X. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES FILMS

Les microorganismes utilisés pour l'évaluation antimicrobienne des films sont le *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (CIP 224), *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922), *Candida* et *Aspergillus niger*. *S. aureus* et *E. coli* sont deux bactéries fréquemment rencontrées dans le domaine alimentaire et sont respectivement un gram positif et un gram négatif. *Candida* et

Aspergillus sont respectivement une levure et une moisissure, également couramment rencontrées dans le domaine alimentaire. Ces 4 microorganismes ont été choisis comme modèles afin d'évaluer le potentiel antimicrobien du NaBz, qui est surtout connu pour son activité antifongique et qui présente également une activité antibactérienne. Deux types d'analyses ont été effectués au laboratoire de Bactériologie (INSERM U995) de l'Université Lille 2 : la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui permet d'étudier l'activité des composés pris individuellement par contact direct avec la souche considérée et des tests de Kirby-Bauer sur les films chargés ou non.

X.1 Entretien des souches et préparation de l'inoculum

Les souches microbiennes utilisées sont conservées dans un bouillon BH (Brain-Heart, non sélectif), pour être repiquées sur une gélose inclinée de Mueller Hinton Agar (MHA), en formant des stries du fond du tube vers le haut à l'aide d'une pipette Pasteur fermée préalablement plongée dans la suspension de BH. Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies ayant proliféré sur la pente sont remises en suspension en ajoutant 10mL de RC (Ringer cystéiné) et sont décollées à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. La population microbienne est estimée à 10⁹ UFC (Unité Formant une Colonie)/mL.

X.2 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration de produit qui inhibe la croissance visible des bactéries. Elle a été déterminée pour les deux bactéries. Pour la déterminer, une plaque 96 puits est utilisée. La poudre à tester est dissoute à une concentration précise dans un milieu MH (bouillon Mueller Hinton), dont on introduit 200 µL dans le premier puits. Dans les puits suivants, on introduit 100 µL de milieu MH. Ensuite, on dilue successivement la solution, en introduisant 100 µL du premier puits dans le deuxième puits, 100 µL du deuxième puits dans le troisième et ainsi de suite. Il faut veiller, pour avoir le même volume dans chaque puits, à enlever les 100 µL supplémentaires du dernier puits. Ensuite on ajoute 100 µL de la suspension bactérienne dans chaque puits. Les concentrations étudiées sont les suivantes : NaBz, HPβCD de 3,1 à 100 g/L ; PVOH de 0,8 à 25 g/L ; CTR de 0,5 à 16 g/L. D'autre part, par souci de comparaison, un polymère de CTR et HPβCD, préalablement synthétisé, est étudié à des concentrations de 3,1 à 100 g/L [5]. Les concentrations sont choisies en fonction de la solubilité dans le milieu MH. Les plaques sont incubées 24 h à 37 °C. Afin de vérifier l'absence de contamination du milieu de culture et la viabilité de la souche bactérienne,

Deuxième partie : Partie expérimentale

des témoins sont établis. Un témoin positif (T+), composé de 100 μ L de milieu MH et 100 μ L de suspension bactérienne et un témoin négatif (T-) avec 200 μ L de milieu MH. Après 24h d'incubation, la détermination de la CMI se fait par observation à l'œil nu de chaque puits ensemencé (Figure VI.X. 1).

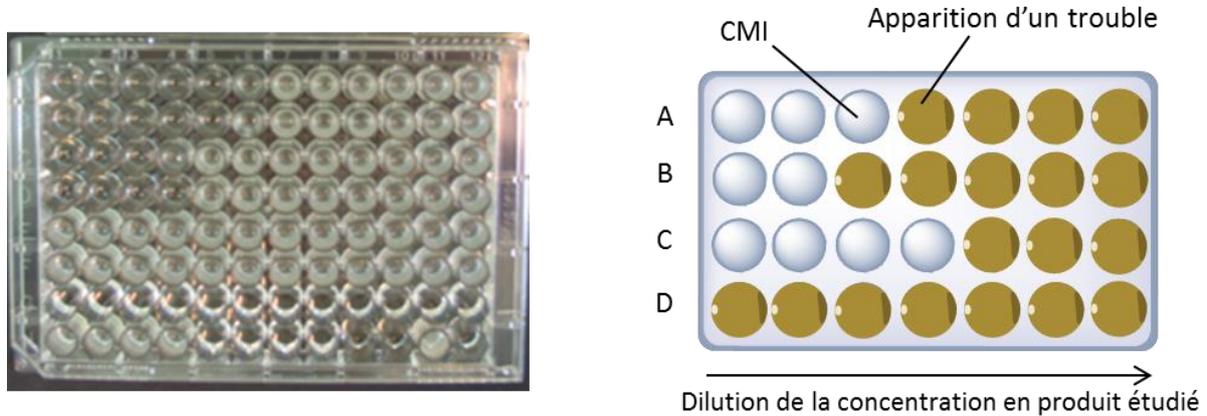


Figure VI.X. 1. Photographie (à gauche) et représentation schématique (à droite) du test de CMI

La CMI est définie comme la plus basse concentration à laquelle il n'y a pas de croissance visible, c'est-à-dire présentant l'absence totale de trouble du milieu de culture.

X.3 Test de Kirby-Bauer (diffusion sur gélose)

Le test de diffusion sur gélose, selon la méthode de Kirby-Bauer, permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des films par la formation d'une zone d'inhibition de la croissance des microorganismes (Figure VI.X. 2) [235;236].

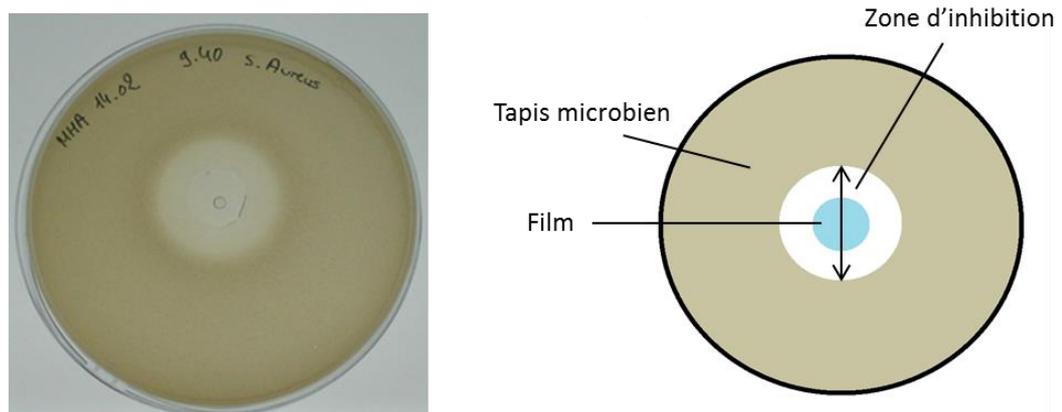


Figure VI.X. 2. Représentation schématique du diamètre d'inhibition pour un test de Kirby Bauer

Les films sont testés sous forme de pastilles de 11 mm de diamètre découpées à l'emporte-pièce. Trois pastilles sont testées pour chaque échantillon. Elles sont préalablement stérilisées par immersion dans l'éthanol (5 min), puis séchées à température ambiante. Les films

étant sensibles à l'humidité, deux méthodes ont été envisagées afin d'optimiser les tests antimicrobiens : la gélose est ensemencée soit en surface soit en masse (Figure VI.X. 3).

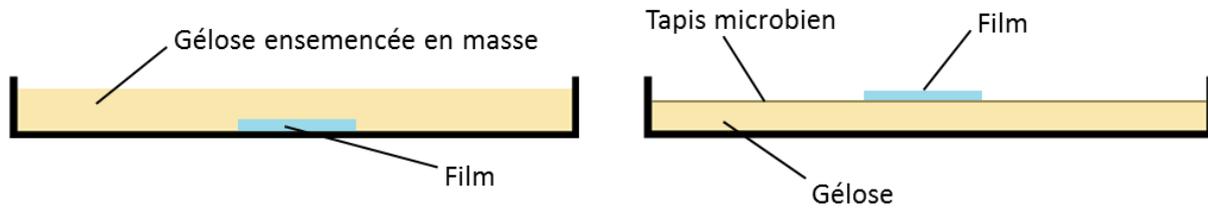


Figure VI.X. 3. Représentation schématique du test de Kirby Bauer avec gélose ensemencée en masse (gauche) ou en surface (droite)

La première méthode est celle utilisée classiquement par dépôt de la pastille sur la gélose, méthode appelée ici en surface. Afin d'obtenir un tapis microbien sur les géloses servant au test de diffusion, on dilue une goutte de la suspension microbienne, estimée à 10^9 UFC/mL, dans 10 mL de RC pour obtenir une suspension à environ 10^4 UFC/mL. Après son ensemencement, les films sont déposés sur la gélose.

Pour la méthode de la gélose ensemencée en masse, les géloses servant au test de diffusion sont ensemencées en masse à partir d'une solution de MHA tiède contenant 10^4 UFC/mL de suspension microbienne. Les films sont déposés sur le fond de la boîte de pétri vide, 18 mL de la solution de MHA ensemencée sont versés sur le film.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, un halo d'inhibition peut être observé (Figure VI.X. 2). Il correspond à la zone où le principe actif a migré et inhibé la croissance des microorganismes considérés.

La Figure VI.X. 4 présente les comportements observés pour les deux méthodes.

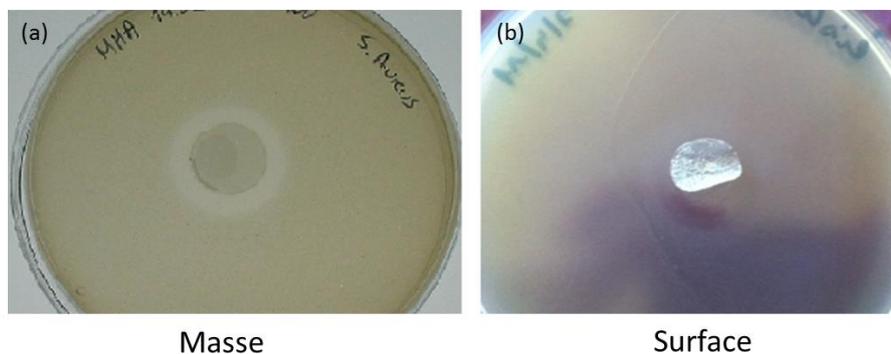


Figure VI.X. 4. Comparaison entre la méthode en masse (a) et en surface (b) pour les tests de Kirby-Bauer

Deuxième partie : Partie expérimentale

Lors du dépôt des films **en surface**, les films se soulèvent, puis sèchent (Figure VI.X. 4 (b)). Dans ces conditions la surface totale de la pastille n'étant pas en contact avec la gélose, il est difficile pour l'agent antimicrobien de migrer et la diffusion n'est pas reproductible.

Pour la méthode **en masse**, le film reste plan (Figure VI.X. 4 (a)). La lecture du diamètre d'inhibition a été possible même en cas de gonflement pour les temps courts de réticulation. Cette méthode suppose une diffusion en 3D et permet une meilleure reproductibilité par rapport aux comportements de gonflement variés des films en fonction de la réticulation. En effet, le film étant entouré par la géloseensemencée et la diffusion se faisant dans toutes les directions, sa forme influence peu la diffusion de l'agent antimicrobien. Ainsi, notre choix se porte sur la méthode en masse.

Troisième partie : Résultats et Discussion

Chapitre VII :
Elaboration et étude des films non
chargés en NaBz

Ce chapitre est consacré à l'élaboration des films de PVOH réticulés par le CTR. En raison de la dégradation thermique du CTR à une température inférieure à la fusion du PVOH (mise en évidence par ATG en Annexe 6), la voie par extrusion a été écartée. Aussi, la méthode par « casting » a été choisie comme voie alternative pour la préparation des films. Peu d'études développent les relations entre le procédé et la réaction de réticulation pour des systèmes PVOH/CTR. Il a donc été nécessaire d'analyser l'influence des paramètres de formulation (dilution, composition de la solution) et les conditions de réticulation sur les caractéristiques des films obtenus. Nous avons réalisé cette étude approfondie sur les films non chargés. Ainsi, dans un premier temps, l'impact du procédé par casting sur les propriétés et la structure du PVOH non réticulé est étudié. Ensuite, l'élaboration des films PVOH/CTR réticulés est présentée à travers la mise en évidence puis l'étude de la cinétique de la réaction de réticulation, les effets sur les propriétés physiques résultantes et l'impact de l'ajout de l'HP β CD. Différents procédés de réticulation sont comparés. Finalement, une étude complète des compositions optimales est menée.

I. ELABORATION DES FILMS PVOH NON RETICULES : EFFET DE LA DILUTION

Deux méthodes sont rencontrées dans la littérature pour la préparation de solutions de PVOH : l'agitation mécanique [82] et l'autoclave [152]. Les deux méthodes ont été testées afin de choisir la plus appropriée pour la réalisation des films. Nous avons constaté que les solutions aqueuses de PVOH obtenues par autoclave étaient systématiquement non homogènes avec la présence de nombreuses bulles, phénomène qui s'amplifie lors de l'agitation. Au contraire, les solutions obtenues par agitation mécanique sont homogènes et dépourvues de bulles. Ceci permet de mesurer un volume de solution précis nécessaire au contrôle de l'épaisseur des films et d'éviter la présence de bulle dans le film à l'état solide. Aussi dans la suite du travail, les solutions aqueuses de PVOH ont été exclusivement préparées par agitation mécanique. Le banc oscillant est utilisé pour maintenir l'homogénéité des solutions lors de leur refroidissement ou avant le dépôt dans le moule.

Au préalable, une étude est menée pour déterminer l'effet de la dilution sur les propriétés thermiques et mécaniques des films obtenus, le but étant de fixer la concentration en PVOH dans la solution la plus adaptée à notre travail. En effet, la dilution entraîne un désenchevêtrement des chaînes dans la solution (cf. Chapitre II - I.3), ce qui peut impliquer une augmentation de la cristallinité et de l'étirabilité. Cependant, si la dilution est trop élevée, il n'y a pas assez d'enchevêtrements entre chaînes macromoléculaires pour assurer la cohésion à l'état

solide du système. Aussi, trois concentrations en PVOH ont été testées : 1, 5 et 17 wt%. La Figure VII.I. 1 présente l'effet de la concentration en PVOH dans la solution aqueuse sur les propriétés thermiques des films séchés.

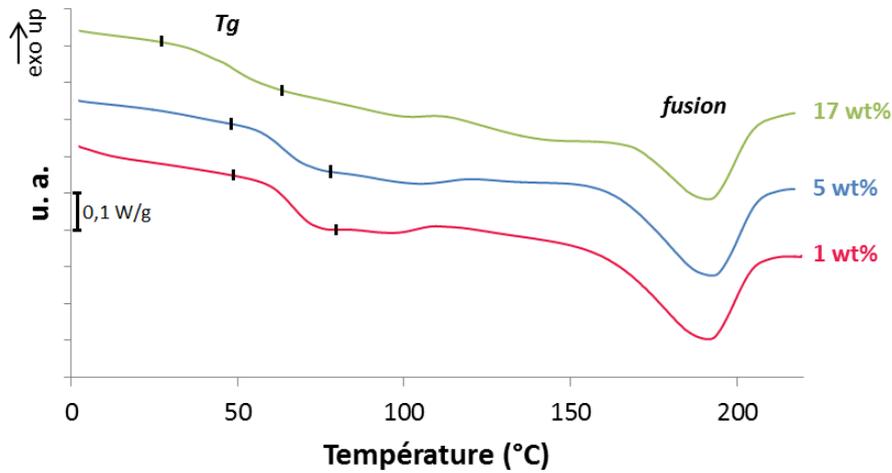


Figure VII.I. 1. Thermogrammes DSC de films de PVOH séchés pour 3 dilutions initiales (1, 5 et 17 wt%)

Quelle que soit la concentration en PVOH dans la solution, on distingue un saut de Cp caractéristique de la transition vitreuse (Tg) situé vers 50 °C, ainsi qu'un pic endothermique correspondant à la fusion des cristaux de PVOH vers 190 °C. A titre indicatif, les Tg et Tf d'un PVOH atactique complètement hydrolysé sont plutôt situées vers 70-80°C et 230-250°C respectivement [82]. Les valeurs plus faibles déterminées dans notre travail sont liées à la présence des motifs VAc (cf. Chapitre II - I.2). Concernant l'aire sous le pic de fusion qui caractérise le taux de cristallinité, celle-ci augmente légèrement lorsque le taux de PVOH dans la solution diminue. Ce phénomène peut être attribué à l'effet de désenchevêtrement avec la dilution qui facilite la cristallisation [237].

L'influence de l'humidité sur les propriétés thermiques des différents films de PVOH a également été évaluée. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau VII.I. 1. Les caractéristiques thermiques du film moulé sont incluses à titre de comparaison. Avec l'augmentation de l'humidité, une chute importante de Tg est observée indépendamment du taux de dilution : la transition vitreuse passe de 50 °C à l'état séché à environ -40 °C pour les échantillons stabilisés à 98 %H.R. Cette chute traduit l'effet plastifiant des molécules d'eau qui rompent les liaisons hydrogène entre chaînes de PVOH au sein de la phase amorphe. Alors que la température de fusion est indépendante des conditions de stockage, une diminution significative de χ_c est observée avec l'augmentation de l'humidité quel que soit le film considéré. Ce résultat a déjà été rapporté dans la littérature par Hodge et *al.* et a été attribué à la dissolution progressive par les molécules d'eau des cristallites à l'interface cristal/amorphe [238].

Tableau VII.I. 1. Caractéristiques thermiques des films de PVOH en fonction de la concentration en polymère dans la solution aqueuse pour trois conditions de stockage

Concentration en PVOH (%w/w)	Films par méthode casting			Film moulé	
	1	5	17		
Conditions					
wt % eau*	séché	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
	58% H.R.	8 ± 1	8 ± 1	7 ± 2	7 ± 1
	98% H.R.	21 ± 2	19 ± 1	26 ± 2	20 ± 2
Tg (°C)	séché	57 ± 4	57 ± 1	41 ± 5	53 ± 1
	58% H.R.	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
	98% H.R.	- 42 ± 6	- 35 ± 6	- 46 ± 3	- 46 ± 2
Tf (°C)	Séché	192 ± 1	192 ± 1	192 ± 1	192 ± 1
	58% H.R.	193 ± 1	193 ± 1	193 ± 1	193 ± 1
	98% H.R.	193 ± 1	194 ± 1	194 ± 1	N/A
Xc (%)	Séché	26 ± 1	25 ± 1	19 ± 2	14 ± 1
	58% H.R.	18 ± 2	16 ± 1	11 ± 2	8 ± 2
	98% H.R.	11 ± 3	5 ± 3	5 ± 2	N/A

*contenu en eau déterminé par ATG

Le taux de cristallinité des films de PVOH a également été estimé par diffraction des rayons X (DRX). La Figure VII.I. 2 présente les diffractogrammes des films de PVOH en fonction de la concentration de la solution initiale.

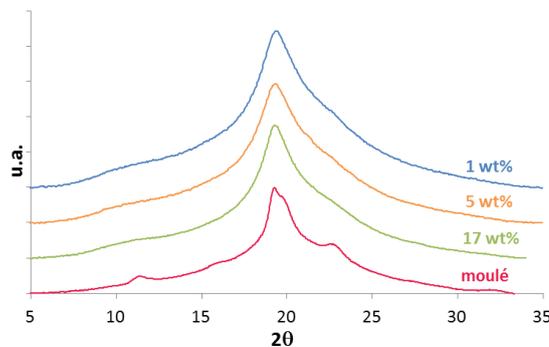


Figure VII.I. 2. Diffractogramme RX des films PVOH en fonction de la concentration de la solution initiale. Quels que soient les paramètres d'élaboration du film, les échantillons présentent une large diffraction localisée autour de $2\theta = 20^\circ$. De surcroît, dans le cas du film moulé, plusieurs raies

cristallines peuvent être identifiées à $2\theta \approx 11, 19$ et 22° . D'après Bunn, ces raies correspondent à la diffraction des plans (100), (10-1) (101) et (200) de la maille monoclinique du PVOH [86]. Sachant que l'étude DSC a montré que tous les films de PVOH présentent une fusion, des cristaux plus petits et/ou défectueux pourraient être à l'origine de l'absence des raies cristallines sur les diffractogrammes des films obtenus par casting.

Une estimation du taux de cristallinité des échantillons a été réalisée à partir d'une déconvolution des diffractogrammes sur la base des résultats présentés par Assender *et al.* [85]. Chaque diffractogramme est déconvolué à l'aide de 5 gaussiennes, une pour la partie amorphe et quatre autres pour les raies cristallines correspondant à la diffraction des plans (100), (10-1) (101) et (200). Un exemple est donné sur la Figure VII.I. 3, le taux de cristallinité est alors évalué par le rapport de l'aire des raies cristallines sur l'aire totale. Le Tableau VII.I. 2 regroupe les résultats obtenus sur l'ensemble des films.

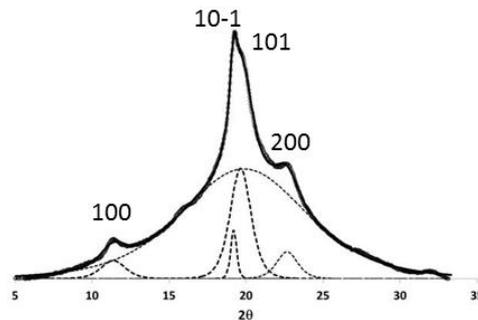


Figure VII.I. 3. Déconvolution du thermogramme RX du film PVOH moulé

Les taux de cristallinité sont en bon accord avec ceux rapportés dans la littérature, obtenus par cette même technique [87]. En revanche, on constate que ces valeurs sont nettement plus élevées que celles obtenues précédemment par DSC. Plusieurs raisons peuvent être invoquées pour expliquer cette différence comme l'incertitude de la déconvolution liée à la largeur des pics de diffraction et l'incertitude sur le choix de l'enthalpie de fusion standard pour les essais thermiques. Toutefois, notons que l'on observe comme par DSC que les films par casting ont une cristallinité systématiquement supérieure à celle du film moulé. Aussi, la DRX est une technique pertinente qui permettra de comparer de façon relative la cristallinité des différents films dans la suite du travail.

Tableau VII.I. 2. Degré de cristallinité obtenu par déconvolution des films PVOH en fonction de la concentration de la solution initiale

Concentration (%w/w)	Degré de cristallinité χ_c (%)
Moulé	24 ± 5
17 wt%	30 ± 5
5 wt%	28 ± 5
1 wt%	28 ± 5

L'influence du taux de dilution et de l'humidité relative sur les propriétés mécaniques a également été évaluée. La Figure VII.I. 4 illustre les évolutions du module de conservation, E' , et du facteur de perte visqueuse $\tan \delta$, en fonction de la température pour des films de PVOH moulé et obtenus par casting (5 wt%) conditionnés à deux hygrométries différentes.

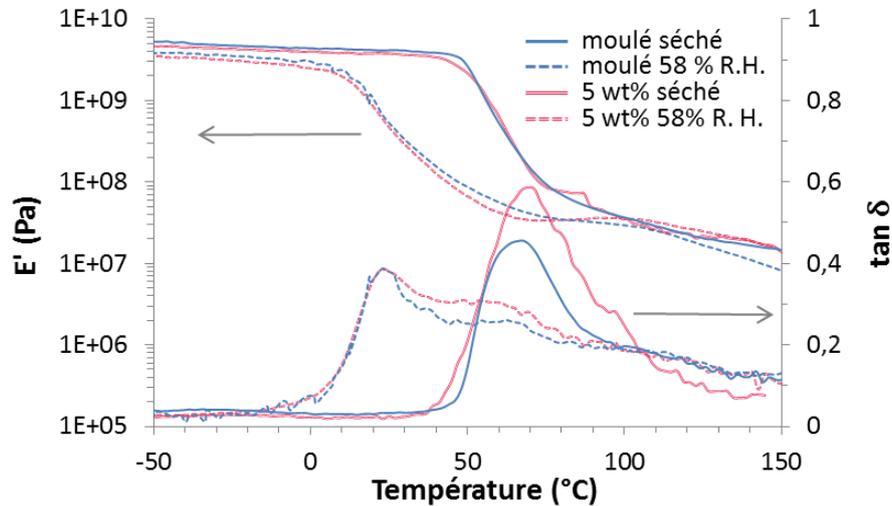


Figure VII.I. 4. Réponse mécanique dynamique des films de PVOH en fonction de la température selon 2 modes d'élaboration (moulé et casting) pour 2 conditionnements (séchés ou hydratés à 58 %H.R.)

Dans la gamme de température étudiée, tous les échantillons montrent une seule relaxation caractérisée par la diminution prononcée de E' et un pic d'amortissement de $\tan \delta$. Ce phénomène correspond à la relaxation principale associée à la transition vitreuse du PVOH [239]. Cette relaxation semble indépendante de la préparation du film mais est très sensible aux conditions de stockage, en parfait accord avec les résultats DSC. Ainsi la température du maximum du pic de $\tan \delta$ diminue de 65 à 20 °C pour les films séchés et hydratés respectivement. Il est à noter que l'étalement du pic de $\tan \delta$ pour les échantillons humides provient du séchage progressif des échantillons au cours de l'expérience.

La Figure VII.I. 5(a) représente l'évolution de la contrainte nominale en fonction de la déformation nominale à température ambiante des films de PVOH conditionnés à 58 et 98 % H.R.. Aucun résultat n'est rapporté pour les films séchés qui sont extrêmement fragiles. Les valeurs de contrainte au seuil et d'allongement à la rupture pour les films conditionnés à 58 %H.R. sont reportées dans le tableau de la Figure VII.I. 5(b).

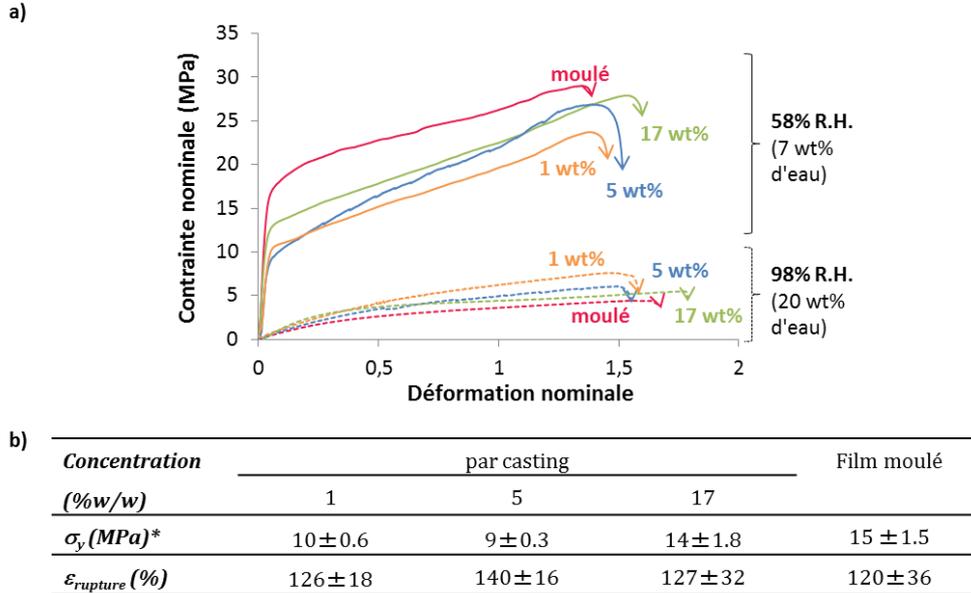


Figure VII.I. 5. Courbes de contrainte-déformation (a) pour des films de PVOH hydratés (58 %H.R. et 98 %H.R.) moulés et obtenus par casting (1 à 17 wt%) par traction uniaxiale à $T=22^\circ\text{C}$ ($T_{\text{exp}} > T_g$) et valeurs de la contrainte au seuil et d'allongement à la rupture (b) pour les films PVOH conditionnés à 58 %H.R.

A 58 ou 98 %H.R., l'ensemble des échantillons présente un comportement ductile, principalement lié au fait que la température d'étirage est supérieure à la T_g des matériaux. Nous n'avons pas constaté d'influence majeure de l'élaboration des films sur la déformation à la rupture (Figure VII.I. 6). En revanche, une diminution de la contrainte au seuil (σ_y) est observée avec la concentration en PVOH dans la solution d'origine pour les films équilibrés à 58 %H.R.. Ce résultat peut paraître surprenant étant donné l'augmentation du taux de cristallinité avec la dilution. Ceci montre que d'autres paramètres structuraux que la teneur en cristaux jouent un rôle important dans l'initiation de la plasticité, tels que le nombre de molécules de liens et la topologie moléculaire par exemple.

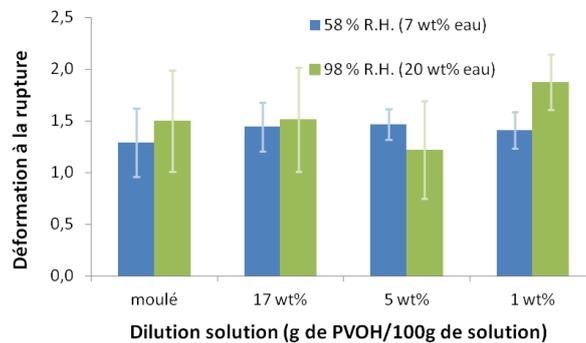


Figure VII.I. 6. Comparaison de la déformation à la rupture en fonction de la dilution pour des films PVOH hydratés

Avec l'augmentation du taux d'humidité, on assiste à une chute considérable du niveau de contrainte qui peut être due à la fois à la diminution de T_g et à la chute de la cristallinité (Figure VII.I. 5).

Pour résumer, aucune différence significative entre les films moulé et réalisés par casting n'a été mise en évidence en ce qui concerne les caractérisations structurales et thermomécaniques du PVOH. La dilution n'influençant pas de façon majeure les propriétés des films, la concentration choisie pour la suite du travail a été fixée à 5 wt% en produits qui est un bon compromis entre viscosité et volume de solution nécessaire pour faire un film.

II. ETUDE DE LA REACTION DE RETICULATION DES FILMS DE PVOH PAR LE CTR

Afin d'étudier la réaction de réticulation et les propriétés physiques résultantes, deux types de films PVOH/CTR, l'un contenant 10 wt% et l'autre 40 wt% de CTR, sont analysés. La réaction de réticulation est une estérification entre les fonctions OH du PVOH et les fonctions COOH du CTR. Pour les deux concentrations, les fonctions OH sont en excès par rapport aux fonctions COOH, c'est à dire 11 OH pour 1 COOH pour 10 wt% de CTR et 2 OH pour 1 COOH pour 40 wt% de CTR. Les films PVOH/CTR sont réticulés par un traitement thermique à 130 °C, précédé d'un séchage (16 h à 60 °C), et des temps croissants. Les photographies des films obtenus sont présentées sur la Figure VII.II. 1. Notons que la température de réticulation a été choisie sur la base de travaux précédents portant sur la synthèse d'un polymère de CD et de CTR, menés au laboratoire [5].

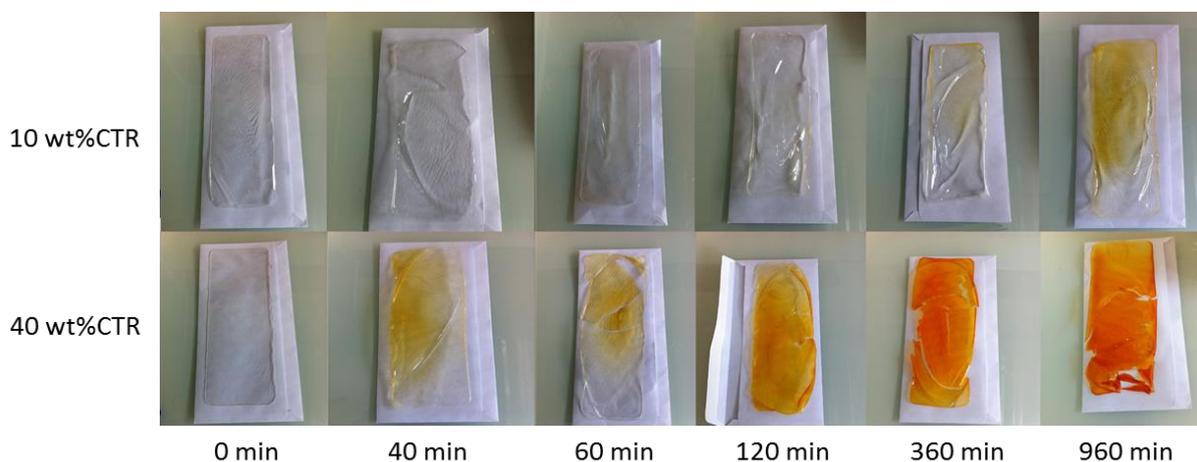


Figure VII.II. 1. Photographie des films PVOH/CTR en fonction de la quantité de CTR et du temps de réticulation

Les films non réticulés sont transparents et souples. Une fois réticulés, ces derniers sont, comme attendu, d'autant plus rigides que le temps de réticulation ($t_{\text{rét}}$) et la quantité de CTR augmentent. On peut même noter que les films PVOH/CTR-60/40 sont cassants à partir de 120 min de chauffage. Par ailleurs, un jaunissement des films est observé avec l'augmentation du temps de réaction. Cette coloration est amplifiée avec la quantité de CTR. Ce jaunissement est

connu dans la littérature et est attribué à la déshydratation du CTR et à la formation de doubles liaisons [240].

Remarque : Les films obtenus par ce protocole d'élaboration (utilisation de moule), présentent de nombreux défauts d'aspects (plis, défaut de planéité etc.) qui seront améliorés dans la suite de l'étude.

II.1 Mise en évidence de la réaction par RMN

De manière à vérifier si la consommation des réactifs est totale, une étude RMN ^1H a été réalisée sur les films réticulés. Les spectres RMN ^1H des réactifs résiduels obtenus par extraction solvant sur les films de PVOH/CTR sont présentés en Figure VII.II. 2. L'intensité du signal a été amplifiée afin de révéler les éventuels pics résiduels.

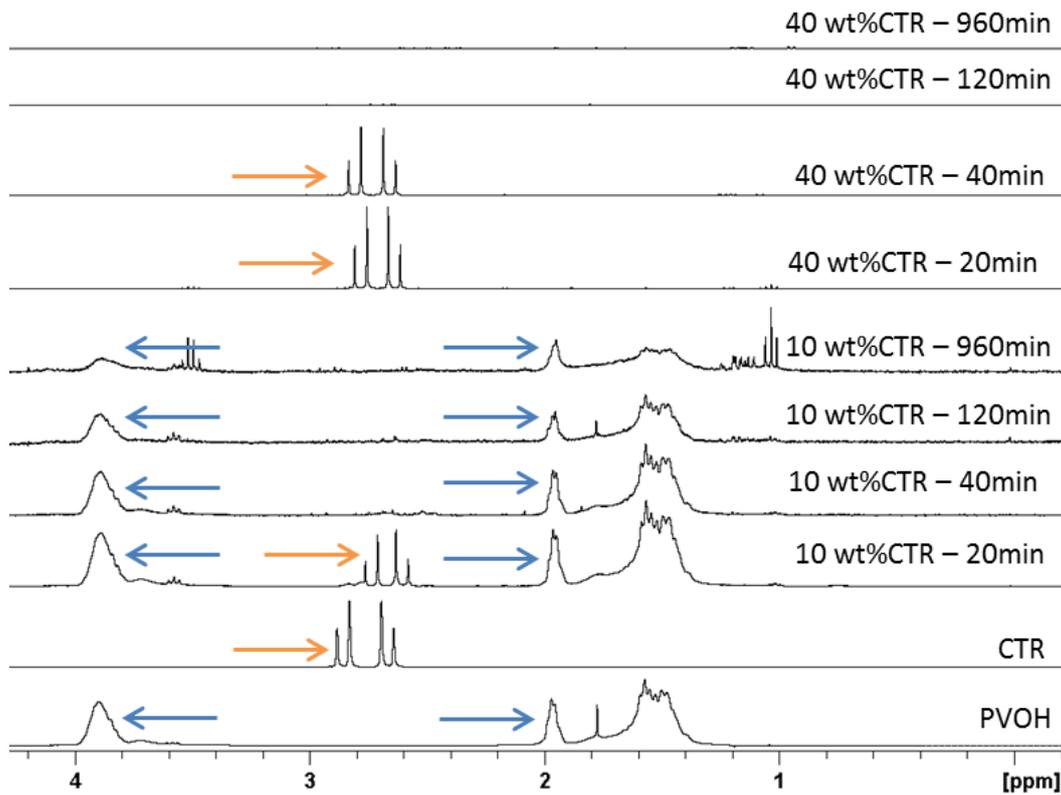


Figure VII.II. 2. Comparaison des spectres RMN ^1H dans le D_2O des réactifs résiduels et des composés initiaux

De manière générale, la quantité des composés résiduels diminue progressivement avec $t_{\text{rét.}}$.

Pour les films à 10 wt% de CTR, il n'y a plus de CTR (flèche orange) détecté à partir de 40 min. Pour les $t_{\text{rét.}}$ supérieurs à 120 min, la quantité de composés résiduels est très faible, seul le PVOH (flèche bleue) est toujours présent jusqu'à 960 min de réticulation. Ce résultat indique que pour

10 wt% de CTR, une faible quantité de chaînes de PVOH non réticulé est présente dans le film même après 960 min.

Pour les films à 40 wt% de CTR, le PVOH n'est plus détecté dès 20 min de réticulation alors que le CTR, toujours présent à 40 min, n'est plus détecté à 120 min.

Remarque : Les spectres entre 5 et 9 ppm présentés en Annexe 4, mettent en évidence la libération du catalyseur (NaH_2PO_2) pour l'ensemble des films, ce qui indique qu'il n'est ni lié, ni emprisonné par le réseau.

Le jaunissement des films, la modification de la souplesse des films et la consommation des réactifs mise en évidence par RMN ^1H , confirment que la réaction de réticulation a bien eu lieu. Nous avons donc décidé d'approfondir ces résultats par une étude cinétique de la réaction.

II.2 Cinétique de réticulation

La cinétique de réticulation est étudiée par le biais de l'évolution de la transition vitreuse (T_g) en fonction du temps de réticulation ($t_{\text{rét}}$). En effet, de façon générale, la T_g des polymères réticulés dépend non seulement de la rigidité de la chaîne principale mais aussi de la densité de réticulation [241]. La Figure VII.II. 3(a) présente les thermogrammes des films séchés pour les deux proportions de CTR et pour trois $t_{\text{rét}}$. La T_g est caractérisée par sa valeur de température et par l'amplitude du saut de C_p (capacité calorifique). L'évolution de la T_g en fonction de $t_{\text{rét}}$ est résumée par la Figure VII.II. 3(b) pour les films séchés et ceux conditionnés à 58% H.R.

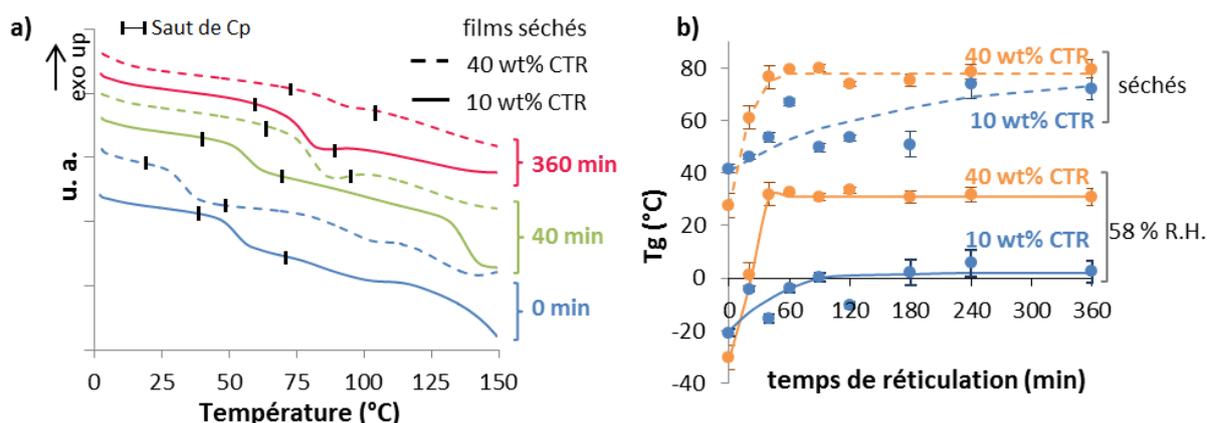


Figure VII.II. 3. Profils DSC (a) et valeurs de T_g (b) en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour deux taux de CTR dans des films séchés et hydratés

Pour les films sans traitement thermique, un effet plastifiant du CTR est observé quel que soit le conditionnement. Cet effet est d'autant plus prononcé que la concentration en CTR est élevée.

En effet, pour les films séchés, la T_g chute de 57 à 42 °C quand on passe de 0 à 10 wt% de CTR, puis à 28 °C avec 40 wt% de CTR. Une chute similaire est observée pour les films hydratés.

Comme attendu **pour les films réticulés**, la T_g augmente progressivement avec $t_{rét}$ et avec la concentration en CTR. Ce phénomène est plus marqué pour les films hydratés. L'évolution de la T_g est plus lente pour les films avec 10 wt% de CTR que pour ceux avec 40 wt% de CTR. Pour les films PVOH/CTR-90/10, le plateau est atteint après 180 min de réticulation et il n'y a pas d'évolution de l'amplitude du saut de C_p . Pour les films PVOH/CTR-60/40, une augmentation brusque de la T_g est observée, suivie d'une stabilisation à partir de 60 min de chauffage quelles que soient les conditions de stockage. Sachant que la T_g augmente avec la densité de réticulation, cela peut suggérer qu'il n'y a plus d'évolution majeure de la structure du réseau PVOH/CTR au-delà de 60 min de chauffage. Notons, cependant, une diminution de l'amplitude des ΔC_p avec $t_{rét}$ pour PVOH/CTR-60/40 comme le montre à titre d'exemple le thermogramme à $t_{rét} = 360$ min (Figure VII.II. 3(a)).

La Figure VII.II. 4 représente l'évolution de ΔC_p en fonction de $t_{rét}$ pour les deux types de films.

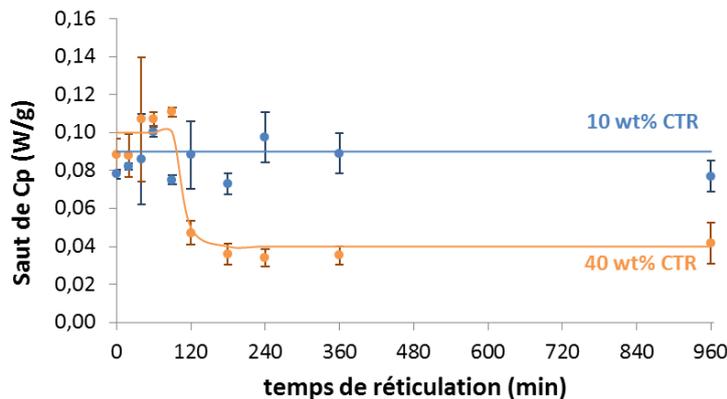


Figure VII.II. 4. Amplitude du saut de C_p en fonction de $t_{rét}$ pour les deux proportions pour les films séchés

Alors que ΔC_p est constant pour les films PVOH/CTR-90/10, une diminution est observée à partir de 120 min pour les films PVOH/CTR-60-40. Ces résultats peuvent indiquer que la quantité de phase amorphe qui relaxe à T_g diminue à partir de 120 min pour les films PVOH/CTR-60/40. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat. Une augmentation de la cristallinité est rejetée car aucune phase ordonnée n'est mise en évidence pour 40 wt% de CTR quel que soit le temps de réticulation, comme on le verra ultérieurement (Chapitre VII – II.3). Une réaction de réticulation ultérieure, probable pour les fortes proportions en CTR, induisant une restriction des mouvements moléculaires entre les nœuds de réticulation est suggérée et sera discutée par la suite.

Dans le cas des films séchés, pour des temps de réticulation longs (>240 min), la valeur de Tg est étonnamment quasi-similaire pour les deux proportions en CTR. Comme l'ont montré Krumova et *al.* dans le cas d'un PVOH réticulé avec du diisocyanate d'hexaméthylène, nous pouvons expliquer ce phénomène par une compensation entre la formation du réseau chimique (augmentation des liaisons covalentes) et l'affaiblissement du réseau physique (diminution des liaisons hydrogène)[175].

La diminution de Tg entre les états séché et hydraté est plus prononcée pour 10 que pour 40 wt% de CTR. Ce phénomène est lié au fait que les molécules d'eau viennent rompre les liaisons hydrogène intermoléculaires des OH restant du PVOH. Or, l'impact de l'eau a d'autant moins d'effet sur les films où la concentration en CTR est importante. Notons que cette diminution en groupes hydroxyles impacte également sur la quantité d'eau absorbée par les films. En effet, pour les films stabilisés à 58 %H.R., l'ensemble des films avec **10 wt% de CTR** contiennent 11 wt% d'eau alors que les films réticulés avec **40 wt% de CTR** en contiennent 8 wt%.

Une autre façon de suivre l'évolution de la réaction de réticulation consiste à doser les COOH non réagis dont l'existence est liée à la réaction d'estérification (Figure VII.II. 5).

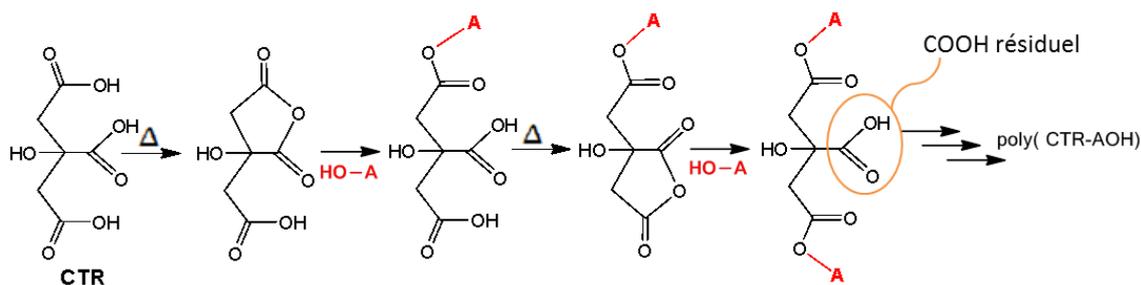


Figure VII.II. 5. Réaction d'estérification entre CTR et AOH catalysée par la formation d'un anhydride intramoléculaire pour la réticulation par la réaction du CTR avec les fonctions hydroxyles (A-OH)

La comparaison de l'évolution de la Tg d'une part et de la quantification des COOH non réagis d'autre part en fonction de $t_{\text{rét}}$ est présentée sur la Figure VII.II. 6.

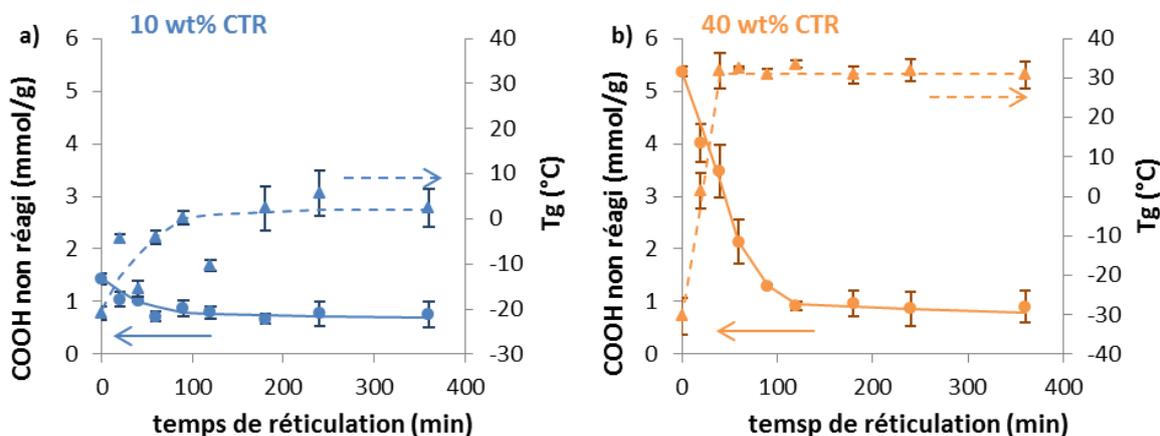


Figure VII.II. 6. COOH non réagis et Tg en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour 10 wt% CTR (a) et 40 wt% CTR (b)

Ainsi, parallèlement à l'augmentation de T_g avec $t_{rét}$, une diminution de la quantité de COOH libres est observée pour les deux proportions de CTR. Cette diminution est, comme attendu, nettement plus marquée pour les films contenant 40 wt% de CTR. Après 120 min, la quantité de COOH résiduels reste constante indépendamment de la quantité initiale de CTR. A ce temps de réticulation, tout le CTR est lié comme l'a montré la RMN précédemment.

Essayons d'évaluer la valeur théorique de COOH libres selon le schéma réactionnel envisagé (Figure VII.II. 5). Si le CTR est consommé selon ce mécanisme, seuls deux tiers des fonctions COOH réagissent. La valeur finale théorique de fonctions COOH devrait alors être environ 0,5 mmol/g et 1,9 mmol/g pour les films avec 10 wt% et 40 wt% de CTR respectivement.

- Pour PVOH/CTR-90/10, la valeur expérimentale de COOH résiduels ($0,60 \pm 0,12$ mmol/g) est proche de la valeur théorique, de plus, les valeurs de plateaux pour T_g et la concentration en COOH résiduels sont atteints pour le même $t_{rét}$ de l'ordre de 90 min.
- Dans le cas du PVOH/CTR-60/40, le comportement est différent. La valeur expérimentale de COOH résiduels au plateau ($0,76 \pm 0,13$ mmol/g) est nettement plus faible que la valeur théorique (1,9 mmol/g). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que pour de fortes proportions en CTR, la proximité spatiale entre les fonctions COOH permet la formation d'anhydrides par un mécanisme intermoléculaire d'estérification supplémentaire.

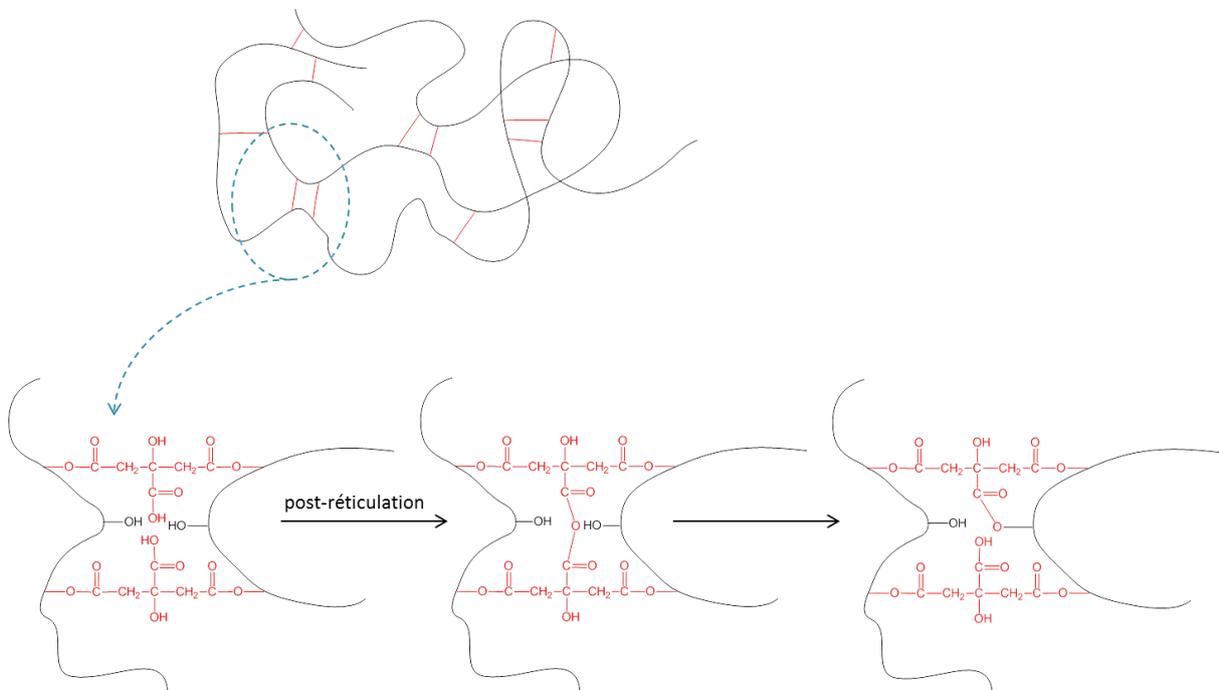


Figure VII.II. 7. Schéma du mécanisme proposé de la réaction de post-réticulation par la formation d'anhydrides intermoléculaires

Cette post-réticulation ne conduit pourtant pas à l'augmentation de Tg. En effet, le maximum de la Tg est atteint autour de 40-60 min alors qu'aux mêmes temps la valeur pour les COOH résiduels continue à diminuer. On peut noter cependant que pour ces $t_{\text{rét}}$, la valeur de COOH résiduels est d'environ 2-3 mmol/g, ce qui est proche de la valeur théorique si on n'envisage que le mécanisme de réticulation initial. La réaction d'estérification supplémentaire, qui s'opère suivant le mécanisme décrit dans la Figure VII.II. 7, impliquerait les groupes chimiques COOH proches des points de réticulation précédents. Ce phénomène de post-réticulation n'a pas d'effet majeur sur la valeur de Tg mais pourrait être à l'origine de la diminution du saut de Cp à Tg.

A partir des valeurs de COOH résiduels, il est possible de calculer le nombre de motifs théorique entre deux nœuds de réticulation pour les films PVOH/CTR. L'hypothèse posée pour le calcul est de considérer une répartition régulière des nœuds. Le calcul est présenté en Annexe 5. Le Tableau VII.II. 1 résume les valeurs pour les deux types de films.

Tableau VII.II. 1. Evaluation du nombre de motifs et de la masse molaire entre 2 nœuds de réticulation

Films		COOH non réagis (mmol/g film)	nombre de motifs entre 2 nœuds	Tg (°C)
90/10	20 min	1,04	48	-4 ± 1
	90 min	0,87	33	0 ± 1
	960 min	0,60	22	2 ± 4
60/40	20 min	4,01	7	1 ± 4
	120 min	0,91	3	33 ± 1
	960 min	0,76	2	31 ± 3

Entre 20 et 960 min, le nombre de motifs entre deux nœuds de réticulation a diminué d'un facteur 2-3 pour les deux concentrations de CTR. Aussi, il passe de 48 à 22 motifs pour les films à 10 wt% de CTR alors qu'il passe de 7 à 2 motifs pour les films contenant 40 wt% de CTR. Notons que, dès 20 min de réticulation, la densité de réticulation dans le film contenant 40 wt% de CTR est trois fois plus importante que pour le film avec le traitement thermique le plus long pour 10 wt% de CTR.

Pour résumer, le nombre de motifs entre deux nœuds reste relativement élevé, même pour des $t_{\text{rét}}$ importants, pour les films PVOH/CTR-90/10 contrairement au cas des films PVOH/CTR-60/40. La différence de nombre de motifs entre deux nœuds de réticulation, pour les deux types de films, explique les différences de Tg aux temps de réticulation élevés. Notons par exemple que, pour une concentration de COOH résiduel égale à 0,9 mmol/g, un film PVOH/CTR-90/10 a 33 motifs entre nœuds de réticulation et une Tg $\approx 0^\circ\text{C}$ (58 %H.R.) alors qu'un film PVOH/CTR-60/40 a 3 motifs et une Tg $\approx 30^\circ\text{C}$ (58 %H.R.). En revanche, aux temps de

réticulation faibles l'interprétation est plus complexe. Les effets combinés de la densité de réticulation et du CTR non lié jouant le rôle de plastifiant mènent à des Tg similaires.

II.3 Effet de la réaction de réticulation sur l'organisation structurale et les propriétés physiques des films

L'organisation cristalline du PVOH dans les films PVOH/CTR en fonction du temps de réticulation a été évaluée par DRX. En effet, l'ATG (Annexe 6) nous a montré que les films de PVOH/CTR se dégradent à partir de 150 °C, soit bien avant le point de fusion du PVOH ($T_f \approx 190$ °C). Par conséquent, la DSC ne peut pas être utilisée pour mettre en évidence la fusion éventuelle de cristaux de PVOH. La Figure VII.II. 8 représente les diffractogrammes RX des films de PVOH/CTR à différents $t_{\text{rét}}$.

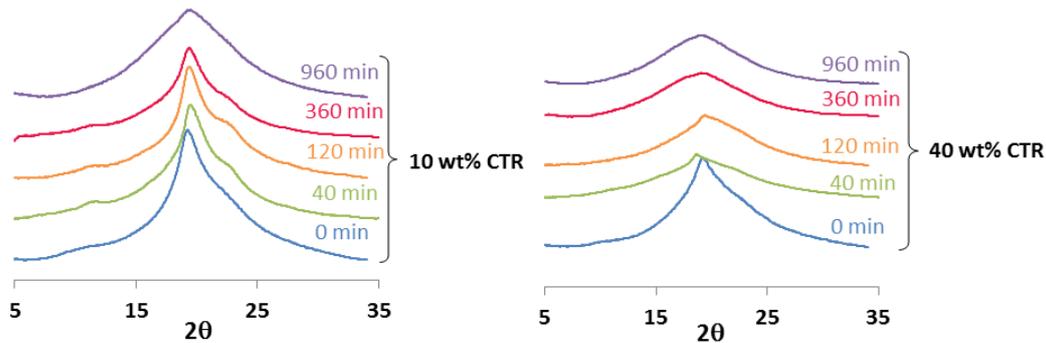


Figure VII.II. 8. Diffractogramme RX des films PVOH/CTR en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour les deux proportions. Quels que soient la quantité de CTR et le temps de réticulation, seul un large halo de diffraction, localisé autour de $2\theta = 20$ °, est clairement observé sans aucune évidence de raie cristalline, ce qui suggère que l'ensemble des échantillons est plutôt amorphe. On constate néanmoins une évolution des profils de diffraction avec $t_{\text{rét}}$, notamment pour le PVOH/CTR-90/10 suggérant un changement structural. Pour approfondir cette observation, une déconvolution des diffractogrammes a été réalisée en s'appuyant sur la méthode présentée précédemment (Chapitre VII – I). Un exemple est donné sur la Figure VII.II. 9.

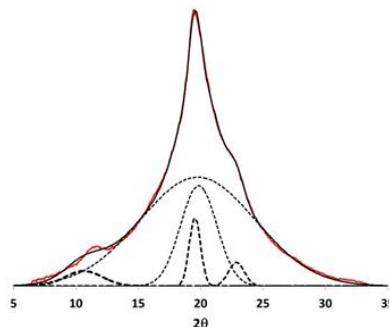


Figure VII.II. 9. Déconvolution du thermogramme RX du film PVOH/CTR-90/10-40min

A partir de cette déconvolution, une estimation du χ_c a alors été réalisée pour l'ensemble des films. La même démarche a été appliquée à l'ensemble des diffractogrammes afin d'avoir une étude comparative. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VII.II. 2.

Tableau VII.II. 2. Degré de cristallinité des films PVOH/CTR en fonction de $t_{rét}$

$t_{rét}$ (min)	Degré de cristallinité χ_c (%)	
	10 wt% CTR	40 wt% CTR
0	30 ± 5	ND
40	30 ± 5	ND
120	30 ± 5	ND
360	26 ± 5	ND
960	ND*	ND

*ND = non détectable

Seuls les films avec 10 wt% de CTR, réticulés jusqu'à 360 min, montrent une cristallinité de l'ordre de 30 %. L'origine de la disparition des cristaux pour des temps supérieurs à 360 min reste à ce jour inexplicée. Les films contenant 40 wt% de CTR sont, quant à eux, quasiment dépourvus de cristaux, quel que soit $t_{rét}$.

L'influence de la réticulation sur les propriétés mécaniques des films a été également évaluée. L'évolution du module de conservation et de $\tan \delta$ en fonction de la température pour différents $t_{rét}$ est représentée sur la Figure VII.II. 10 pour le film contenant 10 wt% de CTR. Une augmentation de la température de la relaxation principale, associée à la transition vitreuse, est clairement mise en évidence avec le temps de réticulation, en accord avec les précédents résultats obtenus par DSC.

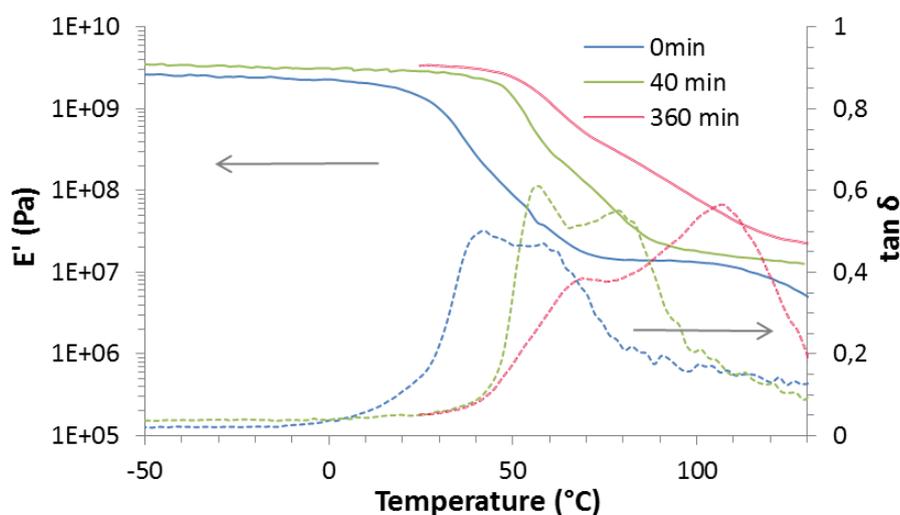


Figure VII.II. 10. Evolution du module de conservation E' et de $\tan \delta$ de l'angle de perte des films PVOH/CTR-90/10 séchés en fonction de la température pour différents $t_{rét}$

Notons par ailleurs que le module de conservation tend à augmenter avec $t_{\text{rét}}$, en particulier dans le domaine caoutchoutique. De façon générale dans ce domaine, le module augmente avec le taux de réticulation et la cristallinité. Dans le cas présent, l'évolution de E' dans le domaine caoutchoutique peut être attribuée éventuellement à l'augmentation de la densité de réticulation, le χ_c étant de l'ordre de 30 % pour les trois échantillons. On peut noter la présence d'un double pic sur la courbe de $\tan \delta$ au niveau de la relaxation principale. Ceci suggère la présence de plusieurs relaxations au sein de la phase amorphe même pour l'échantillon non réticulé. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène, telles que l'eau résiduelle présente dans les échantillons et/ou une répartition non homogène du CTR dans le film. Cette dernière hypothèse est plutôt privilégiée car des résultats similaires ont été obtenus sur des échantillons ayant subi des temps de séchage plus longs.

L'évolution du module de E' et de $\tan \delta$ en fonction de la température pour un même $t_{\text{rét}}$ (40 min) pour les deux concentrations de CTR est comparée sur la Figure VII.II. 11. La chute de E' , associée à la relaxation principale, débute vers 50°C quel que soit l'échantillon, mais a lieu sur une gamme de température plus large pour le film à 40 wt% de CTR. Alors que sa valeur est quasi identique pour les deux échantillons dans le domaine vitreux, E' est légèrement plus faible dans le domaine caoutchoutique pour 40 wt% de CTR. On aurait pu s'attendre à une valeur de E' nettement plus élevée pour le film à 40 wt% CTR comparé au film avec 10 wt% de CTR, compte tenu de la plus forte densité de réticulation pour le PVOH/CTR-60/40. Ceci souligne d'une part le rôle majeur des cristaux dans le cas du PVOH/CTR-90/10 et l'effet plastifiant du CTR non lié dans le cas du PVOH/CTR-60/40.

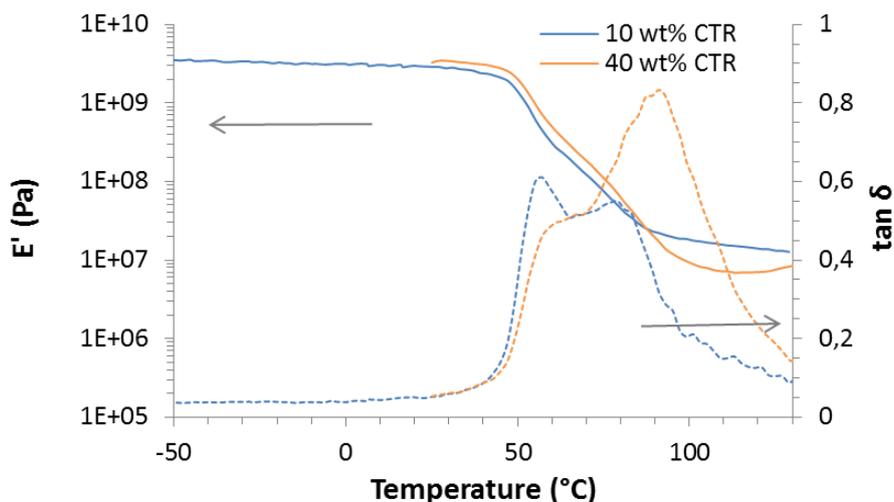


Figure VII.II. 11. Evolution du module de conservation E' et de $\tan \delta$ des films PVOH/CTR-40min séchés en fonction de la température pour les deux proportions en CTR

La Figure VII.II. 12 illustre l'influence de l'eau sur les relaxations viscoélastiques.

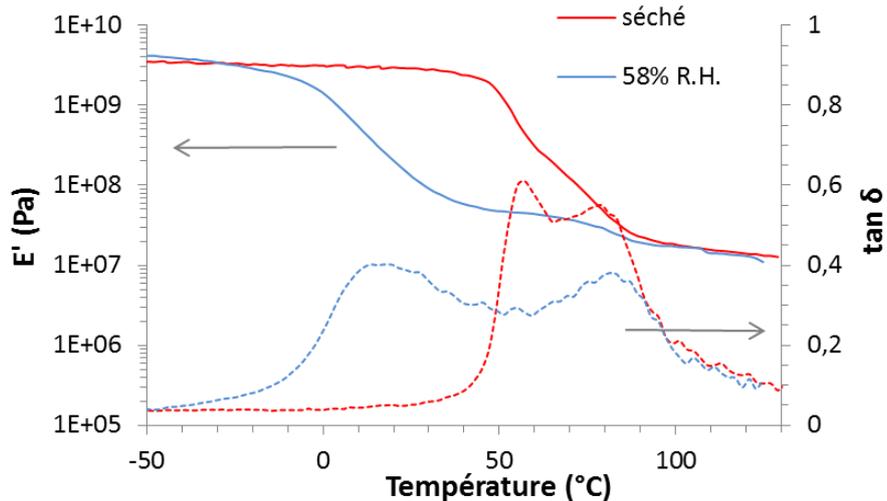


Figure VII.II. 12. Evolution du module de conservation E' et de $\tan \delta$ des films PVOH/CTR-90/10-40min séché et hydraté en fonction de la température

Conformément aux résultats obtenus par DSC, on assiste à une diminution de la température de relaxation principale pour l'échantillon hydraté traduisant le rôle plastifiant de l'eau sur le PVOH réticulé. Le pic sur la courbe de $\tan \delta$ est beaucoup plus étalé pour le film hydraté que pour le film séché, en raison de l'évaporation progressive de l'eau durant l'expérience, comme précisé précédemment. Ainsi, à température ambiante, le film sec est à l'état vitreux alors que le film stabilisé à 58 %H.R. est dans sa zone de transition. Ceci aura des conséquences considérables notamment sur les propriétés mécaniques, comme le montre le paragraphe suivant.

Pour l'application visée, la ductilité des films est un critère important. L'effet de la réticulation sur le comportement mécanique suivi par traction uniaxiale est illustré sur la Figure VII.II. 13. A partir des courbes contrainte - déformation nominales (Figure VII.II. 13(a)) pour différents $t_{\text{rét}}$, les valeurs de l'allongement à la rupture ont été compilées (Figure VII.II. 13(b)).

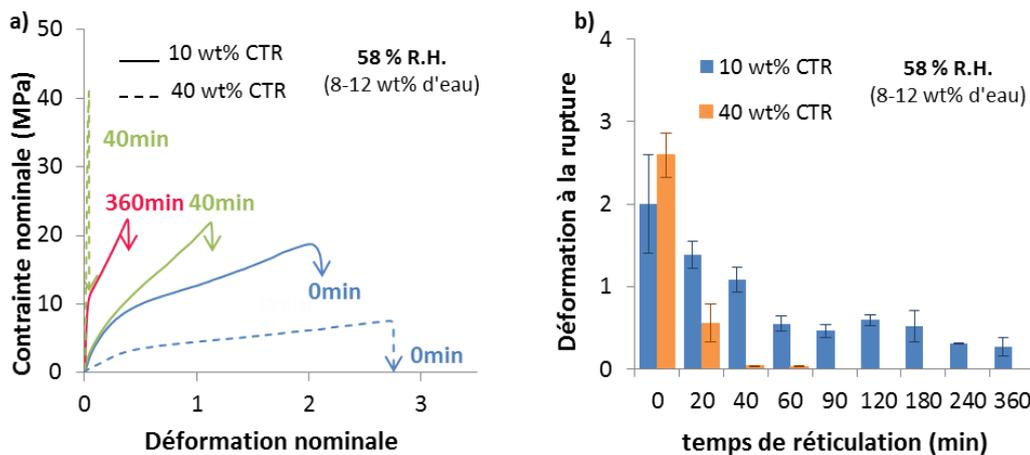


Figure VII.II. 13. Courbes de contrainte et déformation nominales (a) et diagrammes de déformation à la rupture (b) en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour deux proportions en CTR par traction uniaxiale à $T = 22^\circ\text{C}$ pour des films hydratés à 58 %H.R.

Pour les films non réticulés, une amélioration de la ductilité est observée quand la concentration en CTR augmente, comme l'indiquent la diminution du niveau de contrainte et l'augmentation de l'allongement à la rupture.

Les films à 40 wt% de CTR montrent, dès **40 min** de réticulation, un comportement fragile lié à la forte densité de réticulation empêchant toute déformation plastique. En revanche, **les films à 10 wt% de CTR**, réticulés jusqu'à **360 min**, présentent une déformation plastique homogène. On constate que le niveau de contrainte augmente et la déformation à la rupture diminue significativement lorsque $t_{\text{rét}}$ augmente. Ce comportement peut être attribué à la diminution de la masse entre nœuds chimiques impliquant d'une part un accroissement de rigidité et une augmentation de la T_g . Il est cependant difficile de poursuivre l'analyse en particulier pour corréler la réponse mécanique (taux de durcissement, extension limite du réseau) aux paramètres structuraux, comme la masse entre nœuds chimiques car la température d'étirage est bien au-dessus de la T_g pour l'échantillon non réticulé et est de l'ordre de la T_g pour ceux fortement réticulés.

En raison de l'extrême fragilité des films à 40 wt% de CTR, nous choisissons de fixer notre attention sur les films contenant 10 wt% de CTR pour l'étude de l'influence de l'incorporation d'HP β CD sur les propriétés des films.

II.4 Influence de l'ajout d'HP β CD sur la réaction de réticulation

L'un des objectifs de ce travail est d'incorporer l'HP β CD dans la matrice polymère. Ce dérivé de cyclodextrine (CD) est choisi pour ses propriétés de vecteur de principe actif afin de prolonger la libération d'un conservateur alimentaire. Comme le PVOH, l'HP β CD possède des fonctions OH qui peuvent réagir avec les fonctions COOH du CTR. La composition étudiée est de 80 wt% de PVOH, 10 wt% d'HP β CD et 10 wt% de CTR selon une approche similaire à la précédente. Le nombre de OH dans les films avec ou sans HP β CD est proche, de l'ordre de 16 mmol/g. Les films obtenus à différents temps sont présentés sur la Figure VII.II. 14.

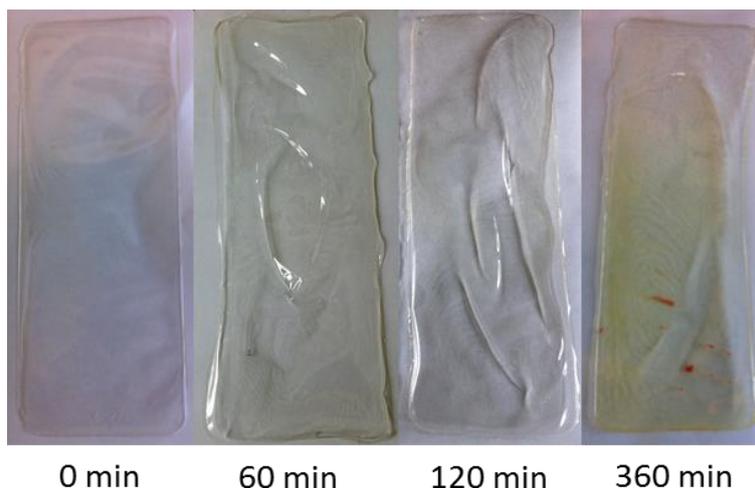


Figure VII.II. 14. Photographie des films PVOH/HPβCD/CTR-80/10/10 en fonction de $t_{rét}$

Comme pour les films sans HPβCD, on observe un jaunissement pour les longs temps de réticulation (360 min).

Les spectres RMN 1H des réactifs non réagis, obtenus par extraction solvant pour les films PVOH/HPβCD/CTR sont présentés sur la Figure VII.II. 15. L'intensité des spectres est de nouveau amplifiée pour révéler les composés résiduels éventuels. Aucun effet de l'HPβCD sur la cinétique de réticulation n'est observé. En effet, comme pour les films de PVOH/CTR-90/10, le CTR (flèche orange) est entièrement consommé à partir de 40 min de chauffage, alors que le PVOH (flèche bleue) et l'HPβCD (flèche rose) ne sont pas complètement liés même après 960 min.

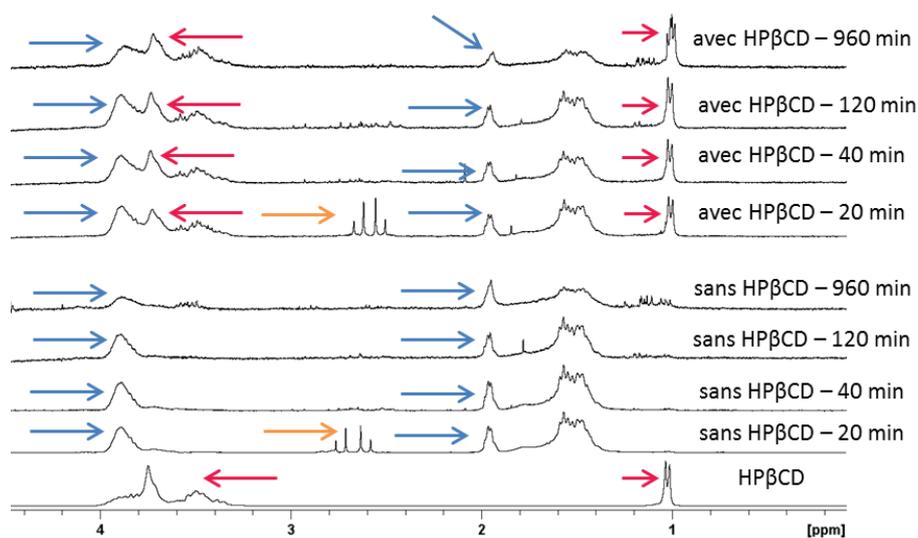


Figure VII.II. 15. Spectres RMN 1H dans le D_2O des réactifs résiduels des films PVOH/HPβCD/CTR-80/10/10 en fonction de $t_{rét}$ comparés aux films PVOH/CTR-90/10

La cinétique de la réaction de réticulation est également évaluée en suivant les COOH résiduels en fonction de $t_{rét}$ (Figure VII.II. 16).

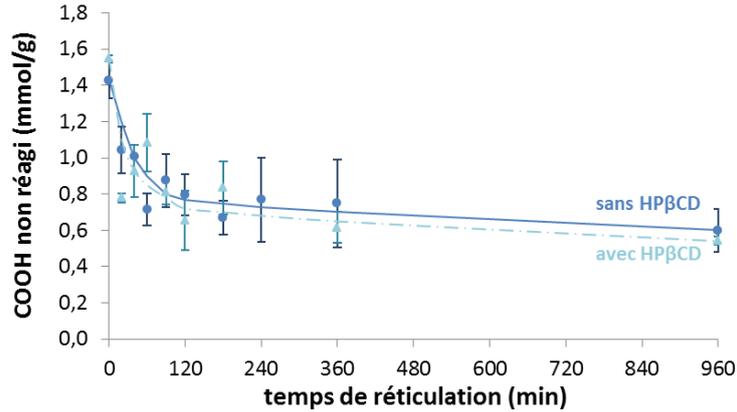


Figure VII.II. 16. Comparaison des COOH résiduels pour PVOH/CTR et PVOH/HPβCD/CTR avec 10 wt% CTR en fonction de $t_{\text{rét}}$

A 10 wt% de CTR, les résultats obtenus pour les films avec ou sans HPβCD montrent le même comportement. La concentration de 10 wt% en HPβCD ne modifie donc pas la cinétique de réticulation.

Il est aussi important d'étudier l'effet d'HPβCD sur la flexibilité des films à travers l'analyse de la Tg (Figure VII.II. 17).

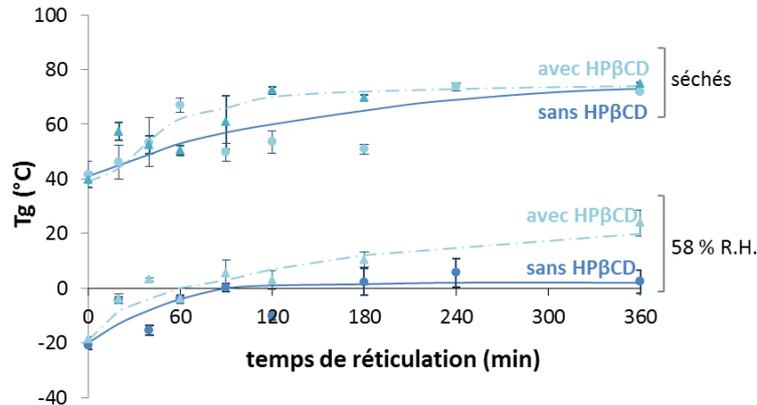


Figure VII.II. 17. Evolution de la Tg des films PVOH/CTR et PVOH/HPβCD/CTR en fonction de $t_{\text{rét}}$

Pour les films non réticulés, on n'observe pas d'effet majeur de l'HPβCD sur la Tg. En revanche, pour les films réticulés, l'incorporation d'HPβCD tend à rigidifier légèrement le réseau.

Quant aux propriétés viscoélastiques des films avec HPβCD en fonction de $t_{\text{rét}}$ (Figure VII.II. 18), celles-ci sont similaires à celles obtenues pour les films sans HPβCD : une augmentation de la température de la relaxation principale est constatée ainsi que du module de conservation dans le plateau caoutchoutique avec $t_{\text{rét}}$.

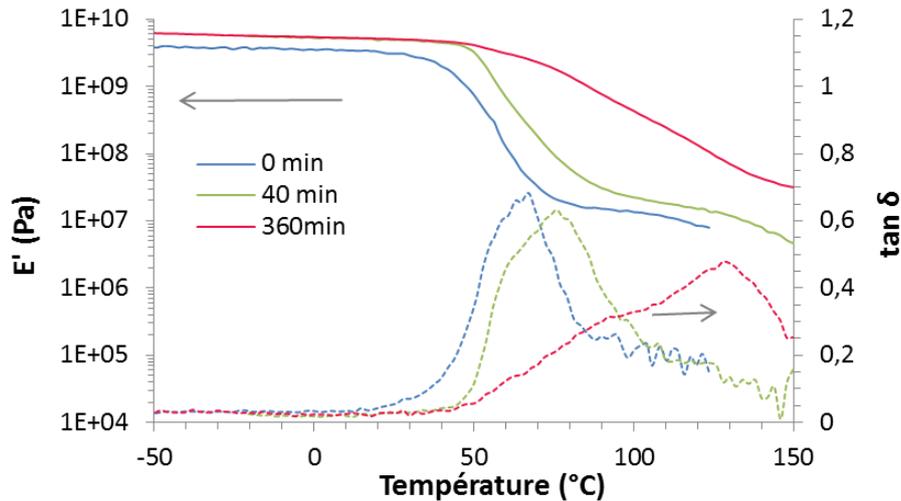


Figure VII.II. 18. Evolution de E' et de $\tan \delta$ en fonction de la température des films PVOH/HP β CD/CTR-80/10/10 séchés pour différents $t_{rét}$

La molécule d'HP β CD étant une molécule volumineuse et rigide, sa présence tend à diminuer la mobilité globale du réseau.

L'influence de l'incorporation d'HP β CD sur l'organisation structurale du PVOH a été suivie par RX (Figure VII.II. 19). Aucune évidence d'épaulement de raies cristallines n'est observée.

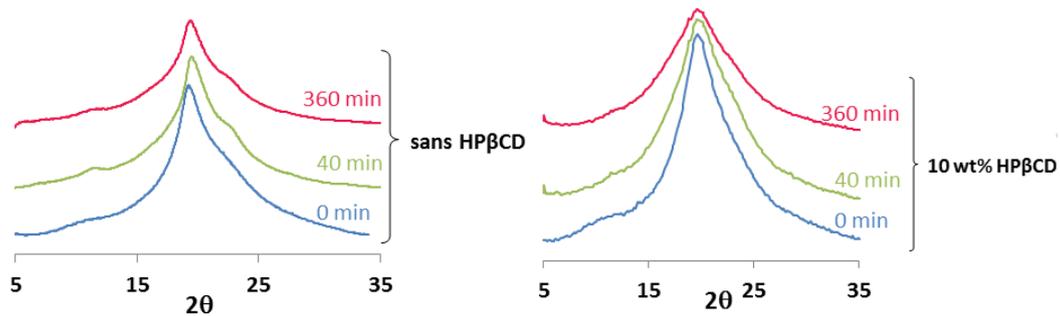


Figure VII.II. 19. Diffractogramme RX des films PVOH/HP β CD/CTR en fonction de $t_{rét}$

Très peu, voire aucune cristallinité n'est détectée dans ces films (Tableau VII.II. 3), contrairement aux films de PVOH/CTR pour des $t_{rét}$ équivalents. En effet, la cristallinité diminue de 30 à 10 % pour les films non réticulés et de 26 % à non détectable pour les films réticulés 360 min. Ceci montre que l'HP β CD, de par sa présence dans le réseau polymère, gêne la cristallisation du PVOH.

Tableau VII.II. 3. Degré de cristallinité des films PVOH/HP β CD/CTR pour deux $t_{rét}$

$t_{rét}$ (min)	Degré de cristallinité χ_c (%)
0	10 \pm 5
360	ND

La Figure VII.II. 20 présente le comportement mécanique en traction de ces films.

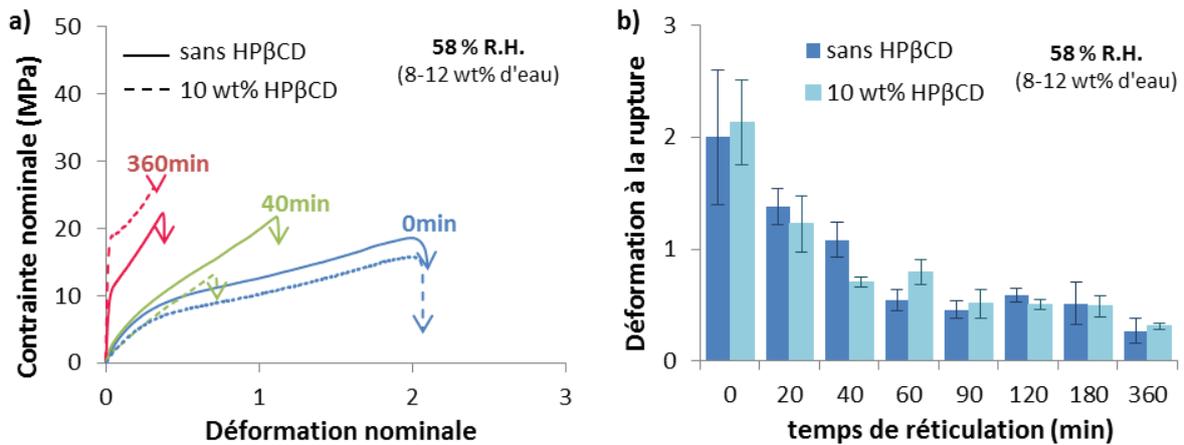


Figure VII.II. 20. Courbes de traction uniaxiale (a) et diagrammes de déformation à la rupture (b) en fonction de $t_{rét}$ pour des films PVOH/HP β CD/CTR hydratés à 58 %H.R. (température d'étirage = 22 °C)

Pour l'ensemble des films, la présence d'HP β CD n'a pas d'effet majeur ni sur le niveau de contrainte ni sur la déformation à la rupture.

II.5 Optimisation du procédé de réticulation des films

Pour les films contenant du CTR, trois méthodes ont été envisagées pour procéder à la réticulation par traitement thermique (Figure VII.II. 21). La première consiste à placer le film entre deux feuilles de téflon, elles-mêmes placées entre deux plaques de verres. L'ensemble du montage est maintenu par des pinces. Pour ce cas de figure, les deux faces sont en contact avec une feuille de téflon. Pour la deuxième méthode, le film est directement réticulé dans le moule silicone dans lequel il a été formé. L'une des faces du film est au contact du moule et l'autre au contact de l'air. Enfin, la dernière méthode est réalisée en plaçant le film sur un cadre métallique à l'aide de pinces. Dans ce cas, les deux faces du film sont au contact de l'air.



Figure VII.II. 21. Photographies des procédés utilisés pour la réticulation des films

Les films avec une faible quantité en CTR (10 wt%) n'ont pas montré de différence visuelle quelle que soit la méthode de réticulation utilisée. Quant aux films avec 40 wt% de CTR, le procédé a un effet sur l'aspect. Des photographies des films obtenus selon les différentes méthodes sont présentées par la Figure VII.II. 22.

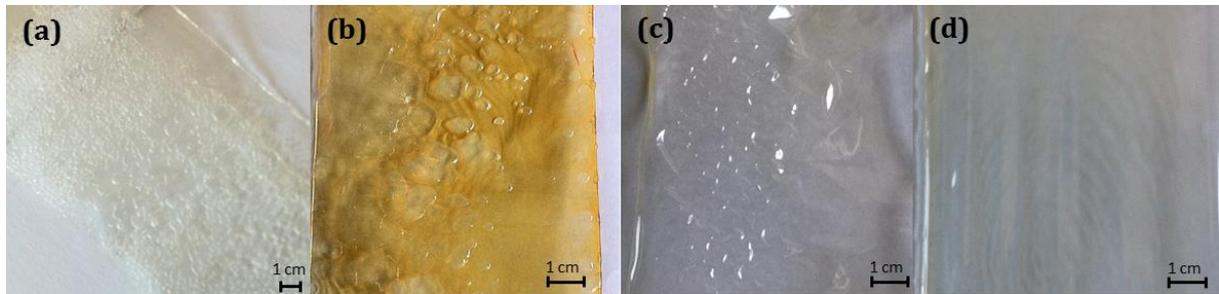


Figure VII.II. 22. Photographies des films à 40 wt% de CTR selon la méthode de réticulation

La première méthode (feuilles de téflon et plaques de verre) permet d'obtenir un film plan mais entraîne la formation de nombreuses bulles dans le film (Figure VII.II. 22 (a)). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'eau formée lors de la réaction d'estérification s'évapore durant le traitement thermique (130 °C). Le film étant enfermé, l'eau a du mal à s'évacuer et entraîne la formation des bulles. Ce phénomène ne s'observe pas pour les films contenant 10 wt% de CTR car la formation d'eau au cours de la réaction est plus faible.

En ce qui concerne la deuxième méthode (réticulation dans le moule), de nombreuses bulles sont également observées (Figure VII.II. 22(b)). Un séchage (16 h à 60 °C), préalable au traitement thermique dans le moule, permet de surmonter ce problème (Figure VII.II. 22(c)). L'évacuation d'eau étant plus douce, il n'y a pas de formation de bulles. Malgré tout, on observe un certain nombre de défauts d'aspects (plis, défaut de planéité etc.). Par ailleurs, après un certain nombre d'utilisations, les moules ont vieilli, ce qui a entraîné un décollement difficile des films après réticulation, laissant des résidus à la surface des films.

La méthode utilisant un cadre métallique n'a pas entraîné la formation de bulles dans les films (Figure VII.II. 22(d)), l'eau pouvant s'évacuer facilement par les deux faces du film. Les bords des films étant maintenus par des pinces, il y a peu de défauts de planéité. Par la suite, la méthode retenue par l'optimisation du procédé est la réticulation sur le cadre métallique.

Les désavantages de la méthode de réticulation dans le moule ont été décelés assez tardivement. Si bien que l'étude sur la réaction de réticulation a été initialement menée avec des films réticulés dans le moule avec séchage préalable. Par la suite, une étude d'optimisation est menée pour des films réticulés sur **cadre métallique** afin de déterminer la formulation la plus adaptée à notre travail (Chapitre VII - III). L'influence du procédé (moule ou cadre) a été étudiée sur la

cinétique de réticulation de films à 10 wt% de CTR. Aucune différence significative n'a été constatée. Toutefois la cinétique semble légèrement ralentie avec le cadre.

Pour résumer, la comparaison des procédés de réticulation a permis de sélectionner la méthode par cadre qui, en plus d'éviter la formation de bulles lors du traitement, résiste mieux aux conditions de réaction. L'étude de la réaction de réticulation a mis en évidence que 10 wt% de CTR n'est pas suffisant pour réticuler l'ensemble du PVOH et de l'HP β CD contrairement aux films avec 40 wt% de CTR qui, toutefois, sont très fragiles. Ainsi, pour la suite du travail, des compositions en CTR intermédiaire (20 et 30 wt% de CTR) seront étudiées afin d'identifier des proportions permettant un compromis entre la réticulation de l'ensemble des réactifs et la souplesse des films obtenus. L'étude sur l'incorporation de 10 wt% d'HP β CD n'ayant pas montré d'influence majeure sur le comportement global des films (Chapitre VII – II.4), nous pouvons envisager d'augmenter la quantité d'HP β CD de manière à incorporer une plus grande quantité de conservateur.

III. ETUDE DES FILMS DE COMPOSITION EN CTR INTERMEDIAIRE

Les films de compositions intermédiaires (20 et 30 wt% de CTR avec 30 wt% ou sans HP β CD) choisis sont tels que les fonctions OH initiales sont en excès par rapport aux fonctions COOH du CTR, c'est à dire 5 OH pour 1 COOH pour 20 wt% de CTR et 3 OH pour 1 COOH pour 30 wt% de CTR. Les films obtenus sont plans et transparents (exemples de films sur la Figure VII.III. 1). Notons que les films avec 30 wt% d'HP β CD semblent plus fragiles.



Figure VII.III. 1. Photographies des films de compositions intermédiaires (20 wt% et 30 wt% de CTR) avec 30 wt% ou sans HP β CD réticulés 120 min

III.1 Identification des réactifs non réagis

La Figure VII.III. 2 présente un bilan des réactifs non réagis présents en fonction du temps de réticulation pour l'ensemble des différentes compositions de films. Les spectres RMN ^1H des réactifs non réagis des nouveaux films de compositions intermédiaires sont présentés en Annexe 7 (Figure A. 12 et Figure A. 13).

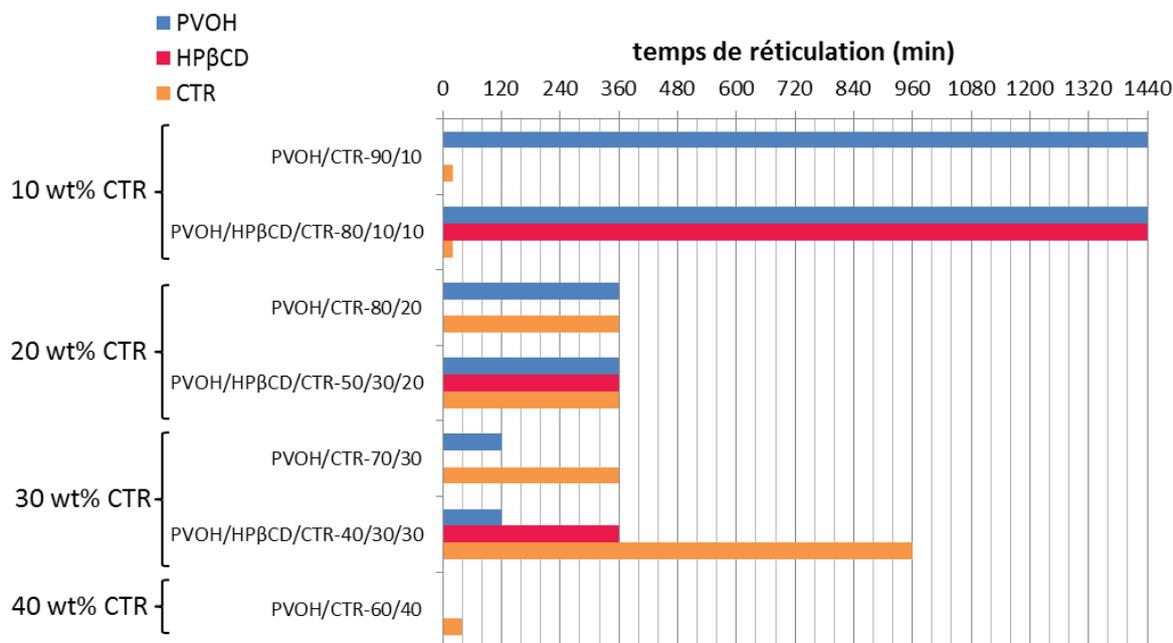


Figure VII.III. 2. Bilan des réactifs non réagis obtenus par extraction solvant et mis en évidence par RMN ^1H en fonction du temps de réticulation

Pour les films avec 20 wt% de CTR, aucun réactif n'est détecté au-delà de 360 min. Ce résultat indique qu'il y a suffisamment de CTR pour réticuler l'ensemble des chaînes de PVOH et des molécules d'HPβCD et qu'il n'est pas nécessaire de chauffer plus longtemps pour lier l'ensemble du CTR.

Pour les films avec 30 wt% de CTR, l'HPβCD semble réticuler plus lentement que le PVOH. En revanche, quelle que soit la composition, il existe un intervalle de temps où des molécules de CTR libres sont présentes alors que l'ensemble du PVOH et/ou de l'HPβCD est complètement lié.

Notons qu'un film lavé dans l'eau puis étudié par RMN ^{13}C (Figure VII.III. 3) confirme bien la participation d'HPβCD de manière covalente au réseau tridimensionnel par la modification du pic à 72 ppm (flèche rouge) et l'apparition du pic à 104 ppm (flèche bleue).

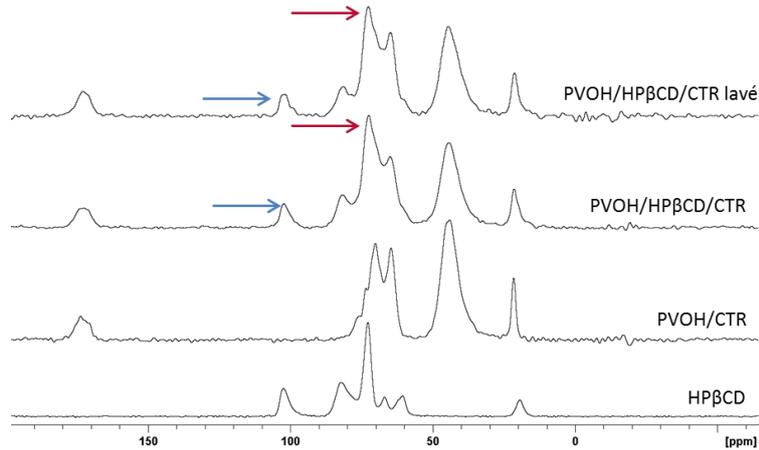


Figure VII.III. 3. Spectres RMN ^{13}C des films PVOH/HP β CD/CTR lavé ou non comparé à l'HP β CD et à un film PVOH/CTR avec 20 wt% de CTR

Les compositions intermédiaires (20 et 30 wt% CTR) permettent, contrairement aux films PVOH/CTR-90/10, de lier l'ensemble du PVOH et de l'HP β CD. Afin d'analyser si ces compositions permettent d'obtenir des films moins fragiles qu'avec 40 wt% de CTR, les propriétés mécaniques des films obtenus seront étudiées.

III.2 Etude de la réticulation et des caractéristiques mécaniques

La cinétique de la réaction de réticulation pour les films de composition intermédiaire avec 30 wt% ou sans HP β CD a été évaluée (Figure VII.III. 4).

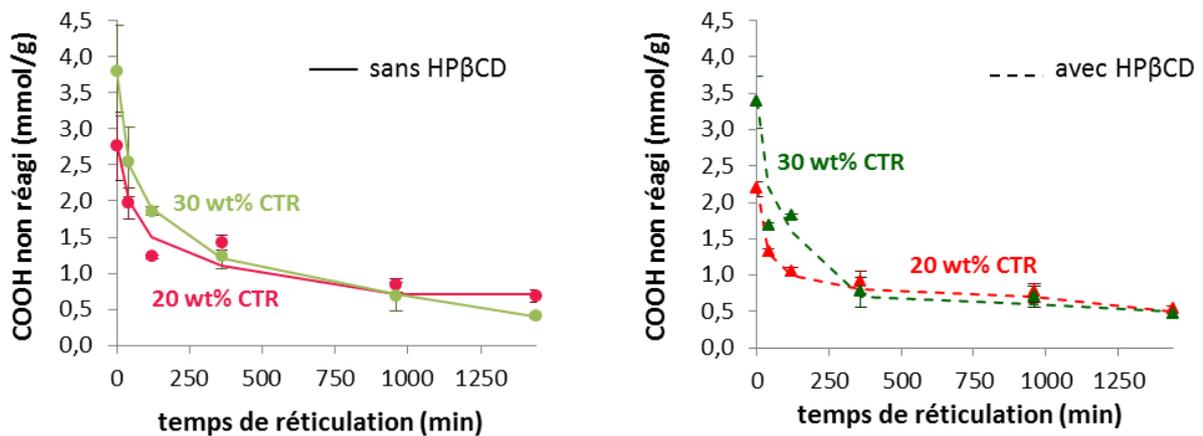


Figure VII.III. 4. COOH non réagis en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour des films de compositions intermédiaires (20 et 30 wt% de CTR) avec 30 wt% ou sans HP β CD

Le dosage des fonctions COOH résiduelles met en évidence que, quelle que soit la concentration en CTR, l'HP β CD n'a pas d'influence majeure sur la cinétique de réticulation. Notons toutefois que la cinétique est légèrement plus lente pour 30 wt% de CTR, ce qui confirme les résultats obtenus par RMN. Les quantités finales théoriques calculées de la même façon que

précédemment (Chapitre VII – II.2) sont d'environ 0,97 mmol/g et 1,4 mmol/g pour les films 20 et 30 wt% de CTR respectivement. La valeur expérimentale est légèrement inférieure à la théorie pour les films à 20 wt% de CTR et deux fois plus faible pour les films à 30 wt% de CTR. Ce résultat montre que plus la proportion de CTR est grande, plus le phénomène de post-réticulation est important.

Le suivi de la T_g en fonction de $t_{rét}$ est présenté sur la Figure VII.III. 5.

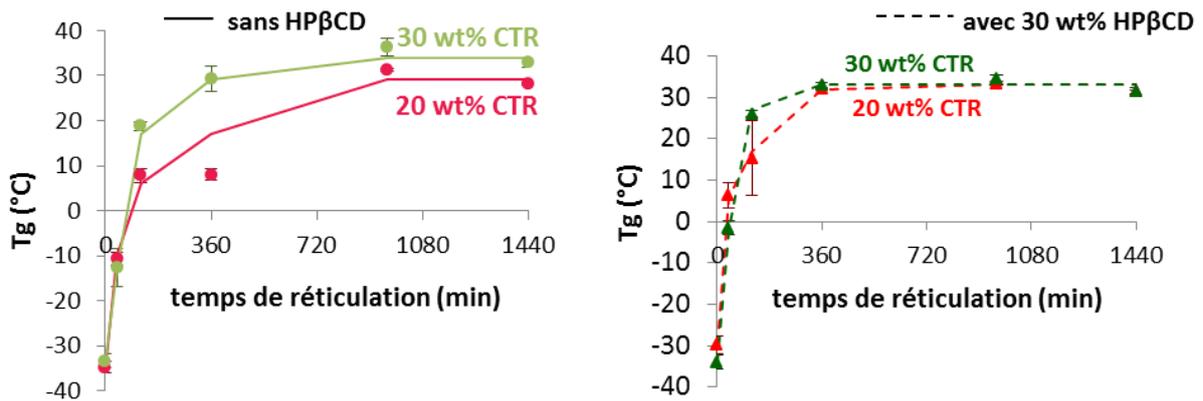


Figure VII.III. 5. Valeur de T_g en fonction de $t_{rét}$ pour des films (conditionnés à 58% H.R.) pour deux composition en CTR (20 et 30 wt% de CTR) avec 30 wt% ou sans HPβCD

Les T_g au plateau pour 20 et 30 wt% de CTR sont similaires à celles pour 40 wt% de CTR, soit de l'ordre de 30°C. La présence d'HPβCD n'a pas d'effet majeur sur l'évolution de la T_g .

Les films avec 30 wt% d'HPβCD étant fragiles, les tests de traction sont réalisés exclusivement sur les films sans HPβCD afin d'observer l'influence de la composition sur le comportement mécanique des films et sont présentés sur la Figure VII.III. 6.

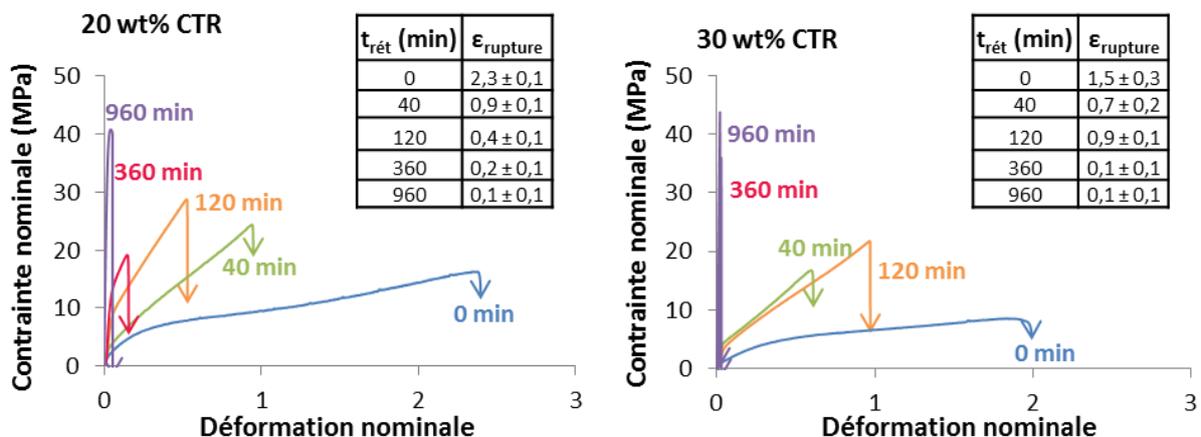


Figure VII.III. 6. Courbes de contrainte et déformation nominales pour des films de compositions intermédiaires (20 et 30 wt% de CTR) par traction uniaxiale à $T = 22^\circ\text{C}$ (films hydratés à 58 %H.R., sans HPβCD)

Pour 20 et 30 wt% de CTR, les films sont ductiles jusqu'au moment où toutes les chaînes de PVOH sont réticulées, comme révélé par RMN, c'est-à-dire jusqu'à $t_{\text{rét}} = 360$ min et $t_{\text{rét}} = 120$ min pour 20 et 30 wt% de CTR respectivement. Ces deux films semblent être de bons candidats car pour 30 et 20 wt% CTR, il existe des conditions pour lesquelles l'ensemble du PVOH est lié sans que les films ne soient trop fragiles.

III.3 Influence de la température de réticulation sur les caractéristiques des films

Les temps de chauffage permettant de réticuler l'ensemble des réactifs à 130 °C sont très longs (supérieurs à 360 min), ce qui n'est pas compatible avec une application industrielle. Une étude sur le traitement thermique a été menée afin de 1) déterminer l'influence de la température sur le temps nécessaire pour lier les réactifs et 2) analyser les propriétés des films résultantes. Deux choix de traitement thermique sont envisagés, d'une part un pré-séchage du film et d'autre part l'augmentation de la température de réticulation. En effet, de l'eau étant produite pendant la réaction de réticulation, une diminution de l'eau préalablement contenue dans le film pourrait favoriser l'équilibre vers la réaction d'estérification et ainsi augmenter la cinétique de réticulation. Les expériences menées dans cette démarche ont montré que le pré-séchage n'a pas eu d'influence sur la cinétique de réaction. Aussi, seule une étude sur l'augmentation de la température de chauffage (140 et 150 °C) est menée sur des films PVOH/CTR-80/20. Les films obtenus, présentés sur la Figure VII.III. 7, sont plans et transparents. Un jaunissement pour les films réticulés à 150°C est observé.



Figure VII.III. 7. Photographie des films de PVOH/CTR-80/20-120min réticulés à températures croissantes

L'étude RMN ^1H des composés résiduels pour les films réticulés à 140 et 150 °C montre clairement l'effet de la température sur la cinétique de réticulation (Figure VII.III. 8).

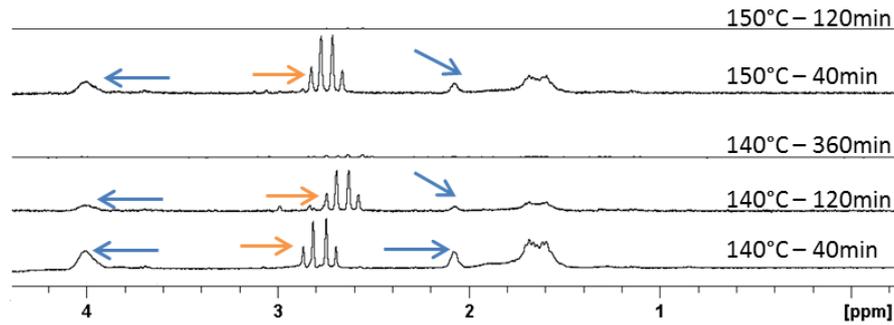


Figure VII.III. 8. Comparaison des spectres RMN ^1H dans le D_2O des réactifs résiduels pour des films PVOH/CTR-80/20 réticulés à 140 °C et 150 °C

En effet, le PVOH (flèche bleue) et le CTR (flèche orange) ne sont plus détectés à partir de 360 min pour les films réticulés à 140 °C, et 120 min pour ceux réticulés à 150 °C. Pour rappel, le temps nécessaire à 130 °C était de 960 min.

L'influence du traitement thermique sur la cinétique de la réaction de réticulation a aussi été évaluée (Figure VII.III. 9).

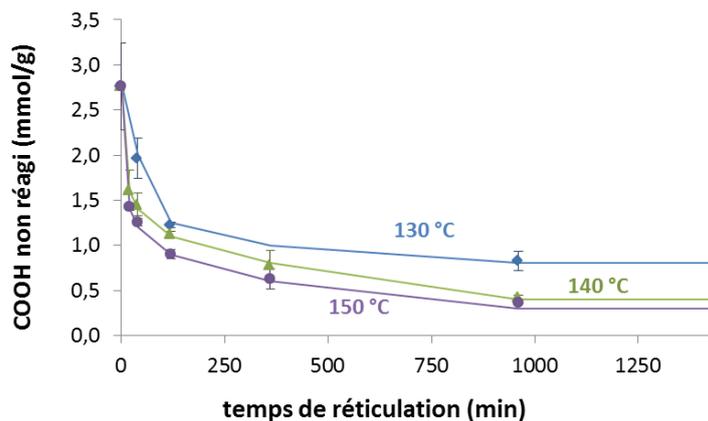


Figure VII.III. 9. COOH non réagis en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour des films PVOH/CTR-80/20 réticulés à différentes températures

La cinétique est accélérée avec la température, particulièrement à 150 °C. Les valeurs de COOH résiduels au plateau sont d'autant plus faibles que la température de réticulation est élevée, ce qui signifie que la post-réticulation est plus importante avec la température et des temps longs. L'élévation de la température de réticulation semble donc faciliter les réactions intermoléculaires.

Le suivi de la T_g en fonction de $t_{\text{rét}}$ pour les différents traitements thermiques est présenté sur la Figure VII.III. 10.

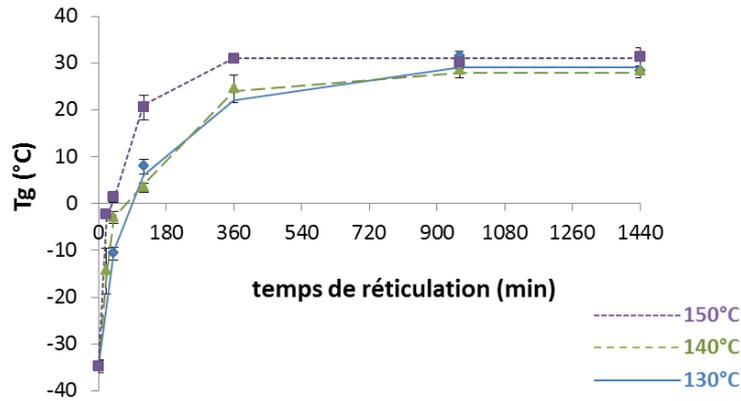


Figure VII.III. 10. Valeurs de Tg en fonction de $t_{rét}$ pour des films PVOH/CTR-80/20 (conditionnés à 58 %H.R.) selon différents traitements thermiques

L'évolution de la Tg pour 130 et 140 °C est similaire. Le comportement des films réticulés à 150 °C est différent, en corrélation avec les résultats obtenus pour le dosage des fonctions COOH résiduelles. La valeur de Tg au plateau est atteinte pour des temps de réticulation plus courts pour les films réticulés à 150 °C indiquant que la réticulation primaire est accélérée à cette température. La valeur au plateau est voisine pour les trois films (autour de 30 °C), ce qui confirme que la post-réticulation ne modifie pas la valeur de Tg au plateau.

Pour finir, les tests de traction pour les différentes températures de réticulation sont réalisés sur des films réticulés 120 min. Les résultats sont présentés sur la Figure VII.III. 11.

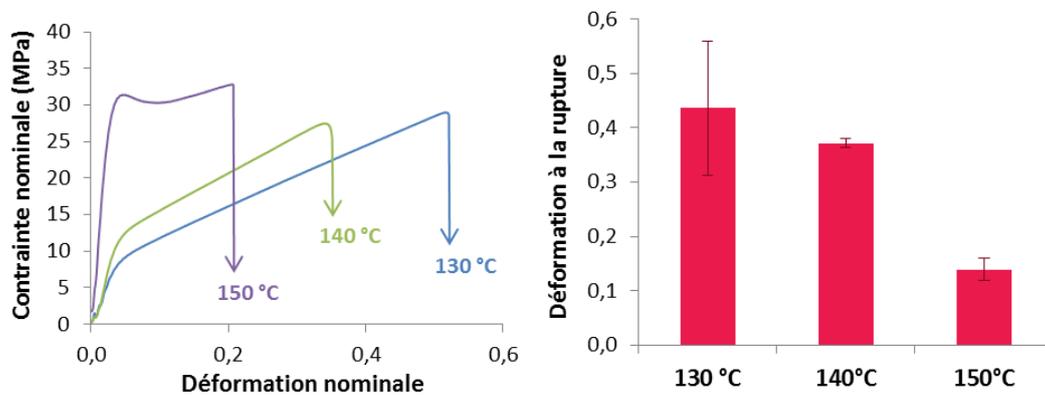


Figure VII.III. 11. Courbes de contrainte et déformation nominales et diagrammes de déformation à la rupture pour des films avec 20 wt% de CTR réticulés 120 min par traction uniaxiale à T = 22 °C pour des films hydratés à 58 %H.R.

A nouveau, le comportement des films réticulés à 130 et 140 °C est assez proche alors que celui du film réticulé à 150 °C se distingue. Le comportement différent du film à 150 °C est lié à la réaction de réticulation qui est plus avancée. Les films réticulés à 130 et 140 °C sont plus ductiles car moins réticulés et comportant une part de réactifs non réagis (rôle de plastifiant).

En conclusion l'augmentation de la température de traitement permet de diminuer le temps de réticulation nécessaire pour une conversion totale. Cependant, pour obtenir des films souples sans coloration jaune, il est préférable de ne pas dépasser 140 °C. Ces résultats nécessiteraient d'être complétés par une étude similaire sur les films avec 30 wt% de CTR.

IV. EFFET DE LA COMPOSITION ET DE LA RETICULATION SUR LA PERMEABILITE DES FILMS

L'étude de la perméabilité aux gaz (O_2 et vapeur d'eau) est importante pour l'application emballage alimentaire. Aussi, il est intéressant d'étudier l'impact de la réticulation et de l'incorporation d'HP β CD sur les propriétés de transport. Une étude préalable sur les films secs à 23 °C n'a pas permis de mettre en évidence une influence significative de la composition sur la perméabilité à O_2 . Compte tenu des fortes incertitudes sur les résultats expérimentaux, liées aux valeurs très faibles situées dans la limite de détection de l'appareil ($10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$), l'ensemble des films a une perméabilité à l'oxygène en moyenne de l'ordre de $0,01 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$. Cette valeur est en assez bon accord avec celle rapportée dans la littérature pour le PVOH de l'ordre de $0,0025 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ [29]. **La perméabilité à l'oxygène (OP)** en fonction de la composition pour des films hydratés (50 %H.R.) avec 20 wt% de CTR avec et sans HP β CD est présentée Figure VII.IV. 1.

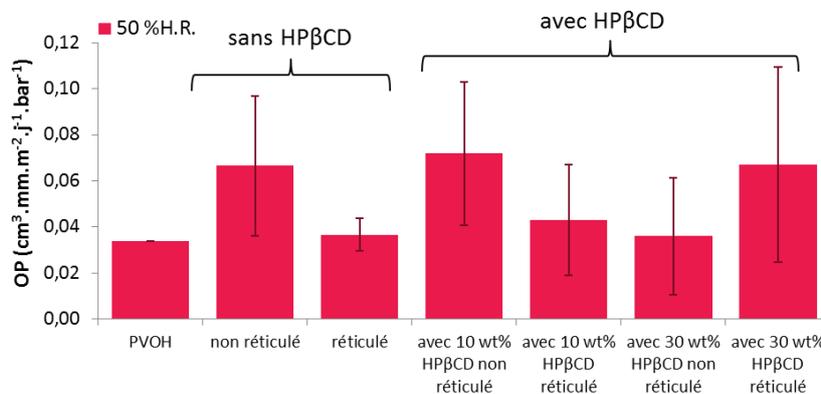


Figure VII.IV. 1. Etude de la perméabilité à l'oxygène en fonction de la composition des films à 20 wt% CTR hydratés (50 %H.R.) réticulés (360 min) ou non

Avec l'hydratation (50 %H.R. à 23 °C) pour l'ensemble des films, nous avons constaté une augmentation de la perméabilité à l'oxygène significative par rapport aux films secs liée à la diminution de la cristallinité et de la Tg provoquant une augmentation des coefficients de diffusion et de solubilité, et donc une augmentation de la perméabilité. Comme le montre la Figure VII.IV. 1, ni l'ajout de CTR ou d'HP β CD, ni la réticulation ne semblent influencer de façon significative la perméabilité du PVOH située autour de $0,034 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$. Les films

obtenus conservent plutôt une faible perméabilité à l'oxygène si on les compare à celle du PET orienté ($1,6 \text{ cm}^3.\text{mm}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ (0% H.R., 23 °C)) considéré comme très barrière à l'oxygène et au PP ($81 \text{ cm}^3.\text{mm}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{bar}^{-1}$ (0% H.R., 23 °C)), qui a une forte perméabilité à l'oxygène [29].

En ce qui concerne **la perméabilité à la vapeur d'eau (WVP)**, l'étude est menée sur des films hydratés (50 %H.R.) à 23 °C en fonction de la composition (Figure VII.IV. 2). Ces résultats sont, dans ces cas, déterminés avec une barre d'erreur acceptable. De manière générale, l'ajout de CTR et de façon moins marquée d'HP β CD tend à augmenter la perméabilité à la vapeur d'eau par rapport au PVOH ($12 \text{ g}.\text{mm}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{bar}^{-1}$). Néanmoins, alors que la perméabilité diminue avec la réticulation dans le cas des films sans HP β CD, l'effet inverse est observé dans le cas des films avec HP β CD. Il est difficile d'expliquer ce phénomène pour le moment. Cela nécessiterait une étude structurale des films plus approfondie.

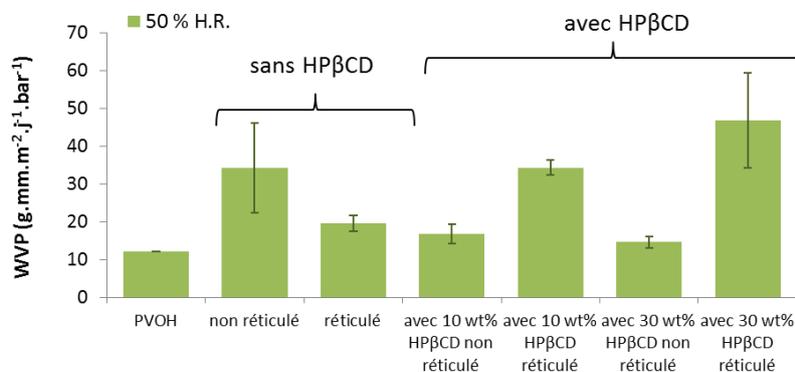


Figure VII.IV. 2. Etude de la perméabilité à la vapeur d'eau en fonction de la composition des films à 20 wt% de CTR hydratés (50 %H.R.) réticulés (360 min) ou non

Les valeurs sont difficilement comparables à celles de la littérature qui sont données pour des conditions de 90% H.R. et 38 °C. Cependant, il est à noter que par comparaison avec le PA66 ($1,5 \text{ g}.\text{mm}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{bar}^{-1}$), qui a une forte perméabilité à la vapeur d'eau, et au PP ($0,26 \text{ g}.\text{mm}.\text{m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{bar}^{-1}$), qui est barrière à la vapeur d'eau [29], les films obtenus restent plutôt perméables à la vapeur d'eau. En conclusion, quel que soit le film considéré, la perméabilité (O_2 ; H_2O) est similaire à celle du PVOH.

Pour résumer, les compositions intermédiaires (20 et 30 wt% CTR) ont montré qu'à partir de 20 wt% CTR, l'ensemble des réactifs peut être liés de façon covalente. A 130 °C, ces deux compositions permettent d'avoir des films ductiles pour des temps de réticulation raisonnables. Une augmentation de la température diminue le temps de réticulation et la température de 140 °C semble un bon compromis entre temps de réticulation et souplesse. L'ensemble des films est peu perméable à l' O_2 et fortement perméable à la vapeur d'eau.

Chapitre VIII :
Etude des films chargés en NaBz

L'étude des conditions d'élaboration (composition, procédé, température, temps) des films de PVOH, **non chargés**, réticulés par le CTR ayant abouti à une bonne compréhension des mécanismes et propriétés des films, ce travail est poursuivi par **l'étude des films chargés en NaBz** seul ou sous forme de complexe avec l'HP β CD. Cette dernière permet d'envisager une libération prolongée du conservateur. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la formation d'un complexe d'inclusion entre le NaBz et l'HP β CD et dans un second temps, l'étude des films chargés est abordée. Pour ce faire, la présence du NaBz sera préalablement mise en évidence dans les films avant de suivre sa libération dans l'eau. Enfin, l'activité antimicrobienne sur gélose des films sera étudiée.

I. ETUDE PAR RMN DU COMPLEXE ENTRE LE NABZ ET L'HPBCD

Aucun résultat à ce sujet n'ayant été reporté dans la littérature, l'étude de la complexation entre HP β CD et NaBz est menée par RMN ^1H afin d'observer la potentielle inclusion. Les spectres RMN ^1H de l'HP β CD et du NaBz sont présentés en Annexe 2 (Figure A. 1 et Figure A. 6).

Une séquence ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) d'un mélange équimolaire d'HP β CD et de NaBz est réalisée dans le but de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion [HP β CD : NaBz]. La Figure VIII.I. 1 rappelle la structure de l'HP β CD (les protons internes de la cavité sont H₃ et H₅) et du NaBz. Le spectre ROESY 2D pour un mélange équimolaire entre NaBz et HP β CD à 15 mM est présenté sur la Figure VIII.I. 2.

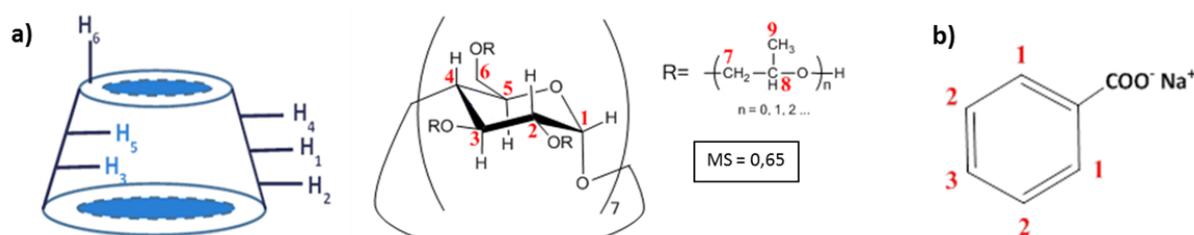


Figure VIII.I. 1. Schéma et formule d'HP β CD (a) et formule du NaBz (b) pour le positionnement des protons

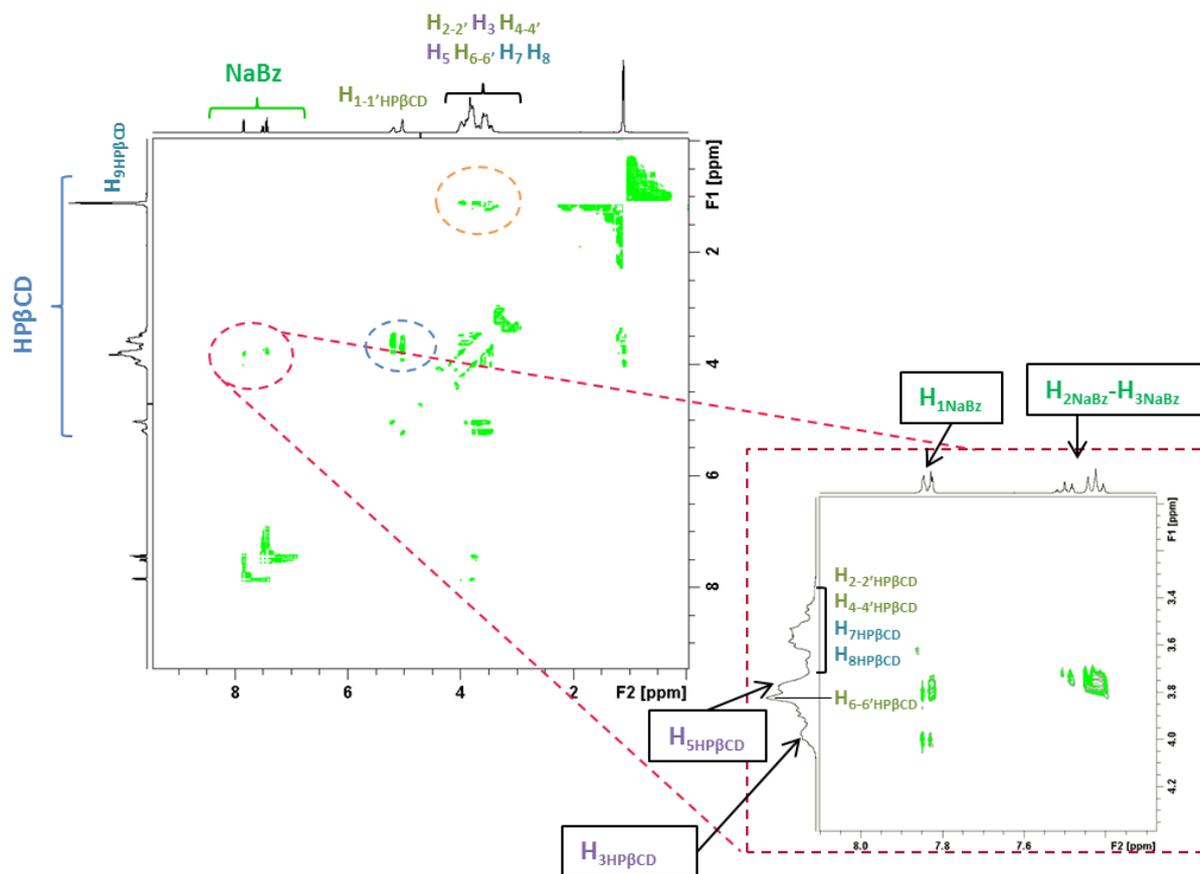


Figure VIII.I. 2. Spectre ROESY du mélange équimolaire de HPβCD (15 mM) et NaBz (15 mM) dans D₂O

La carte 2D du spectre ROESY révèle des taches de corrélation entre les protons aromatiques du NaBz et les protons internes H₃ et H₅ de l'HPβCD (cercle rose). Ce résultat va dans le sens d'une inclusion du NaBz dans la cavité de l'HPβCD. On observe également deux autres taches de corrélation entre les protons de l'HPβCD, les zooms de ces taches de corrélation sont présentés en Annexe 8 (Figure A. 14 et Figure A. 15). La première est entre les protons H_{1-1'} et les protons H_{2-2'}, H_{4-4'}, H₇, H₈ et H₆ (cercle bleu) et s'explique par la proximité spatiale de ces différents protons à l'extérieur de la cavité. La deuxième tache est observée entre les CH₃ (H₉) du groupement hydroxypropyl et l'ensemble des protons de l'HPβCD (cercle orange), ce qui indique que le bras hydroxypropyl peut entrer dans la cavité.

Il reste maintenant à déterminer la stœchiométrie du complexe d'inclusion entre HPβCD et NaBz. Dans ce but, une étude est réalisée par la méthode des variations continues (méthode de JOB). Pour cela, des solutions de concentrations variables en molécules hôtes (HPβCD) et en molécules invitées (NaBz) sont préparées (HPβCD : NaBz variant de 10 : 0 à 0 : 10). Le rapport molaire des concentrations varie dans une gamme : $0 < \frac{[NaBz]}{[NaBz] + [HP\beta CD]} < 1$ ou encore $0 < \frac{[HP\beta CD]}{[NaBz] + [HP\beta CD]} < 1$. La concentration totale, $[NaBz] + [HP\beta CD]$, est constante. Le paramètre expérimental mesuré est le déplacement chimique des protons qui sera affecté par la

complexation. Le graphique de la concentration ($[NaBz]$ ou $[HP\beta CD]$) multipliée par la variation de déplacement chimique des protons correspondants ($\Delta\delta_{NaBz}$ ou $\Delta\delta_{HP\beta CD}$) en fonction du rapport molaire des concentrations ($\frac{[NaBz]}{[NaBz]+[HP\beta CD]}$ ou $\frac{[HP\beta CD]}{[NaBz]+[HP\beta CD]}$) est tracé. Le maximum de la courbe résultante donne le rapport stœchiométrique du complexe (par exemple si le maximum est obtenu pour un rapport molaire de 0,5, le complexe est de type 1:1). La variation de déplacements chimiques des protons H_3 et H_5 de l'HP β CD est présentée en Figure VIII.I. 3 (a) et celle des protons aromatiques du NaBz en Figure VIII.I. 3 (b).

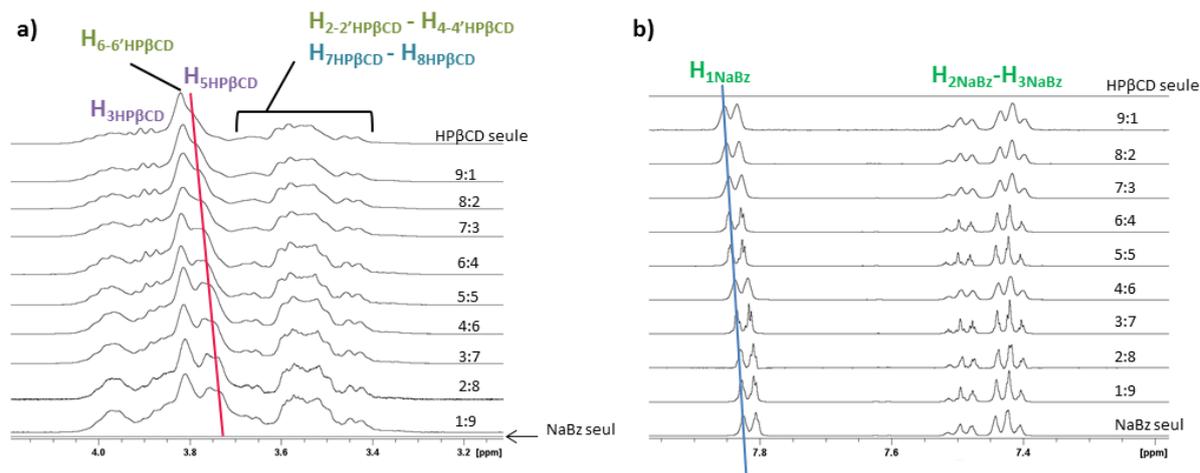


Figure VIII.I. 3. Variation de déplacements chimiques des protons H_3 et H_5 de l'HP β CD selon le rapport $[HP\beta CD] : [NaBz]$ (a) et des protons aromatiques du NaBz selon le rapport $[HP\beta CD] : [NaBz]$ (b)

La variation de déplacements chimiques des protons H_3 et H_5 est mise en évidence par le **segment rose** et celle de déplacements chimiques des protons aromatiques par le **segment bleu**. A partir de ces déplacements, nous avons pu tracer les courbes de JOB (Figure VIII.I. 4).

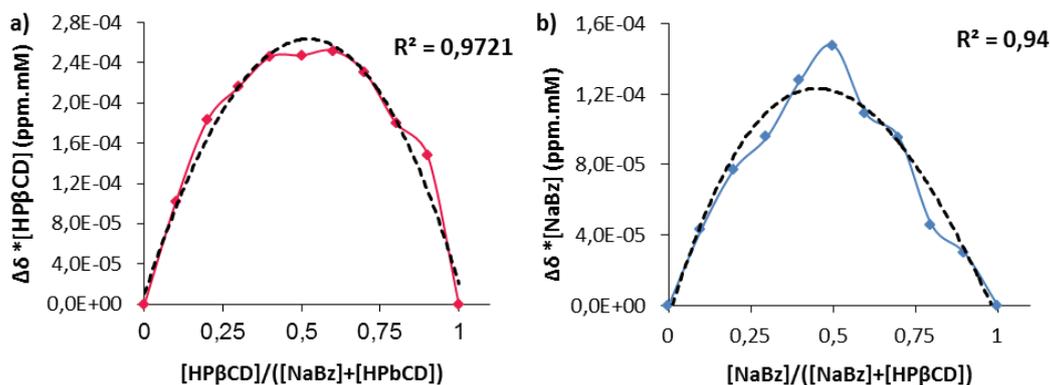


Figure VIII.I. 4. Variation du déplacement chimique du proton H_5 de l'HP β CD en fonction de la fraction d'HP β CD dans le mélange (a) et des protons aromatiques du NaBz en fonction de la fraction de NaBz dans le mélange (b)

La Figure VIII.I. 4 (a) montre que la variation du déplacement chimique connaît un maximum pour une valeur de $\frac{[HP\beta CD]}{[NaBz]+[HP\beta CD]}$ proche de 0,5. Parallèlement la Figure VIII.I. 4 (b) montre que

la variation du déplacement chimique connaît un maximum pour une valeur de $\frac{[NaBz]}{[NaBz] + [HP\beta CD]}$ également proche de 0,5. Le complexe majoritaire [HP β CD : NaBz] est donc de type 1 :1. Les coefficients de corrélation des courbes ne sont pas parfaits, ceci pourrait s'expliquer par le fait que le bras hydroxypropyl entre dans la cavité et perturbe la complexation.

Pour résumer, cette étude a mis en évidence la complexation du NaBz avec l'HP β CD. De par cette inclusion, on peut envisager une libération prolongée du NaBz.

II. MISE EN EVIDENCE DU NABZ DANS LES FILMS

La RMN solide ^{13}C a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de NaBz dans les films. Pour cela un spectre d'un film contenant 10 wt% de NaBz est comparé à un film de PVOH/CTR et au NaBz (Figure VIII.II. 1).

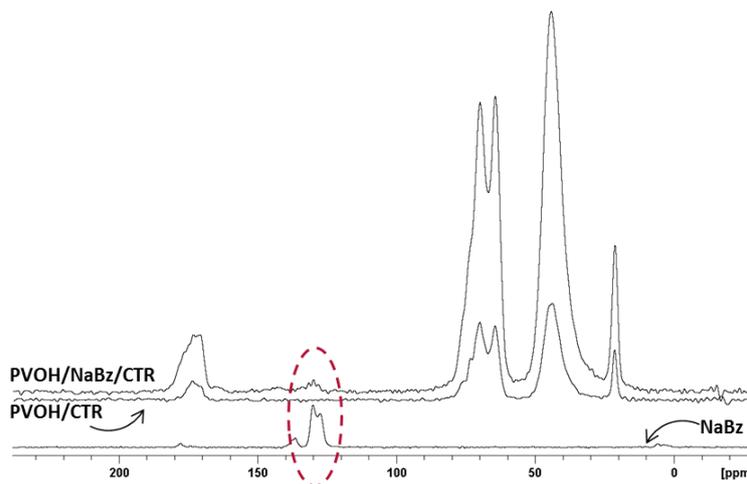


Figure VIII.II. 1. Spectres RMN ^{13}C d'un film PVOH/NaBz/CTR contenant 10 wt% de NaBz comparé à un film PVOH/CTR et au NaBz

Uniquement à partir de 10 wt% de NaBz, les films ont montré un pic aux alentours de 130 ppm (Figure VIII.II. 1). Ce pic correspond aux protons aromatiques du NaBz. La limite de détection du NaBz dans les films par RMN solide ^{13}C est donc de 10 wt%, cette technique n'est pas assez sensible pour notre travail.

De même, par spectroscopie IR, des travaux précédents menés au laboratoire ont montré que le NaBz à des teneurs inférieures à 5 wt% pour des films de PVOH n'est pas détectable. Pour détecter des taux inférieurs (1 à 3 wt%), nous avons finalement opté pour la spectroscopie Raman car le NaBz présente un spectre ayant une bande intense vers 1000 cm^{-1} . Dans ce but, les spectres Raman d'un film contenant 1 wt% de NaBz et d'un film PVOH/CTR ont été comparés (Figure VIII.II. 2).

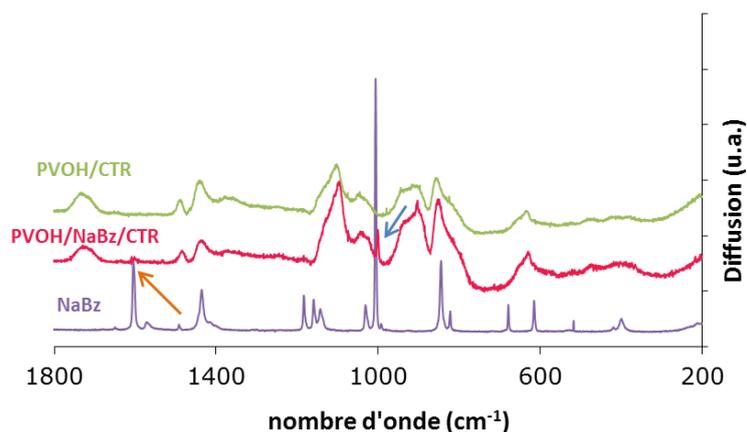


Figure VIII.II. 2. Spectre Raman d'un film PVOH/NaBz/CTR (contenant 1 wt% de NaBz) comparé au NaBz (sous forme de poudre) et à un film non chargé PVOH/CTR

Les attributions des trois spectres Raman sont présentées dans le Tableau VIII.II. 1. Sur le spectre du film PVOH/NaBz/CTR, on observe les pics à 1000 cm^{-1} (flèche bleue) et 1600 cm^{-1} (flèche orange), caractéristiques du cycle aromatique monosubstitué du NaBz.

Tableau VIII.II. 1. Attributions des pics des spectres Raman des films PVOH/NaBz/CTR et PVOH/CTR et du NaBz

$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹) NaBz	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹) PVOH/CTR	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹) PVOH/CTR/NaBz	Attribution
	1720	1717	C=O acide carboxylique saturé aliphatique C=O ester
1600		1586	-C=C- aromatique
	1480	1478	Déformation -(CH ₂)-
1433		1431	-C=C- aromatique CO ₂ - sel d'acide carboxylique
	1430	1431	Déformation CH d'alcool secondaire Elongation CO et déformation OH d'acide carboxylique
1180			Déformation CH aromatique dans le plan
	1100	1088	Elongation C-C
1000		1000	Déformation CH aromatique dans le plan
	900, 850	883, 830	C-C doublet
840, 677		833	Déformation CH aromatique hors du plan
	625	625	Déformation CO en dehors du plan
612, 517			Déformation CH aromatique dans le plan

L'apparition des pics du NaBz sur des films contenant de l'HP β CD a également été observée. La spectroscopie Raman est donc la méthode la plus adaptée pour la détection du NaBz dans nos films car elle permet de mettre en évidence jusqu'à 1 wt% de NaBz.

La microsonde Raman permet également d'effectuer l'image 2D de la répartition spatiale du NaBz sur 1 cm² avec un pas de 200 μm. Nous avons choisi d'observer la répartition de la bande à 1000 cm⁻¹ car elle est la plus intense pour le NaBz. Les cartographies des films chargés avec 1 ou 3 wt% de NaBz sous forme de complexe ou non sont présentées sur la Figure VIII.II. 3, l'intensité de la couleur rouge étant proportionnelle à la quantité de NaBz.

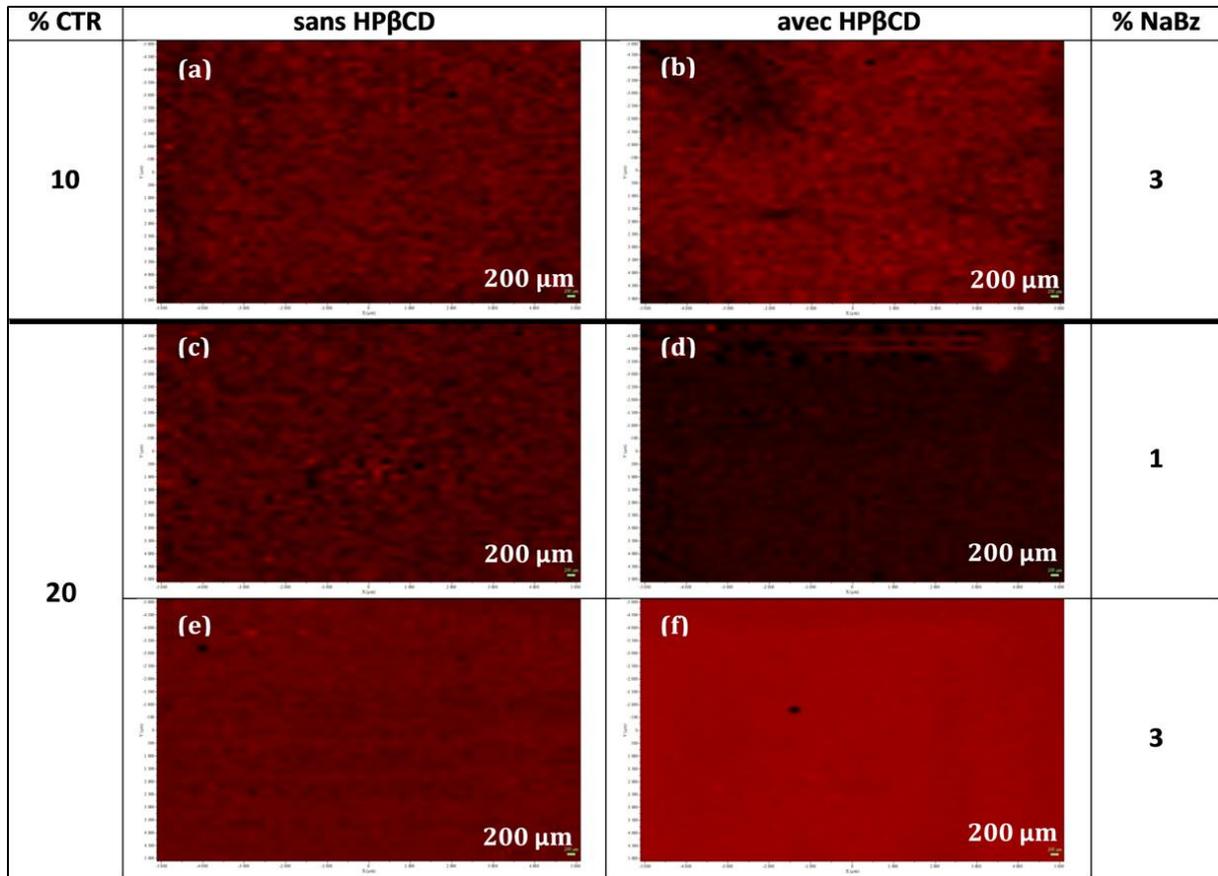


Figure VIII.II. 3. Cartographies des films chargés avec 1 ou 3 wt% de NaBz sous forme de complexe ou non

De manière générale, le NaBz est réparti de façon homogène pour l'ensemble des films. L'homogénéité est améliorée quand le taux de CTR et de NaBz augmente. Le film à 3 wt% de NaBz sous forme de complexe avec HPβCD et 20 wt% de CTR montre une excellente homogénéité à l'échelle choisie.

III. ETUDE DE LA LIBERATION DU NABZ

Ayant vérifié la présence de NaBz dans les films, nous avons donc pu envisager des tests de libération.

Les tests de libération ont été développés par adaptation de la directive 85/572/CEE sur les matériaux plastiques en contact avec les denrées alimentaires [20]. Celle-ci définit 4 simulants d'aliment pour les tests de libération de composants de l'emballage vers l'aliment: l'eau distillée, l'acide acétique 3 % (p/v), l'éthanol 10 % (v/v) et l'huile d'olive raffinée. Dans notre cas, le simulant utilisé est l'eau distillée, qui s'avère être un système simple nous permettant d'étudier les différents phénomènes mis en jeu. De plus, elle est préconisée par le règlement 10/2011/CE pour l'évaluation de la migration globale lorsque l'application vise tous les types de denrées alimentaires [26]. La directive préconise que le test soit réalisé à 40 °C. Les températures choisies pour notre test seront 37 °C (proche de la borne préconisée par la directive), 25 °C (température ambiante réelle) et 4 °C (correspondant à la température dans le réfrigérateur).

Typiquement, un échantillon de film est immergé dans de l'eau distillée sous agitation. La libération du NaBz en solution est suivie par spectroscopie UV. Après chaque mesure, le volume de prélèvement est remis dans le volume initial. Le pH a été mesuré au cours des tests et se situe autour de pH 5-6.

L'influence de plusieurs paramètres sur la cinétique de libération ont été étudiés : le temps de réticulation ($t_{\text{rét}}$) des films, la quantité d'agent réticulant (CTR), la quantité de NaBz, la présence d'HP β CD en tant que vecteur d'agent antimicrobien et la température de libération. Ce « screening » permettra de cerner le meilleur candidat pour la problématique envisagée. Notons que les films résistent à l'immersion dans l'eau lors du test de libération.

III.1 Influence des paramètres de réticulation

Rappelons que les films ont été réticulés à 130 °C. L'influence de la réticulation sur la libération du NaBz est ici étudiée à travers **la quantité de CTR dans le film et le temps de réticulation** ($t_{\text{rét}}$). La Figure VIII.III. 1 compare la cinétique de libération du NaBz pour 3 films PVOH/NaBz/CTR à concentration en NaBz constante (3 wt% soit 30 mg/g) et à concentration en CTR croissante (10, 20 et 30 wt%). Pour chaque formulation de film, deux $t_{\text{rét}}$ sont comparés. La quantité de NaBz libéré est exprimée en % de la quantité de NaBz introduit dans le film.

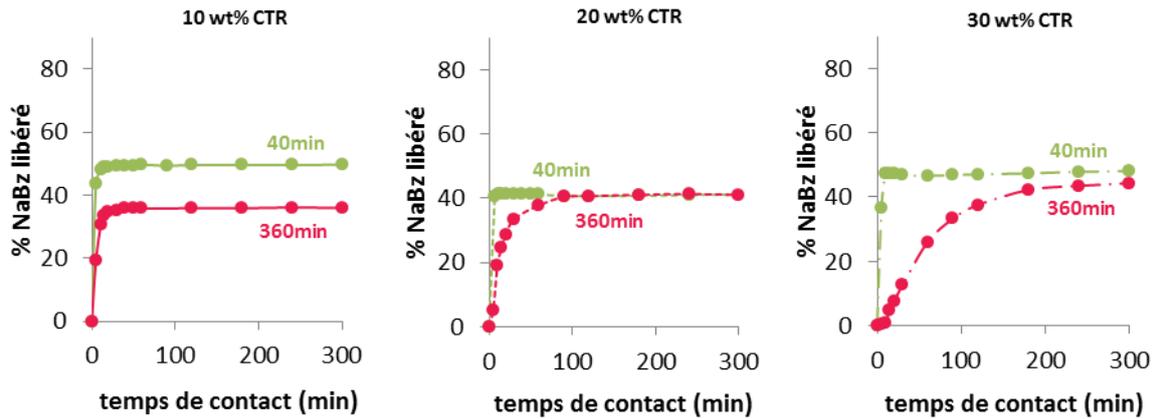


Figure VIII.III. 1. Cinétiques de libération à 37 °C du NaBz pour des films PVOH/NaBz/CTR à 3 wt% de NaBz, 3 concentrations en CTR et deux $t_{rét}$

De façon générale, les courbes montrent une augmentation de la quantité de NaBz libéré avec le temps de contact jusqu'à atteindre un plateau. Pour l'ensemble des films, la quantité de NaBz libéré ne dépasse pas 50 % de la quantité de NaBz introduit dans les films. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les molécules de NaBz sont en partie emprisonnées dans le réseau ou interagissent avec les COOH résiduels greffés sur le film (liaisons ioniques ou covalentes).

Pour tous les films réticulés 40 min, quel que soit le taux en CTR, le plateau est très vite atteint (entre 4 et 10 min). La quantité de CTR n'influence donc pas la cinétique de libération pour un $t_{rét}$ faible (40 min).

En revanche, **pour 360 min de réticulation**, le plateau est atteint après 12, 41 et 118 min pour 10, 20 et 30 wt% de CTR respectivement. Pour ce temps de réticulation, plus la quantité de CTR est importante, plus la libération est retardée. Les quantités libérées au plateau sont assez voisines et sont de l'ordre de 40 % de la quantité de NaBz introduit. Ce comportement est directement lié à la densité du réseau macromoléculaire. Pour un faible taux de CTR (10 wt%), la densité du réseau est faible (27 motifs entre deux nœuds de réticulation calculés cf. Annexe 5). Quand la quantité de CTR augmente (à partir de 20 wt%), un temps long de 360 min est nécessaire pour obtenir un réseau stable (ensemble des réactifs liés, quantité de COOH résiduels au plateau cf. Chapitre VII) qui, par ailleurs, est d'autant plus dense que la quantité de CTR est importante (11 et 5 motifs entre deux nœuds de réticulation pour 20 et 30 wt% de CTR respectivement).

Cette densité de réticulation influence la cinétique de libération mais assez peu la quantité libérée pour 20 et 30 wt% de CTR. En revanche, le comportement des films avec 10 wt% de CTR est assez particulier, une diminution de la quantité libérée est observée avec le $t_{rét}$. Ce comportement reste inexpliqué pour le moment. Ces résultats montrent qu'il est possible de prolonger la libération en faisant varier le $t_{rét}$ et le % de CTR.

III.2 Influence du complexe [HP β CD : NaBz]

De manière à modifier la cinétique de libération, nous avons entrepris d'étudier l'impact de la présence d'un complexe entre HP β CD et NaBz sur la libération de ce dernier. Dans ce but, nous allons comparer des films avec ou sans HP β CD, mais aussi des films avec une dextrine linéaire, la maltodextrine (MX) (modèle sans cavité). Pour cela, les libérations des films contenant 20 wt% de CTR et 3 wt% de NaBz seul, sous forme de complexe avec HP β CD ou de mélange avec de la MX sont comparées sur la Figure VIII.III. 2.

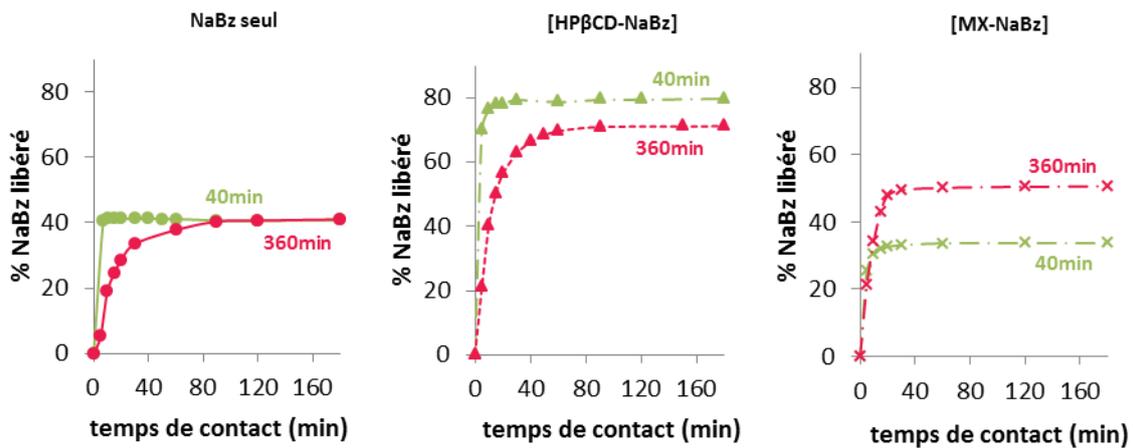


Figure VIII.III. 2. Cinétiques de libération à 37 °C du NaBz de films contenant 20 wt% de CTR et 3 wt% de NaBz avec et sans dextrines à deux $t_{rét}$

A taux de CTR équivalent, si on considère la cinétique de libération :

- **Pour les films peu réticulés** ($t_{rét} = 40$ min), les plateaux sont rapidement atteints (≤ 10 min) quelle que soit la composition du film (avec ou sans dextrine).
- **Les films réticulés 360 min**, et ayant donc une densité de réseau plus importante, présentent une libération retardée avec ou sans HP β CD. Seul le film contenant de la MX a une libération peu retardée. L'incorporation de la dextrine linéaire semble modifier la structure du réseau (taille des mailles, propriétés de gonflement). Nous n'avons cependant pas mené d'étude pouvant confirmer cette hypothèse.

A taux de CTR équivalent, si on considère la quantité de NaBz libéré au plateau :

- L'incorporation d'un complexe d'inclusion [HP β CD : NaBz] préalablement formé, augmente la quantité libérée d'environ un facteur 2 par rapport aux deux autres films. Par exemple, pour les films réticulés 360 min, la quantité libérée passe de 40 - 51 % sans HP β CD à 74 % avec HP β CD. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat :
 - La taille des molécules d'HP β CD aurait pour conséquence un réseau plus rigide avec des mailles de plus grande taille que ceux des deux autres films. La MX est

linéaire et ne forme donc pas de complexe d'inclusion. Elle a une structure plus proche de celle du PVOH, elle est plus souple.

- La complexation préalable du NaBz le rendrait plus disponible car il serait moins prisonnier du réseau.
- La présence d'HP β CD minimiserait les interactions entre le NaBz et le CTR.
- On constate, encore une fois, le comportement particulier du film contenant MX, pour lequel la quantité libérée est supérieure après un temps de réticulation de 360 min.

Afin d'approfondir les résultats sur l'augmentation de la quantité de NaBz libéré au plateau en présence d'HP β CD, une cinétique de libération d'un film contenant un mélange physique d'HP β CD et de NaBz, non complexé, réticulé 360 min, est comparée à celle d'un film avec le complexe en Figure VIII.III. 3.

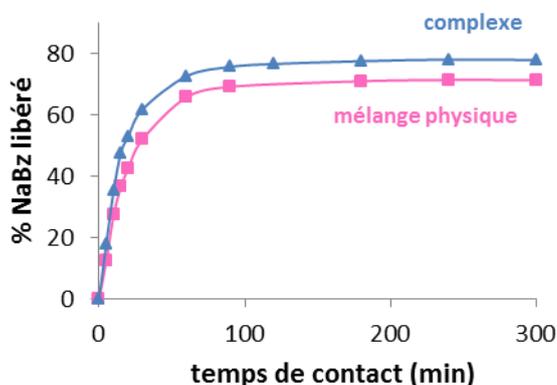


Figure VIII.III. 3. Comparaison des cinétiques de libération à 37 °C entre le complexe [HP β CD : NaBz] et un mélange physique pour des films avec 20 wt% de CTR, 3 wt% de NaBz, réticulés 360 min

Aux incertitudes près, il y a peu de différences de comportement entre le mélange physique et le complexe préalablement formé. L'augmentation de la quantité de NaBz libéré est donc probablement due à l'incorporation de l'HP β CD qui modifie la structure du réseau tridimensionnel formé (mailles plus grandes). Néanmoins, pour le mélange physique, un phénomène d'inclusion du NaBz dans la cavité de l'HP β CD dans la solution de préparation du film est envisageable. Dans ce cas, l'inclusion du NaBz le protégerait des interactions avec les COOH résiduels.

III.3 Influence de la quantité de NaBz

L'effet de la quantité de NaBz sur les profils de libération est étudié dans ce paragraphe. Dans ce but, la libération de films PVOH/NaBz/CTR contenant une quantité de NaBz croissante est comparée pour deux $t_{\text{rét}}$ (40 et 360 min) sur la Figure VIII.III. 4. Pour cette étude, la quantité de NaBz libéré est exprimée en mg/g.

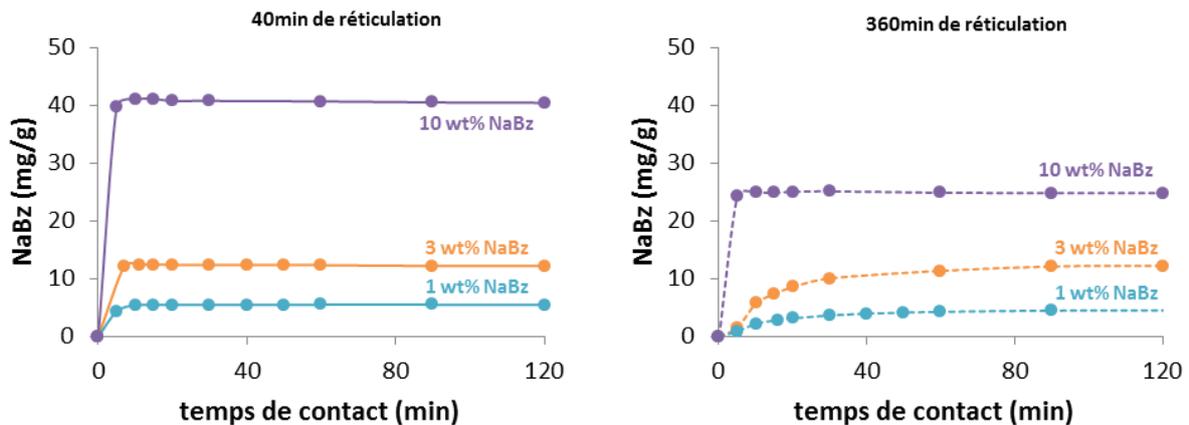


Figure VIII.III. 4. Cinétiques de libération à 37 °C pour des films PVOH/NaBz/CTR contenant 1, 3 ou 10 wt% de NaBz pour deux $t_{\text{rét}}$ (40 et 360 min)

Pour des films de formulations équivalentes et sans HP β CD :

- Quel que soit le temps de réticulation, la quantité libérée augmente avec la quantité initiale incorporée dans le film. Exprimées en %, les quantités libérées ne sont jamais totales. Elles sont globalement plus importantes pour **les films moins réticulés** ($t_{\text{rét}} = 40$ min), soit de l'ordre de 40 à 60 %, que pour **les films plus réticulés** ($t_{\text{rét}} = 360$ min), soit de l'ordre de 20 à 50 %. L'augmentation de la quantité libérée en fonction de la quantité de NaBz incorporé n'est pas linéaire. Par exemple, pour les films réticulés 360 min, on observe une diminution du pourcentage de NaBz libéré avec l'augmentation de la quantité incorporée dans le film, soit 44, 40 et 25 % libérés pour 1, 3 et 10 wt% de NaBz incorporé respectivement.
- Au niveau du comportement cinétique, comme pour les exemples précédents, **les films plus réticulés** présentent globalement un profil de libération retardé (1 et 3 wt% de NaBz). Notons cependant le comportement particulier du film réticulé 360 min avec le plus fort taux en NaBz (10 wt%) pour lequel la cinétique de libération est plus rapide que pour les deux autres films (1 et 3 wt% NaBz incorporé). Une quantité importante de NaBz (10 wt%) semble être à l'origine d'une mauvaise répartition dans le film avec du NaBz exclus du réseau macromoléculaire. Notons que les films obtenus avec 10 wt% de NaBz sont blanchâtres.

L'influence de la présence de 10 wt% d'HP β CD pour des films avec 1 ou 10 wt% de NaBz a été mise en évidence sur la Figure VIII.III. 5.

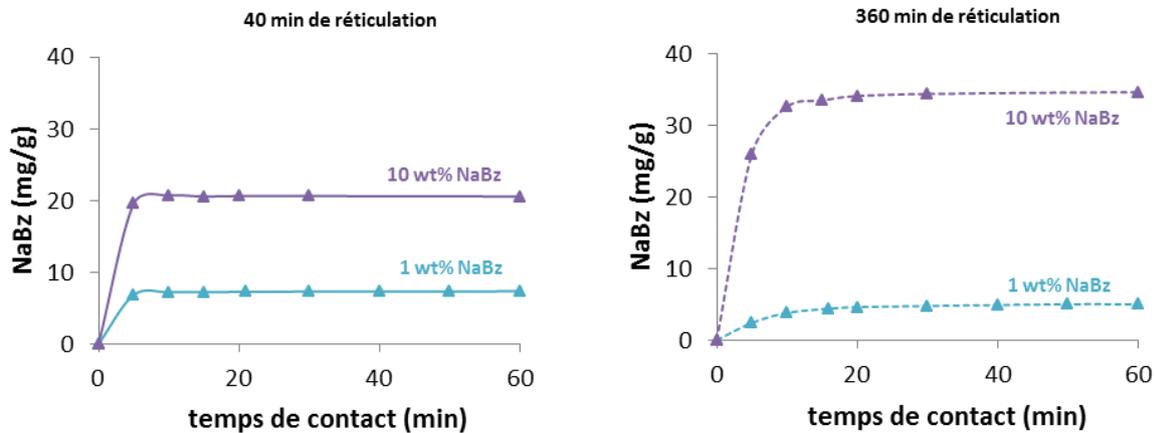


Figure VIII.III. 5. Cinétiques de libération à 37 °C pour des films PVOH/[HP β CD-NaBz]/CTR contenant 1 ou 10 wt% de NaBz pour deux $t_{rét}$ (40 et 360 min)

Pour des films de formulations équivalentes en présence d'HP β CD :

- Comme pour les films sans HP β CD, la quantité de NaBz libéré augmente avec la quantité initiale incorporée dans le film de façon non proportionnelle (50 % pour 1 wt% de NaBz incorporé et 31 % pour 10 wt%).
- Quelle que soit la quantité de NaBz dans le film, un effet retard est observé pour **les films réticulés 360 min**. Contrairement aux films sans HP β CD, l'incorporation de 10 wt% de NaBz n'accélère pas la cinétique de libération (début du plateau à 22 min et 19 min pour 1 et 10 wt% de NaBz respectivement). Ce résultat pourrait s'expliquer par une meilleure répartition du NaBz en présence d'HP β CD.

De manière générale, cette étude montre que la quantité libérée en mg/g augmente avec la quantité de NaBz dans le film bien que la tendance ne soit pas proportionnelle, avec ou sans HP β CD. La cinétique de libération, quant à elle, ne semble pas modifiée par la quantité en NaBz, à l'exception du film sans HP β CD réticulé 360 min contenant 10 wt% de NaBz (Figure VIII.III. 4).

III.4 Influence de la température de libération

Un dernier paramètre important, concernant ces tests simulant la libération, est la température d'essai car, en fonction de l'aliment, la température de stockage sera différente. Nous avons donc étudié l'effet de la température de libération sur des films de compositions équivalentes (Figure VIII.III. 6).

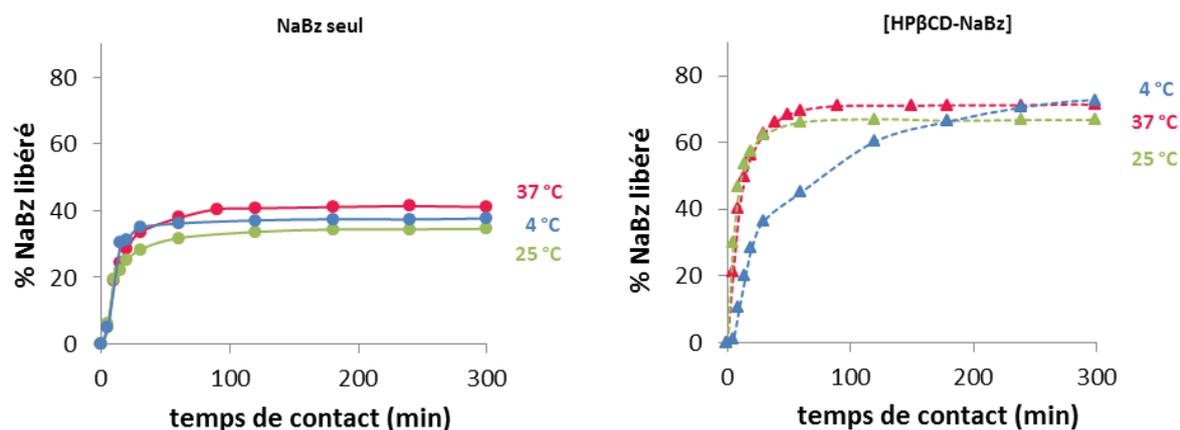


Figure VIII.III. 6. Cinétiques de libération du NaBz pour des films avec 20 wt% de CTR, 3 wt% de NaBz avec ou sans HP β CD réticulés 360 min : Effet de la température de libération

Pour les films sans HP β CD, la cinétique de libération (début de plateau vers 40 min) ainsi que la quantité de NaBz libéré (autour de 35 - 40 %) ne sont pas influencées par la température de libération. **Pour les films avec HP β CD**, les cinétiques de libération et les quantités de NaBz sont similaires à 25 et 37 °C. En revanche, la température de 4 °C semble ralentir la cinétique de libération. Or, la constante de stabilité des complexes avec les CDs diminue lorsque la température augmente, comme il a été observé pour un couple entre β CD et acide benzoïque [42;242], ce qui explique le ralentissement de la libération à 4 °C. Ce résultat confirme l'intérêt d'utiliser l'HP β CD et permet d'envisager l'adaptation des compositions et du temps de réticulation des films en fonction de la température d'entreposage.

Bilan des résultats de libération

L'impact des différents paramètres structuraux (quantité d'agent réticulant, temps de réticulation, HP β CD, %NaBz) ayant été étudié, il est nécessaire de dégager les meilleurs candidats pour la libération. Pour cela, le Tableau A. 6, présenté en Annexe 9, regroupe de manière exhaustive toutes les caractéristiques sur le réseau et la libération des films étudiés (quantité de COOH résiduels des films non chargés de composition équivalente, temps du début du plateau et quantité de NaBz libéré au plateau). La quantité des COOH résiduels des films non chargés de composition équivalente permet de donner une indication sur la densité du réseau du film et sur le nombre de COOH libres qui peuvent interagir avec le NaBz. Les paramètres recherchés pour la libération et l'activité antimicrobienne sont un temps long de début de plateau, une quantité élevée de NaBz libéré tout en gardant des fonctions COOH résiduelles permettant en parallèle une activité antimicrobienne par contact.

Les quantités idéales de CTR par rapport à cet objectif sont de 20 ou 30 wt% pour des $t_{\text{rét}}$ à partir de 360 min de réticulation. Il est à noter que l'augmentation de $t_{\text{rét}}$ (960 et 1440 min) permet encore de retarder l'obtention du plateau (79 et 100 min respectivement) pour les films PVOH/NaBz/CTR-77/3/20, mais ne modifie pas la quantité libérée. La quantité croissante de NaBz permet d'augmenter la quantité (mg/g) de NaBz libéré mais cette tendance n'est pas proportionnelle. Les proportions de NaBz pour lesquelles la cinétique de libération est la plus lente sont 1 et 3 wt%. Par ailleurs, 3 wt% de NaBz initial permettant de libérer 3 à 4 fois plus de NaBz que 1 wt% en NaBz, cette concentration de 3 wt% semble un bon choix pour l'activité antimicrobienne. Contrairement à ce qui était attendu, l'HP β CD ne permet pas de prolonger la libération mais permet de libérer presque deux fois plus de NaBz. Les films de PVOH contenant 20 wt% de CTR, 30 wt% d'HP β CD et 3 wt% de NaBz à partir de 360 min de réticulation semblent donc être les meilleurs candidats. Cependant, ces temps longs de réticulation sont peu favorables pour une application industrielle. Par ailleurs, en présence d'HP β CD, la diminution de la température de libération permet un ralentissement de la cinétique de libération.

L'étude approfondie de la libération en milieu aqueux n'est cependant pas complètement représentative et est assez loin des conditions réelles d'action des films d'emballage antimicrobien. Il est donc nécessaire de compléter ces résultats par une étude de l'activité antimicrobienne des films.

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

L'élaboration des films ayant été étudiée, la libération simulée du NaBz observée et les paramètres l'influençant identifiés, la dernière étape de ce travail est d'étudier la réelle activité antimicrobienne, donc non simulée, de ces films. Les microorganismes choisis pour cette étude sont fréquemment rencontrés dans le domaine alimentaire : deux bactéries *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (CIP 224) (gram+) et *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922) (gram-), une levure *Candida* et une moisissure *Aspergillus niger*. Dans un premier temps, une comparaison de l'activité antimicrobienne intrinsèque des composants initiaux des films est réalisée et dans un second temps, l'activité des films est étudiée. Pour cela, l'influence de différents paramètres liés à la structure des films a été étudiée : la quantité de NaBz, le temps de réticulation ($t_{\text{rét}}$), la quantité d'agent réticulant (CTR) et pour terminer quelques résultats avec un autre conservateur, la nisine. Ce « screening » permettra de cerner le meilleur candidat pour la problématique envisagée.

IV.1 Concentration minimale inhibitrice des composants des films

Une première étape est d'identifier l'activité antimicrobienne de chacun des composants utilisés pour l'élaboration des films. Cette étude a été réalisée uniquement sur les deux bactéries : *S. aureus*, gram+, et *E. coli*, gram-. Pour cela la concentration minimale inhibitrice de chacun des composants (CMI) a été déterminée (Tableau VIII.IV. 1). Un autre conservateur, la nisine, connue pour être active contre les gram+, est également inclus dans l'étude microbiologique afin de comparer son activité à celle du NaBz.

Tableau VIII.IV. 1. Concentration minimale inhibitrice des réactifs, des conservateurs et d'un polymère d'HP β CD et CTR.

Produits	CMI (g/L)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 224	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
NaBz	25	25
Acide benzoïque	27*	13*
CTR	2	4
Citrate de sodium	> Conc**	> Conc
Poly-HP β CD-CTR***	6,25	25
Nisine	0,31	> Conc
HP β CD	> Conc	> Conc
PVOH	> Conc	> Conc

* données de la littérature [243]

**>Conc signifie que la CMI potentielle du composé est supérieure aux concentrations testées, soit ici à la limite de solubilité.

*** Polymère d'HP β CD réticulé par 50 wt% de CTR

Le NaBz et le CTR sont actifs contre les deux bactéries, gram+ et gram-. Considérons leurs couples acide/sel, soit acide benzoïque/NaBz et CTR/citrate de sodium. Dans la littérature, l'acide benzoïque montre une CMI légèrement supérieure à celle du NaBz contre *S. aureus* et environ deux fois moins élevée contre *E. coli*. En revanche, le citrate de sodium n'a montré aucune CMI. Le CTR est plus actif que le NaBz mais son activité est la conséquence de son acidité alors que le NaBz présente des CMI sous forme acide et sous forme de sel.

La nisine est très active contre la bactérie gram+, comme attendu. Elle a la CMI la plus basse de tous les composants testés. En revanche, aucune CMI n'a été révélée pour *E. coli*.

Quant à l'HP β CD et au PVOH, ils ne montrent aucune activité contre ces deux bactéries. Un polymère d'HP β CD et de CTR (poly-HP β CD-CTR) est également testé afin d'évaluer l'impact de la réticulation par le CTR, similaire à celle de nos films. Il présente une activité contre les deux bactéries, qui s'explique par la présence de CTR lié.

Notre stratégie apporte l'avantage d'une forte activité en milieu acide, due au CTR, et d'une activité même en milieu moins acide, due au NaBz. Le NaBz est intéressant car il est actif sur les deux types de bactéries, et ce quel que soit le pH du milieu. Le CTR et la nisine sont intéressants car ils sont tous deux plus actifs que le NaBz mais dans des conditions particulières. Dans la suite du travail, l'impact de leur incorporation sur l'activité des films va être étudié.

IV.2 Etude de l'activité des films réticulés, par la méthode Kirby Bauer

L'activité des films formulés est, quant à elle, mise en évidence par des tests de diffusion sur gélose, méthode dite de Kirby-Bauer. Elle permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des films par la formation d'une zone d'inhibition de la croissance des microorganismes autour de l'échantillon [235;236]. Rappelons que deux protocoles ont été envisagés pour ces tests et qu'après optimisation, la méthode dite en masse a été sélectionnée (Chapitre VI – X.3).

L'étude de l'activité antimicrobienne des films demande de s'intéresser aux différents paramètres qui peuvent l'influencer, en l'occurrence la quantité de NaBz incorporé en présence ou non d'HP β CD, la quantité d'agent réticulant (CTR) et la comparaison à un autre conservateur connu : la nisine.

IV.2.1 Influence de la quantité de NaBz et de la présence d'HP β CD

Une étude antérieure du laboratoire avait montré que des films à base de PVOH chargés en NaBz et réticulés par le GA (qui ne porte pas de fonction COOH et qui une fois réagi n'a pas d'effet antimicrobien) avaient une activité contre *S. aureus* (Figure VIII.IV. 1). Nous avons donc montré la bioactivité du NaBz dans la matrice PVOH.

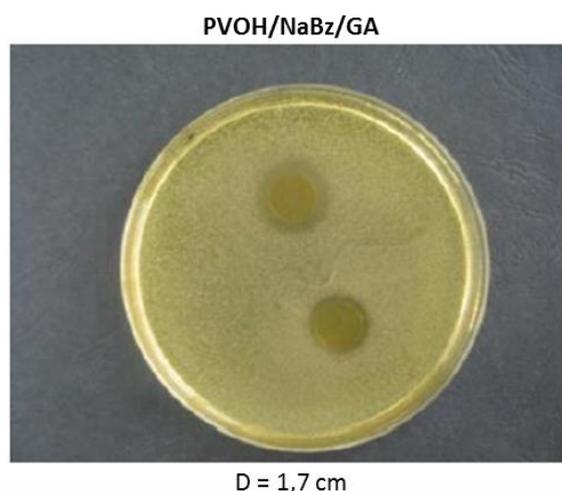


Figure VIII.IV. 1. Test Kirby-Bauer pour des films PVOH réticulés par du glutaraldéhyde et contenant du NaBz sur la bactérie *S. aureus*

Pour notre étude, à taux de CTR constant (20 wt%), nous avons fait varier la quantité en NaBz et étudié l'influence de la présence ou non du complexe [HP β CD : NaBz] ainsi que de la structure du réseau (au travers du temps de réticulation). Les tests de libération dans l'eau ayant montré que l'augmentation de NaBz incorporé dans les films menait à une quantité libérée supérieure, des films à taux de NaBz croissant (0, 3 et 6 wt% de NaBz) ont été réalisés. Dans le cas des films avec HP β CD, il n'est pas possible d'incorporer 6 wt% de NaBz sous forme de complexe 1 : 1 car la proportion en HP β CD nécessaire est trop importante (60 wt%). Pour ces films un mélange [HP β CD : NaBz] 1:2 (avec une part de NaBz inclus dans les cavités et l'autre part en excès), préparé suivant le même protocole que pour le complexe (Chapitre V - III), est incorporé. Les résultats obtenus pour ces films vis-à-vis de la bactérie *S. aureus* sont présentés sur la Figure VIII.IV. 2.

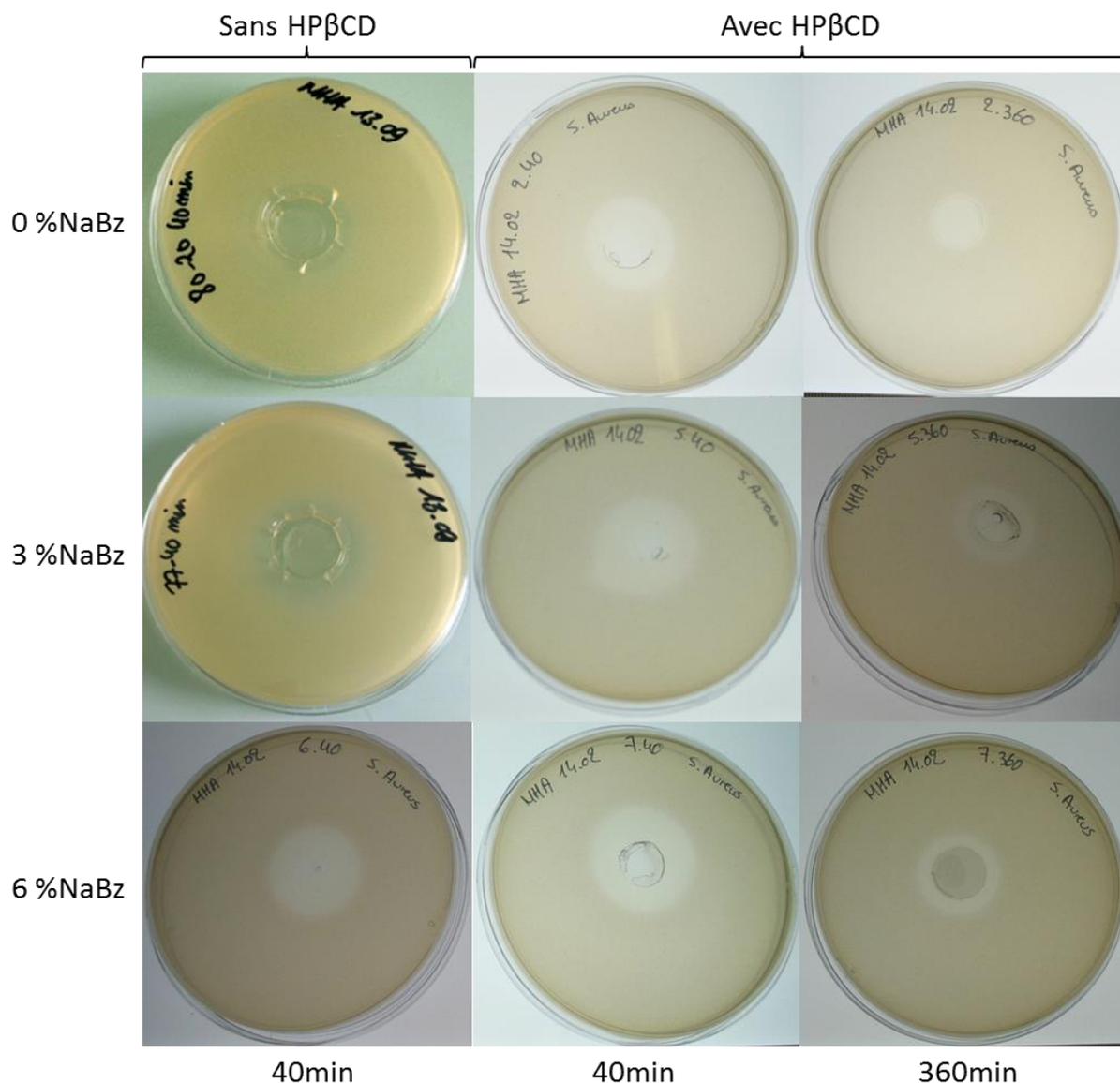


Figure VIII.IV. 2. Tests Kirby-Bauer en masse sur *S.aureus* pour des films réticulés avec 20 wt% de CTR (40 ou 360 min) pour des quantités variables en NaBz avec 30 wt% ou sans HPβCD

Pour l'ensemble des films, on peut observer l'apparition d'un cercle d'inhibition, ils montrent tous une activité contre *S. aureus* y compris ceux sans NaBz.

IV.2.1.1 Cas des films sans HPβCD

Les résultats quantitatifs des films sans HPβCD pour les 4 microorganismes étudiés sont présentés Figure VIII.IV. 3. Le trait noir correspond au diamètre initial des films (11 mm). Les films ayant un diamètre d'inhibition égal à 11 mm ont ainsi une activité uniquement par contact alors que les films ayant un diamètre supérieur ont une activité à la fois par contact et par diffusion.

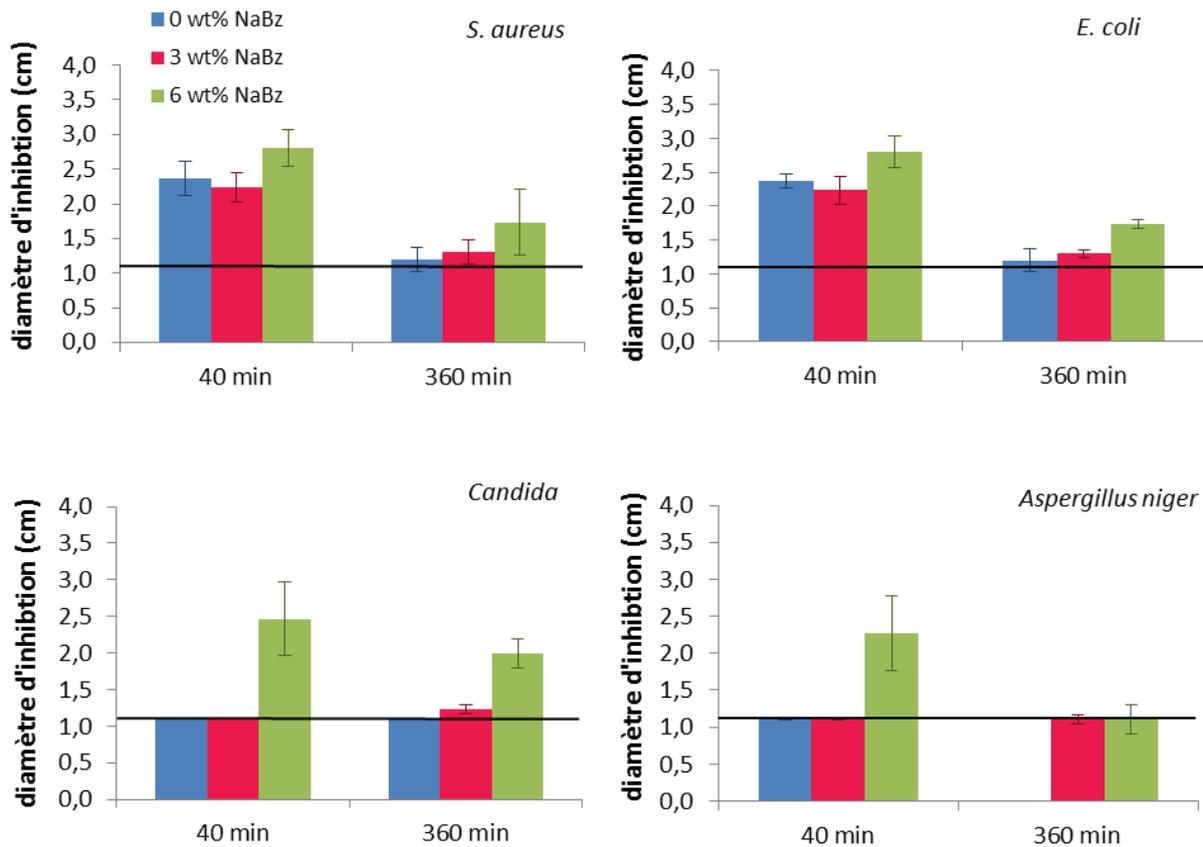


Figure VIII.IV. 3. Diagramme des diamètres d'inhibition de films à 20 wt% CTR sans HP β CD en fonction de $t_{rét}$ (40 et 360 min) et de la quantité de NaBz contre 4 espèces microbiennes

On peut tout d'abord remarquer deux groupes distincts de microorganismes du point de vue de l'inhibition : les bactéries d'une part et les champignons (levure et moisissure) d'autre part.

A taux de CTR constant (ici 20 wt%) :

- **Pour les deux bactéries**, le diamètre d'inhibition diminue quand $t_{rét}$ augmente, avec ou sans NaBz. L'impact du NaBz n'est pas flagrant. En effet, **les films non chargés** ont déjà une activité. Etant donné la CMI du CTR (2 et 4 g/L pour *S. Aureus* et *E. coli* respectivement) comparée à celle du NaBz (25 g/L pour les deux), on en déduit que l'activité des films est surtout due au contact avec le CTR lié et à la diffusion du CTR libre. Notons que cette activité est plus importante pour un $t_{rét}$ de 40 min, due au CTR libre mis en évidence préalablement (cf. RMN du Chapitre VII - III). Toutefois, une légère augmentation du diamètre d'inhibition est observée pour **6 wt% de NaBz**, probablement liée à la diffusion plus importante de NaBz.
- **Pour les champignons**, les tendances sont moins évidentes. Seuls les films avec 6 wt% de NaBz semblent présenter une activité par diffusion. Pour les autres formulations, l'activité est seulement par contact. Ce résultat est probablement dû à une

activité par diffusion du NaBz contre ces deux microorganismes. Notons toutefois que contre *Aspergillus niger*, le film avec 6 wt% de NaBz réticulé 360 min ne montre pas d'activité par diffusion (contrairement aux autres microorganismes) et que le même film sans NaBz ne montre aucune activité même par contact.

IV.2.1.2 Cas des films avec HP β CD

L'influence de l'HP β CD est maintenant étudiée à travers les résultats quantitatifs de films avec des proportions croissantes en NaBz, cette fois sous forme de complexe vis-à-vis des quatre microorganismes (Figure VIII.IV. 4).

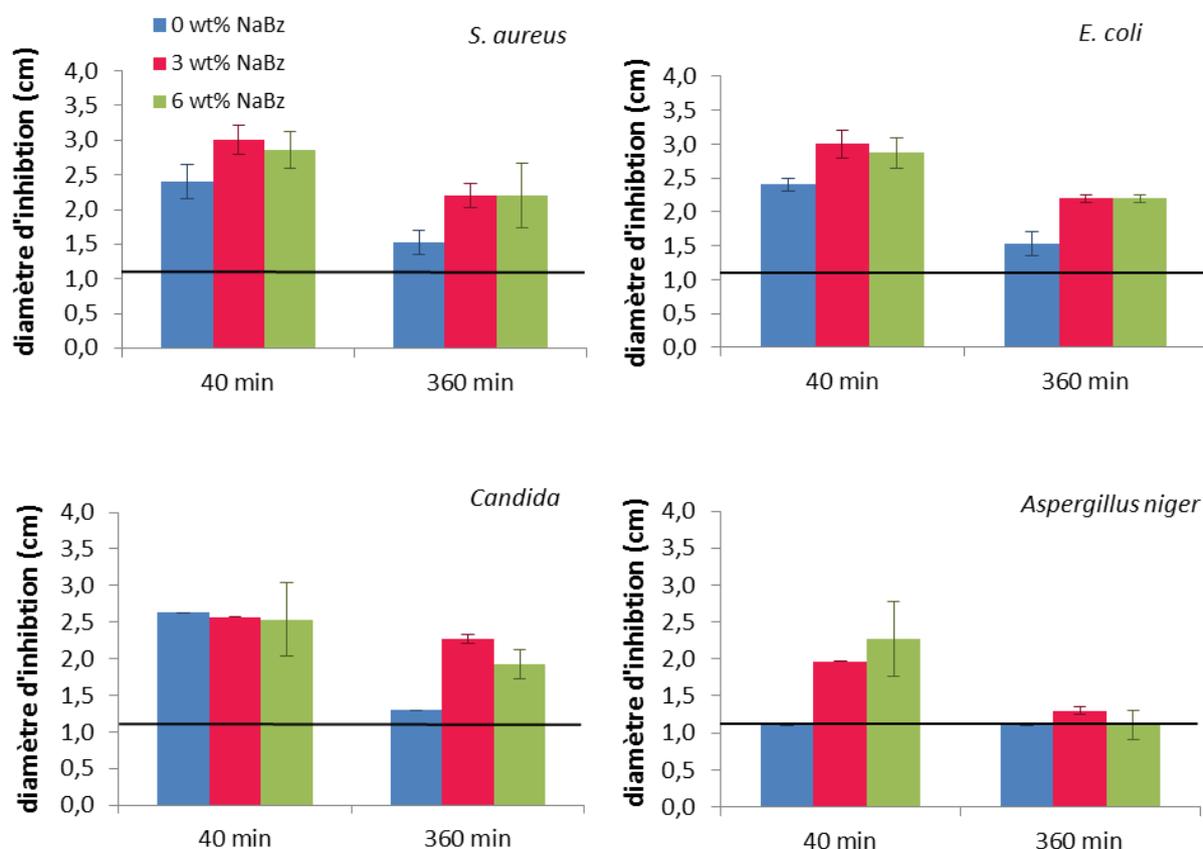


Figure VIII.IV. 4. Diagramme des diamètres d'inhibition de films à 20 wt% CTR avec HP β CD en fonction de $t_{\text{rét}}$ (40 et 360 min), de la quantité de NaBz contre 4 espèces microbiennes

Dans ce cas, une différence d'activité en fonction de la nature des microorganismes est beaucoup moins flagrante. *Aspergillus niger* se distingue légèrement des trois autres microorganismes mais on peut néanmoins dégager des tendances. En effet, de manière générale :

- Quel que soit le microorganisme, le diamètre d'inhibition est souvent supérieur à 11 mm, ce qui montre une activité par diffusion plus présente que pour les films sans HP β CD.

- Cette activité par diffusion diminue quand le temps de réticulation augmente mais de manière moins importante que pour les films sans HP β CD.
- La présence de NaBz a peu d'influence sur l'activité antimicrobienne pour les temps faibles de réticulation (40 min), sauf pour *Aspergillus niger*. Pour les longs temps de réticulation (360 min), la présence de NaBz permet d'améliorer l'activité antimicrobienne pour les bactéries et *Candida*.
- **La présence d'HP β CD** améliore uniquement l'activité des films avec 3 wt% de NaBz par rapport à ceux sans HP β CD. Le fait qu'elle ne permette pas d'améliorer l'activité des films avec 6 wt% de NaBz est un résultat surprenant qui reste à approfondir. Pour les tests contre *Candida*, les films non chargés ont un diamètre d'inhibition plus grand en présence d'HP β CD. Etant donné l'absence de NaBz dans ces films, il est intéressant d'envisager que la présence d'HP β CD joue également un rôle dans la diffusion du CTR libre.

Du point de vue des microorganismes, les mécanismes d'inhibition sont différents. En effet, les résultats montrent que les microorganismes n'ont pas la même sensibilité aux différents films. *Aspergillus niger* semble surtout sensible à la diffusion de NaBz. *Candida* semble surtout sensible à NaBz mais la diffusion du CTR permet également de l'inhiber. Quant aux bactéries (*S. aureus* et *E. coli*), elles sont sensibles à NaBz et CTR mais l'activité des films est surtout liée à la libération du CTR. L'activité des films est plus grande pour 40 min de réticulation, surtout pour *Aspergillus niger*.

Pour conclure, avec HP β CD, l'activité par diffusion est améliorée. Il semblerait donc que le réseau macromoléculaire en présence d'HP β CD possède une structure différente et peut-être plus lâche permettant de libérer le CTR non lié et le NaBz.

IV.2.1.3 Etude ponctuelle sur les films contenant 10 wt% de NaBz

Sans HP β CD, l'augmentation de la proportion de NaBz ayant montré une légère amélioration sur l'activité des films, une étude ponctuelle sur les quatre microorganismes pour des films chargés avec 10 wt% de NaBz a été réalisée. Le but est d'observer si une plus forte augmentation de la quantité de NaBz améliore l'activité des films. A titre de comparaison, des films avec ou sans HP β CD sont réalisés. Dans ce cas, 10 wt% de NaBz sont ajoutés sous forme de mélange avec 10 wt% d'HP β CD. Le mélange [HP β CD : NaBz] 1:10 est préparé suivant le même protocole que pour le complexe [HP β CD : NaBz] 1:1 (Chapitre V - III). A titre d'exemple, les résultats de diamètre d'inhibition obtenus pour les films réticulés 40 min avec 10 wt% de NaBz avec HP β CD contre *S. aureus*, *E. coli* et *Candida* sont présentés sur la Figure VIII.IV. 5. On observe bien un cercle d'inhibition pour ces trois microorganismes.

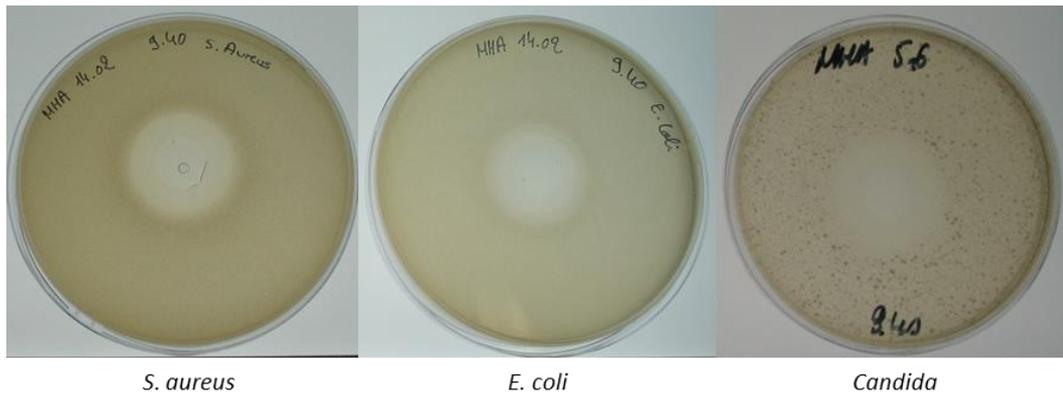


Figure VIII.IV. 5. Tests Kirby-Bauer en masse sur *S. aureus*, *E. coli* et *Candida* pour des films PVOH/[HP β CD-NaBz]/CTR-60/[10-10]/20 réticulés 40 min

Les films à 10 wt% de NaBz ont été comparés avec ceux à 6 wt% de NaBz. Les résultats quantitatifs pour les quatre microorganismes étudiés sont présentés Figure VIII.IV. 6.

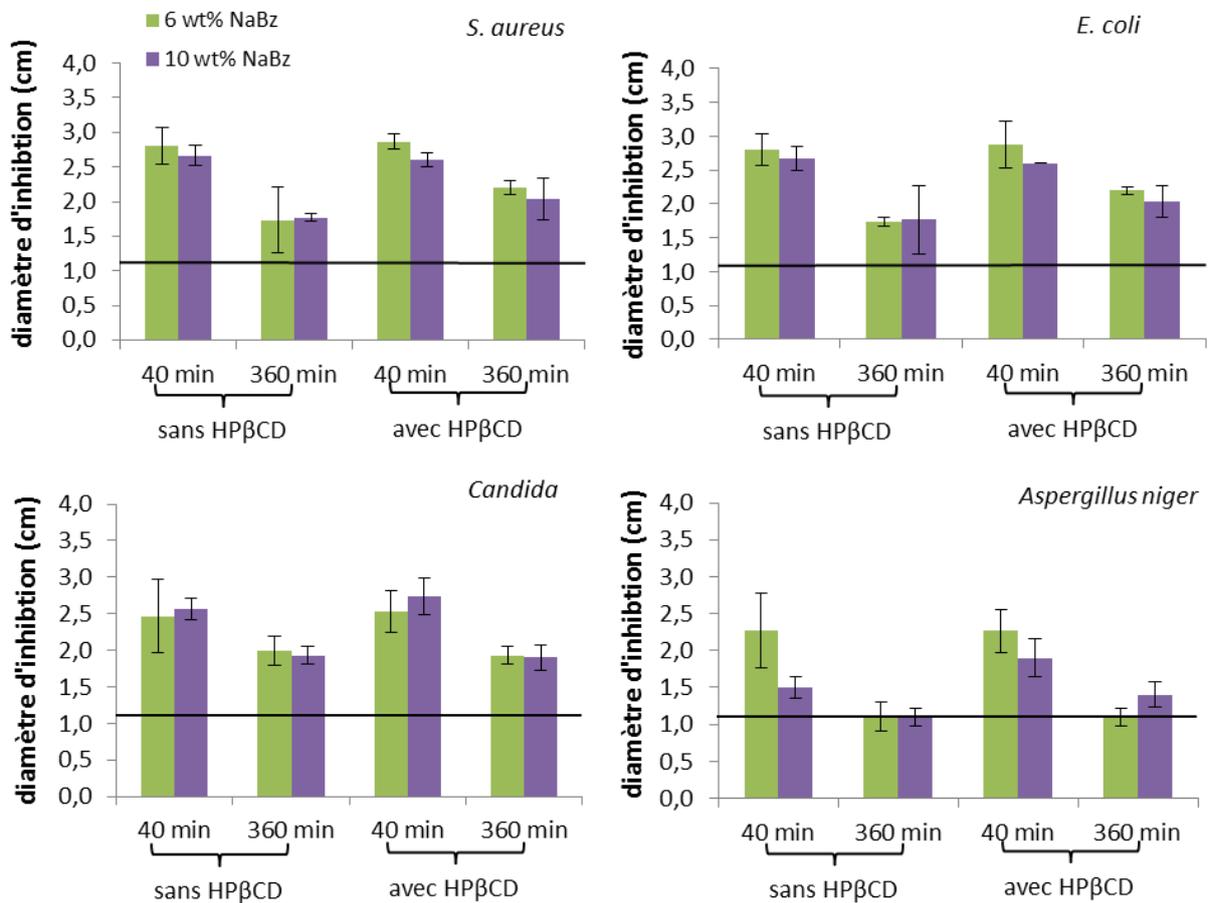


Figure VIII.IV. 6. Diagramme des diamètres d'inhibition de films à 20 wt% en CTR avec ou sans HP β CD en fonction de t_{rét} (40 et 360 min) contre les 4 microorganismes : Comparaison entre 6 et 10 wt% NaBz

Pour l'ensemble des microorganismes, les résultats obtenus pour les deux compositions de film sont similaires. Comme vu précédemment, de façon générale, seul le t_{rét} diminue l'activité des films pour les quatre microorganismes. L'augmentation de la quantité de NaBz, avec 10 wt% ou

sans HP β CD, ne permet pas d'augmenter le diamètre d'inhibition. Ces résultats indiquent donc une activité antimicrobienne majoritairement due au CTR.

On constate donc que l'ensemble des films a une activité antibactérienne et antifongique, au minimum par contact. Les meilleurs candidats pour une activité antimicrobienne sur gélose sur l'ensemble des microorganismes sont les films de composition suivante :

- Sans HP β CD : avec 6 wt% de NaBz
- Avec HP β CD : dans la fourchette 3 à 10 wt% de NaBz

La présence d'HP β CD permet une amélioration de l'activité dès 3 wt% de NaBz. Pour l'ensemble des films, la meilleure activité est obtenue pour **un temps de réticulation de 40 min**.

Il est difficile de corrélérer les résultats antimicrobiens avec la libération dans l'eau car, contrairement à la libération qui ne suit que le NaBz, l'activité antimicrobienne est également due aux COOH libres du CTR. Nous avons donc voulu mesurer l'impact de la quantité de COOH sur l'activité antimicrobienne.

IV.2.2 Influence de la quantité de COOH résiduels

Nous avons donc comparé des films à 20 et 30 wt% de CTR sans NaBz et pour deux temps de réticulation contre *S. aureus*. De plus, pour être plus précis, la quantité de COOH dans le film (soit lié, soit libre), et non pas la quantité de CTR, est considérée. Les résultats vis-à-vis de *S. aureus* sont présentés sur la Figure VIII.IV. 7.

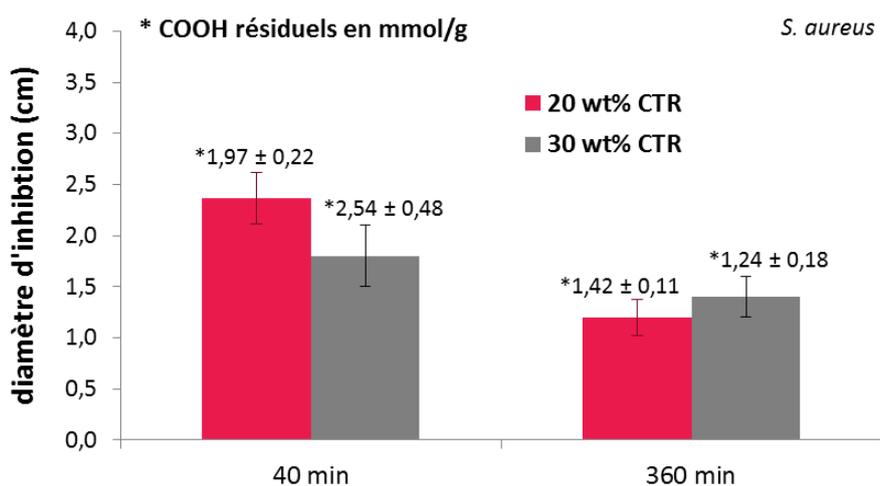


Figure VIII.IV. 7. Diagramme des diamètres d'inhibition en fonction de $t_{\text{rét}}$ (40 et 360 min), de la quantité de CTR sans NaBz contre *S. aureus* (CIP 224)

Comme vu précédemment, le paramètre le plus influent est l'augmentation de $t_{\text{rét}}$ qui entraîne la diminution de la quantité de COOH et donc la diminution du diamètre d'inhibition.

A formulation et temps de réticulation équivalents, la quantité initiale de CTR introduit dans les films n'a pas d'effet majeur sur le diamètre d'inhibition. En effet, nous avons observé que les quantités de COOH résiduels sont similaires pour 20 et 30 wt% de CTR. L'activité antimicrobienne résulte de la diffusion du CTR et des COOH résiduels fixés sur le film. Afin d'approfondir cette étude sur l'influence des COOH sur l'activité des films, il faudrait étudier une gamme de films à teneur en COOH plus large.

IV.2.3 Comparaison avec un autre agent antimicrobien : la nisine

Afin d'évaluer la polyvalence de notre système, les films contenant 20 wt% de CTR ont été testés avec un autre agent antimicrobien, la nisine. La nisine est l'antimicrobien le plus rencontré dans la littérature et a une activité antimicrobienne bien ciblée. En effet, il est très actif contre *S. aureus* mais a une activité nulle contre *E. coli*. L'étude de la CMI a montré qu'elle avait une activité supérieure contre *S. aureus* (CMI = 0,31 g/L) à celles du NaBz (CMI = 25 g/L) et du CTR (CMI = 2 g/L).

Aucune complexation n'est rapportée dans la littérature, toutefois une inclusion dans la cavité de l'HP β CD est envisageable. Les films étudiés contiennent 20 wt% de CTR, 0 ou 30 wt% d'HP β CD et 3 wt% d'agent antimicrobien.

Les résultats obtenus pour les films contenant de la nisine, réticulés 40 min et 360 min, sur *S. aureus* sont présentés sur la Figure VIII.IV. 8.

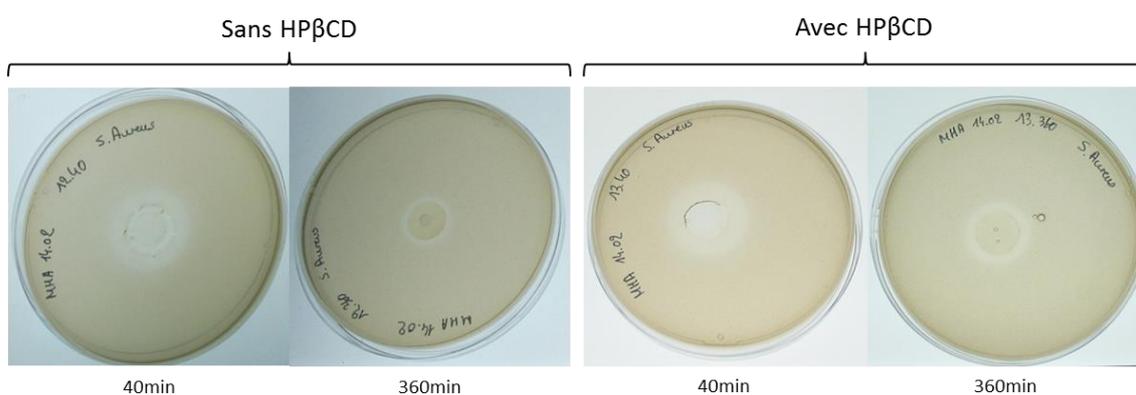


Figure VIII.IV. 8. Tests Kirby-Bauer en masse sur *S.aureus* pour des films PVOH/Nisin/CTR et PVOH/[HP β CD-Nisin]/CTR réticulés 40 et 360 min

L'ensemble des films présente un cercle d'inhibition pour *S. aureus*. Les résultats quantitatifs pour les deux bactéries étudiées sont présentés sur la Figure VIII.IV. 9.

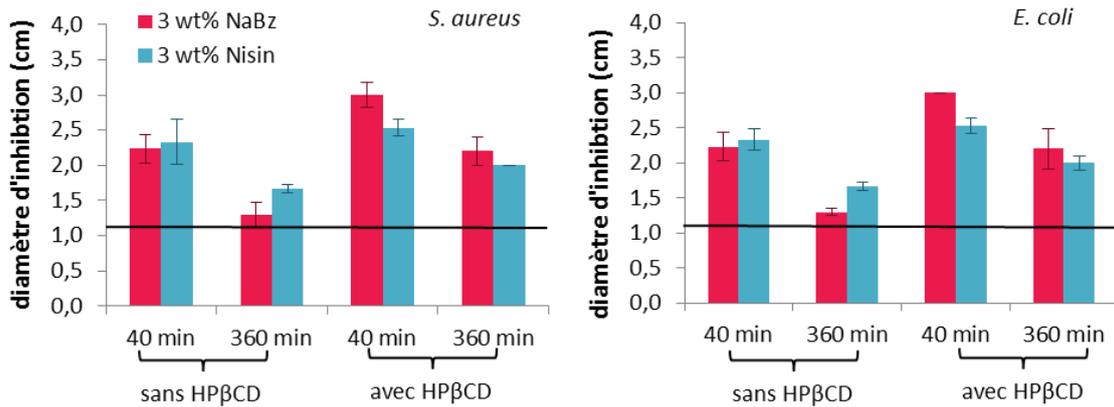


Figure VIII.IV. 9. Diagramme des diamètres d'inhibition de films à 20 wt% CTR en présence ou non d'HPβCD (30 wt%) en fonction de $t_{rét}$ (40 et 360 min) contre *S. aureus* et *E. coli* : Comparaison entre nisine et NaBz

Comme pour les films avec NaBz, une diminution du diamètre d'inhibition avec l'augmentation du temps de réticulation et une amélioration du diamètre grâce à l'HPβCD sont observées pour les films chargés en nisine. Ces résultats vont dans le sens d'une activité majoritairement liée à l'action des COOH résiduels.

Vis-à-vis des bactéries, le même profil est observé avec la nisine et le NaBz. Notons que l'activité est en grande partie liée au CTR. En effet, le profil des films avec du NaBz ou de la nisine est similaires malgré leur différence d'activité intrinsèque. Notamment dans le cas d'*E. coli*, les grands diamètres d'inhibition ne sont pas liés à la nisine mais plutôt au CTR car l'étude de la CMI a montré l'absence d'activité de la nisine contre cette bactérie.

En conclusion, concernant l'activité de nos films sur les deux bactéries, la meilleure CMI de la nisine par rapport à NaBz contre *S. aureus*, n'a pas permis d'améliorer l'activité des films. De plus, malgré l'absence d'activité de la nisine contre *E. coli*, les films sont actifs. Ces deux résultats montrent que contre les deux bactéries, c'est l'activité du CTR qui prédomine.

Pour résumer, l'ensemble des films étudiés a une activité antimicrobienne au moins par contact grâce au CTR lié. On peut supposer un mécanisme de contact avec le NaBz, mais celui-ci est masqué par le CTR. La libération du NaBz ou de la nisine et du CTR non lié (CMI du CTR faible donc une faible quantité peut avoir une activité) permettrait une plus grande activité liée à la diffusion. Pour l'ensemble des films, la meilleure activité est obtenue pour **un temps de réticulation de 40 min**. Les films les plus intéressants pour une activité antimicrobienne sur gélose sur l'ensemble des microorganismes testés sont les films de composition suivante :

- sans HPβCD : avec 6 wt% de NaBz
- avec HPβCD : dans la fourchette 3 à 10 wt% de NaBz.

La présence d'HP β CD permet d'améliorer l'activité à partir de 3 wt% de NaBz. Ce résultat pourrait s'expliquer par la quantité de NaBz libéré dans l'eau qui est deux fois supérieure en présence d'HP β CD. Cependant, il est étonnant que les films avec 6 wt% de NaBz ne suivent pas cette tendance. Ces résultats sont donc à approfondir. En effet, la libération dans le simulant, qu'est l'eau, augmente avec la quantité de NaBz incorporé, alors qu'il n'y a pas d'influence majeure observée pour les tests antimicrobiens, particulièrement en présence d'HP β CD. Aussi, il serait intéressant d'étudier la libération du NaBz dans la gélose et de comparer la concentration libérée à sa CMI.

Les mêmes formulations de films se révèlent les plus efficaces à la fois pour l'activité antimicrobienne et la cinétique de libération. Quel que soit le temps de réticulation, ces films ont une activité par contact et par diffusion. Aux temps faibles (40 min), l'activité par diffusion est meilleure qu'aux temps longs (360 min). Toutefois, la libération du NaBz dans l'eau n'est retardée que pour les temps longs. En effet, avec l'augmentation du temps de réticulation :

- le rayon d'inhibition diminue
- la cinétique de libération dans l'eau est ralentie
- la quantité libérée dans l'eau ne varie pas

Ce travail a permis de développer des films à base de PVOH réticulés par le CTR ayant une activité antimicrobienne sur les différents types de microorganismes rencontrés en alimentaire (bactéries gram+ et gram-, levures, moisissures) par une action de diffusion (CTR non lié et NaBz) couplée à une action par contact (CTR lié et NaBz dans le film). Le CTR est très actif mais l'est uniquement sous sa forme acide alors que le NaBz, moins actif, présente une activité antimicrobienne y compris sous forme acide benzoïque. Bien que masquée par le CTR lors des expériences, l'activité du NaBz est intéressante en pH basique. L'ensemble des résultats reste à approfondir et des expériences complémentaires devront être réalisées. En effet, nous n'avons pas aujourd'hui tous les éléments permettant d'expliquer les mécanismes mis en jeu, telles que les CMI pour la levure et la moisissure ou des informations sur l'activité isolée du NaBz. En revanche, cette étude microbiologique a permis de mettre en évidence **une activité antibactérienne et antifongique pour l'ensemble des films** avec un potentiel sur une large gamme de pH.

CONCLUSION GENERALE

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une nouvelle thématique du laboratoire « Emballages antimicrobiens » qui a été soutenue par la région Nord - Pas de Calais et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). L'objectif était de réaliser un film à contact alimentaire antimicrobien par libération de conservateur à base de composés non toxiques et biodégradables suivant une élaboration propre.

Sur la base de travaux précédents menés au laboratoire, sur la réticulation des polyols par des polyacides carboxyliques, nous avons développé un système PVOH/HP β CD réticulé par l'acide citrique, pour la libération du NaBz. Les films sont obtenus par casting et réticulés lors d'un traitement thermique (130 – 150 °C) réalisé en étuve sur un cadre métallique.

La réaction de réticulation par l'acide citrique a été mise en évidence et analysée sur une composition simple PVOH/CTR à travers l'étude de la Tg et des COOH résiduels en fonction du temps de réticulation. L'étude de différentes compositions a permis de sélectionner les concentrations de 20 et 30 wt% en CTR pour un compromis entre réticulation suffisante et ductilité du film préservée. Toutefois, les temps de réticulation nécessaires pour lier l'ensemble des réactifs sont très longs et non favorables à une application industrielle. Il est alors important de diminuer ce temps de réaction en augmentant soit la température, soit le taux de réticulant. L'augmentation de la température de réticulation (140, 150 °C) pour la concentration à 20 wt% de CTR permet de diminuer le temps nécessaire (d'un facteur 2,6 et 8 respectivement) pour lier l'ensemble des composants du film. Parallèlement, les films avec 30 wt% de CTR ont montré une cinétique de réticulation plus rapide que ceux avec 20 wt% de CTR. D'autres paramètres pourraient être pris en compte pour diminuer le temps de réticulation : la diminution de l'épaisseur du film et l'utilisation d'un autre procédé de chauffage pour réticuler (ex : rampe infrarouge).

La réaction de réticulation n'est pas modifiée par la présence d'HP β CD. Toutefois, la quantité de 30 wt% d'HP β CD fragilise les films contrairement à 10 wt%. Ceci sous-entend une structure tridimensionnelle du réseau formé dépendant de la formulation du film. Il serait intéressant de compléter cette étude en examinant des taux intermédiaires d'HP β CD.

L'étude de la perméabilité sur les films à 20 wt% de CTR a montré que ni l'ajout de CTR ou d'HP β CD, ni la réticulation n'a d'influence majeure sur les propriétés barrière des films de PVOH, soit une faible perméabilité à l'oxygène et une forte perméabilité à la vapeur d'eau.

Le caractère bioactif des films chargés en NaBz a été évalué via des tests de libération du NaBz dans l'eau et des tests antimicrobiens sur gélose. Les résultats obtenus nous ont permis de dégager quelques conclusions et interrogations.

En terme de libération du NaBz dans l'eau, l'objectif d'obtenir une cinétique ralentie a été atteint pour des temps longs de réticulation. Les meilleurs candidats identifiés sont les films avec 20 ou 30 wt% de CTR à partir de 360 min de réticulation en présence de 30 wt% d'HP β CD et 3 wt% de NaBz. L'HP β CD ne permet pas de ralentir la cinétique de libération mais permet de doubler la quantité de NaBz libéré. La proportion de 30 wt% d'HP β CD fragilisant les films et la formation en amont du complexe ne modifiant pas la cinétique de libération par rapport à un mélange physique, il n'est pas nécessaire de préparer un complexe équimolaire. Il serait intéressant d'étudier des films avec une concentration plus faible en HP β CD et avec du NaBz (à partir de 3 wt%) en excès vis-à-vis d'HP β CD. Par ailleurs, plusieurs comportements lors de l'étude de la libération n'ont pas pu être expliqués. Par la suite, une caractérisation plus fine du réseau formé à l'échelle macromoléculaire pourrait nous apporter de nouvelles informations.

L'activité antimicrobienne sur gélose a révélé deux mécanismes d'action : par contact et par diffusion. Ces deux mécanismes ont été mis en évidence pour la majorité des films avec 20 wt% de CTR et vis-à-vis de l'ensemble des microorganismes étudiés (*S. aureus*, *E. coli*, *Candida* et *Aspergillus niger*). Les meilleurs résultats sont néanmoins obtenus pour le film avec 6 wt% de NaBz sans HP β CD et les films avec 3 à 10 wt% de NaBz avec HP β CD. Quel que soit le temps de réticulation, ces films ont une activité par contact et par diffusion. Aux temps faibles (40 min), l'activité par diffusion est meilleure qu'aux temps longs (360 min). Toutefois, la libération du NaBz dans l'eau n'est retardée que pour les temps longs.

Il est difficile de corréler les résultats antimicrobiens sur gélose à la libération simulée dans l'eau pour cause de milieux différents. Parallèlement, les mesures de libération dans l'eau ne concernant que le NaBz, il serait intéressant de quantifier la quantité de CTR libéré dans l'eau suivi par un dosage HPLC par exemple. De plus, un traitement des films permettant de transformer les fonctions COOH en COO⁻ (moins actives) permettrait d'isoler la participation de NaBz dans l'activité antimicrobienne. Une autre approche serait de quantifier la diffusion des antimicrobiens dans la gélose afin de comparer leur concentration à leur CMI.

Au cours de ce travail, un film antibactérien et antifongique a été développé avec succès. Il serait néanmoins important par la suite de trouver un compromis entre libération prolongée et ductilité selon l'application visée. Par ailleurs, cette étude ayant été réalisée à l'échelle du laboratoire, il sera nécessaire de déterminer les conditions pour transposer ce procédé à l'échelle industrielle. L'objectif écologique semble avoir été atteint puisque l'élaboration des

films se fait par voie aqueuse et que l'ensemble des réactifs utilisés est biocompatible et biodégradable. De plus une partie de ces réactifs est biosourcée. Par la suite, il serait intéressant d'évaluer la biodégradabilité des films après réticulation. Il faudrait également évaluer la migration spécifique et globale des constituants du film en fonction de la denrée alimentaire visée.

Ce travail a été mené avec le NaBz comme modèle de conservateur mais il est envisageable d'élargir l'étude sur l'activité antimicrobienne par la transposition à d'autres agents antimicrobiens telles que les huiles essentielles qui sont prometteuses. Aussi, notre système PVOH/HP β CD pourrait constituer une plateforme modulable suivant l'application alimentaire visée.

Dans le cadre de la réalisation de cette thèse, j'ai pu appréhender la thématique de l'alimentaire et particulièrement de l'emballage actif. La pluridisciplinarité de ce sujet m'a permis d'aborder plusieurs domaines (chimie, physique, microbiologie) et d'ouvrir mes champs de compétences. Il m'a été offert de collaborer avec d'autres laboratoires : le Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), le Centre Commun de Mesures RMN, le Laboratoire de Bactériologie (INSERM U995) et l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Reims (ESIREims), ce qui a été très enrichissant sur les plans humain et technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Gontard, N., *Les emballages actifs*. Tec&Doc ed.; Paris, **2000**, ISBN : 2-7430-0387-1.
- [2] Appendini, P.; Hotchkiss, J. H., Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2002**, *3* (2), 113-126.
- [3] Joerger, R. D., Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging Technology and Science* **2007**, *20* (4), 231-273.
- [4] Welch, M., *Text. Res. J.* **1988**, *58*, 480.
- [5] Martel, B.; Ruffin, D.; Weltrowski, M.; Lekchiri, Y.; Morcellet, M., Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *97* (2), 433-442.
- [6] *Industrie & technologies février 2013* n°951 (<http://www.industrie-techno.com/n-951-fevrier-2013.22758>), pp 57 - 64.
- [7] Directive 94/62/CE relative aux emballages et aux déchets d'emballages - JO L 365 du 31.12.1994, p.10-23 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT). In *31994L0062* Conseil du **20 décembre 1994**.
- [8] Directive 89/109/CEE relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires - JO L 40 du 11.02.1989, p.38-44 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT). In *31989L0109* Conseil du **21 décembre 1988**.
- [9] *Emballages plastiques alimentaires et sécurité du consommateur*; Revue de l'INRA (<http://www7.inra.fr/internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/DOC/secualim/pdf98/emballage.pdf>); **Octobre 1998**
- [10] Farris, S.; Schaich, K. M.; Liu, L.; Piergiovanni, L.; Yam, K. L., Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science and Technology* **2009**, *20* (8), 316-332.
- [11] PlasticsEurope - Plastics - the Facts 2013 [ref. du **12 mai 2014**]. Disponible sur web: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2013.aspx?Page=DOCUMENT&FolID=2>.
- [12] Selke, S. E.; Hernandez, R. J., Packaging: Polymers in Flexible Packaging. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology (Second Edition)*, Editors-in-Chief: , K. H. J. B.; Robert, W. C.; Merton, C. F.; Bernard, I.; Edward, J. K.; Subhash, M.; Patrick, V., Eds. Elsevier: Oxford, **2001**; pp 6652-6656.
- [13] Azeredo, H. M. C. d., Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* **2009**, *42* (9), 1240-1253.
- [14] Re, G. L.; Benali, S.; Habibi, Y.; Raquez, J.-M.; Dubois, P., Stereocomplexed PLA nanocomposites: From in situ polymerization to materials properties. *Eur. Polym. J.* **2014**, *54* (0), 138-150.
- [15] NCB-01E - Nanocor [ref. du **22 avril 2014**]. Disponible sur web: http://www.nanocor.com/tech_sheets/I103.pdf.
- [16] Gloaguen, J.-M.; Lefèbvre, J.-M., Nanotechnologies - Nanocomposites polymères/silicates en feuillets (nm3050). *Techniques de l'ingénieur* **2007**.
- [17] Neto, J. M. B. Emballage sous forme de plateau destiné au conditionnement de produits alimentaires "prêts à consommer". WO/2007/051265, **2007**.
- [18] Stepanov, V. V.; Mamikonjan, M. L.; Reshetnikov, O. N. Enveloppe pour produits alimentaires. WO/2009/041850, **2009**.
- [19] Directive 82/711/CEE établissant les règles de base nécessaires à la vérification de la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 297 du 23.10.1982, p.26-30 (DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL). In *31982L0711* Conseil du **18 octobre 1982**.
- [20] Directive 85/572/CEE Liste des simulants à utiliser pour vérifier la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 372 du 31.12.1985, p.14-21 (DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL). In *385L0572* Conseil du **19 décembre 1985**.
- [21] Directive 93/8/CEE modifiant la directive 82/711/CEE du Conseil établissant les règles de base nécessaires à la vérification de la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 90 du 14.04.1993, p.22-25 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT). In *31993L0008* Commission du **15 mars 1993**.

- [22] Directive 90/128/CEE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 75 du 21.03.1990, p.19-40 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT). In *31990L0128* Commission du **23 février 1990**.
- [23] Directive 2002/72/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 220 du 15.08.2002, p.18-58 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT, FI, SV). In *32002L0072* Commission du **6 août 2002**.
- [24] Directive 2007/19/CE portant modification de la directive 2002/72/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires et de la directive 85/572/CEE du Conseil fixant la liste de simulants à utiliser pour vérifier la migration des constituants des matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires - JO L 91 du 31.03.2007, p.17-36 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV). In *32007L0019* Commission du **30 mars 2007**.
- [25] Règlement 1935/2004/CE concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires et abrogeant les directives 80/590/CEE et 89/109/CEE - JO L 338 du 13.11.2004, p.4-17 (ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, SK, SL, FI, SV). In *32004R1935* Parlement Européen et Conseil du **27 octobre 2004**.
- [26] Règlement 10/2011/CE concernant les matériaux et objets en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires - JO L 12 du 15.01.2011, p.1-89 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV). In *32011R0010*, Commission du **14 janvier 2011**.
- [27] Brody, A. L.; Bugusu, B.; Han, J. H.; Sand, C. K.; McHugh, T. H., Innovative food packaging solutions. *J. Food Sci.* **2008**, *73* (8), R107-R116.
- [28] Reyne, M., Emballages plastiques (a9780). *Techniques de l'Ingénieur* **1993**.
- [29] Chomon, P., Emballages plastiques - Polymères utilisés (am3575). *Techniques de l'ingénieur* **2012**.
- [30] Risch, S. J., Food Packaging History and Innovations. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (18), 8089-8092.
- [31] Labuza, T. P.; Breene, W. M., Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods 1. *Journal of Food Processing and Preservation* **1989**, *13* (1), 1-69.
- [32] Rooney, M. L., Overview of active food packaging. In *Active Food Packaging*, Rooney, M. L., Ed. Springer US: **1995**; pp 1-37.
- [33] Règlement 450/2009/CE concernant les matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires - JO L 135 du 30.05.2009, p.3-11 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV). In *32009R0450* Commission du **29 mai 2009**.
- [34] Film de transfert d'agent modifiant et procédé de cuisson d'une denrée alimentaire. WO/1997/036799 **1997**.
- [35] Nielsen, T., *Active packaging: a literature review* **1997**, ISBN : 91-7290-180-2.
- [36] AGELESS EYE Oxygen Indicator[AGELESS] [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.mgc.co.jp/eng/products/abc/ageless/eye.html>.
- [37] Sauerstoffindikatoren | Dry & Safe GmbH [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.trockenmittel.ch/sauerstoffabsorber/sauerstoffindikatoren/1-441.html>.
- [38] Traceo - Cryolog [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.traceo.com/fr/>.
- [39] Accueil - ripeSense® | Reperez la couleur [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: http://www.ripesense.com/Fr/Francaise_home.html.
- [40] GSFA Online Food Additive Index - CODEX Alimentarius [ref. du **23 avril 2014**]. Disponible sur web: <http://www.codexalimentarius.net/gsaonline/additives/index.html?lang=en>.
- [41] Aree, T.; Chaichit, N., Crystal structure of beta-cyclodextrin-benzoic acid inclusion complex. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338* (5), 439-446.
- [42] Belyakova, L. A.; Lyashenko, D. Y., Complex formation between benzene carboxylic acids and β -cyclodextrin. *Journal of Applied Spectroscopy* **2008**, *75* (3), 314-318.
- [43] Salvatierra, D.; Jaime, C.; Virgili, A.; Sánchez-Ferrando, F., Determination of the inclusion geometry for the β -cyclodextrin/benzoic acid complex by NMR and molecular modeling. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (26), 9578-9581.
- [44] Siimer, E.; Kurvits, M.; Köstner, A., Thermochemical investigation of β -cyclodextrin complexes with benzoic acid and sodium benzoate. *Thermochim. Acta* **1987**, *116* (C), 249-256.
- [45] Irina V, T., Comparative thermodynamic study on complex formation of native and hydroxypropylated cyclodextrins with benzoic acid. *Thermochim. Acta* **2011**, *526* (1-2), 118-121.

- [46] Directive 95/2/CE concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants - JO L 61 du 18.03.1995, p.1-40 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT, FI, SV). In *31995L0002* Parlement européen et Conseil du **20 février 1995**.
- [47] Zengin, N.; Yüzbaşoğlu, D.; Ünal, F.; Yılmaz, S.; Aksoy, H., The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49* (4), 763-769.
- [48] Supasorb - Thermarite (M) [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.thermarite.com.my/supasorb.html>.
- [49] Franke, I.; Wijma, E.; Bouma, K., Shelf life extension of pre-baked buns by an active packaging ethanol emitter. *Food Addit. Contam.* **2002**, *19* (3), 314-322.
- [50] Technologies - Freund Pharmatec [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.freundpharmatec.com/technologies>.
- [51] López-Rubio, A.; Almenar, E.; Hernandez-Muñoz, P.; Lagarón, J. M.; Catalá, R.; Gavara, R., Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. *Food Reviews International* **2004**, *20* (4), 357-387.
- [52] ATCO | LABORATOIRES STANDA [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.standa-fr.com/a-propos/atco/>.
- [53] Oxbar - Constar - Clearly The Best [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.constar.net/tech-barrier-oxbar.php>.
- [54] Altieri, C.; Sinigaglia, M.; Corbo, M. R.; Buonocore, G. G.; Falcone, P.; Del Nobile, M. A., Use of entrapped microorganisms as biological oxygen scavengers in food packaging applications. *LWT - Food Science and Technology* **2004**, *37* (1), 9-15.
- [55] Del Nobile, M. A.; Cannarsi, M.; Altieri, C.; Sinigaglia, M.; Favia, P.; Iacoviello, G.; D'Agostino, R., Effect of Ag-containing Nano-composite Active Packaging System on Survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *J. Food Sci.* **2004**, *69* (8), E379-E383.
- [56] Agion Technology: How it Works [ref. du **08 janvier 2014**]. Disponible sur web: <http://www.agion-tech.com/Technology.aspx?id=156>.
- [57] Mecitoğlu, Ç.; Yemenicioğlu, A.; Arslanoğlu, A.; Elmacı, Z. S.; Korel, F.; Çetin, A. E., Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International* **2006**, *39* (1), 12-21.
- [58] Conte, A.; Buonocore, G. G.; Sinigaglia, M.; Del Nobile, M. A., Development of immobilized lysozyme based active film. *J. Food Eng.* **2007**, *78* (3), 741-745.
- [59] Min, S.; Harris, L. J.; Krochta, J. M., Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Sci.* **2005**, *70* (7), m332-m338.
- [60] Vartiainen, J.; Rättö, M.; Paulussen, S., Antimicrobial activity of glucose oxidase-immobilized plasma-activated polypropylene films. *Packaging Technology and Science* **2005**, *18* (5), 243-251.
- [61] Franklin, N. B.; Cooksey, K. D.; Getty, K. J. K., Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Individually Packaged Hot Dogs with a Packaging Film Coating Containing Nisin. *J. Food Prot.* **2004**, *67* (3), 480-485.
- [62] Natrajan, N.; Sheldon, B. W., Efficacy of Nisin-Coated Polymer Films To Inactivate *Salmonella* Typhimurium on Fresh Broiler Skin. *J. Food Prot.* **2000**, *63* (9), 1189-1196.
- [63] Coma, V.; Martial-Gros, A.; Garreau, S.; Copinet, A.; Salin, F.; Deschamps, A., Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. *J. Food Sci.* **2002**, *67* (3), 1162-1169.
- [64] Möller, H.; Grelier, S.; Pardon, P.; Coma, V., Antimicrobial and Physicochemical Properties of Chitosan-HPMC-Based Films. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (21), 6585-6591.
- [65] Shearer, A. E. H.; Paik, J. S.; Hoover, D. G.; Haynie, S. L.; Kelley, M. J., Potential of an antibacterial ultraviolet-irradiated nylon film. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67* (2), 141-146.
- [66] Karam, L.; Jama, C.; Mamede, A. S.; Fahs, A.; Louarn, G.; Dhulster, P.; Chihib, N. E., Study of nisin adsorption on plasma-treated polymer surfaces for setting up materials with antibacterial properties. *Reactive and Functional Polymers* **2013**, *73* (11), 1473-1479.
- [67] Quintavalla, S.; Vicini, L., Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **2002**, *62* (3), 373-380.
- [68] Cagri, A.; Ustunol, Z.; Ryser, E. T., Inhibition of Three Pathogens on Bologna and Summer Sausage Using Antimicrobial Edible Films. *J. Food Sci.* **2002**, *67* (6), 2317-2324.

- [69] Oussalah, M.; Caillet, S.; Salmiéri, S.; Saucier, L.; Lacroix, M., Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (18), 5598-5605.
- [70] Seydim, A. C.; Sarikus, G., Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* **2006**, *39* (5), 639-644.
- [71] Dawson, P.; Carl, G.; Acton, J.; Han, I., Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult. Sci.* **2002**, *81* (5), 721-726.
- [72] Eswaranandam, S.; Hettiarachchy, N. S.; Johnson, M. G., Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-incorporated Soy Protein Film Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. *J. Food Sci.* **2004**, *69* (3), FMS79-FMS84.
- [73] Ouattara, B.; Simard, R. E.; Piette, G.; Bégin, A.; Holley, R. A., Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* **2000**, *62* (1-2), 139-148.
- [74] Kurek, M.; Guinault, A.; Voilley, A.; Galić, K.; Debeaufort, F., Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chem.* **2014**, *144* (0), 9-17.
- [75] Kurek, M.; Moundanga, S.; Favier, C.; Galić, K.; Debeaufort, F., Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. *Food Control* **2013**, *32* (1), 168-175.
- [76] Fernandez-Saiz, P.; Ocio, M. J.; Lagaron, J. M., Antibacterial chitosan-based blends with ethylene-vinyl alcohol copolymer. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80* (3), 874-884.
- [77] Chen, M.-C.; Yeh, G. H.-C.; Chiang, B.-H., Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation* **1996**, *20* (5), 379-390.
- [78] Cha, D. S.; Cooksey, K.; Chinnan, M. S.; Park, H. J., Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT - Food Science and Technology* **2003**, *36* (2), 209-213.
- [79] Suppakul, P.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W.; Miltz, J., Diffusion of linalool and methylchavicol from polyethylene-based antimicrobial packaging films. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44* (9), 1888-1893.
- [80] Weng, Y.-M.; Chen, M.-J.; Chen, W., Antimicrobial Food Packaging Materials from Poly(ethylene-co-methacrylic acid). *LWT - Food Science and Technology* **1999**, *32* (4), 191-195.
- [81] Sadaka, F.; Ngumjeu, C.; Brachais, C.-H.; Vroman, I.; Tighzert, L.; Couvercelle, J.-P., WITHDRAWN: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2013**, *20* (0), 350.
- [82] Finch, C. A., *Polyvinyl alcohol; properties and applications*. Wiley: **1973**.
- [83] DeMerlis, C. C.; Schoneker, D. R., Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41* (3), 319-326.
- [84] Noro, K., Emulsion polymerisation of vinyl acetate in relation to the chemical structure of polyvinyl alcohol. *British Polymer Journal* **1970**, *2* (2), 128-134.
- [85] Assender, H. E.; Windle, A. H., Crystallinity in poly(vinyl alcohol). 1. An X-ray diffraction study of atactic PVOH. *Polymer* **1998**, *39* (18), 4295-4302.
- [86] Bunn, C. W., Crystal Structure of Polyvinyl Alcohol. *Nature* **1948**, *161* (4102), 929-930.
- [87] Wang, J.; Lu, Y.; Yuan, H.; Dou, P., Crystallization, orientation morphology, and mechanical properties of biaxially oriented starch/polyvinyl alcohol films. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *110* (1), 523-530.
- [88] Okaya, T.; Ikani, K., *Polyvinyl Alcohol Development*. John Wiley: New York, **1992**.
- [89] Hu, H.; Zhang, X.; He, Y.; Guo, Z. S.; Zhang, J.; Song, Y., Combined effect of relative humidity and temperature on dynamic viscoelastic properties and glass transition of poly(vinyl alcohol). *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130* (5), 3161-3167.
- [90] Marten, F. L., *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. H. F. Mark, et al. Wiley-Interscience: New York, **1989**; Vol. 17.
- [91] Daniels, W., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Wiley-Interscience: New York, **1987**.
- [92] Chiellini, E.; Corti, A.; D'Antone, S.; Solaro, R., Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2003**, *28* (6), 963-1014.
- [93] Avis du groupe scientifique sur les additifs alimentaire, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments à la demande de la Commission relative à l'utilisation de l'alcool polyvinylique

comme agent enrobant pour les compléments alimentaires. In *Question N°EFSA-Q-2005-017* Adopté le **5 décembre 2005**.

[94] Buonocore, G. G.; Conte, A.; Corbo, M. R.; Sinigaglia, M.; Del Nobile, M. A., Mono- and multilayer active films containing lysozyme as antimicrobial agent. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2005**, *6* (4), 459-464.

[95] Aladjoff, I.; Nilsson, H.; Silvegren, C.; Tornell, B., Poly (vinyl alcohol) polymers with a low degree of hydrolysis. I. Formation and dissociation of multimers in aqueous solution. *Acta Chem. Scand.* **1982**, *36*, 259 - 266.

[96] Eagland, D.; Crowther, N. J., Influence of composition and segment distribution upon lower critical demixing of aqueous poly(vinyl alcohol-stat-vinyl acetate) solutions. *Eur. Polym. J.* **1991**, *27* (3), 299-301.

[97] Atanase, L.-I. Contribution à l'étude des complexes poly(vinyle alcool-vinyle acétate) / Tensioactifs anioniques: Caractéristiques colloïdales des nanogels et extension aux copolymères à blocs. Thèse de doctorat en Chimie des Matériaux, Université de Haute Alsace, **2010**.

[98] Fishman, M. L.; Coffin, D. R.; Onwulata, C. I.; Willett, J. L., Two stage extrusion of plasticized pectin/poly(vinyl alcohol) blends. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *65* (4), 421-429.

[99] Ghoshal, S.; Denner, P.; Stapf, S.; Mattea, C., Structural and dynamical heterogeneities in PVA films induced by evaporation during the formation process. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *515* (4-6), 231-234.

[100] Giterrini, L. M.; De Oliveira, M. P.; Branciforti, M. C.; Custódio, T. A.; Bretas, R. E. S., Thermal and structural characterization of nanofibers of poly(vinyl alcohol) produced by electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *112* (3), 1680-1687.

[101] Limpan, N.; Prodpran, T.; Benjakul, S.; Prasarpran, S., Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. *Food Hydrocolloids* **2012**, *29* (1), 226-233.

[102] Zhang, W.; Yang, X.; Li, C.; Liang, M.; Lu, C.; Deng, Y., Mechanochemical activation of cellulose and its thermoplastic polyvinyl alcohol eco composites with enhanced physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (1), 257-263.

[103] Garrett, P. D.; Grubb, D. T., Effect of drawing on the α relaxation of poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1988**, *26* (12), 2509-2523.

[104] Ito, Y.; Kagaku, K., The Permeability of Gases and Vapors through High polymer Films XIII. The Permeation and Diffusion. **1961**, *18* (190), 124-132.

[105] Ito, Y.; Kagaku, K., The Permeability of Gases and Vapors through High polymer Films XIV. The Permeability of Gases through the Moistened High polymer Films. **1961**, *18* (191), 158-162.

[106] Zia, K. M.; Zuber, M.; Rizwan, A.; Jamil, T.; Tabasum, S.; Shahid, M., Modification of cellulosic fabric using polyvinyl alcohol - Part-I: Physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (3), 2063-2067.

[107] Zuber, M.; Zia, K. M.; Bhatti, I. A.; Jamil, T.; Fazal ur, R.; Rizwan, A., Modification of cellulosic fabric using polyvinyl alcohol, part-II: Colorfastness properties. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (4), 2439-2446.

[108] Işıklıan, N.; Şanlı, O., Separation characteristics of acetic acid-water mixtures by pervaporation using poly(vinyl alcohol) membranes modified with malic acid. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **2005**, *44* (9), 1019-1027.

[109] Basak, P.; Adhikari, B., Poly (vinyl alcohol) hydrogels for pH dependent colon targeted drug delivery. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20* (SUPPL. 1), S137-S146.

[110] Huang, H. D.; Ren, P. G.; Chen, J.; Zhang, W. Q.; Ji, X.; Li, Z. M., High barrier graphene oxide nanosheet/poly(vinyl alcohol) nanocomposite films. *J. Membr. Sci.* **2012**, *409-410*, 156-163.

[111] Sjödin, K. Stratifié de conditionnement et récipients de conditionnement produits à partir de ce stratifié et possédant d'excellentes propriétés de décollement. WO/1998/032603, **1998**.

[112] Leth, I. Stratifié d'emballage et procédé de production du stratifié d'emballage. WO/2008/076033, **2008**.

[113] Adams, J. P. Carton laminé pour applications de conditionnement de produits alimentaires. WO/2005/014283, **2005**.

[114] Johansson, H. Stratifié pour conditionnements et conditionnement produit avec ce stratifié. WO/2002/024544, **2002**.

[115] Mucha, M.; Ludwiczak, S.; Kawinska, M., Kinetics of water sorption by chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol). *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62* (1), 42-49.

[116] Park, S. Y.; Jun, S. T.; Marsh, K. S., Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. *Food Hydrocolloids* **2001**, *15* (4-6), 499-502.

- [117] Zhuang, P. Y.; Li, Y. L.; Fan, L.; Lin, J.; Hu, Q. L., Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (3), 658-663.
- [118] Zu, Y.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Shan, C.; Zu, S.; Wang, K.; Li, Y.; Ge, Y., Preparation and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50* (1), 82-87.
- [119] Costa-Júnior, E. S.; Barbosa-Stancioli, E. F.; Mansur, A. A. P.; Vasconcelos, W. L.; Mansur, H. S., Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76* (3), 472-481.
- [120] Rodrigues, I. R.; de Camargo Forte, M. M.; Azambuja, D. S.; Castagno, K. R. L., Synthesis and characterization of hybrid polymeric networks (HPN) based on polyvinyl alcohol/chitosan. *Reactive and Functional Polymers* **2007**, *67* (8), 708-715.
- [121] Abdelgawad, A. M.; Hudson, S. M.; Rojas, O. J., Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydr. Polym.* **2013**.
- [122] Zuo, X.; Balasubramanian, R., Evaluation of a novel chitosan polymer-based adsorbent for the removal of chromium (III) in aqueous solutions. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 2181-2186.
- [123] Fajardo, A. R.; Lopes, L. C.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C., Development and application of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for removal and recovery of Pb(II). *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **2012**, *183* (0), 253-260.
- [124] Ming Yang, J.; Chih Chiu, H., Preparation and characterization of polyvinyl alcohol/chitosan blended membrane for alkaline direct methanol fuel cells. *J. Membr. Sci.* **2012**, *419-420*, 65-71.
- [125] Sin, L. T.; Rahman, W. A. W. A.; Rahmat, A. R.; Khan, M. I., Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol-cassava starch blends through DSC. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (1), 224-226.
- [126] Rahman, W. A. W. A.; Sin, L. T.; Rahmat, A. R.; Samad, A. A., Thermal behaviour and interactions of cassava starch filled with glycerol plasticized polyvinyl alcohol blends. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81* (4), 805-810.
- [127] Shi, R.; Bi, J.; Zhang, Z.; Zhu, A.; Chen, D.; Zhou, X.; Zhang, L.; Tian, W., The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74* (4), 763-770.
- [128] Chao, K.-P.; Chow, J.-D.; Chai, W.-L.; Hong, G.-M., Estimation of resistance of starch/polyvinyl alcohol blends to permeation by organic solvents. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89* (2), 432-437.
- [129] Sin, L. T.; Rahman, W. A. W. A.; Rahmat, A. R.; Samad, A. A., Computational modeling and experimental infrared spectroscopy of hydrogen bonding interactions in polyvinyl alcohol-starch blends. *Polymer* **2010**, *51* (5), 1206-1211.
- [130] Yoon, S. D.; Chough, S. H.; Park, H. R., Properties of starch-based blend films using citric acid as additive. II. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100* (3), 2554-2560.
- [131] Luo, X.; Li, J.; Lin, X., Effect of gelatinization and additives on morphology and thermal behavior of corn starch/PVA blend films. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (4), 1595-1600.
- [132] Jiang, X.; Jiang, T.; Gan, L.; Zhang, X.; Dai, H.; Zhang, X., The plasticizing mechanism and effect of calcium chloride on starch/poly(vinyl alcohol) films. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (4), 1677-1684.
- [133] Majdzadeh-Ardakani, K.; Nazari, B., Improving the mechanical properties of thermoplastic starch/poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2010**, *70* (10), 1557-1563.
- [134] El-Sayed, S.; Mahmoud, K. H.; Fatah, A. A.; Hassen, A., DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. *Physica B: Condensed Matter* **2011**, *406* (21), 4068-4076.
- [135] Qiu, K.; Netravali, A. N., Fabrication and characterization of biodegradable composites based on microfibrillated cellulose and polyvinyl alcohol. *Composites Science and Technology* **2012**, *72* (13), 1588-1594.
- [136] Stoica-Guzun, A.; Stroescu, M.; Jipa, I.; Dobre, L.; Zaharescu, T., Effect of γ irradiation on poly(vinyl alcohol) and bacterial cellulose composites used as packaging materials. *Radiat. Phys. Chem.* **2013**, *84* (0), 200-204.
- [137] Uddin, A. J.; Araki, J.; Gotoh, Y., Characterization of the poly(vinyl alcohol)/cellulose whisker gel spun fibers. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **2011**, *42* (7), 741-747.
- [138] Juby, K. A.; Dwivedi, C.; Kumar, M.; Kota, S.; Misra, H. S.; Bajaj, P. N., Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89* (3), 906-913.
- [139] Alexy, P.; Bakoš, D.; Hanzelová, S.; Kukulíková, L.; Kupec, J.; Charvátová, K.; Chiellini, E.; Cinelli, P., Poly(vinyl alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends: I. Experimental design optimisation and biodegradation behaviour. *Polym. Test.* **2003**, *22* (7), 801-809.
- [140] Lyons, J. G.; Geever, L. M.; Nugent, M. J. D.; Kennedy, J. E.; Higginbotham, C. L., Development and characterisation of an agar-polyvinyl alcohol blend hydrogel. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2009**, *2* (5), 485-493.

- [141] Hezaveh, H.; Muhamad, I. I., Controlled drug release via minimization of burst release in pH-response kappa-carrageenan/polyvinyl alcohol hydrogels. *Chem. Eng. Res. Des.* (0).
- [142] Hezaveh, H.; Muhamad, I. I., Controlled drug release via minimization of burst release in pH-response kappa-carrageenan/polyvinyl alcohol hydrogels. *Chem. Eng. Res. Des.* **2013**, *91* (3), 508-519.
- [143] Xu, X. J.; Huang, S. M.; Zhang, L. H., Biodegradability, antibacterial properties, and ultraviolet protection of polyvinyl alcohol-natural polyphenol blends. *Polym. Compos.* **2009**, *30* (11), 1611-1617.
- [144] Sudhamani, S. R.; Prasad, M. S.; Udaya Sankar, K., DSC and FTIR studies on Gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocolloids* **2003**, *17* (3), 245-250.
- [145] Levi, S.; Rac, V.; Manojlovi, V.; Raki, V.; Bugarski, B.; Flock, T.; Krzyczmonik, K. E.; Nedovi, V., Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science* **2011**, *1* (0), 1816-1820.
- [146] Limpan, N.; Prodpran, T.; Benjakul, S.; Prasarpran, S., Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *J. Food Eng.* **2010**, *100* (1), 85-92.
- [147] Mansur, H. S.; Sadahira, C. M.; Souza, A. N.; Mansur, A. A. P., FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C* **2008**, *28* (4), 539-548.
- [148] Yeom, C. K.; Lee, K. H., Pervaporation separation of water-acetic acid mixtures through poly(vinyl alcohol) membranes crosslinked with glutaraldehyde. *J. Membr. Sci.* **1996**, *109* (2), 257-265.
- [149] Fundueanu, G.; Constantin, M.; Ascenzi, P., Poly(vinyl alcohol) microspheres with pH- and thermosensitive properties as temperature-controlled drug delivery. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6* (10), 3899-3907.
- [150] Hasimi, A.; Stavropoulou, A.; Papadokostaki, K. G.; Sanopoulou, M., Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44* (12), 4098-4107.
- [151] Praptowidodo, V. S., Influence of swelling on water transport through PVA-based membrane. *J. Mol. Struct.* **2005**, *739* (1-3), 207-212.
- [152] Buonocore, G. G.; Del Nobile, M. A.; Panizza, A.; Corbo, M. R.; Nicolais, L., A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. *J. Controlled Release* **2003**, *90* (1), 97-107.
- [153] Majumdar, S.; Adhikari, B., Polyvinyl alcohol: A taste sensing material. *Sens. Actuators, B* **2006**, *114* (2), 747-755.
- [154] Riyajan, S. A.; Chaiponban, S.; Tanbumrung, K., Investigation of the preparation and physical properties of a novel semi-interpenetrating polymer network based on epoxidised NR and PVA using maleic acid as the crosslinking agent. *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **2009**, *153* (1-3), 199-205.
- [155] Han, B.; Li, J.; Chen, C.; Xu, C.; Wickramasinghe, S. R., Effects of degree of formaldehyde acetal treatment and maleic acid crosslinking on solubility and diffusivity of water in PVA membranes. *Chem. Eng. Res. Des.* **2003**, *81* (10), 1385-1392.
- [156] Burshe, M. C.; Sawant, S. B.; Joshi, J. B.; Pangarkar, V. G., Sorption and permeation of binary water-alcohol systems through PVA membranes crosslinked with multifunctional crosslinking agents. *Sep. Purif. Technol.* **1997**, *12* (2), 145-156.
- [157] Machado, L. D. B.; Bavaresco, V. P.; Pino, E. S.; Zavaglia, C. A. C.; Reis, M. C., TA of PVAL hydrogel cross-linked by chemical and EB irradiation process used as artificial articular cartilage. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2004**, *75* (2), 445-451.
- [158] Aji, Z., Preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogels containing citric or succinic acid using gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem.* **2005**, *74* (1), 36-41.
- [159] Sivakumar, M.; Kanagesan, S.; Chinnaraj, K.; Suresh Babu, R.; Nithyanantham, S., Synthesis, Characterization and Effects of Citric Acid and PVA on Magnetic Properties of CoFe₂O₄. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2013**, *23* (2), 439-445.
- [160] Wang, S.; Ren, J.; Li, W.; Sun, R.; Liu, S., Properties of polyvinyl alcohol/xylan composite films with citric acid. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *103* (0), 94-99.
- [161] Thomas, L. V.; Arun, U.; Remya, S.; Nair, P. D., A biodegradable and biocompatible PVA-citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20* (SUPPL. 1), S259-S269.
- [162] Morancho, J. M.; Salla, J. M.; Cadenato, A.; Fernández-Francos, X.; Colomer, P.; Calventus, Y.; Ramis, X.; Ruiz, R., Thermal analysis of enhanced poly(vinyl alcohol)-based proton-conducting membranes crosslinked with sulfonation agents for direct methanol fuel cells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124* (SUPPL. 1), E57-E65.

- [163] Salt, Y.; Hasanoğlu, A.; Salt, I.; Keleşer, S.; Özkan, S.; Dinçer, S., Pervaporation separation of ethylacetate-water mixtures through a crosslinked poly(vinylalcohol) membrane. *Vacuum* **2005**, *79* (3-4), 215-220.
- [164] Lang, K.; Sourirajan, S.; Matsuura, T.; Chowdhury, G., A study on the preparation of polyvinyl alcohol thin-film composite membranes and reverse osmosis testing. *Desalination* **1996**, *104* (3), 185-196.
- [165] Das, P.; Ray, S. K.; Kuila, S. B.; Samanta, H. S.; Singha, N. R., Systematic choice of crosslinker and filler for pervaporation membrane: A case study with dehydration of isopropyl alcohol-water mixtures by polyvinyl alcohol membranes. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, *81* (2), 159-173.
- [166] Quintero, S. M. M.; Ponce F, R. V.; Cremona, M.; Triques, A. L. C.; d'Almeida, A. R.; Braga, A. M. B., Swelling and morphological properties of poly(vinyl alcohol) (PVA) and poly(acrylic acid) (PAA) hydrogels in solution with high salt concentration. *Polymer* **2010**, *51* (4), 953-958.
- [167] Jianqi, F.; Lixia, G., PVA/PAA thermo-crosslinking hydrogel fiber: Preparation and pH-sensitive properties in electrolyte solution. *Eur. Polym. J.* **2002**, *38* (8), 1653-1658.
- [168] Giménez, V.; Mantecón, A.; Cádiz, V., Crosslinking of poly(vinyl alcohol) using dianhydrides as hardeners. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *59* (3), 425-431.
- [169] Xiao, S.; Huang, R. Y. M.; Feng, X., Preparation and properties of trimesoyl chloride crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes for pervaporation dehydration of isopropanol. *J. Membr. Sci.* **2006**, *286* (1-2), 245-254.
- [170] Alupeii, I. C.; Popa, M.; Hamcerencu, M.; Abadie, M. J. M., Superabsorbant hydrogels based on xanthan and poly(vinyl alcohol): 1. The study of the swelling properties. *Eur. Polym. J.* **2002**, *38* (11), 2313-2320.
- [171] Robb, I. D.; Smeulders, J. B. A. F., The rheological properties of weak gels of poly(vinyl alcohol) and sodium borate. *Polymer* **1997**, *38* (9), 2165-2169.
- [172] Liang, S.; Liu, L.; Huang, Q.; Yam, K. L., Preparation of single or double-network chitosan/poly(vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77* (4), 718-724.
- [173] Murphy, D. J.; Sankalia, M. G.; Loughlin, R. G.; Donnelly, R. F.; Jenkins, M. G.; McCarron, P. A., Physical characterisation and component release of poly(vinyl alcohol)-tetrahydroxyborate hydrogels and their applicability as potential topical drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (2), 326-334.
- [174] Immelman, E.; Sanderson, R. D.; Jacobs, E. P.; Van Reenen, A. J., Poly(vinyl alcohol) gel sublayers for reverse osmosis membranes. I. Insolubilization by acid-catalyzed dehydration. *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *50* (6), 1013-1034.
- [175] Krumova, M.; López, D.; Benavente, R.; Mijangos, C.; Pereña, J. M., Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer* **2000**, *41* (26), 9265-9272.
- [176] Kumar, M.; Varshney, L.; Francis, S., Radiolytic formation of Ag clusters in aqueous polyvinyl alcohol solution and hydrogel matrix. *Radiat. Phys. Chem.* **2005**, *73* (1), 21-27.
- [177] Lina, B. A. R.; Bär, A., Subchronic (13-week) oral toxicity study of α -cyclodextrin in dogs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2004**, *39* (SUPPL.), S27-S33.
- [178] Lina, B. A. R.; Bär, A., Subchronic oral toxicity studies with γ -cyclodextrin in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **1998**, *27* (2), 178-188.
- [179] Bellringer, M. E.; Smith, T. G.; Read, R.; Gopinath, C.; Olivier, P., β -Cyclodextrin: 52-week toxicity studies in the rat and dog. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33* (5), 367-376.
- [180] Toyoda, K.; Shoda, T.; Uneyama, C.; Takada, K.; Takahashi, M., Carcinogenicity study of β -cyclodextrin in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35* (3-4), 331-336.
- [181] Donaubaueer, H. H.; Fuchs, H.; Langer, K. H.; Bär, A., Subchronic intravenous toxicity studies with γ -cyclodextrin in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **1998**, *27* (2), 189-198.
- [182] Gould, S.; Scott, R. C., 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43* (10), 1451-1459.
- [183] Trapani, G.; Lopodota, A.; Boghetich, G.; Latrofa, A.; Franco, M.; Sanna, E.; Liso, G., Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl- β - cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **2003**, *268* (1-2), 47-57.
- [184] He, Q.; Wu, W.; Xiu, K.; Zhang, Q.; Xu, F.; Li, J., Controlled drug release system based on cyclodextrin-conjugated poly(lactic acid)-b-poly(ethylene glycol) micelles. *Int. J. Pharm.* **2013**, *443* (1-2), 110-119.
- [185] Zhao, D.; Zhao, L.; Zhu, C. S.; Huang, W. Q.; Hu, J. L., Water-insoluble β -cyclodextrin polymer crosslinked by citric acid: Synthesis and adsorption properties toward phenol and methylene blue. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2009**, *63* (3-4), 195-201.
- [186] Martel, B.; Morcellet, M.; Ruffin, D.; Vinet, F.; Weltrowski, M., Capture and controlled release of fragrances by CD finished textiles. *Journal of Inclusion Phenomena* **2002**, *44* (1-4), 439-442.

- [187] Vermet, G. Apport de nouvelles propriétés antibactériennes et analgésiques sur un implant de réfection pariétale. Thèse de Doctorat en Molécules et Matière Condensée, n° ordre: 40797, Universités des Sciences et Technologies de Lille, **2012**.
- [188] Weltrowski, M.; Morcellet, M.; Martel, B. Fibre présentant des propriétés de complexation améliorées et des propriétés échangeuses de cations. WO2000047811 A1, **2000**.
- [189] Ruffin, D. Polymérisation et greffage sur fibres textiles de cyclodextrines par réticulation au moyen d'acides polycarboxyliques. Etude des procédés et applications. Thèse de doctorat en Chimie Organique et Macromoléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, **2002**.
- [190] Martel, B.; Morcellet, M.; Ruffin, D.; Ducoroy, L.; Weltrowski, M., Finishing of polyester fabrics with cyclodextrins and polycarboxylic acids as crosslinking agents. *Journal of Inclusion Phenomena* **2002**, *44* (1-4), 443-446.
- [191] Martel, B.; Weltrowski, M.; Ruffin, D.; Morcellet, M., Polycarboxylic acids as crosslinking agents for grafting cyclodextrins onto cotton and wool fabrics: Study of the process parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83* (7), 1449-1456.
- [192] Olsson, E.; Hedenqvist, M. S.; Johansson, C.; Järnström, L., Influence of citric acid and curing on moisture sorption, diffusion and permeability of starch films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (2), 765-772.
- [193] Menzel, C.; Olsson, E.; Plivelic, T. S.; Andersson, R.; Johansson, C.; Kuktaite, R.; Järnström, L.; Koch, K., Molecular structure of citric acid cross-linked starch films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *96* (1), 270-276.
- [194] Szente, L.; Szejtli, J., Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15* (3-4), 137-142.
- [195] Hill, L. E.; Gomes, C.; Taylor, T. M., Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Science and Technology* **2013**, *51* (1), 86-93.
- [196] Li, X.; Jin, Z.; Wang, J., Complexation of allyl isothiocyanate by α - and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. *Food Chem.* **2007**, *103* (2), 461-466.
- [197] Wang, J.; Cao, Y.; Sun, B.; Wang, C., Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β - cyclodextrin inclusion complexes. *Food Chem.* **2011**, *127* (4), 1680-1685.
- [198] Zhao, M.; Wang, H.; Yang, B.; Tao, H., Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. *Food Chem.* **2010**, *120* (4), 1138-1142.
- [199] López-de-Dicastillo, C.; Gallur, M.; Catalá, R.; Gavara, R.; Hernandez-Muñoz, P., Immobilization of β -cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications. *J. Membr. Sci.* **2010**, *353* (1-2), 184-191.
- [200] Vega-Lugo, A. C.; Lim, L. T., Controlled release of allyl isothiocyanate using soy protein and poly(lactic acid) electrospun fibers. *Food Research International* **2009**, *42* (8), 933-940.
- [201] Fukazawa, R., Kodama, Susumu, Sato, Mieko Cyclodextrin inclusion compound and process for its preparation and use. EP0215169, **1987**.
- [202] Raouche, S.; Mauricio-Iglesias, M.; Peyron, S.; Guillard, V.; Gontard, N., Combined effect of high pressure treatment and anti-microbial bio-sourced materials on microorganisms' growth in model food during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2011**, *12* (4), 426-434.
- [203] Yu, Q.; Song, Y.; Shi, X.; Xu, C.; Bin, Y., Preparation and properties of chitosan derivative/poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84* (1), 465-470.
- [204] Rihawy, M. S.; Alzier, A.; Allaf, A. W., PIXE investigation of in vitro release of chloramphenicol across polyvinyl alcohol/acrylamide hydrogel. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2011**, *269* (17), 1892-1898.
- [205] Bursali, E. A.; Coskun, S.; Kizil, M.; Yurdakoc, M., Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activities of boron/starch/polyvinyl alcohol hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83* (3), 1377-1383.
- [206] Cencetti, C.; Bellini, D.; Pavesio, A.; Senigaglia, D.; Passariello, C.; Virga, A.; Matricardi, P., Preparation and characterization of antimicrobial wound dressings based on silver, gellan, PVA and borax. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90* (3), 1362-1370.
- [207] Jipa, I. M.; Stoica-Guzun, A.; Stroescu, M., Controlled release of sorbic acid from bacterial cellulose based mono and multilayer antimicrobial films. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, *47* (2), 400-406.
- [208] Stroescu, M.; Stoica-Guzun, A.; Jipa, I. M., Vanillin release from poly(vinyl alcohol)-bacterial cellulose mono and multilayer films. *J. Food Eng.* **2013**, *114* (2), 153-157.
- [209] Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, P. K., Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan-PVA film for food packaging applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *45* (4), 372-376.

- [210] Jagannath, J. H.; Nanjappa, C.; Gupta, D. D.; Bawa, A. S., Studies on the stability of an edible film and its use for the preservation of carrot (*Daucus carota*). *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *41* (5), 498-506.
- [211] Ge, L.; Zhao, Y. S.; Mo, T.; Li, J. R.; Li, P., Immobilization of glucose oxidase in electrospun nanofibrous membranes for food preservation. *Food Control* **2012**, *26* (1), 188-193.
- [212] Păduraru, O.; Vasile, C.; Cascaval, C. N.; Stoleriu, A., Phase behaviour of polyvinyl alcohol/ β -cyclodextrin blends. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2007**, *9* (4), 1019-1024.
- [213] Sreenivasan, K., On the restriction of the release of water-soluble component from polyvinyl alcohol film by blending β -cyclodextrin. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *65* (9), 1829-1832.
- [214] Sun, X. Z.; Williams, G. R.; Hou, X. X.; Zhu, L. M., Electrospun curcumin-loaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (1), 147-153.
- [215] Constantin, M.; Fundueanu, G.; Bortolotti, F.; Cortesi, R.; Ascenzi, P.; Menegatti, E., Preparation and characterisation of poly(vinyl alcohol)/cyclodextrin microspheres as matrix for inclusion and separation of drugs. *Int. J. Pharm.* **2004**, *285* (1-2), 87-96.
- [216] Kulkarni, A.; Deng, W.; Hyun, S. H.; Thompson, D. H., Development of a low toxicity, effective pdna vector based on noncovalent assembly of bioresponsive amino- β -cyclodextrin:adamantane-poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene glycol) transfection complexes. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (5), 933-940.
- [217] López-De-Dicastillo, C.; Jordá, M.; Catalá, R.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P., Development of active polyvinyl alcohol/ β -cyclodextrin composites to scavenge undesirable food components. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (20), 11026-11033.
- [218] Kayaci, F.; Uyar, T., Encapsulation of vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun polyvinyl alcohol (PVA) nanoweb: Prolonged shelf-life and high temperature stability of vanillin. *Food Chem.* **2012**, *133* (3), 641-649.
- [219] Kayaci, F.; Ertas, Y.; Uyar, T., Enhanced thermal stability of eugenol by cyclodextrin inclusion complex encapsulated in electrospun polymeric nanofibers. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (34), 8156-8165.
- [220] Jiang, P.; Hao, X.; Sun, M., Transfer behavior of clove oil/ β -cyclodextrin inclusion complex in antibacterial film based on PVA. *Key Eng. Mater.* **2013**, *531-532*, 333-336.
- [221] Liu, W.; Hansen, J. N., Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56* (8), 2551-2558.
- [222] Huang, C.-J.; Shieu, F.-S.; Hsieh, W.-P.; Chang, T.-C., Acidic hydrolysis of a poly(vinyl acetate) matrix by the catalytic effect of Ag nanoparticles and the micellization of Ag-metal-containing polymer. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100*, 1457-1464.
- [223] Padavan, D. T.; Hamilton, A. M.; Millon, L. E.; Boughner, D. R.; Wan, W., Synthesis, characterization and in vitro cell compatibility study of a poly(amic acid) graft/cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (1), 258-267.
- [224] Matsuo, M.; Bin, Y.; Nakano, M., Temperature dependence of the morphology and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) drawn films prepared by gelation/crystallization from solutions by X-ray and solid state ^{13}C NMR. *Polymer* **2001**, *42* (10), 4687-4707.
- [225] Cheung, M. K.; Wang, J.; Zheng, S.; Mi, Y., Miscibility of poly(epichlorohydrin)/poly(vinyl acetate) blends investigated with high-resolution solid-state ^{13}C NMR. *Polymer* **2000**, *41* (4), 1469-1474.
- [226] Rimez, B.; Rahier, H.; Van Assche, G.; Artoos, T.; Biesemans, M.; Van Mele, B., The thermal degradation of poly(vinyl acetate) and poly(ethylene-co-vinyl acetate), Part I: Experimental study of the degradation mechanism. *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93* (4), 800-810.
- [227] Kobayashi, M.; Ando, I.; Ishii, T.; Amiya, S., Structural and dynamical studies of poly(vinyl alcohol) gels by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **1998**, *440* (1-3), 155-164.
- [228] Kanekiyo, M.; Kobayashi, M.; Ando, I.; Kurosu, H.; Ishii, T.; Amiya, S., A structural and dynamic study of poly(vinyl alcohol) in the gel state by solid-state ^{13}C NMR and ^1H pulse NMR. *J. Mol. Struct.* **1998**, *447* (1-2), 49-59.
- [229] Bakkour, Y. Étude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées. Thèse de Chimie Organique et Macromoléculaire, n° ordre: 3646, Université Lille 1, **2005**.
- [230] Ducoroy, L.; Martel, B.; Bacquet, M.; Morcellet, M., Cation exchange finishing of nonwoven polyester with polycarboxylic acids and cyclodextrins. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *103* (6), 3730-3738.
- [231] Fukae, R.; Yamamoto, T.; Fujita, Y.; Kawatsuki, N.; Sangen, O.; Kamachi, M., Poly(vinyl alcohol) with high diad-syndiotacticity and high melting point. *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **1997**, *29* (3), 293-295.
- [232] Wunderlich, B., *Macromolecular Physics, Vol. 1: Crystal Structure, Morphology, Defects*. Academic Press, Inc.: **1973**.

- [233] Tubbs, R. K., Melting point and heat of fusion of poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **1965**, *3* (12), 4181-4189.
- [234] ASTM F1249-90 Standard Test Method for Water Vapor Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Modulated Infrared Sensor. 1995.
- [235] El Ghouli, Y.; Blanchemain, N.; Laurent, T.; Campagne, C.; El Achari, A.; Roudesli, S.; Morcellet, M.; Martel, B.; Hildebrand, H. F., Chemical, biological and microbiological evaluation of cyclodextrin finished polyamide inguinal meshes. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4* (5), 1392-1400.
- [236] Scott, C. P.; Higham, P. A., Antibiotic Bone Cement for the Treatment of Pseudomonas Aeruginosa in Joint Arthroplasty: Comparison of Tobramycin and Gentamicin-Loaded Cements. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2003**, *64* (2), 94-98.
- [237] Darras, O.; Seguela, R.; Rietsch, F., Dried gels from linear low-density polyethylene: Morphology, thermal behavior, and mechanical properties. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1992**, *30* (4), 349-359.
- [238] Hodge, R. M.; Edward, G. H.; Simon, G. P., Water absorption and states of water in semicrystalline poly(vinyl alcohol) films. *Polymer* **1996**, *37* (8), 1371-1376.
- [239] Mc Crum, N. G.; Read, B. E.; Williams, G., *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids, Polyvinyl Esters and Related Polymers*. Dover Publications ed.; **1991**, ISBN : 0-486-66752-9.
- [240] Lu, Y.; Yang, C. Q., Fabric yellowing caused by citric acid as a crosslinking agent for cotton. *Text. Res. J.* **1999**, *69* (9), 685-690.
- [241] Fox, T. G.; Loshaek, S., Influence of molecular weight and degree of crosslinking on the specific volume and glass temperature of polymers. *Journal of Polymer Science* **1955**, *15* (80), 371-390.
- [242] Del Valle, E. M. M., Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **2004**, *39* (9), 1033-1046.
- [243] Eklund, T., Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *International Journal of Food Microbiology* **1985**, *2* (3), 159-167.

ANNEXES

Annexe 1

Liste des microorganismes dans les denrées alimentaires

Tableau A. 1 Microorganismes dans les denrées alimentaires¹

Microorganisme	Genre	Produits alimentaires
Bactéries Gram-	<i>Acinetobacter</i>	Viandes
	<i>Alcaligenes</i>	Lait, volailles
	<i>Citrobacter</i>	(répandu)
	<i>Enterobacter</i>	(répandu)
	<i>Erwinia</i>	Fruits et légumes
	<i>Escherichia</i>	(répandu)
	<i>Flavobacterium</i>	Poissons, végétaux
	<i>Proteus</i>	Œufs, viandes
	<i>Pseudomonas</i>	Lait, œufs, viandes
	<i>Salmonella</i>	(répandu)
	<i>Shigella</i>	(répandu)
	<i>Vibrio</i>	Coquillages, poissons
	<i>Acetobacter</i>	Boissons
	<i>Aeromonas</i>	Poissons
	<i>Alteromonas</i>	poissons
	<i>Campylobacter</i>	Viandes, lait
	<i>Klebsiella</i>	(répandu)
<i>Moraxella</i>	Viandes	
<i>Yersinia</i>	Viandes	
Bactéries Gram+	<i>Bacillus</i>	Viandes, conserves
	<i>Clostridium</i>	Viandes, conserves
	<i>Corynebacterium</i>	(répandu)
	<i>Desulfotomaculum</i>	Conserves
	<i>Lactobacillus</i>	Lait, viandes
	<i>Listeria</i>	Aliments crus, charcuterie, fromage
	<i>Micrococcus</i>	Lait, viandes
	<i>Staphylococcus</i>	(répandu)
	<i>Streptococcus</i>	(répandu)
	<i>Brochothrix</i>	Viandes sous vide
	<i>Leuconostoc</i>	Lait, viandes, boissons
	<i>Pediococcus</i>	Aliments fermentés
	<i>Sarcina</i>	Viandes, charcuterie

¹ Microorganismes d'importance alimentaire | azaquar.com [ref. du 08 janvier 2014]. Disponible sur web: <http://www.azaquar.com/doc/microorganismes-importance-alimentaire>

Tableau A. 1 Microorganismes dans les denrées alimentaires (suite)

Microorganisme	Genre	Produits alimentaires
Levures (Famille <i>Saccharomycetaceae</i>)	<i>Debaryomyces</i>	Charcuterie, vins, boissons
	<i>Hansenula</i>	Jus de fruits, saumures, champignons
	<i>Kluyveromyces</i>	Boissons
	<i>Pichia</i>	Œufs
	<i>Saccharomyces</i>	Fruits, légumes, boissons, œufs
	<i>Saccharomycopsis</i>	Boissons, choucroute
	<i>Schizosaccharomyces</i>	Produits sucrés
Levures (Famille <i>Cryptococcaceae</i>)	<i>Brettanomyces</i>	Bière, produits acidifiés
	<i>Candida</i>	Viandes, margarine
	<i>Kloeckera</i>	Boissons
	<i>Phaffia</i>	Boissons
	<i>Rhodotorula</i>	Boissons
	<i>Trichosporon</i>	Viandes, bières
Moisissures	<i>Aspergillus</i>	Riz, céréales, fruits, œufs, huiles, tourteaux, arachides, sucre de canne
	<i>Botrytis</i>	Fruits et légumes
	<i>Byssochlamys</i>	Fruits en conserve, boissons
	<i>Cladosporium</i>	Pruneaux, viandes, céréales, lait
	<i>Curvularia</i>	Coprah, riz
	<i>Eurotium</i>	Céréales, viandes
	<i>Fusarium</i>	Céréales, fruits et légumes
	<i>Geotrichum</i>	Huiles, lait
	<i>Helminthosporium</i>	Riz, végétaux
	<i>Mucor</i>	Produits laitiers, céréales, fruits, coprah, œufs
	<i>Penicillium</i>	Fruits, coprah, céréales, riz, viandes, œufs, lait
	<i>Rhizopus</i>	Pain, Fruits (fraises, bananes, prunes), coprah, palme
	<i>Trichothecium</i>	Lait, fruits et légumes

Les microorganismes **en gras** sont les genres les plus courants.

Annexe 2

Etude RMN des produits initiaux

L'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HPβCD)

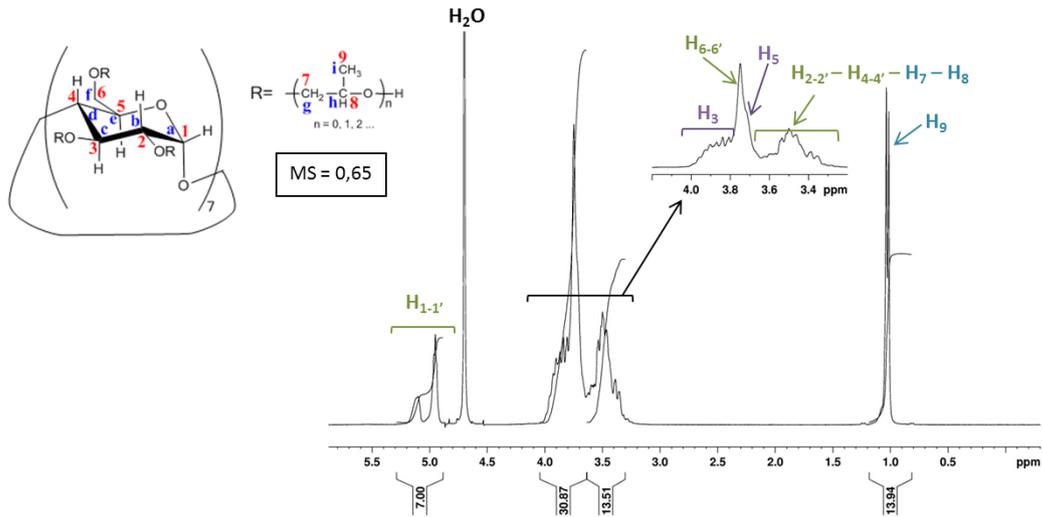


Figure A. 1. Spectre RMN ^1H liquide de l'HPβCD dans D_2O

MS = molar substitution: nombre moyen de groupes hydroxypropyles par unité glucose anhydre.

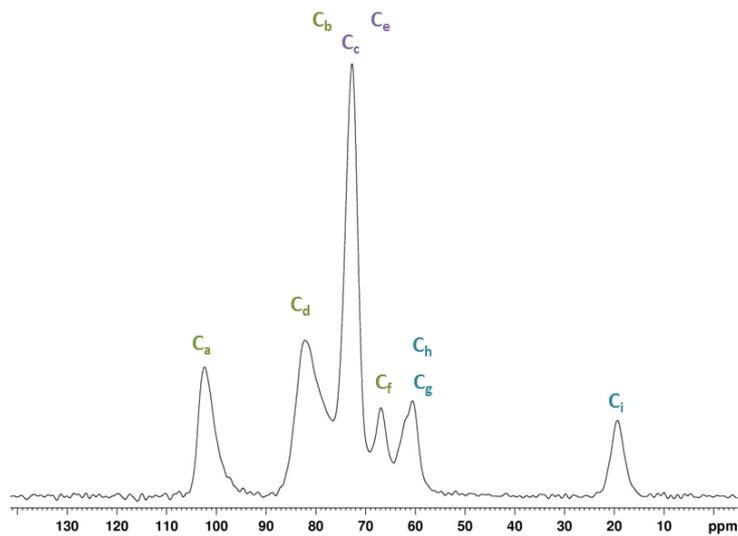


Figure A. 2. Spectre RMN ^{13}C solide de l'HPβCD

Tableau A. 2. Attribution des pics observés par RMN ^1H liquide et ^{13}C solide pour l'HP β CD

^1H liquide (D_2O)			^{13}C solide	
δ (ppm)	Multiplicité	Attribution	δ (ppm)	Attribution ^{2, 3}
5,1-4,9	Doublet de doublet	$\text{H}_{1-1'}$	102	C_a
4 - 3,8	Multiplet	H_3	82	C_d
3,74	Multiplet	H_6	72	$\text{C}_b-\text{C}_c-\text{C}_e$
3,71	Multiplet	H_5	66	C_f
3,64 - 3,30	Multiplet	$\text{H}_{2-4-7-9}$	60	C_g-C_h
1	doublet	H_9	19	C_i

La maltodextrine (MX)

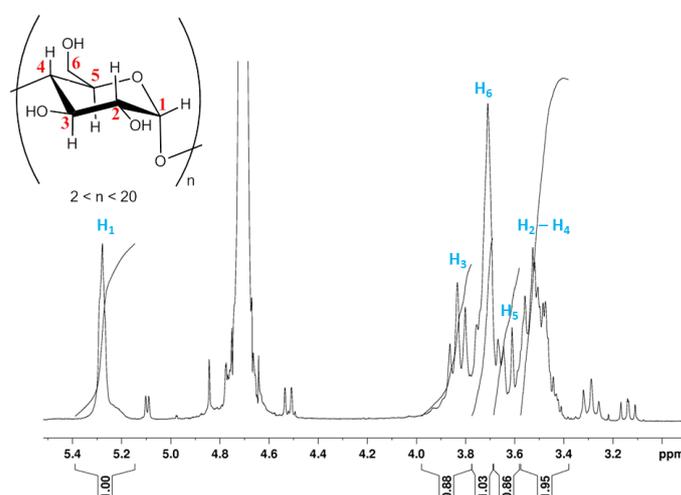


Figure A. 3. Spectre RMN ^1H liquide de la MX dans D_2O

Tableau A. 3. Attribution des pics observés par RMN ^1H liquide pour la MX

^1H liquide (D_2O)		
δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
5,28	Singulet	H_1
3,91 - 3,78	Triplet	H_3
3,70	Multiplet	H_6
3,67 - 3,62	Multiplet	H_5
3,59 - 3,99	Multiplet	$\text{H}_2 - \text{H}_4$

² Crini, G.; Cosentino, C.; Bertini, S.; Naggi, A.; Torri, G.; Vecchi, C.; Janus, L.; Morcellet, M., Solid state NMR spectroscopy study of molecular motion in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) crosslinked with epichlorohydrin. *Carbohydr. Res.* 1998, 308 (1-2), 37-45.

³ Janus, L.; Crini, G.; El-Rezzi, V.; Morcellet, M.; Cambiaghi, A.; Torri, G.; Naggi, A.; Vecchi, C., New sorbents containing beta-cyclodextrin. Synthesis, characterization, and sorption properties. *Reactive and Functional Polymers* 1999, 42 (3), 173-180.

L'acide citrique (CTR)

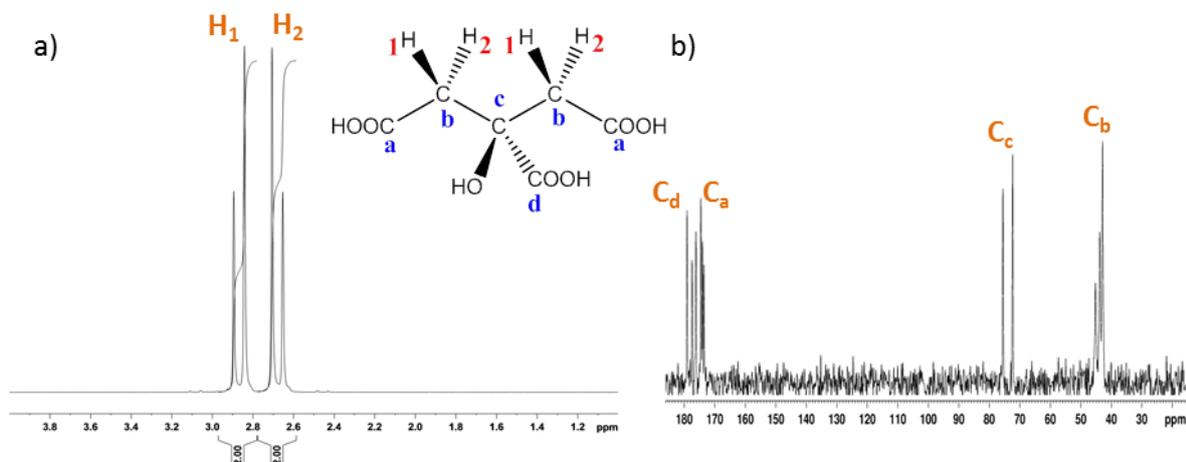


Figure A. 4. Spectre RMN ^1H liquide dans D_2O (a) et spectre RMN ^{13}C solide(b) du CTR

Tableau A. 4. Attribution des pics observés par RMN ^1H liquide et ^{13}C solide pour le CTR

^1H liquide			^{13}C solide	
δ (ppm)	Multiplicité	Attribution	δ (ppm)	Attribution
2,9	Doublet	H_1	179 - 176	C_d
2,7	Doublet	H_2	174 - 173	C_a
			76 - 72	C_c
			45 - 43	C_b

L'hypophosphite de sodium (NaH_2PO_2)

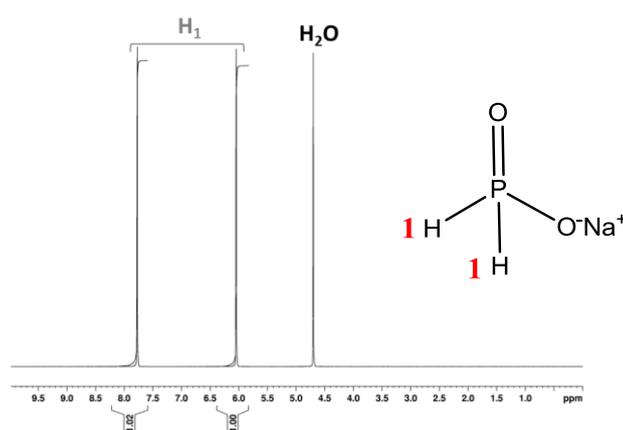


Figure A. 5. Spectre RMN ^1H liquide du NaH_2PO_2 dans D_2O , attribution du doublet des H_1 entre 7,79 et 6,05 ppm⁴

⁴ Polyakov, A. I.; Bitenbayev, M. I., NMR study of transport of nuclear spin polarization in sodium hypophosphite $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. *Solid State Sci.* 2009, 11 (5), 945-947.

Le benzoate de sodium (NaBz)

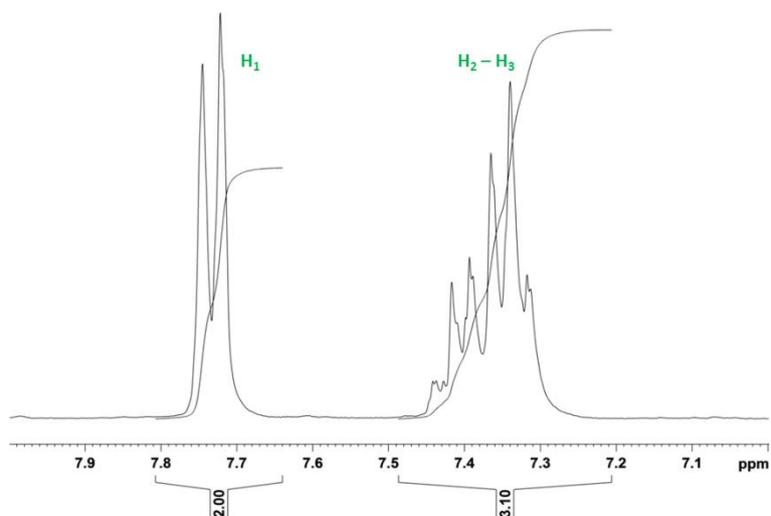


Figure A. 6. Spectre RMN ^1H liquide du NaBz dans D_2O

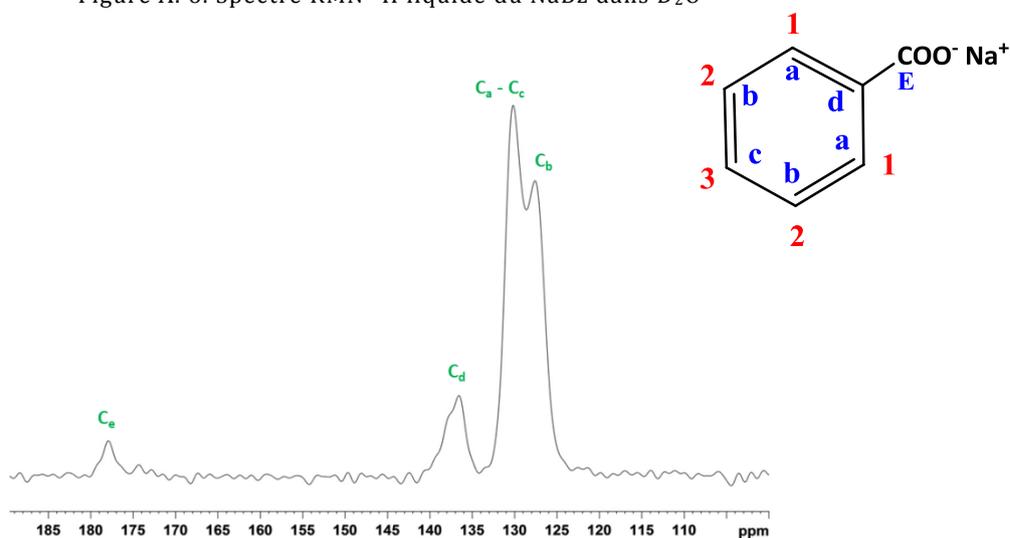


Figure A. 7. Spectre RMN ^{13}C solide du NaBz

Tableau A. 5. Attribution des pics observés par RMN ^1H liquide et ^{13}C solide pour le NaBz

^1H liquide			^{13}C solide	
δ (ppm)	Multiplicité	Attribution	δ (ppm)	Attribution
7,74-7,72	Doublet	H_1	178	C_e
7,44 - 7,31	Multiplet	$\text{H}_2 - \text{H}_3$	138 - 137	C_d
			130	$\text{C}_a - \text{C}_c$
			127	C_b

Annexe 3

Courbe d'étalonnage du NaBz dans l'eau

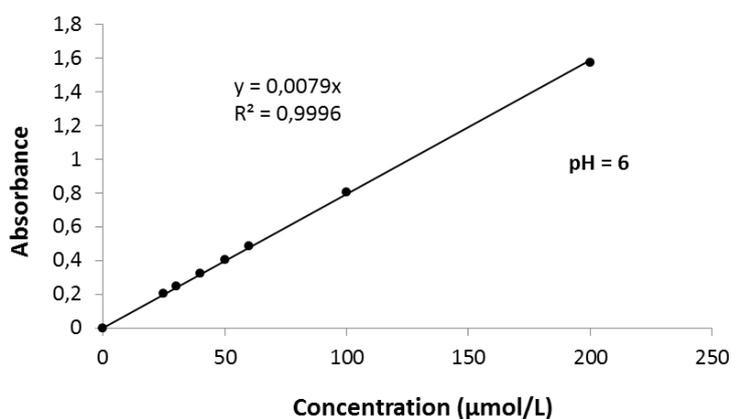


Figure A. 8. Courbe d'étalonnage du NaBz dans l'eau $A = f(C)$ à $\lambda = 224 \text{ nm}$ obtenue par spectroscopie UV-Vis à pH = 6

L'équation de la droite d'étalonnage du NaBz (Figure A. 8), suivant la loi de Beer-Lambert, permet de calculer la concentration en NaBz dans la solution à partir de l'absorbance maximale. L'équation de la droite est $A = 0,0079 C$ (avec C en $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Annexe 4

Spectres RMN des films PVOH/CTR -90/10 et PVOH/CTR-60/40 entre 5 et 9 ppm

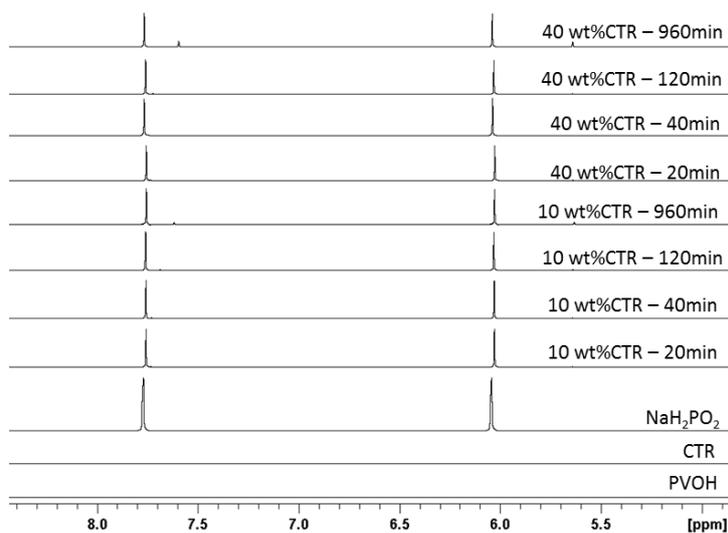


Figure A. 9. Comparaison des spectres RMN ^1H des réactifs résiduels et des composés initiaux entre 5 et 9 ppm

Annexe 5

Calcul pour la détermination de la masse molaire entre les nœuds de réticulation

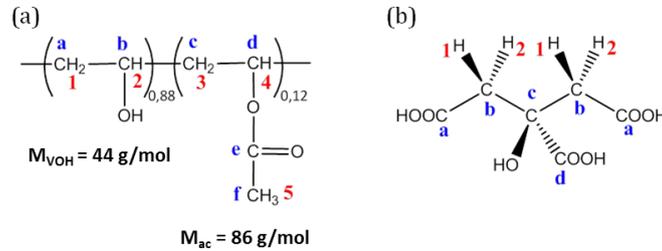


Figure A. 10. Structures chimiques du PVOH et du CTR

Les pourcentages molaires en motif sont $x = 0,88$ et $y = 0,12$ pour VOH et VAc, respectivement. Pour obtenir le pourcentage massique, noté ω , en motifs VOH et VAc :

$$\omega_{VOH} = \frac{xM_{VOH}}{xM_{VOH} + yM_{VAc}} = \frac{0,88 \times 44}{0,88 \times 44 + 0,12 \times 86} = 0,79$$

$$\omega_{ac} = \frac{xM_{ac}}{xM_{VOH} + yM_{VAc}} = \frac{0,12 \times 86}{0,88 \times 44 + 0,12 \times 86} = 0,21$$

Pour un échantillon de 1g de PVOH/CTR-90-10-20min ayant $n_{COOH \text{ non réagi}} = 1,04 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$,

$$n_{VOH \text{ initial}} = \frac{\omega_{VOH} \times m_{PVOH}}{M_{VOH}} = \frac{0,79 \times 0,9}{44} = 162 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n_{COOH \text{ initial}} = 3 \times n_{CTR} = \frac{3 \times m_{CTR}}{M_{CTR}} = \frac{3 \times 0,1}{210,14} = 143 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n_{VAc} = \frac{\omega_{VAc} \times m_{PVOH}}{M_{VAc}} = \frac{0,21 \times 0,9}{86} = 21,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

1 fonction COOH réagit avec 1 fonction OH donc

$$n_{VOH \text{ réagi}} = n_{COOH \text{ initial}} - n_{COOH \text{ non réagi}} = 3,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_{VOH \text{ non réagi}} = n_{VOH \text{ initial}} - n_{VOH \text{ réagi}} = 157,79 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

Si on ramène à 1g de PVOH, on a :

$$n_{VAc} = 24,419 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_{VOH \text{ réagi}} = 4,293 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n_{VOH \text{ non réagi}} = 175,252 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$$\text{Nombre total de motif} = 204 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$$

$4,29 \cdot 10^{-4}$ moles de motifs sont impliquées dans la réticulation sur $204 \cdot 10^{-4}$ moles. En considérant une répartition régulière avec un bout de chaîne, soit autant d'intervalles que de ponts de réticulation, on a

$\frac{204 \cdot 10^{-4}}{4,293 \cdot 10^{-4}} = 47,51$ motifs entre 2 nœuds de réticulation. La masse molaire moyenne d'un motif est

$M_{VOH} \times x_{VOH} + M_{VAc} \times y_{VAc} = 44 \times 0,88 + 86 \times 0,12 = 49,04 \text{ g/mol}$, donc la masse molaire estimée entre 2 nœuds de réticulation est $49,04 \times 47,51 = 2330 \text{ g/mol}$.

Annexe 6

Thermogrammes ATG des réactifs et des films PVOH, PVOH/CTR et PVOH/HP β CD/CTR

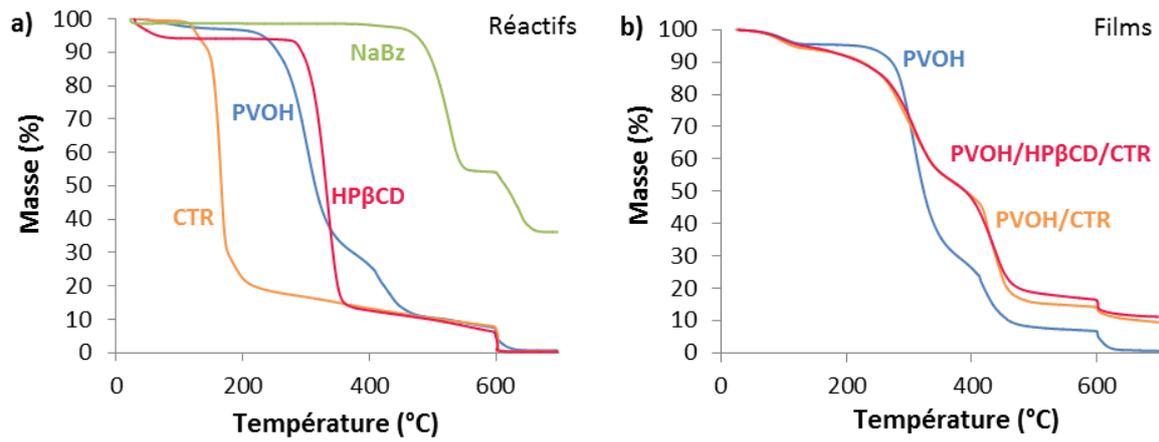


Figure A. 11. Thermogrammes ATG des réactifs (a) et des films (b) PVOH, PVOH/CTR et PVOH/HP β CD/CTR

Annexe 7

Spectres RMN des réactifs résiduels pour les films de compositions intermédiaires

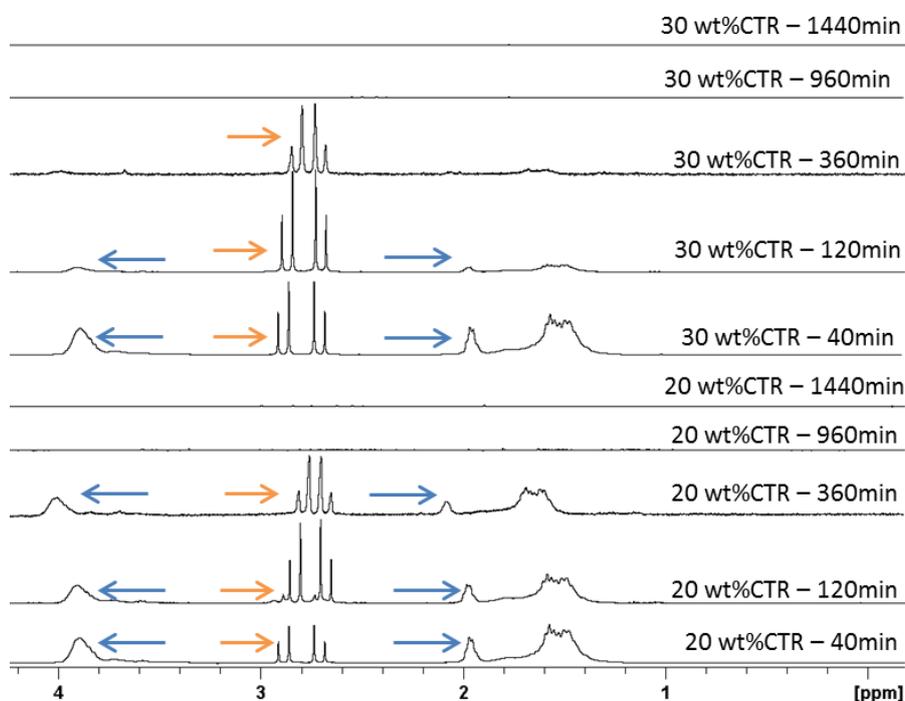


Figure A. 12. Spectres RMN ^1H dans le D_2O des réactifs résiduels pour des films PVOH/CTR avec 20 ou 30 wt% de CTR

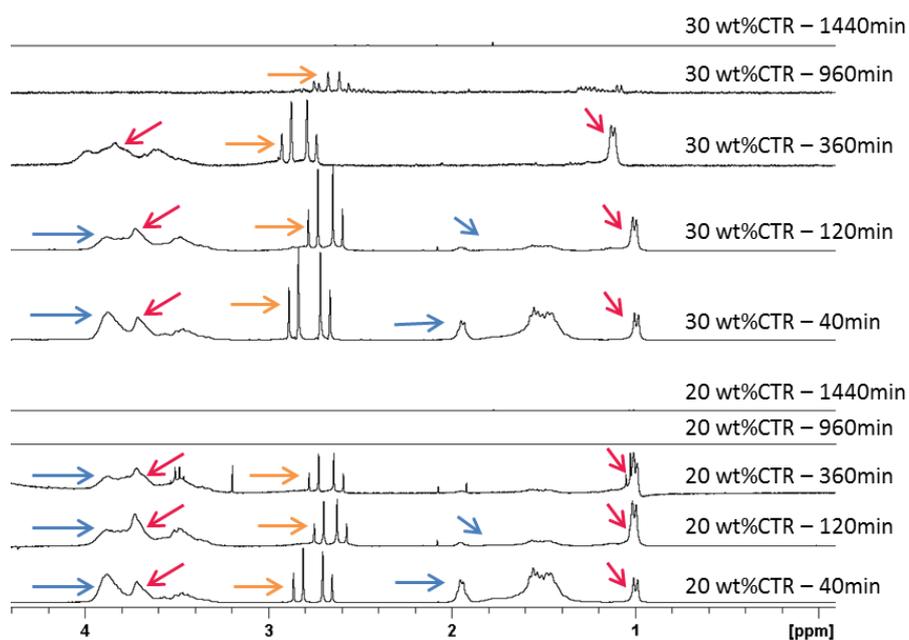


Figure A. 13. Spectres RMN ^1H dans le D_2O des réactifs résiduels pour des films PVOH/HP β CD/CTR avec 20 ou 30 wt% de CTR et 30 wt% d'HP β CD

Annexe 8

Zoom sur les taches de corrélation du spectre ROESY 2D du mélange [HP β CD : NaBz]

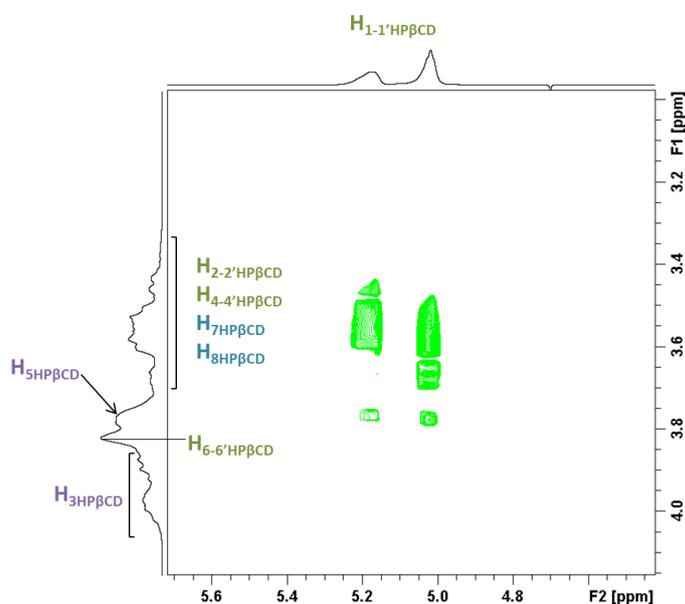


Figure A. 14. Zoom sur la tache de corrélation du spectre ROESY 2D du mélange [HP β CD-NaBz] correspondant au cercle bleu

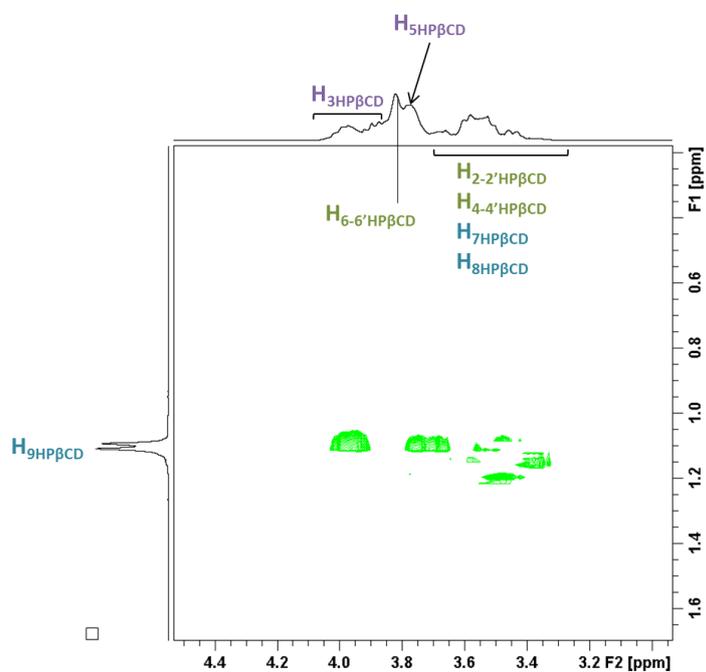


Figure A. 15. Zoom sur la tache de corrélation du spectre ROESY 2D du mélange [HP β CD-NaBz] correspondant au cercle orange

Annexe 9

Tableau récapitulatif des résultats de libération du NaBz

Tableau A. 6. Résultats de l'étude de libération du NaBz pour les films obtenus (température de réticulation 130 °C)

PVOH (%)	HPβCD (%)	NaBz (%)	CTR (%)	t _{rét} (min)	Début de plateau (min)	NaBz libéré (%)	NaBz libéré (mg/g)	COOH résiduels film non chargé correspondant (mmol/g)
89	0	1	10	40	6	34	3,4	0,92 ± 0,01
89	0	1	10	360	6	22	2,2	0,64 ± 0,08
87	0	3	10	40	5	48	14,4	0,92 ± 0,01
87	0	3	10	360	12	35	10,5	0,64 ± 0,08
79	0	1	20	40	7	55	5,5	1,97 ± 0,22
79	0	1	20	360	45	44	4,4	1,42 ± 0,11
77	0	3	20	40	6 ± 2	41 ± 1	12,3 ± 0,3	1,97 ± 0,22
77	0	3	20	120	12	46	13,8	1,23 ± 0,03
77	0	3	20	360	41 ± 5	40 ± 1	12 ± 0,3	1,42 ± 0,11
77	0	3	20	960	79 ± 5	41 ± 2	12,3 ± 0,6	0,83 ± 0,09
77	0	3	20	1440	100 ± 1	40 ± 3	12 ± 0,9	0,68 ± 0,09
70	0	10	20	40	6	42	42	1,97 ± 0,22
70	0	10	20	360	5	25	25	1,42 ± 0,11
69	0	1	30	40	10	60	6	2,54 ± 0,48
69	0	1	30	360	70	56	5,6	1,24 ± 0,18
67	0	3	30	40	8 ± 2	48 ± 3	14,4	2,54 ± 0,48
67	0	3	30	360	118 ± 45	44 ± 2	13,2	1,24 ± 0,18
60	0	10	30	40	7	39	39	2,54 ± 0,48
60	0	10	30	360	10	29	29	1,24 ± 0,18
79	10	1	10	40	6	19	1,9	1,35 ± 0,31
79	10	1	10	120	16	36	3,6	0,92 ± 0,16
79	10	1	10	360	11	48	4,8	0,58 ± 0,04
57	30	3	10	360	10	68	20,4	0,70 ± 0,015
69	10	1	20	40	5	72	7,2	1,92 ± 0,12
69	10	1	20	360	22	50	5	1,44 ± 0,13
47	30	3	20	40	5 ± 1	78 ± 5	23,4 ± 1,5	1,31 ± 0,05
47	30	3	20	120	6	76	22,8	1,04 ± 0,06
47	30	3	20	360	46 ± 6	74 ± 4	21,9 ± 1,2	0,90 ± 0,15
47	30	3	20	960	95 ± 58	76 ± 4	22,8 ± 1,2	0,76 ± 0,13
47	30	3	20	1440	135	76	22,8	0,53 ± 0,06
60	10	10	20	40	6 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	1,92 ± 0,12
60	10	10	20	360	19 ± 11	31 ± 4	31 ± 4	1,44 ± 0,13
59	10	1	30	40	14	82	8,2	2,96 ± 0,013
59	10	1	30	360	75	67	6,7	1,41 ± 0,13
37	30	3	30	360	59 ± 16	68 ± 2	20,4 ± 0,6	0,77 ± 0,21

Annexe 10

Communications

Communications orales :

1. C. Birck, M. Bacquet, S. Degoutin, V. Miri, N. Chihib, J.P. Cornard, P. Dhulster ; Conception et caractérisation de nouveaux films d'emballage bioactif à contact alimentaire. XIIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, SFGP2011, Lille (France), 29 novembre - 1^{er} décembre **2011**
2. C. Birck, M. Bacquet, S. Degoutin, V. Miri, C. Neut, M. Maton ; Conception et caractérisation de nouveaux films d'emballage bioactif à contact alimentaire. 40ème Congrès du JEPO, Anduze, 30 septembre - 5 octobre **2012**

Poster :

3. C. Birck, M. Bacquet, S. Degoutin, V. Miri ; Optimisation des propriétés thermo-mécaniques de films anti-microbiens à base de poly(alcool vinylique). XIIIème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, SFGP2011, Lille (France), 29 novembre - 1^{er} décembre **2011**

Article :

4. C. Birck, S. Degoutin, N. Tabary, V. Miri, M. Bacquet ; New crosslinked cast films based on poly(vinyl alcohol): Preparation and physico-chemical properties, *eXPRESS Polymer Letters*, 2014, **8**(12), 941-952

New crosslinked cast films based on poly(vinyl alcohol): Preparation and physico-chemical properties

C. Birck^{1,2}, S. Degoutin^{1,2}, N. Tabary^{1,2}, V. Miri^{1,2}, M. Bacquet^{1,2*}

¹Unité des Matériaux et Transformations (UMET), CNRS UMR 8207, Equipe ISP, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

Received 14 May 2014; accepted in revised form 13 July 2014

Abstract. In this paper, we propose a green route to prepare insoluble poly(vinyl alcohol) (PVOH) cast films with potential application as antimicrobial packaging. First PVOH films were cast from different aqueous solutions and analyzed by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Dynamic Mechanical Analysis (DMA) to determine their physical properties under two storage conditions. In order to obtain insoluble films, PVOH was then crosslinked by citric acid (CTR) as confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses. The crosslinking reaction parameters (curing time, crosslinker content) were studied by comparing the characteristics of PVOH/CTR films, such as free COOH content and glass transition temperature (T_g) value, as well as the impact of the crosslinking reaction on mechanical properties. It was found that for 40 and 10 wt% CTR contents, 120 and 40 min of crosslinking times were necessary to bind all CTR respectively. Brittle films were obtained for 40 wt% CTR whereas 10 wt% CTR content led to ductile films. Finally, films containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), chosen as a potential vector of antimicrobial agent, were prepared. The obtained results show that the incorporation of HP β CD in the PVOH matrix does not mainly influence the physical and mechanical properties of the films.

Keywords: mechanical properties, poly(vinyl alcohol), cyclodextrin, crosslinking, cast films

1. Introduction

Poly(vinyl alcohol) (PVOH) is a non-toxic, biodegradable polymer used in food packaging applications owing to its high barrier properties to oxygen and carbon dioxide [1, 2]. However, due to its solubility in water, it is often combined with other polymers in multilayer structures, PVOH being located in the core layer. An alternative route to avoid the use of several polymers would be the crosslinking of PVOH. For this polymer, the most commonly used crosslinkers are dialdehydes, such as glyoxal [3] or glutaraldehyde [4, 5] and polycarboxylic acids. Among the latter, citric acid (CTR) [6, 7], succinic acid [8] and tartaric acid [9] have the advantage of being used as food additives. In partic-

ular, citric acid (food additive European code E330) is interesting for its low price. It is also well-known as crosslinking agent for compounds bearing hydroxyl groups (like polysaccharides and cyclodextrins) as already reported by our group [10, 11].

The aim of this study is to prepare antimicrobial films for food industry, which is emerging in the area of active packaging [12]. In order to confer a prolonged antimicrobial activity to PVOH crosslinked films, we develop an original approach which consists in adding cyclodextrin in the PVOH matrix. Cyclodextrins present several advantages for our application. These biodegradable cyclic oligosaccharides can be used to form inclusion complexes with antimicrobial agents, in order to release it onto

*Corresponding author, e-mail: maryse.bacquet@univ-lille1.fr
© BME-PT

the surface of the food [13–15]. The hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), selected for this study, is a derivative of the β -cyclodextrin (food additive E 459) and is non-toxic [16].

The objective of this work is to prepare new films based on PVOH and HP β CD, crosslinked by CTR via a green route. In order to optimize the preparation, different processing parameters such as the PVOH dilution ratio, the formulation of the initial batches with or without cyclodextrin and the crosslinking reaction time are studied. Relationships between processing and physico-chemical properties are investigated using several characterization techniques. The release kinetics of an active principle and the antibacterial activity of the optimized films will be discussed in a following paper.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Poly (vinyl alcohol) (PVOH, $M_w = 31\,000$ – $50\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 87–89% hydrolysis, powder) was purchased from Aldrich Chemicals (St. Quentin Fallavier, France). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) was provided by Roquette (Lestrem, France). This derivative of β -cyclodextrin (β CD) is very soluble in water ($>1000\text{ g/L}$). The mean Molar Substitution (MS), which is the average number of hydroxypropyl groups per anhydroglucose unit, is 0.65. Citric acid (CTR), sodium hydroxide and calcium acetate were commercial chemical grade products, supplied by Aldrich Chemicals.

2.2. Films preparation

For non-crosslinked PVOH films, PVOH was dissolved in distilled water at three concentrations (1, 5, 17 wt%) by mechanical agitation with helical blade (150 rpm), in the temperature range 75–90°C during 3 to 5 hours. The homogeneous solution was then slowly cooled at room temperature, cast onto a silicone plate and dried under a hood for 16 hours. To study the effect of PVOH dilution, a non-crosslinked PVOH film was prepared by compression molding at 220°C, 50 bars, and cooled down to room temperature at 1°C/min.

For crosslinked PVOH/CTR films, CTR was added in the homogeneous PVOH solution. The final reagents concentration was equal to 5 wt%. The solution was stirred by mechanical agitation and cast, using similar conditions as previously described. Once the film was formed, the crosslinking reaction

was achieved through a heat treatment at $130\pm 1^\circ\text{C}$ during increasing times (from 0 to 960 min). Two relative weight compositions of PVOH/CTR films were prepared: 90/10 and 60/40.

Crosslinked PVOH/CTR/HP β CD films, in weight proportions 80/10/10, were prepared following the same protocol as for films without HP β CD. The proportion of HP β CD in the film was fixed considering first an equimolar complex between HP β CD and the later added antimicrobial agent and secondly according to the European directive giving a limit for constituent's migration in food packaging at 10 mg/dm^2 [17].

The thickness of each film was $120\pm 20\ \mu\text{m}$.

Two storage conditions have been used for the films. Dried films were obtained by keeping them at 60°C during 16 hours under vacuum. Hydrated films were obtained by conditioning at 58% Relative Humidity (R.H.) during three days (room temperature in an environmental chamber in the presence of NaBr saturated solutions).

2.3. Thermogravimetric analysis (TGA)

TGA was used to determine the water content and the thermal degradation of films. Experiments were performed on a TA Q50 (TA Instruments, United States) apparatus from ambient to 600°C with a heating rate of 5°C/min. The sample was placed in an open platinum pan under nitrogen.

2.4. Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC measurements were performed on a TA Q100 (TA Instruments, United States) apparatus under ultra-pure nitrogen at a heating rate of 10°C/min. PVOH and PVOH/CTR films (with or without HP β CD) were analyzed, during the first heating, from –70 to 220°C and to 150°C, respectively. The glass transition temperature (T_g) was taken at the onset of the heat capacity jump and the melting point (T_m) at the maximum of the endothermic peak. The crystallinity degree (X_c) was calculated using the value of 162 J/g which is the most cited reference melting enthalpy for PVOH crystals [18–20]. Three replicates were analyzed for each film.

2.5. X-ray diffraction (XRD)

Wide-angle-X-ray scattering (WAXS) analysis was performed using a Rigaku rotating anode equipment (Rigaku, Japan) operating at 50 kV and 100 mA. The Cu K α radiation ($\lambda = 1.54\ \text{\AA}$) was selected with a

point focusing monochromator. The WAXS patterns were recorded on MAR2300 imaging plates. Radial Intensity Profiles, $I(2\theta)$, were obtained by azimuthal integration of the 2D patterns.

2.6. Dynamic mechanical analysis (DMA)

DMA measurements were performed on a Rheometrics RSA III (TA Instruments, United States) apparatus operating in tensile mode at a frequency of 1 Hz using a dynamic strain amplitude $\epsilon_0 = 0.05\%$ in the temperature range $-50^\circ\text{C} < T < 150^\circ\text{C}$. Specimens with gauge width and length $6\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ were cut out from the films of PVOH crosslinked or not.

2.7. Uniaxial tensile measurements

Uniaxial Tensile testing was conducted on a 4466 Instron (Instron, United Kingdom) machine at room temperature (22°C) using specimens with 24 and 5 mm of gauge length and width, respectively. The tensile tests were carried out at a constant crosshead speed of $14.4\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ which corresponds to an initial strain rate of 0.01 s^{-1} . The nominal stress σ_N and the nominal strain ϵ_N were defined as conventionally by the ratio of the force per the initial cross-section and the elongation per the initial length of the sample, respectively. Three replicates have been analyzed for each film.

2.8. Nuclear magnetic resonance (NMR)

^1H NMR was used to check the presence of unreacted reagents in films. Each film was immersed in water during 3 days under agitation. Once the film was removed, the solution containing released reagents was freeze-dried. The obtained solid was dissolved in D_2O and freeze-dried again. The final obtained solid was dissolved in D_2O and analyzed by ^1H NMR using a spectrometer Bruker Avance™ (Bruker Corporation, Germany) 300 MHz at room temperature.

2.9. Free COOH groups quantification

This quantification was undertaken by Ion Exchange Capacity (IEC) method through pH-metric titration using calcium acetate [21]. Each sample was dried 16 hours at 60°C before titration. Typically, 0.1 g of film sample was stirred in 100 mL of a calcium acetate solution during 2 hours. The formed acetic acid was titrated by a standard NaOH solution. The

amount of carboxylic functions was calculated following the Equation (1):

$$IEC [\text{mmol/g}] = \frac{C_b[\text{mmol/mL}] \cdot V_e[\text{mL}]}{\text{sample weight}[\text{g}]} \quad (1)$$

where C_b and V_e correspond to the concentration and the equivalent volume of the NaOH solution respectively. Three replicates were undertaken for each film.

3. Results and discussion

A TGA study concerning the thermal behavior of the initial reagents was first carried out (Figure 1). We noticed the lower degradation temperature of CTR (170°C) compared to the other reagents. Thus, the compression molding method at 220°C is not suitable for the preparation of PVOH/CTR films. Therefore, the solvent casting method was chosen as an alternative route for the preparation of our films.

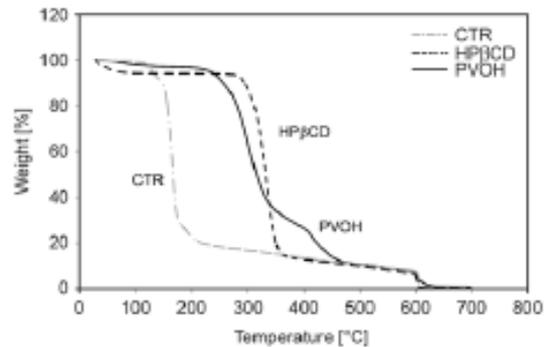


Figure 1. TGA profiles of initial reagents

3.1. Effect of dilution on the physical properties of non-crosslinked PVOH films

Polymer dilution is expected to involve a disentanglement of the polymer coils. This phenomenon may induce an increase of crystallinity. This disentanglement may also affect drawability. At high dilution ratio, there is not enough entanglement to ensure a physical crosslinked network behavior, inducing a decrease of the drawability. So a preliminary study was carried out to investigate the effect of dilution on thermal and mechanical properties of PVOH films, in order to fix the optimal dilution ratio for the further study.

The impact of the dilution ratio during the cast preparation on these thermal transitions is detailed in Table 1. Results for the thermocompression molded film are included for the sake of comparison.

Table 1. Thermal characteristics of cast and molded films dried or conditioned at 58% R.H.

Concentration [%w/w]	Cast films						Molded film	
	1		5		17		dried	58% R.H.
Conditioning	dried	58% R.H.	dried	58% R.H.	dried	58% R.H.	dried	58% R.H.
wt% water*	2±2	8±1	1±1	8±1	2±1	7±2	1±1	7±1
T_g [°C]	57±4	7±1	57±1	7±1	41±5	6±1	53±1	6±1
T_m [°C]	192±1	193±1	192±1	193±1	192±1	193±1	192±1	193±1
X_c [%]**	26±1	18±2	25±1	16±1	19±2	11±2	14±1	8±2

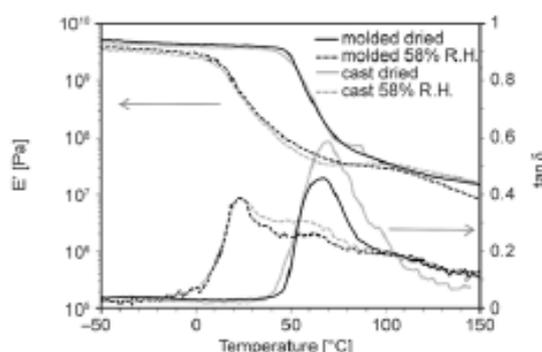
*water content determined by TGA

** X_c = crystallinity degree

As regards T_g and T_m , no major difference is observed whatever the film preparation method. In the dried conditions (corresponding to 2±1 wt% of water in the samples), films are characterized by a T_g around 55°C and a melting point T_m at 193°C. For comparison, the reported values for partially hydrolyzed PVOH are 80±5°C for T_g and 185±5°C for T_m [1]. In the present study, these relatively 'low' transition temperatures could be explained by the presence of acetate in this hydrolyzed PVOH (87–89%). Under 58% R.H. conditions (corresponding to about 10 wt% of water), compared to dried one, a T_g drop is observed for all samples, relevant to the plasticizer effect of water molecules which disrupt molecular hydrogen bonds between PVOH chains in the amorphous phase.

Crystallinity is higher for cast films than for the molded ones, and tends to increase with the dilution ratio. This phenomenon may be attributed to the effect of disentanglements with dilution which promotes crystallization, as expected [22]. With humidity, a significant decrease of X_c is observed for all samples, suggesting that water molecules destroy crystals. This is consistent with results already reported in literature which have shown that water dissolves gradually crystallites by attacking them at the crystalline/amorphous interface [23].

The evolution of the storage modulus, E' , and loss factor $\tan \delta$, as a function of temperature for molded and PVOH 5 wt% cast films is presented in Figure 2. In the studied temperature range, all samples exhibit only one relaxation characterized by a pronounced decrease of E' and a damping peak of $\tan \delta$. This phenomenon is assigned to the main α_s relaxation associated with the glass transition [24, 25]. As shown in Figure 2, this relaxation is rather independent of film preparation but is very sensitive to water content, in good agreement with DSC results. The peak temperature of $\tan \delta$ decreases from 65°C to about 20°C for dried and 58% R.H. films, respectively. Note

**Figure 2.** Dynamic mechanical response as a function of temperature of molded and 5 wt% cast PVOH films in dried and 58% R.H. conditions

that the broadness of the peak for humid samples comes from the water evaporation during the experiment.

The yield stress σ_y and the strain at break ϵ_{break} values of PVOH films conditioned at 58% R.H. are reported in Table 2. No result is reported for dried films because, in this case, all samples exhibit a very brittle behavior, related to the drawing temperature well below T_g .

All samples display a ductile behavior. No major influence of film preparation on the strain at break is noticed while an increase of σ_y is observed as initial PVOH concentration increases. One may have expected the reverse evolution considering the variation of the crystal content with the polymer concentration (Table 1). This shows that other structural parameters, than only the crystal content, play an important role in the initiation of plasticity, such as the number of tie molecules.

To sum up, these results do not show any significant difference between all cast films regarding struc-

Table 2. Mechanical data measured for the different films

PVOH concentration [%w/w]	Cast films			Molded film
	1	5	17	
σ_y [MPa]	10.3±0.6	9.1±0.3	13.8±1.8	14.7±1.5
ϵ_{break} [%]	126±18	140±16	127±32	120±36

tural and thermomechanical characterizations. These cast films exhibit similar behavior as the molded film. For the following studies, films will be prepared from a total concentration of reactants of 5 wt%, which is the easiest to process in terms of viscosity.

3.2. Influence of crosslinker amount and crosslinking time on structure of PVOH/CTR films

The crosslinking reaction involved in this study consists in the esterification between hydroxyl functions of PVOH and carboxylic functions of CTR as presented in Figure 3a.

The esterification is activated by the preformation of CTR anhydride under the heat treatment. The CTR being a triacid, residual COOH are present in the three-dimensional network at the end of the reaction. Previous works showed that the esterification occurs from 130°C [11].

A constant temperature of 130±1°C was applied for all this study. Two weight proportions of CTR (10 and 40 wt%) representative of low and high crosslinker contents were chosen. For both cases, there is an excess of OH due to PVOH compared with COOH

functions. Indeed, there are 10 functions OH for 1 function COOH for 10 wt% CTR films, and 2 functions OH for 1 function COOH in 40 wt% CTR films. The reaction time varied from 0 to 960 min. As shown on Figure 3b, films are transparent. Visual observations showed that the yellowing and the brittleness increase with CTR content and crosslinking time. With 10 wt% CTR, there is a slight yellowing from 120 min and films are never brittle. With 40 wt% CTR, yellowing is observed from 40 min. Films are brittle from 60 min. The yellowing is due to CTR dehydration and formation of a double bond sensitive to oxidation [26].

To check the efficiency of covalent bonding of the different reagents, eventual unreacted CTR and PVOH were obtained by D₂O extraction of PVOH/CTR films. The ¹H NMR spectra of residual reagents in relation to crosslinking time is presented on Figure 4 (range 4–0 ppm).

The magnitude of the signal for soluble part of the films has been amplified in order to reveal eventual residual compounds and compared to initial reagents. The chemical shifts for PVOH and CTR were attributed to protons also represented on Figure 4.

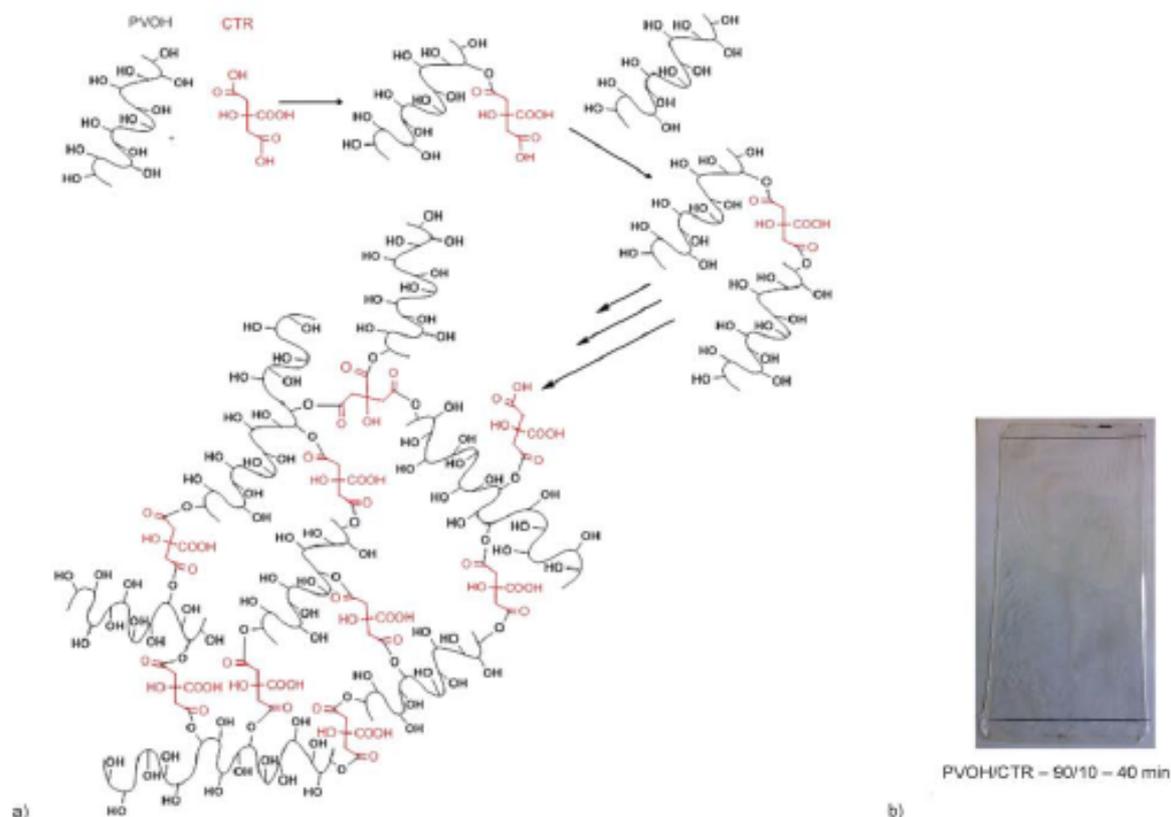


Figure 3. (a) Expected reaction between PVOH and CTR and (b) picture of PVOH/CTR 90/10 film

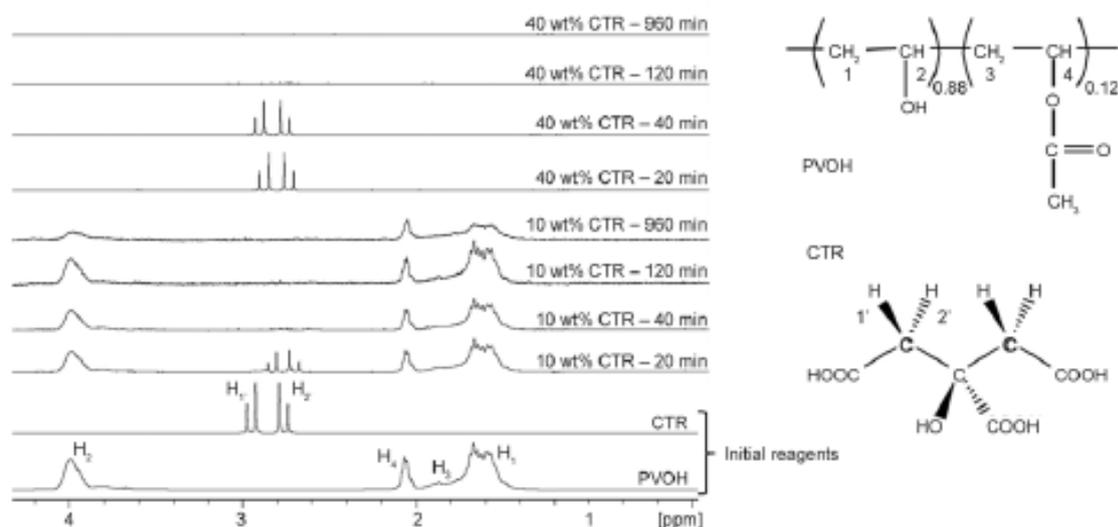


Figure 4. Comparison of ^1H NMR spectra for residual reagents in PVOH/CTR films related to CTR ratio and reaction time and protons of CTR and PVOH 88%

We notice that the quantity of residual compounds progressively decreases with crosslinking time. For 40 wt% CTR films, PVOH is not detected after 20 min as well as CTR after 120 min. This means that for this CTR content, a crosslinking time of 120 min is necessary to bind all CTR to PVOH matrix. For 10 wt % CTR films, after 40 minutes, CTR is not detected whereas PVOH is still present after 960 min. This indicates that for 10 wt% CTR, even after 960 min, a weak amount of non cross-linked PVOH chains remains in the films. Nevertheless, the amount of those residual compounds for all the films up to 120 min is very low (less than 0.1%, determined by weight measurements). It is well known that the glass transition of the crosslinked polymers depends not only on the main chain rigidity, but also on crosslinking density. In

this study, the effect of crosslinking conditions on the PVOH/CTR network is thus investigated considering the evolution of the glass transition. In Figure 5a, typical thermograms for several crosslinking times are shown for both kinds of films. All samples exhibit a heat capacity jump, which is clearly curing time-dependent. The evolution of T_g as a function of crosslinking time is represented on Figure 5b for both storage conditions.

In the case of non crosslinked films (time = 0 min), a plasticizer effect of CTR is observed whatever the storage conditions. As expected, this effect is more pronounced for higher CTR concentration. In dried conditions, PVOH exhibits a T_g at 57°C, while this latter decreased to 42°C and 28°C for PVOH/CTR-90/10 and PVOH/CTR-60/40 respectively. Similar drop is observed for hydrated non crosslinked films.

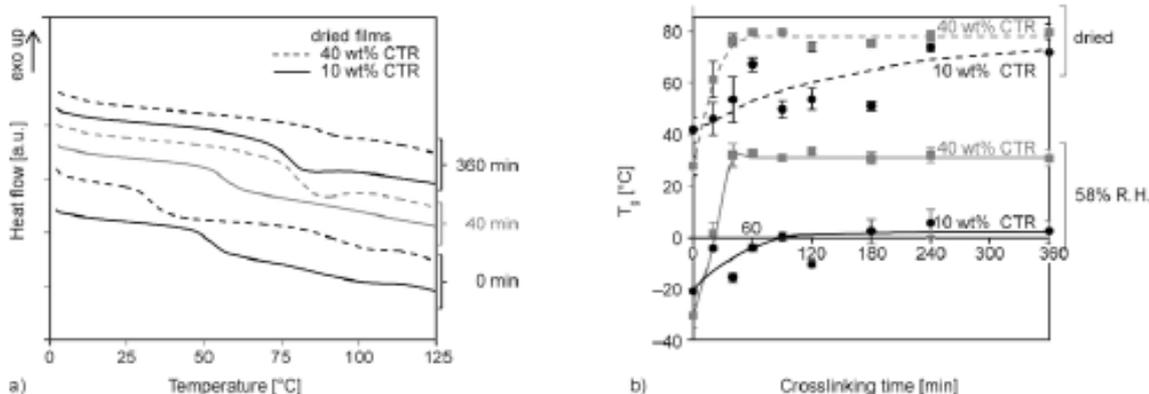


Figure 5. Effect of crosslinking parameters and storage conditions on T_g for different PVOH/CTR films: (a) DSC profiles and (b) T_g as a function of crosslinking time

Then, the T_g progressively increases with crosslinking time for both proportions of CTR. This increase is slower for 10 wt % CTR than for 40 wt% CTR films. In the latter case, an abrupt rise of T_g is observed followed by a leveling off beyond 60 min of heating whatever the storage conditions. Considering that T_g increases with crosslink density, this may suggest that no major evolution of the PVOH/CTR-60/40 network structure occurs above a curing time of 60 min. However, one can observe a decrease of the heat capacity jump ΔC_p from a crosslinking time of 40 to 360 min. Note that this effect does not occur for PVOH-CTR 90-10. This observation may indicate that the amorphous phase content which relaxes at T_g decreases with crosslinking time for the PVOH/CTR-60/40. Several assumptions could be proposed to explain this result. An increase of crystallinity has been rejected because no ordered phase is evidenced for 40 wt% CTR whatever the crosslinking time, as it will be shown later. A subsequent crosslinking reaction inducing a restriction of the molecular motions between chemical entanglements is suggested and will be discussed further below.

For dried films, the value of T_g with high crosslinking time (from 240 min) is surprisingly quite similar for both CTR concentrations. However, T_g rise for 90/10 films is not so smooth. In fact in the dried state, T_g results from several main combining parameters: the crosslinking density and the hydrogen bonds between hydroxyl groups of PVOH chains but also the intrinsic flexibility of PVOH and CTR chains. As shown in literature, these two parameters acted by a compensation effect between the weakening of the chemical network and the plasticizing effect of the introduced more or less flexible linkers [27]. When films are hydrated and swollen under equilibrium, the decreasing gap of T_g for 10 wt% CTR is much more pronounced than the one for 40 wt% CTR. Indeed, the greater proportion of

PVOH hydroxyl groups is, the more they could interact with water molecules resulting in a more pronounced plasticizer effect of water.

The quantification of residual (or free) COOH groups could also provide some additional information about the formation of the PVOH-CTR network. The esterification reaction, catalyzed by intramolecular CTR anhydride formation (Figure 6) highlighted the origin of these free COOH groups. If CTR is consumed according to this intramolecular mechanism, namely 2/3 COOH functions have reacted. Then, the final theoretical COOH amount values should be around 0.5 and 1.9 mmol/g for PVOH/CTR-90/10 and PVOH/CTR-60/40 films respectively.

The comparison of free COOH quantification and T_g evolution for the two films is given on Figure 7. As expected, free COOH functions amount decreases with crosslinking time for both proportions of CTR. A higher decrease is obviously observed for films with 40 wt% CTR. After 120 minutes, the amount of residual COOH functions remains constant regardless initial amount of CTR. At this crosslinking time, all CTR is covalently bound as previously proved by NMR (Figure 4). For PVOH/CTR-90/10 (Figure 7a), the experimental value (0.60 ± 0.12 mmol/g) is close to the theoretical one (0.5 mmol/g). Note that the plateau for T_g and residual COOH are reached for the same crosslinking time (90 min). In the case of PVOH/CTR-60/40 (Figure 7b), the behavior is different. First the COOH experimental value at the plateau (0.76 ± 0.13 mmol/g) is lower than the theoretical one (1.9 mmol/g). Then, the maximum in T_g is achieved from around 40–60 min while at this time COOH value is still decreasing. In addition, we notice that at 40–60 min, the COOH value is about 2–3 mmol/g and close to the calculated one according to the crosslinking mechanism. This can be explained by the fact that for high proportions of CTR, the esterification occurred in two steps. The

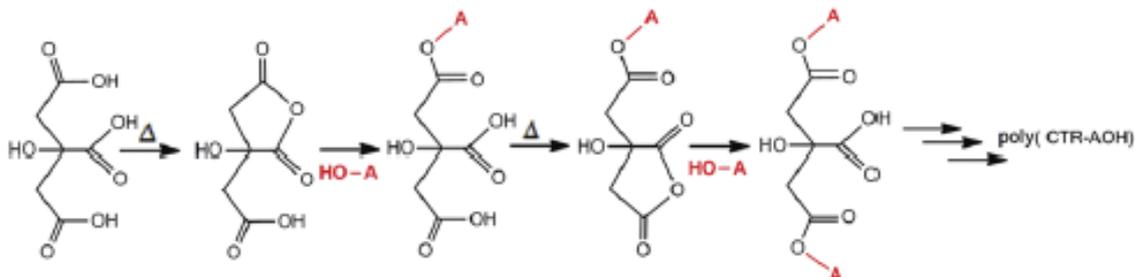


Figure 6. Scheme of intramolecular CTR anhydride formation and esterification between CTR and A-OH = PVOH

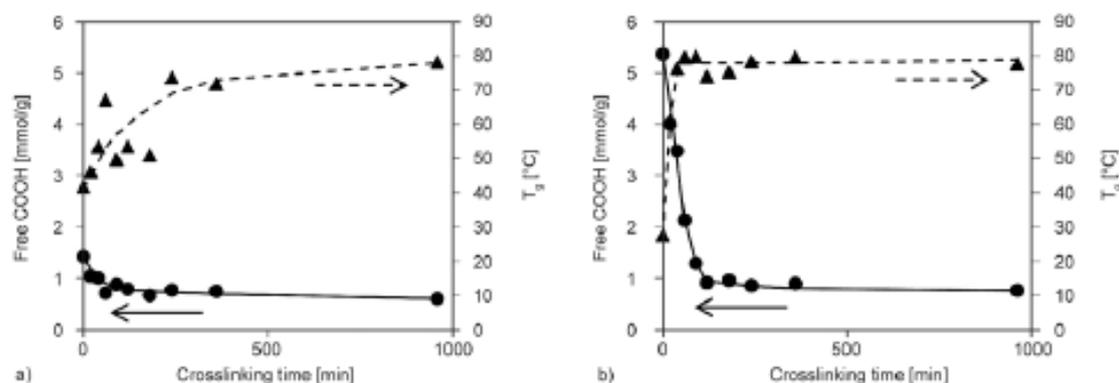


Figure 7. Free COOH groups and T_g of hydrated PVOH/CTR films as a function of crosslinking time for (a) PVOH/CTR 90/10 and (b) PVOH/CTR 60/40

first one may correspond to the grafting of CTR on PVOH chains. Then the spatial proximity between COOH functions already grafted allows the formation of anhydrides via an intermolecular mechanism and therefore additional post-esterification reaction involving chemical groups close to previous crosslinking points. This phenomenon has no major effect on T_g value neither on the global crosslinking degree but may result in a decrease of the heat capacity jump at T_g as previously mentioned.

3.3. Physical and mechanical characterization of PVOH/CTR films

It is interesting to check if some crystallinity is present in initial PVOH/CTR films and remains after crosslinking reaction. PVOH/CTR films exhibit a degradation phenomenon well below the melting point of PVOH ($T_m = 185 \pm 5^\circ\text{C}$). Therefore, DSC cannot be used to highlight any melting peak in this case. So, X-ray diffractograms of PVOH/CTR films were recorded as a function of crosslinking time (Figure 8). Whatever the CTR content and crosslink-

ing time, only one broad diffraction located at around $2\theta = 20^\circ$ is observed without any evidence of crystalline peak which suggests that all samples are mainly in disordered state.

In Figure 9, typical DMA curves of three hydrated PVOH/CTR-90/10 films are shown: non cross-linked one and two crosslinked ones. An increase of the main relaxation temperatures with crosslinking time is observed, in good agreement with previous DSC results. As expected, the storage modulus E' increases with the heating time, below as well as above T_g , relevant to an increase of the crosslink density which rigidifies the polymer network. Additionally, one can notice the presence of two peaks in the $\tan\delta$ curves indicating various relaxations in the amorphous phase, even in the non crosslinked sample. This could suggest that the concentration of CTR is not homogeneous at local scale inside the sample.

The effect of crosslinking conditions on tensile behavior is illustrated on Figure 10. For the non-crosslinked films ($t = 0$ min), one can observe the

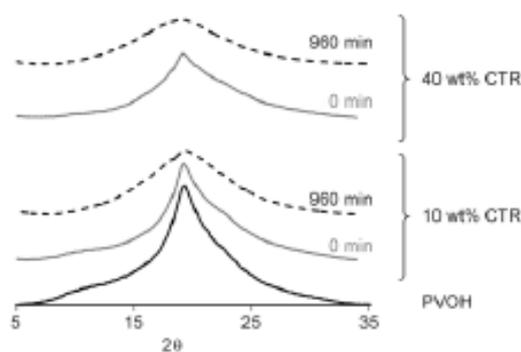


Figure 8. WAXS patterns of hydrated PVOH/CTR films for different crosslinking times

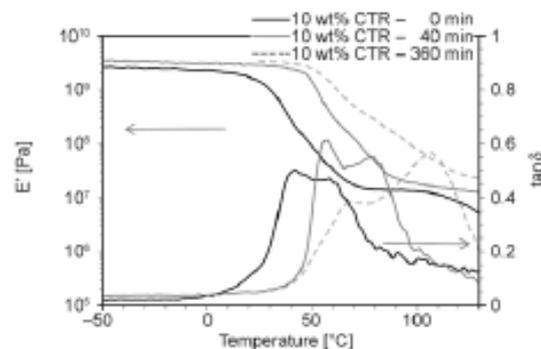


Figure 9. Dynamic mechanical response as a function of temperature of hydrated PVOH/CTR 90/10 films for different crosslinking times

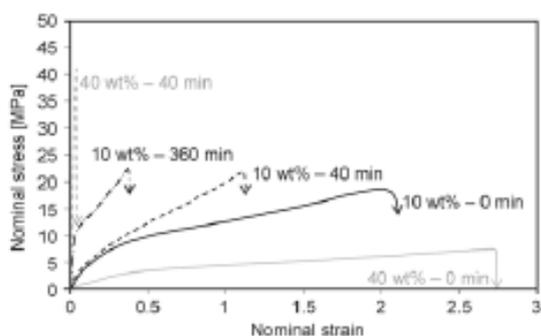


Figure 10. Nominal stress–strain curves of the PVOH/CTR films for different proportions of CTR and crosslinking times under uniaxial drawing at $T=22^{\circ}\text{C}$ at 58% R.H.

plasticizer effect of CTR indicated by an improvement of ductility as CTR concentration is increased. PVOH/CTR-60/40 samples exhibit a brittle behavior from 40 min curing, related to the highly crosslinking density preventing any plastic deformation. Owing to their brittleness, we decided to focus our attention only on the films containing 10% CTR. All samples exhibit a homogeneous deformation. The stress level increases and the strain at break significantly decreases as the crosslinking time is

increased. This behavior is related to the reduction of the chemical entanglement mass involving an enhancement of the rigidity and reduction of the limit of extensibility of chain segments between entanglements.

3.4. Influence of HPβCD on films properties with 10% of CTR

One of the main objectives of this study is to incorporate HPβCD in the polymer matrix. This cyclodextrin derivative would be used as a vector for prolonged release of a food preservative. As PVOH, HPβCD possesses OH functions which may react with COOH functions of CTR, allowing it to take part of the three-dimensional network. Because films with 40 wt% CTR are too brittle from 40 min of crosslinking, only films containing 10 wt% CTR are studied. Thus, the influence of the HPβCD addition on film properties was investigated on films containing 80 wt% PVOH, 10 wt% HPβCD and 10 wt% CTR using similar approach as previously. In that case, PVOH/HPβCD/CTR-80/10/10 and PVOH/CTR-90/10 cast solutions contain similar quantities of OH groups per gram.

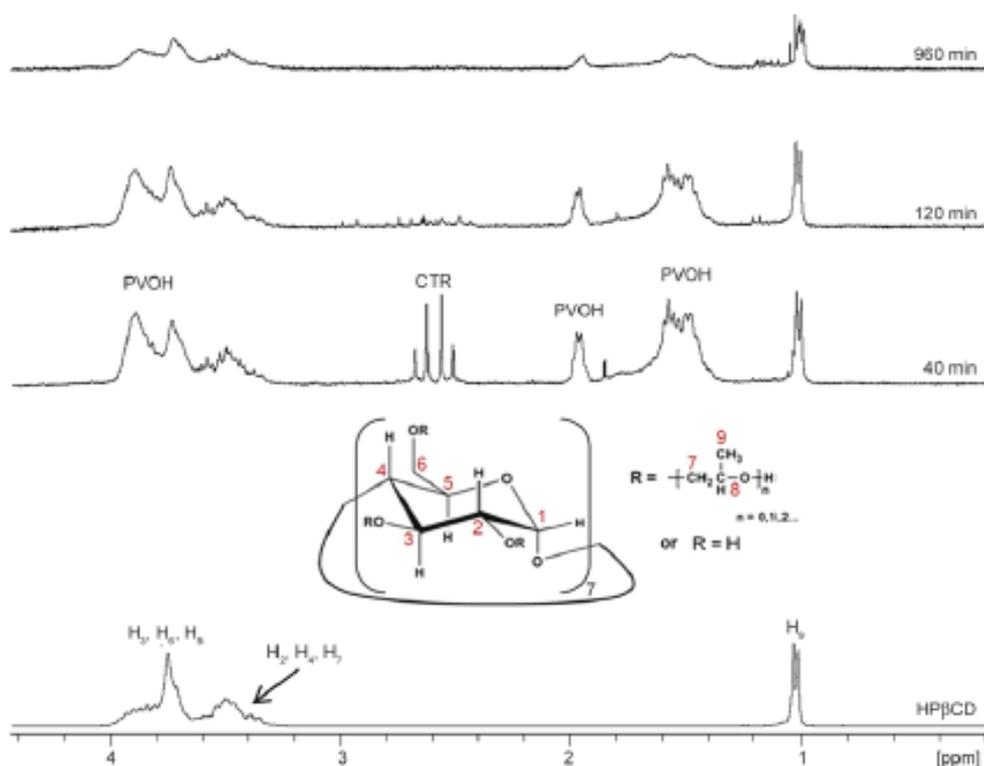


Figure 11. ^1H NMR spectra in D_2O of residual reagents of PVOH/CTR/HPβCD films with 10 wt% CTR and 10 wt% HPβCD for three crosslinking times

The ^1H NMR spectra of unreacted reagents obtained by solvent extraction for PVOH/HP β CD/CTR cross-linked films is presented on Figure 11. As previously, the intensity of the spectra has been magnified to reveal the low amounts of residual compounds. As observed for PVOH/CTR films (Figure 4), CTR is completely bound at 120 min, whereas PVOH and HP β CD are not completely bound even after 960 min. However the amounts of residual reagents are very low (<0.1%, determined by weight measurements).

The kinetics of the crosslinking reaction is evaluated following the free COOH content as a function of crosslinking time (Figure 12). Results show the same behavior as for PVOH/CTR films with 10 wt% CTR (Figure 7). COOH functions amount decreases with crosslinking time and reaches a quasi-plateau. The final amount of the free COOH groups is the same with or without HP β CD. The concentration of 10 wt% HP β CD does not modify the crosslinking kinetics.

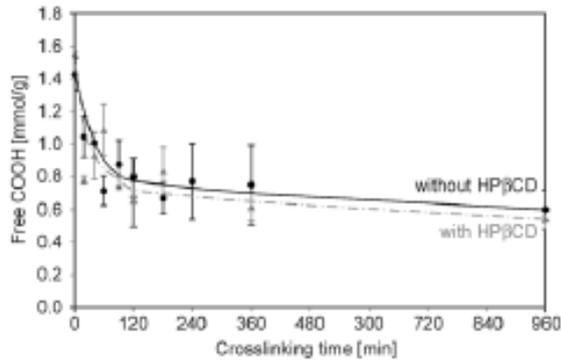


Figure 12. Free COOH quantification of PVOH/CTR and PVOH/HP β CD/CTR films with 10 wt% CTR as a function of crosslinking time

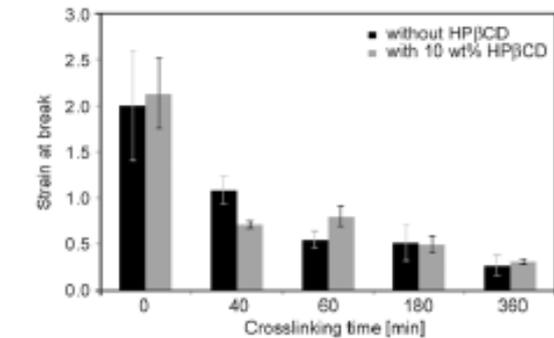
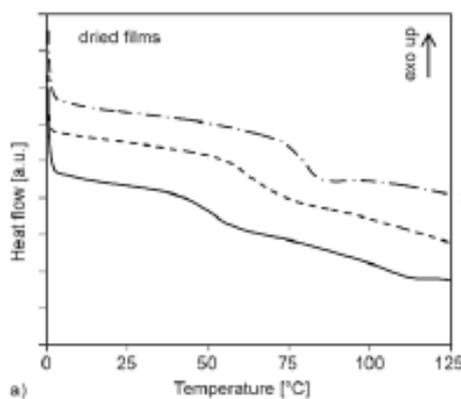


Figure 14. Strain at break at 22°C of PVOH/CTR and PVOH/HP β CD/CTR films, conditioned at 58% R.H., as a function of crosslinking time

It is also important to study the effect of HP β CD on film flexibility through T_g analysis (Figure 13). We notice no plasticizer effect of HP β CD on non-crosslinked films ($t = 0$ min). The incorporation of HP β CD in the polymer network seems to rigidify it. HP β CD is a bulky and rigid molecule. Its presence should decrease the global mobility of polymer chains.

Finally, drawing experiments were carried out and values of strain at break are reported on Figure 14. For all crosslinking times, the presence of HP β CD does not affect significantly the drawability of films. All samples present a ductile behavior.

4. Conclusions

Films based on PVOH and crosslinked with CTR, have been prepared in two steps by solvent casting method followed by heat treatment. Different characteristics of the films (chemical structure, T_g , crystallinity and tensile properties) were studied in relation to their formulation and the crosslinking time. Films with high content of CTR (40 wt%) are too brittle for the considered food application while films

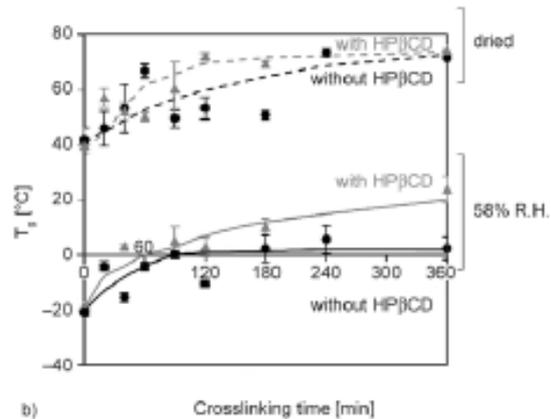


Figure 13. (a) DSC profiles of PVOH/HP β CD/CTR films and (b) values of T_g as a function of crosslinking time with or without HP β CD

with low content of CTR (10 wt%) are transparent and show a ductile behavior. However, we highlighted that even after 960 min of crosslinking, a weak quantity of PVOH is not bound. We could expect that an intermediate formulation of PVOH and CTR could be more suitable for the targeted application. Moreover, during the crosslinking reaction, a part of COOH functions remains free. We could take advantage of these acid functions for further food storage. Finally, the incorporation of 10 wt% of cyclodextrin derivative as food additive carrier does not influence the characteristics of the films containing 10 wt% CTR. This formulation will be used for further studies.

References

- [1] Finch C. A.: Polyvinyl alcohol development. Wiley, New York (1992).
- [2] Imam S. H., Cinelli P., Gordon S. H., Chiellini E.: Characterization of biodegradable composite films prepared from blends of poly(vinyl alcohol), cornstarch, and lignocellulosic fiber. *Journal of Polymers and the Environment*, **13**, 47–55 (2005). DOI: [10.1007/s10924-004-1215-6](https://doi.org/10.1007/s10924-004-1215-6)
- [3] Conte A., Buonocore G. G., Sinigaglia M., Del Nobile M. A.: Development of immobilized lysozyme based active film. *Journal of Food Engineering*, **78**, 741–745 (2007). DOI: [10.1016/j.jfoodeng.2005.11.013](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.013)
- [4] Hasimi A., Stavropoulou A., Papadokostaki K. G., Sanopoulou M.: Transport of water in polyvinyl alcohol films: Effect of thermal treatment and chemical crosslinking. *European Polymer Journal*, **44**, 4098–4107 (2008). DOI: [10.1016/j.eurpolymj.2008.09.011](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.09.011)
- [5] Mansur H. S., Sadahira C. M., Souza A. N., Mansur A. A. P.: FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C*, **28**, 539–548 (2008). DOI: [10.1016/j.msec.2007.10.088](https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088)
- [6] Shi R., Bi J., Zhang Z., Zhu A., Chen D., Zhou X., Zhang L., Tian W.: The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers*, **74**, 763–770 (2008). DOI: [10.1016/j.carbpol.2008.04.045](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.045)
- [7] Wang S., Ren J., Li W., Sun R., Liu S.: Properties of polyvinyl alcohol/xylan composite films with citric acid. *Carbohydrate Polymers*, **103**, 94–99 (2014). DOI: [10.1016/j.carbpol.2013.12.030](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.030)
- [8] Ajji Z.: Preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogels containing citric or succinic acid using gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, **74**, 36–41 (2005). DOI: [10.1016/j.radphyschem.2004.12.005](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.12.005)
- [9] Salt Y., Hasanoğlu A., Salt İ., Keleşer S., Özkan S., Dinçer S.: Pervaporation separation of ethylacetate–water mixtures through a crosslinked poly(vinylalcohol) membrane. *Vacuum*, **79**, 215–220 (2005). DOI: [10.1016/j.vacuum.2005.03.010](https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2005.03.010)
- [10] Martel B., Morcellet M., Ruffin D., Ducoroy L., Weltrowski M.: Finishing of polyester fabrics with cyclodextrins and polycarboxylic acids as crosslinking agents. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **44**, 443–446 (2002). DOI: [10.1023/A:1023080221850](https://doi.org/10.1023/A:1023080221850)
- [11] Martel B., Ruffin D., Weltrowski M., Lekchiri Y., Morcellet M.: Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *Journal of Applied Polymer Science*, **97**, 433–442 (2005). DOI: [10.1002/app.21391](https://doi.org/10.1002/app.21391)
- [12] Dainelli D., Gontard N., Spyropoulos D., Zondervan van den Beuken E., Tobback P.: Active and intelligent food packaging: Legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, **19**, S103–S112 (2008). DOI: [10.1016/j.tifs.2008.09.011](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011)
- [13] Teixeira B. N., Ozdemir N., Hill L. E., Gomes C. L.: Synthesis and characterization of nano-encapsulated black pepper oleoresin using hydroxypropyl beta-cyclodextrin for antioxidant and antimicrobial applications. *Journal of Food Science*, **78**, 1913–1920 (2013). DOI: [10.1111/1750-3841.12312](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12312)
- [14] Piercey M. J., Mazzanti G., Budge S. M., Delaquis P. J., Paulson A. T., Truelstrup Hansen L.: Antimicrobial activity of cyclodextrin entrapped allyl isothiocyanate in a model system and packaged fresh-cut onions. *Food Microbiology*, **30**, 213–218 (2012). DOI: [10.1016/j.fm.2011.10.015](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.015)
- [15] Astray G., Gonzalez-Barreiro C., Mejuto J. C., Rial-Otero R., Simal-Gándara J.: A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1631–1640 (2009). DOI: [10.1016/j.foodhyd.2009.01.001](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.001)
- [16] Frömring K.-H., Szejtli J.: Cyclodextrins in pharmacy. Springer, Dordrecht (1994).
- [17] Council Directive 85/572/EEC D. Laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs (1985).
- [18] Fukae R., Yamamoto T., Fujita Y., Kawatsuki N., Sangen O., Kamachi M.: Poly(vinyl alcohol) with high diad-syndiotacticity and high melting point. *Polymer Journal*, **29**, 293–295 (1997). DOI: [10.1295/polymj.29.293](https://doi.org/10.1295/polymj.29.293)

- [19] Wunderlich B.: *Macromolecular Physics, Volume 1: Crystal structure, morphology, defects*. Academic Press, New York (1973).
- [20] Tubbs R. K.: Melting point and heat of fusion of poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, **3**, 4181–4189 (1965).
DOI: [10.1002/pol.1965.100031213](https://doi.org/10.1002/pol.1965.100031213)
- [21] Ducoroy L., Martel B., Bacquet M., Morcellet M.: Cation exchange finishing of nonwoven polyester with polycarboxylic acids and cyclodextrins. *Journal of Applied Polymer Science*, **103**, 3730–3738 (2007).
DOI: [10.1002/app.25249](https://doi.org/10.1002/app.25249)
- [22] Darras O., Seguela R., Rietsch F.: Dried gels from linear low-density polyethylene: Morphology, thermal behavior, and mechanical properties. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **30**, 349–359 (1992).
DOI: [10.1002/polb.1992.090300405](https://doi.org/10.1002/polb.1992.090300405)
- [23] Hodge R. M., Edward G. H., Simon G. P.: Water absorption and states of water in semicrystalline poly(vinyl alcohol) films. *Polymer*, **37**, 1371–1376 (1996).
DOI: [10.1016/0032-3861\(96\)81134-7](https://doi.org/10.1016/0032-3861(96)81134-7)
- [24] Hoffman J. D.: *Anelastic and dielectric effects in polymeric solids*. Wiley, New York (1969).
- [25] Nishio Y., Manley R. S. J.: Cellulose-poly(vinyl alcohol) blends prepared from solutions in *N,N*-dimethylacetamide-lithium chloride. *Macromolecules*, **21**, 1270–1277 (1988).
DOI: [10.1021/ma00183a016](https://doi.org/10.1021/ma00183a016)
- [26] Lu Y., Yang C. Q.: Fabric yellowing caused by citric acid as a crosslinking agent for cotton. *Textile Research Journal*, **69**, 685–690 (1999).
DOI: [10.1177/004051759906900909](https://doi.org/10.1177/004051759906900909)
- [27] Krumova M., López D., Benavente R., Mijangos C., Pereña J. M.: Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly(vinyl alcohol). *Polymer*, **41**, 9265–9272 (2000).
DOI: [10.1016/S0032-3861\(00\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00287-1)

RESUME

L'objectif de ce travail était de développer des films antimicrobiens à base de poly(alcool vinylique)(PVOH) réticulés par de l'acide citrique (CTR). La démarche choisie a consisté à incorporer dans le polymère du benzoate de sodium (NaBz), seul ou sous forme de complexe avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD). La combinaison des fonctions résiduelles du CTR greffé sur le polymère et du NaBz libre permet d'envisager des effets antimicrobiens par contact et par diffusion. Les films ont été réalisés par casting à partir de solutions aqueuses et réticulés par un traitement thermique. La réaction de réticulation a été mise en évidence et suivie à travers l'étude des composés résiduels, l'évolution de la Tg et des fonctions COOH résiduelles en fonction du temps de réticulation. L'étude de différentes compositions a permis de sélectionner les concentrations de 20 et 30 wt% en CTR pour un compromis entre réticulation suffisante et ductilité du film préservée. Le temps nécessaire pour lier l'ensemble des réactifs diminue avec l'augmentation de la température ou de la quantité de CTR. La réaction de réticulation n'est pas modifiée par la présence d'HP β CD. Avec l'ajout de CTR ou d'HP β CD et la réticulation, les films restent faiblement perméables à O₂ et fortement perméables à la vapeur d'eau. Concernant la libération du NaBz dans l'eau, la cinétique est ralentie à partir de 360 min de réticulation et de 20 wt% de CTR. L'HP β CD n'a pas d'influence sur la cinétique de libération mais a permis de doubler la quantité libérée. L'activité antimicrobienne par contact et par diffusion a été mise en évidence pour la majorité des films contre l'ensemble des microorganismes étudiés.

Mots clés : Alcool polyvinylique, Aliments - Emballages, Emballages actifs, Cyclodextrines, Réticulation (polymérisation), Effet retard, Activité antimicrobienne, Benzoate de sodium

ABSTRACT

The aim of this work was to develop antimicrobial films based on polyvinyl alcohol (PVOH) crosslinked by citric acid (CTR). In our approach, sodium benzoate (NaBz) was introduced in polymer, alone or in complex form with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD). Both CTR residual functions grafted on polymer and free NaBz are expected to provide antimicrobial effects by contact and diffusion. Films were elaborated by casting from aqueous solutions and crosslinked by heat treatment. Crosslinking reaction has been highlighted and followed through the study of residual reagents, the evolution of Tg and residual COOH functions according to crosslinking time. From this investigation, a compromise between sufficient crosslinking and preserved film ductility has been found for a CTR concentration between 20 and 30 wt%. The time required to bind all of the reagents decreases with the increase of temperature or amount of CTR. The crosslinking reaction was not modified by the presence of HP β CD. With the addition of CTR or HP β CD and the crosslinking step, the films remain slightly permeable to O₂ and highly permeable to water vapor. Considering the NaBz release in water, kinetics is slowed from 360 min of crosslinking and 20 wt% CTR. HP β CD has no major influence on the kinetics of release but allow to double released amount. Antimicrobial activity by contact and diffusion has been demonstrated for the majority of films against all studied microorganisms.

Keywords : Polyvinyl alcohol, Food packaging, Active packaging, Cyclodextrin, Crosslinking by polycarboxylic acids, Extended release, Antimicrobial activity, Sodium benzoate