



HAL
open science

Vieillessement des bio-polymères: étude structurale et fonctionnelle

Charlotte Jacquot

► **To cite this version:**

Charlotte Jacquot. Vieillessement des bio-polymères: étude structurale et fonctionnelle. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0293 . tel-01750646

HAL Id: tel-01750646

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750646>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

LIBio
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules



Université de Lorraine

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio)

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

(ENSAIA)

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Présentée par

Charlotte JACQUOT

Vieillessement des biopolymères : étude structurale et fonctionnelle

Biopolymers aging : structural and functional study

Soutenue publiquement le mardi 10 décembre 2013 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Frédéric DEBEAUFORT

Pr. Université de Bourgogne, AgroSup Dijon

Mme Patricia KRAWCZAK

Pr. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai

Examineurs :

Mme. Catherine HUMEAU

Pr. Université de Lorraine, ENSAIA

Mme Claudine ROSIERS

NESTLE France, Responsable du Corporate Packaging

M. Stéphane DESOBRY

Pr. (Directeur de thèse) Université de Lorraine, ENSAIA

Mme Muriel JACQUOT

MCU-HDR (Co-directeur de thèse) Université de Lorraine, ENSAIA

Remerciements

C'est un moment particulier que d'écrire cette dernière page de ma thèse. Bizarrement, pas la plus facile... Parce qu'après trois ans de rencontres, d'échanges, de rires et de larmes, on a à cœur de n'oublier personne parmi ceux qui ont écrit l'histoire avec soi...

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur Stéphane DESOBRY pour sa confiance et pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je lui exprime en particulier toute ma gratitude pour m'avoir soutenue dans les derniers temps pleins de doutes.

Je remercie Muriel JACQUOT pour avoir accepté de codiriger cette thèse et lui souhaite sincèrement tout le succès mérité pour cette nouvelle page de sa vie professionnelle. Je sais combien ce projet représente pour toi et je me réjouis que tu y trouves tout l'épanouissement auquel chacun peut aspirer.

Je remercie Monsieur le Professeur Frédéric DEBEAUFORT de l'Université de Bourgogne et Madame le Professeur Patricia KRAWCZAK de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai d'avoir accepté de juger ces travaux en qualité de rapporteurs.

Je remercie également sincèrement Madame le Professeur Catherine HUMEAU de l'Université de Lorraine et Claudine ROSIERS, Responsable du Corporate Packaging NESTLE France, pour avoir accepté de prendre part à ce jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Raphaël PESCI, maître de conférence à l'Ecole Nationale Supérieure des Arts et Métiers de Metz, pour son aide précieuse, ses idées, ses conseils et sa persévérance avec mes sacrés polymères qui ne voulaient pas être découpés !

J'adresse aussi un grand merci à l'équipe de ProViSys Engineering, Anne-Sophie DIDELOT et Kamel LEDRA, pour m'avoir accueillie, m'avoir accordé du temps et pour m'avoir aidée avec mes films indisciplinés ! Je leur souhaite énormément de succès dans leur entreprise.

Je remercie évidemment tous les membres du LIBio qui m'ont suivie et soutenue pendant ces 3 années, on ne partage pas le quotidien de quelqu'un sans laisser une brassée de beaux souvenirs. En particulier, je voudrais remercier Carole JEANDEL (merci pour les KitKat...) et Carole PERROUD (ma Petite !) sans qui le labo ne pourrait pas fonctionner...

Je voudrais remercier ma Responsable Qualité préférée, Cécile MANGAVEL, pour son écoute, son soutien et nos rires.

Je remercie Claire GAIANI pour son aide précieuse, son soutien et sa réactivité légendaire aux mails désespérés les soirs de weekend !

Je remercie les deux stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant cette thèse, Alice FLOQUET et Patricia MARQUES. Merci d'avoir aussi contribué à ces travaux.

Je remercie tous les étudiants, stagiaires et doctorants, d'hier et d'aujourd'hui : Leila, Smail, Nabila, Ingrid, Vanessa, Razza, Javeed, Christelle, Abdulhadi, Majid et Behnoush, Manu et Stella, Chancelle, Nadia, Hongyuan, Ange, Adrien, Abdur, Alex, Mouna, Mohamed, Mahmoud, Nadine, Mariam....et tous ceux que j'oublie de citer. Merci aussi à mon adorable Marie Céleste, Ghazi la force tranquille, Hugues (on nous aurait raconté cette histoire de thèse en 6^{ème}, je ne l'aurais pas cru !), ma belle Yoana (tu croyais quand même pas qu'on allait vraiment te laisser partir !?!) et à la petite dernière arrivée Magda que j'ai le grand plaisir d'avoir eu le temps de côtoyer un petit peu avant de partir... Je vous souhaite à tous le meilleur.

Un petit mot spécial à Thibaut, pour nos grandes discussions, pour nos conflits et nos rires et tous les moments partagés.

Merci à Jordane pour son aide et son soutien, pour les moments surréalistes, les blagues pourries, les figurines Kinder Surprise... Tu m'avais dit « tu vas pleurer », je ne t'ai pas cru, j'avais tort !

Merci à Florentin, pour le soutien précieux dans les moments difficiles, pour avoir supporté les nombreuses visites sans même râler, pour la musique, pour la fameuse tarte à la tomate et les bons moments partagés à Nancy ou à Vienne!

A Jenny, tant d'année déjà ! Notre aventure partagée à l'ENSAIA a marqué le début d'une belle amitié qui dure depuis... On a rit, beaucoup, on a partagé le meilleur et le pire! Je n'oublierai pas ton soutien au moment où tout semblait s'écrouler. De gros bisous aussi à ton petit Mathis, mon petit neveu de cœur.

A Citlalli, ma Guapa... Par où commencer ? Merci pour tous les moments partagés, à faire la cuisine ensemble, à apprendre l'une de l'autre, à se motiver pour enchaîner nos kilomètres de piscine.. Tu es une personne formidable et j'ai de la chance de t'avoir rencontrée. Je ne sais pas ce que cette thèse aurait été sans toi. Tiens le coup, bientôt la fin pour toi aussi...

Merci à Mad pour son amitié et pour les coups de fils de soutien... Longue vie à nos projets ! (ça y est je suis dispo !)

Merci à ma Matou, mon amie de toujours, celle sur qui je peux compter quoi qu'il arrive depuis plus de 15 ans. Qu'il est précieux que tu sois dans ma vie...

J'adresse enfin un grand merci à tous mes amis (je pense en particulier aux amis de longue date, Pierrot, Fred & Rachou et Coraline mais aussi à Sylvain, Axel, Camille, Caro & PF...)

A Bruno et Françoise, j'aurais aimé que vous puissiez lire ces lignes.

*A ma famille et à mes parents
qui m'ont toujours soutenue dans mes choix
et m'accompagnent de leur Amour et leur Bienveillance*

Je vous aime.

A Greg,

Merci d'être qui tu es,

celui qui partage ma vie, mes joies et mes doutes.

Merci pour ton Amour et ton soutien, je sais que ça n'a pas été facile tous les jours !

Je pense avec bonheur à l'avenir qu'il nous reste à écrire...

LISTE DES COMMUNICATIONS

Article dans une revue professionnelle (Annexe 1)

- **C. Jacquot**, M. Jacquot, S. Desobry. Vieillissement des biopolymères. Industries Alimentaires et Agricoles (IAA), Dossier spécial Emballages, Novembre/Décembre 2011

Publications scientifiques

- **C. Jacquot**, M. Jacquot, P. Marques, J. Jasniewski, S. Desobry. Influence of microwave heating time on structure and properties of Chitosan films. (Soumise août 2013)
- M.J. Akhtar, M. Jacquot, J. Jasniewski, **C. Jacquot**, M. Imran, M. Jamshidian, S. Desobry. Antioxidant capacity and photo-degradation study of HPMC films functionalised with natural plant extract: betacyanins. Carbohydrate Polymers, volume 89, issue 4, 2012. (Annexe 2)

Posters

- **C. Jacquot**, M. Jacquot, Y. Maric, M.J. Akhtar, S. Desobry. Biopolymer Aging : A Sensory Evaluation. 9th Pangborn Sensory Science Symposium. Toronto, Canada, septembre 2011
- **C. Jacquot**, M. Jacquot, S. Desobry. Impact du traitement micro-ondes sur des films de biopolymères: *Cas de l'Hydroxypropyl Methylcellulose*. Séminaire RP2E, janvier 2012

Communication orale nationale

- **C. Jacquot**, M. Jacquot, S. Desobry. Vieillissement des biopolymères. CFIA. Metz, France, octobre 2011

Communications orales internationales

- **C. Jacquot**, M. Jacquot, C. Gaiani, G. Medjahdi, S. Desobry. Influence of Microwave Treatment on biopolymer films structure and properties: *The example of HPMC*. The 2nd International symposium International Meeting on packaging Material/Bioproduct Interactions (MATBIM 2012), Dijon, France. Avril 2012
- **C. Jacquot**, M. Jacquot, P. Marques de Farias, S. Desobry. Influence of post-treatment on chitosan films structure and properties. 6th Iberoamerican Chitin Society (VI SIAQ) and 12th International Conference on Chitin and Chitosan (XII ICC). Fortaleza, Brésil. Septembre 2012.

SOMMAIRE

Introduction	1
Revue Bibliographique	5
1. Polymères et généralités	7
1.1. Structure.....	7
1.2. Cristallinité	8
2. Biopolymères	11
2.1. Contexte	11
2.2. Classification.....	13
2.2.1. Biopolymères issus de la biomasse	14
2.2.2. Biopolymères de synthèse bactérienne	14
2.2.3. Biopolymères obtenus par synthèse chimique	14
2.3. Biopolymères et biodégradabilité	14
3. Vieillessement d'un polymère.....	17
3.1. Dégradation d'un polymère	17
3.2. Dégradation thermique.....	17
3.3. Vieillessement physique et chimique.....	18
3.4. Vieillessement accéléré.....	20
3.5. Influence des micro-ondes	21
4. Les biopolymères utilisés pour ces travaux.....	23
4.1. Le Poly Lactic Acid (PLA)	23
4.1.1. Structure	23
4.1.2. Propriétés et Usages	24
4.1.3. Dégradation.....	25
4.1.4. Dégradation thermique.....	26

4.1.5.	Rôle de l'humidité	27
4.1.6.	Influence de l'irradiation UV	29
4.2.	L'Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)	31
4.2.1.	Structure	31
4.2.2.	Propriétés et Usages	31
4.2.3.	Dégradation.....	32
4.3.	Le Chitosan	34
4.3.1.	Structure	34
4.3.2.	Propriétés et Usages	34
4.3.3.	Dégradation.....	35
Matériels et Méthodes		37
1. Matières premières		39
1.1.	Biopolymères utilisés	39
1.1.1.	HPMC.....	39
1.1.2.	Chitosan	39
1.1.3.	PLA.....	39
1.2.	Solvants	40
1.3.	Consommables.....	40
2. Production des films et tests d'homogénéité.....		40
2.1.	Protocole général	40
2.1.1.	Production des films d'HPMC.....	41
2.1.2.	Production des films de Chitosan.....	42
2.1.3.	Production des films de PLA.....	42
2.2.	Epaisseur	43
2.3.	Contenu en eau	43

3. Méthodes de Vieillessement.....	43
3.1. Pré-conditionnement des films.....	43
3.2. Vieillessement accéléré en enceinte climatique.....	46
3.3. Traitement par micro-ondes.....	46
4. Analyse structurale.....	48
4.1. Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR).....	48
4.1.1. Principe.....	48
4.1.2. Protocole utilisé.....	48
4.1.3. Traitement statistiques.....	49
4.2. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC).....	49
4.2.1. Principe.....	49
4.2.2. Protocole.....	50
4.3. Diffractométrie de rayons X (DRX).....	51
4.4. SEC MALLS.....	51
4.5. Microscopie Electronique à Balayage.....	52
5. Analyse fonctionnelle.....	52
5.1. Essais mécaniques.....	52
5.1.1. Système de traction.....	52
5.1.2. Géométrie des éprouvettes et placement.....	53
5.1.3. Découpe des éprouvettes.....	53
5.2. Colorimétrie.....	55
6. Evaluation sensorielle.....	57
6.1. Analyse olfactive.....	57
6.1.1. Test de Robinson.....	57
6.1.2. Nez électronique.....	58

6.2. Analyse visio-tactile.....	60
6.2.1. Contexte et outil SensoTact®	60
6.2.2. Choix des échantillons.....	62
6.2.3. Choix des descripteurs	62
6.2.4. Traitement statistique.....	63
6.2.5. Organisation de la séance	64
Résultats et Discussion.....	65
1. Influence du vieillissement accéléré sur des films de Biopolymères.....	67
1.1. Introduction.....	67
1.2. Vieillissement de films d'HPMC en enceinte climatique.....	67
1.2.1. Suivi de la couleur des films au cours du vieillissement.....	68
1.2.2. Suivi de la structure du polymère par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier.....	69
1.2.3. Suivi des paramètres thermiques par calorimétrie différentielle à balayage	74
1.2.4. Evaluation des phases amorphe / cristalline par diffraction aux rayons X	77
1.2.5. Observation de la surface des films par Microscopie Electronique à Balayage	78
1.2.6. Essais de traction.....	79
1.2.7. Conclusions	81
1.3. Influence du temps et de la température de vieillissement sur la structure des films de biopolymères	83
1.3.1. Films d'HPMC	83
1.3.2. Films de Chitosan	86
1.3.3. PLA.....	88
1.3.4. Conclusions	89

2. Influence d'un post-traitement micro-onde sur des films de Biopolymères	91
2.1. Tests préliminaires : Influence de l'humidité dans le traitement micro-onde.....	91
2.2. Influence of microwave heating time on structure and properties of Chitosan films.....	93
2.2.1. Introduction	94
2.2.2. Materials and Methods	95
2.2.3. Results and Discussion	101
2.2.4. Résultats additionnels hors publication	112
2.2.5. Conclusions	121
2.3. Influence d'un post-traitement micro-onde sur des films d'HPMC.....	123
2.3.1. Contenu en eau et température de surface des films d'HPMC.....	123
2.3.2. Etude structurale par Spectroscopie infra-rouge FTIR	124
2.3.3. Analyse statistique avec le logiciel The Unscrambler®.....	125
2.3.4. Etude de la cristallinité par Diffractométrie aux Rayons X.....	127
2.3.5. Etude de la surface des films d'HPMC par Microscopie Electronique à Balayage	128
2.3.6. Comportement mécanique en traction	129
2.3.7. Spectrométrie UV-Visible : Transparence	130
2.3.8. Conclusions	131
2.4. Extension de l'étude de l'influence du post-traitement micro-onde sur des films de PLA	
133	
2.4.1. Etude structurale par spectroscopie infra-rouge FTIR	133
2.4.2. Etude de l'état de surface par Microscopie Electronique à Balayage.....	135
2.4.3. Essais de traction en température contrôlée.....	135
2.4.4. Etude de la cristallinité par Diffraction à Rayons X avant et après traitement micro-onde	137
2.4.5. Conclusions	138

Sommaire

2.5. Etude visio-tactile de l'influence d'un post traitement micro-onde sur des films de PLA, Chitosan et HPMC.....	139
2.5.1. Caractéristiques des films utilisés.....	139
2.5.2. Résultats.....	140
2.5.3. Conclusions	146
Conclusions et Perspectives	147
ANNEXES	165

LISTE DES TABLES

<i>Table 1 : Valeurs des paramètres thermiques (températures de transition vitreuse, de cristallisation et de fusion) du PLA selon différentes sources bibliographiques</i>	<i>24</i>
<i>Table 2: Analyse des groupements fonctionnels de l'HPMC tel que décrit par (Subhashree et al., 2011) en FTIR 70</i>	
<i>Table 3 : Evolution de la température de transition vitreuse (Tg), de fusion (Tm) et de cristallisation (Tc) de films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C, 50%RH et obscurité)</i>	<i>76</i>
<i>Table 4: Films characteristics during microwave treatment (800W – 100%RH)</i>	<i>101</i>
<i>Table 5 : Rheological behaviour of solution of chitosan as a function of microwave heating time</i>	<i>108</i>
<i>Table 6 : Identified Volatile Compounds in microwave heating of chitosan films.....</i>	<i>109</i>
<i>Table 7 : Eléments d'interprétation des informations croisées entre les cartes synchrone et asynchrone afin d'accéder à la chronologie des événements.....</i>	<i>115</i>
<i>Table 8 : Lecture croisée des cartes synchrone et asynchrone pour les films de chitosan</i>	<i>115</i>
<i>Table 9 : Contenu en eau des films de biopolymères au cours du traitement micro-ondes.....</i>	<i>139</i>
<i>Table 10 : p-values obtenues pour le test de Friedman sur les 3 descripteurs collant, glissant et rigidité sur les films d'HPMC, PLA et Chitosan. Les valeurs significatives sont présentées en gras.</i>	<i>140</i>
<i>Table 11 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses visuelle et visio-tactile pour le descripteur glissant des films de PLA</i>	<i>142</i>
<i>Table 12 : Test de comparaisons multiples par paires pour l'analyse visuelle pour le descripteur collant pour les films de PLA.....</i>	<i>143</i>
<i>Table 13 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses tactile, visuelle et visio-tactile pour le descripteur rigidité pour les films de PLA</i>	<i>144</i>
<i>Table 14 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses visuelle et visio-tactile pour le descripteur glissant pour les films de chitosan.....</i>	<i>145</i>

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Différents types de polymères selon l'enchaînement des monomères et le branchement des chaînes... 8</i>	8
<i>Figure 2 : Les différentes structures d'organisation cristalline (réseaux de Bravais) 9</i>	9
<i>Figure 3 : Schématisation d'un matériau semi-cristallin 9</i>	9
<i>Figure 4 : Capacités de production en bioplastiques jusque 2011 et prévision 2016 12</i>	12
<i>Figure 5 : Molécule de PLA -Poly Lactic Acid- 23</i>	23
<i>Figure 6: Suivi du poids moléculaire moyen de différents commerciaux de films de PLA soumis à 40°C et 50%RH d'après Ho, 1999 28</i>	28
<i>Figure 7: Suivi du % d'élongation à rupture de différents commerciaux de films de PLA soumis à 40°C et 50%RH d'après Ho, 1999 29</i>	29
<i>Figure 8: Photo-oxydation du PLA d'après Belbachir (2010). a) Attaque de la chaîne de PLA par les UV. b) Excitation photophysique. c) Oxydation et scission de la chaîne 30</i>	30
<i>Figure 9 : Size-exclusion chromatography profils de PLA dégradé aux UV-C entre 0 et 24h d'après Yasuda (Yasuda et al., 2010) 30</i>	30
<i>Figure 10 : Structure de l'HPMC 31</i>	31
<i>Figure 11 : Obtention du chitosan par N-déacétylation de la Chitine 34</i>	34
<i>Figure 12 : Protocole de production des films de biopolymères par méthode de casting..... 41</i>	41
<i>Figure 13: Influence de la température et du taux d'hydratation sur d'un polymère sur la mobilité des chaînes 44</i>	44
<i>Figure 14: Boîte à Aw contrôlée pour équilibrage des films..... 45</i>	45
<i>Figure 15 : Suivi par DSC de la température de transition vitreuse (Tg) et de la température de fusion (Tf) de films d'HPMC au cours des premières semaines de vieillissement à 20°C (a,b) et 40°C (c,d)..... 45</i>	45
<i>Figure 16 : Modèle de découpe des éprouvettes de biopolymères pour les essais de traction..... 53</i>	53
<i>Figure 17 : Principe du montage de découpe au jet d'eau pure utilisé pour la découpe des films de biopolymères 54</i>	54

Liste des Tables et Figures

Figure 18: Espace colorimétrique CIE Lab	56
Figure 19 : Echelle tactile ordonnée de l'outil SensoTact [®] pour le descripteur collant.....	60
Figure 20 : Mouvements exploratoires tangentiel et orthogonal utilisés dans l'évaluation tactile des films selon la méthode SensoTact [®]	63
Figure 21 : Boîte de présentation pour l'analyse visio-tactile des films de biopolymères	64
Figure 22 : Evolution du paramètre colorimétrique L* des films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C/50%RH/obscurité)	68
Figure 23 : Evolution des paramètres colorimétriques a (en gris) et b (en noir) des films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C/50%RH/obscurité).....	69
Figure 24 : Spectres infra-rouges des films d'HPMC soumis à différents temps de vieillissement en enceinte climatique (de 0 à 25 semaines) à 40°C et 50%RH.....	70
Figure 25 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 3440 cm ⁻¹	71
Figure 26 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 1643 cm ⁻¹	72
Figure 27 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 2900 cm ⁻¹	73
Figure 28 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 1053 cm ⁻¹	74
Figure 29 : Thermogramme DSC obtenu à partir d'un film d'HPMC	75
Figure 30 : Thermogrammes obtenus lors de la seconde montée en température pour les films d'HPMC vieillis de 0 à 25 semaines à 40°C, 50% d'Humidité Relative et dans l'obscurité en enceinte climatique.....	75
Figure 31 : Diffractogramme aux rayons X d'un film d'HPMC neuf comparé à un film d'HPMC vieilli pendant 6 mois en enceinte climatique à 40°C et 50%RH.....	77
Figure 32 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de films d'HPMC neufs,.....	78
Figure 33 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de films d'HPMC vieillis 6 mois en enceinte climatique (40°C, 50%RH et dans l'obscurité),.....	78

<i>Figure 34 : Module de Young de films d'HPMC au cours du vieillissement de 0 à 25 semaines à 40°C 50% d'Humidité relative et dans l'obscurité.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 35 : Zoom sur la zone d'intérêt 850-1500 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus pour des films d'HPMC stockés à Aw=0,53 à différentes températures a) 30°C, b) 40°C et c) 50°C pendant 15, 30,75 et 90 jours</i>	<i>84</i>
<i>Figure 36 : Zoom sur la zone d'intérêt 850-1500 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 37 : Zoom sur la zone d'intérêt 1180-1720 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 38 : Zoom sur la zone d'intérêt 1180-1720 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 39 : Zoom sur la zone d'intérêt 850-1900 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 40: Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram of chitosan film obtained</i>	<i>102</i>
<i>Figure 41 : Chitosan film color measurement during microwave treatment</i>	<i>103</i>
<i>Figure 42 : Score plot extracted from the Principal Component Analysis from 10 FTIR average spectra corresponding to different heating time from 0 to 40 minutes</i>	<i>105</i>
<i>Figure 43: FTIR spectra between 800 and 3800 cm⁻¹ during chitosan films microwave heating from 0 to 40 minutes as an example of the 10 heating times studied. The spectrum shown for each heating time is the average spectrum obtained with at least 3 samples.</i>	<i>106</i>
<i>Figure 44 : Calculation of the degree of N-acetylation (DA) of chitosan films</i>	<i>107</i>
<i>Figure 45 : Corrélation 2D obtenu sur les spectres FTIR des films de chitosan chauffés de 0 à 40 minutes au micro-ondes a) carte synchrone et b) carte asynchrone</i>	<i>113</i>
<i>Figure 46 : Loading plot obtenu avec le logiciel Unscrambler[®] pour l'analyse en composante principale menée sur les échantillons de film de chitosan au cours du traitement micro-onde.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 47 : Résultats du test de Robinson pour des films de chitosan après 10 minutes de traitement micro-onde</i>	<i>117</i>
<i>Figure 48: Courbes contrainte-déformation des films de chitosan avant traitement, après 10, 20 et 40 minutes de traitement micro-onde</i>	<i>118</i>
<i>Figure 49 : Suivi du module de Young de film de chitosan au cours du traitement micro-onde</i>	<i>119</i>
<i>Figure 50 : a) Contenu en eau (en %) des films d'HPMC et b) Température de surface (°C) des films d'HPMC au cours du traitement micro-ondes.....</i>	<i>123</i>

Liste des Tables et Figures

<i>Figure 51 : Spectres FTIR moyens de films d'HPMC obtenus avant et après 16 minutes de traitement micro-onde</i>	124
<i>Figure 52: Score plot obtenu par l'ACP des spectres moyens de films d'HPMC au cours des 14 (en bleu) ou 16 (en noir) premières minutes de traitement micro-onde par le logiciel The Unscrambler.....</i>	125
<i>Figure 53 : Diffractogrammes aux rayons X obtenus pour des films d'HPMC neuf (en rouge), traité au micro-onde pendant 15 minutes (en vert) et vieilli 6 mois à 40°C et 50% d'humidité relative (en bleu).....</i>	127
<i>Figure 54: Images de microscopie électronique à balayage obtenues pour</i>	128
<i>Figure 55 : Valeurs du module de Young obtenues après essais de traction sur des films d'HPMC à 0, 8 et 15 minutes de traitement micro-onde</i>	129
<i>Figure 56 : Pourcentage de transmission obtenu par spectrophotométrie sur des films d'HPMC avant (film neuf) et après 15 minutes de traitement micro-onde</i>	130
<i>Figure 57 : Spectres FTIR des échantillons de PLA traités de 0 à 8 minutes au micro-onde (chaque spectre à un temps donné correspond à la moyenne de 3 spectres pour ce temps donné). La flèche représente le sens d'évolution de l'intensité du pic au cours du traitement micro-onde.....</i>	133
<i>Figure 58 : Spectres FTIR moyens et écarts-types obtenus pour les échantillons de PLA avant (0 min) et après 8 minutes de traitement micro-ondes.....</i>	134
<i>Figure 59 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de la surface de films de PLA a)neuf et b) ayant subi un traitement micro-onde de 10 minutes</i>	135
<i>Figure 60 : Essais de traction réalisés sur des films de PLA en température contrôlée.....</i>	136
<i>Figure 61: Superposition des diffractogrammes de PLA neuf (en vert) et de PLA micro-ondé 30 minutes (en rouge).....</i>	137

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
Aw	Activité de l'eau (Water Activity)
DP	Degré de Polymérisation
HPMC	Hydroxypropyl Methylcellulose
PA	Polyamide
PCA	Principal Component Analysis
PE	Polyéthylène
PET	Polyéthylène Téréphtalate
PHA	Polyhydroxyalkanoates
PHB	Poly-Hydroxy-Butyrate
PHV	Poly-Hydroxy-Valerate
PLA	Poly-Lactic Acid
Tc	Température de cristallisation
Tf (ou Tm)	Température de fusion (melting)
Tg	Température de transition vitreuse

Introduction

Les inquiétudes concernant la gestion des déchets vont croissant dans un contexte environnemental préoccupant. Les modes de consommation et la population mondiale toujours croissante ont généré des tonnes de déchets qui compromettent sérieusement l'avenir de la planète. Dans ce contexte, il est apparu urgent de trouver des substituts aux plastiques conventionnels issus de la pétrochimie. Utilisés dans des domaines très variés, de l'agriculture à l'emballage en passant par l'industrie au sens large, ces matériaux sont partout. Pour autant, on sait aujourd'hui que leurs jours sont comptés. D'une part à cause de la gestion délicate des déchets qu'ils produisent, et d'autre part, parce que les ressources pétrolières sont en train de se tarir. Par conséquent, il nous faut réduire notre dépendance au pétrole. La recherche a mis au point différents biopolymères pour substituer progressivement les plastiques traditionnels. Pour autant, leur coût reste élevé et leurs performances demeurent, à l'heure actuelle, en dessous de celles des dérivés de pétrole. De plus, si le caractère biodégradable est plutôt bien documenté, on ne connaît encore que peu leur comportement lors du vieillissement.

Ce travail de thèse se propose d'investiguer le vieillissement de certains bioplastiques dans le cadre d'une utilisation comme packaging alimentaire.

Dans cette optique, nous travaillerons sur l'Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC), le Poly Lactic Acid (PLA) et le Chitosan. Le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) travaille en effet depuis de nombreuses années sur ces matériaux. Cette expertise acquise sur la mise au point de films ainsi que sur leur fonctionnalisation nous permet aujourd'hui d'envisager une étude plus en aval de l'évolution de leurs propriétés au cours du vieillissement, indispensable à leur valorisation.

Une étude en conditions contrôlées de température et d'humidité relative permettra de mettre en évidence les modifications subies par ces biopolymères au cours du vieillissement. Nous verrons ensuite que ces modifications structurales peuvent avoir un impact sur les propriétés des films (couleur, propriétés mécaniques, transparence, barrières..) et donc, en modifier les propriétés d'usage.

Ces dix dernières années, le mode de consommation ont beaucoup évolué. Beaucoup de produits alimentaires sont aujourd'hui conçus pour un usage hors foyer, rapide et pratique. De ce fait, les emballages alimentaires ont suivi la tendance et on voit se développer les emballages micro-ondables (types « box » et « doypack »). Après le scandale des polycarbonates et du bisphénol A (BPA), il paraît d'autant plus crucial de bien connaître le comportement des matériaux polymères utilisés en usage réel.

Dans cette optique, nous avons fait subir un post traitement micro-onde en simulant la présence d'un aliment humide, afin d'étudier les modifications du biopolymères dans ces conditions. La présence de composés néoformés a également été étudiée.

Cette étude originale permet d'enrichir les connaissances de ces matériaux dans un usage d'emballage alimentaire et de poser la question de l'emploi et de l'innocuité de ces biopolymères au cours du vieillissement et des post-traitements.

Revue Bibliographique

1. Polymères et généralités

1.1. Structure

Un polymère est une molécule de haut poids moléculaire constituée par l'assemblage de sous-unités de plus petites tailles, appelées monomères, liées entre elles par des liaisons covalentes. Un polymère peut être caractérisé par son degré de polymérisation (DP) ou sa masse moléculaire. Le degré de polymérisation correspond au nombre de monomères assemblés qui constitue la macromolécule. Si le degré de polymérisation est inférieur à 30, on qualifie la macromolécule d'oligomère. A l'inverse, si le degré de polymérisation est supérieur à 30, c'est un polymère. Un polymère est souvent constitué d'un mélange de chaînes macromoléculaires de tailles différentes avec des degrés de polymérisation différents.

La masse moléculaire d'un polymère est exprimée de deux façons différentes. M_w est la masse moléculaire moyenne de toutes les macromolécules présentes dans le matériau. M_n est la masse moléculaire majoritaire dans le mélange.

Nous l'avons évoqué, les polymères présente une structure plus ou moins complexe, tel que présenté sur la Figure 1.

Les polymères linéaires ne sont constitués de grandes chaînes formées de monomères tous identiques (homopolymères) ou différents (copolymères) et enchaînés selon différentes distributions : alternée, aléatoire ou par bloc. Ces grandes chaînes interagissent et s'assemblent entre elles grâce à des liaisons secondaires faibles (type liaisons hydrogène ou force de Van der Waals), assurant une certaine stabilité de l'ensemble. Ces liaisons faibles sont fortement déstabiliser en cas d'augmentation de la température, jusqu'à leur rupture entraînant une déstabilisation du matériau.

D'autres polymères présentent une structure encore plus complexe avec la présence de chaînes latérales greffées sur la chaîne principale. On distingue les **polymères ramifiés** des **polymères réticulés** qui se déploient dans les trois directions de l'espace et dorment ainsi un véritable réseau.

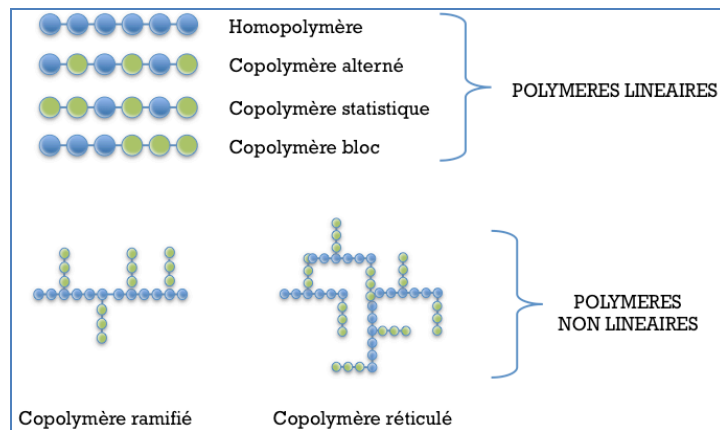


Figure 1: Différents types de polymères selon l'enchaînement des monomères et le branchement des chaînes

1.2. Cristallinité

Les chaînes polymériques peuvent s'organiser de 2 façons différentes, donnant lieu aux deux états de la matière solide. Si les chaînes s'organisent de façon aléatoire, on parle de phase amorphe. La **phase amorphe** est, en théorie équivalente à un liquide « figé », sans ordre moléculaire à grande distance.

A l'inverse, parfois, les chaînes polymériques, malgré leur taille et leur complexité, peuvent s'assembler régulièrement. On parle alors de **phase cristalline**. Les cristaux peuvent être de formes différentes. On en dénombre 7 formes de cristaux (cubique, tétraédrique, hexagonal, monoclinique, triclinique, orthorhombique et rhomboédrique) dont l'organisation interne peut varier légèrement : Les 14 structures possibles appelées réseaux de Bravais sont présentées en Figure 2.

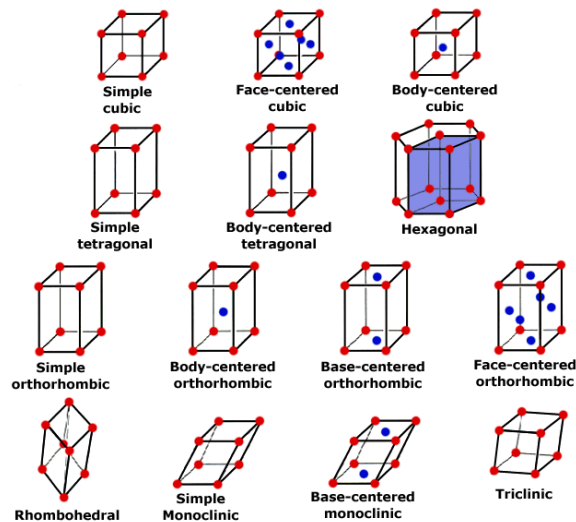


Figure 2 : Les différentes structures d'organisation cristalline (réseaux de Bravais)

Ces 2 états de la matière solide (amorphe / cristallin) peuvent coexister dans un même matériau, on parlera alors d'un **polymère semi-cristallin**, comme indiqué sur la Figure 3, où le degré de cristallinité désigne la proportion de phase cristalline au sein du matériau.

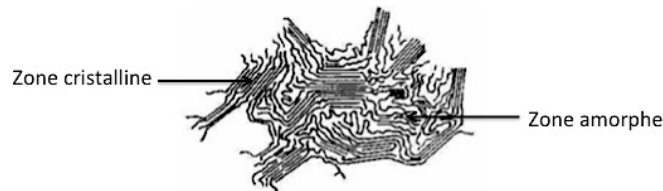


Figure 3 : Schématisation d'un matériau semi-cristallin

Plusieurs paramètres influencent le taux de cristallinité d'un polymère. Parmi les plus importants, on citera ces quelques exemples :

- **Le poids moléculaire** : les polymères de plus petits poids moléculaires ont tendance à cristalliser plus facilement. Cela est compréhensible de par un encombrement stérique plus faible couplé à une mobilité plus grande, permettant un arrangement plus facile des chaînes entre elles.

- **La structure moléculaire** elle même : Nous l'avons vu précédemment, les chaînes polymériques peuvent être linéaires ou non. Les groupes latéraux greffés sur la chaîne principale vont avoir tendance à gêner l'assemblage des macromolécules entre elles et donc, diminuer la cristallinité.
- **Les plastifiants** : Ces molécules de faible poids moléculaire s'intercalent entre les chaînes de polymères et ont tendance donc à diminuer la cristallinité en augmentant la distance entre les chaînes. Un plastifiant peut-être ajouté dans la formulation d'un matériau polymère pour en modifier les propriétés selon l'usage (ex : glycérol) mais il faut savoir que l'eau joue le rôle de plastifiant naturel. Nous aurons à y revenir ultérieurement et en prendre compte dans la réalisation de nos travaux.
- **L'historique thermique du matériau** : Il s'agit d'un paramètre extrêmement important à prendre en compte. En effet, la vitesse de refroidissement imposée à un matériau polymère sous forme fondue va très grandement influencer le taux de cristallisation. En effet, la cristallisation est un phénomène qui nécessite un arrangement des chaînes entre elles, ce qui implique que c'est un processus qui nécessite du temps. Par conséquent, un refroidissement rapide va aller à l'encontre du phénomène de cristallisation. Poussant ce raisonnement à l'extrême, on peut théoriquement considérer qu'un polymère fondu refroidit instantanément (à l'azote liquide par exemple) sera complètement amorphe.

Deux paramètres sont importants à suivre et à comprendre en matière de physique des polymères : La température de fusion (T_f) et la température de transition vitreuse (T_g). La température de fusion concerne la partie cristalline alors que la transition vitreuse concerne l'amorphe.

En dessous de la température de fusion, la phase cristalline du polymère est sous sa forme solide, au-delà, sous sa forme liquide. En effet, l'élévation de la température va créer une agitation moléculaire. De cette agitation va résulter la rupture progressive des liaisons polymériques et le polymère va changer d'état.

La notion de transition vitreuse est un peu moins marquée. En dessous de la T_g, la phase amorphe du polymère est sous un état dit vitreux, avec une mobilité des chaînes très réduites. Si la température s'élève, le polymère est dans un état qualifié de caoutchoutique. Les chaînes polymériques ont alors une certaine mobilité les unes par rapport aux autres, ce phénomène étant notamment dû à des ruptures des liaisons secondaires.

2. Biopolymères

2.1. Contexte

Rencontrant une demande croissante de matériaux plus propres, l'industrie des bioplastiques connaît une croissance intéressante. Par bioplastiques, on entend polymères biosourcés et/ou biodégradables. Les raisons de ce succès sont multiples. Parmi elles, on peut citer :

- l'envolée des prix des énergies fossiles, notamment le pétrole
- la médiatisation et la préoccupation croissante vis-à-vis des problématiques de changement climatique.

Et donc, une bienveillance croissante de l'opinion publique vis à vis de ces matériaux «verts» entraînant un investissement dans ce secteur.

Cette demande croissante rencontre des capacités de productions croissantes et des utilisations toujours plus variées des bioplastiques. En 2011, la capacité de production était de plus d'un million de tonnes, et les prévisions pour 2016 pourraient voir ce tonnage multiplié par 6.

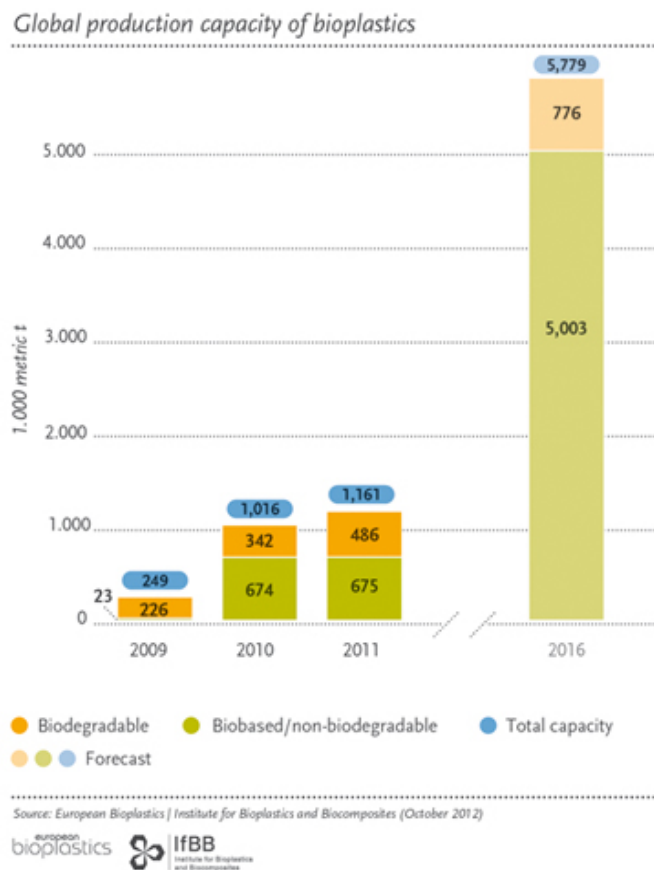


Figure 4 : Capacités de production en bioplastiques jusque 2011 et prévision 2016 (source European Bioplastics)

Les applications industrielles de ces biopolymères sont larges et dans des domaines variés tels que le bâtiment, l’agriculture, la pharmaceutique et les équipements médicaux ou encore le packaging. Ces applications sont rendues possibles par les bonnes performances de ces matériaux, utilisés seuls ou en association avec d’autres polymères traditionnels.

Au niveau mondial, on estime qu’un tiers de la production de plastique est destiné à l’emballage, ce qui en fait un secteur clé que l’on retrouve directement au premier plan de l’utilisation des bioplastiques. En 2011, sur les 1.2 millions de tonnes de bioplastiques produites, environ 40% était destinées au marché de l’emballage.

On sait que la prise de conscience collective sur les enjeux environnementaux permet aux bioplastiques de jouir d’une image très positive auprès des consommateurs qui sont en demande d’emballages renouvelables et raisonnés. La croissance de ce secteur n’est pas

freinée car les bioplastiques (le PLA notamment) s'adaptent globalement bien aux procédés de mise en œuvre des plastiques traditionnels (extrusion, injection, lamination, thermoformage...) permettant une grande diversité dans les emballages possibles (bouteilles, sacs, films, plateau, blisters...) sans obliger les industriels à amorcer une transition technologique trop lourde et coûteuse pour adapter leurs lignes de production.

Les bioplastiques sont donc aujourd'hui une alternative à la fois crédible et attendue dans le domaine de l'emballage alimentaire.

2.2. Classification

Le qualificatif « bio » peut renvoyer à différentes notions et peut être source de confusion dans les esprits. Parler de « biopolymères », est-ce parler de « biodégradabilité », de « bio-fragmentation », de « bio-compostabilité », de l'agriculture biologique, « de bio-sourcing »...?

Les biopolymères regroupent 3 catégories selon le mode de production :

- a) Les polymères issus directement de la biomasse
- b) Les polymères synthétisées par des micro-organismes ou des bactéries modifiées génétiquement
- c) Les polymères produits par synthèse chimique à partir de monomères d'origine naturelle

2.2.1. Biopolymères issus de la biomasse

Cette catégorie comprend les polysaccharides (amidon, chitosan, lignine, cellulose...), les protéines (animales comme le collagène ou la caséine ou végétales telles que le gluten) et les résines naturelles.

Les biopolymères issus de la biomasse sont présents naturellement dans l'environnement.

2.2.2. Biopolymères de synthèse bactérienne

Ce sont en général des polyesters et ils sont utilisables en l'état. On trouve par exemple les polyhydroalkanoates (PHA), le polyhydroxybutyrate (PHB), l'hydroxyl-valérate (PHV), mais aussi la cellulose bactérienne ou le xanthane.

2.2.3. Biopolymères obtenus par synthèse chimique

Ils sont obtenus par synthèse chimique à partir de monomères d'origine naturelle renouvelable. L'exemple le plus connu est le Poly Lactic Acid (PLA), qui, comme son nom l'indique, est un polymère d'unités d'acide lactique.

2.3. Biopolymères et biodégradabilité

Si le vieillissement des polymères dits « traditionnels » tels que le PE, le PA ou le PET sont aujourd'hui bien connus, le vieillissement des biopolymères non issus de la pétrochimie est assez peu étudié.

En effet, les travaux menés sur ces biopolymères se sont plutôt attachés à en démontrer la biodégradabilité ([Ahn et al., 2001](#), [Kale et al., 2007](#), [Kijchavengkul et al., 2010](#))

Le terme **biodégradabilité** renvoie à la capacité d'un matériau à être dégradé par des micro-organismes dans un environnement favorable en température, humidité et oxygénation sans

production de produits dont l'action pourrait se révéler dommageable pour l'environnement. Le polymère est dégradé progressivement : clivés en sous-unités de tailles de plus en plus petite, et finalement totalement converti en dioxyde de carbone (CO₂), méthane et/ou eau et nouvelle biomasse (Castelan, 2007).

La qualification d'un matériau « biodégradable » est strictement encadrée par **la norme NF EN 13432 « Exigences relatives aux emballages valorisables par compostage et biodégradation – Programme d'essai et Critères d'évaluation de l'acceptation finale des emballages »**.

Cette norme prévoit plusieurs critères règlementaires pour la qualification d'un matériau :

- Composition du matériau, notamment les seuils de présence de métaux lourds et de fluor tolérés
- Biodégradabilité évaluée par des essais en laboratoire et en conditions maîtrisées : le matériau doit être dégradé à hauteur de 60 à 90% en masse en 6 mois
- Qualité et innocuité du compost obtenu.

La biodégradabilité est évaluée en conditions *in vitro*, c'est le test de Sturm en milieu liquide qui repose sur l'observation de l'activité respiratoire des micro-organismes du milieu de biodégradation. On suit ainsi la production de CO₂, la consommation d'O₂ ainsi que la croissance microbienne.

Pour poursuivre l'étude *in vitro*, des études de biodégradabilité sont menées en laboratoire dans un milieu-test puis *in situ* sur le terrain avec des mesures de perte de masse d'échantillons abandonnées dans le sol. Cette dernière méthode reste difficile à maîtriser du fait de la multitude de paramètres mis en jeu mais est en cours de normalisation.

Suivant la définition de la biodégradabilité, on comprend donc que définir un matériau de « biodégradable » ne présage en rien son origine mais que cela qualifie sa fin de vie. Ainsi, un matériau biodégradable peut, selon son origine ou sa voie de synthèse, être issu de la pétrochimie comme des ressources renouvelables.

Ce dernier critère exclut de fait les mécanismes de « bio-fragmentation ». En effet, des produits ont été mis sur le marché, de type sacs plastiques ou films de couverture pour l'agriculture (paillage). Il s'agissait d'additiver un polymère d'origine pétrochimique non intrinsèquement biodégradable (ex : Polyéthylène) avec des molécules dites pro-dégradantes afin d'initier la rupture des chaînes et provoquer ainsi le clivage des macromolécules. Trois types de molécules pro-dégradantes pouvaient être employées : des stabilisants (type antioxydant phénolique), pour assurer la stabilité du matériau pendant son stockage, des agents photo-dégradants (stéarate de Fe^{3+}) permettant la dégradation du matériau sous exposition lumineuse (en extérieur pour le paillage, par exemple), et enfin de thermo-dégradants pour assurer l'ultime fragmentation du polymère. Dans ce cas, il s'agit d'une décomposition du matériau plastique en une multitude de petits résidus plastiques mais non visibles. Ces résidus invisibles sont pourtant encore bien présents et ont un potentiel de nocivité vis-à-vis de l'environnement. De plus, les agents utilisés comme catalyseurs de cette bio-fragmentation sont loin d'être anodins et neutres du point de vue environnemental (métaux lourds, par exemple) (Al Mahdi, 2006). De ce fait, qualifier ces matériaux de « bioplastiques » serait indu, et les commercialiser en laissant planer la confusion avec un matériau biodégradable serait répréhensible.

3. Vieillessement d'un polymère

Nous le verrons ultérieurement, plusieurs facteurs peuvent provoquer la dégradation d'un polymère. Toutefois, peu importe le déclencheur de cette dégradation, le premier phénomène mis en jeu est la rupture de liaison. Pour qu'il y ait rupture, il faut un apport d'énergie. Cette énergie peut être d'origine variée : thermique, mécanique, lumineuse, chimique...etc.

3.1. Dégradation d'un polymère

La dépolymérisation d'un polymère débute par une phase d'amorçage. La scission primaire est habituellement d'origine photochimique ou thermique.

Elle peut se produire à une extrémité comme à un endroit quelconque de la chaîne. La scission initiale se produit au niveau d'une zone d'affaiblissement du polymère, comme par exemple l'existence de liaisons faibles aux extrémités.

La dépolymérisation se poursuit par l'étape dite de dépropagation. On caractérise l'importance de cette étape par la longueur cinétique de chaîne en dépropagation. Ce facteur renseigne sur le nombre de monomères produits par la chaîne en cours de dépolymérisation.

Enfin, l'étape de dépolymérisation s'achève par la terminaison

3.2. Dégradation thermique

Pour caractériser la dégradation thermique d'un polymère, on peut définir la notion de température de demi-vie ($T_{1/2}$). Il s'agit de la température pour laquelle la moitié d'un échantillon de polymère est dégradée après une durée de chauffe de 30 minutes. On la calcule grâce à la formule empirique proposée en Équation 1 (Mercier and Maréchal, 1993).

$$T_{1/2} = 1,6 E + 140$$

Équation 1 : Calcul de la température de demi-vie d'un polymère

Où E correspond à la valeur de l'énergie de rupture de la liaison chimique impliquée dans la scission primaire. E exprimé en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

3.3. Vieillessement physique et chimique

Le vieillissement d'un matériau correspond à la modification lente et irréversible de sa structure chimique.

Le vieillissement intervient sous la pression de différents évènements :

- de par la nature même du polymère, lui conférant une certaine instabilité intrinsèque
- sous l'influence de facteurs de l'environnement avec lequel il interagit : humidité, température, rayonnements UV...
- sous l'effet des sollicitations extérieures appliquées au matériau : compression, flexion, étirement, etc.

Il existe deux principaux types de vieillissement selon l'importance des remaniements et modifications subies par le polymère : le vieillissement chimique et le vieillissement physique.

Le vieillissement chimique implique une modification profonde de la structure avec notamment, des remaniements au niveau des groupements fonctionnels.

Le vieillissement physique, appelé aussi relaxation structurale, consiste en un réarrangement spatial des molécules sans atteinte à la structure chimique. C'est un phénomène naturel qui affecte significativement les propriétés physiques de la phase amorphe dans des polymères vitreux ou partiellement vitreux. Les effets du vieillissement physique débutent aux alentours

de la température de transition vitreuse (T_g) et on considère généralement que ces phénomènes sont thermoréversibles.

On peut observer des phénomènes de cristallisation. Cela a pour conséquence une diminution du volume libre de par la croissance de la partie cristalline et donc une diminution de la mobilité des chaînes de polymères les unes par rapport aux autres. Cette baisse de la mobilité entraîne ainsi une diminution des propriétés mécaniques du matériau (Acioli-Moura and Sun, 2008).

Du fait de l'expansion de la partie cristalline, il se crée au sein du matériau des tensions qui participent à des phénomènes de ruptures intra et inter-chaînes.

La plupart des études chimiques sur la dégradation thermique sont en accord avec les réactions de dégradation purement thermiques causées par la température seule (dans le vide ou dans un gaz inerte), les réactions thermo-oxydatives en présence d'oxygène atmosphérique ou d'ozone, ou les réactions hydrolytiques causées par la présence d'eau.

Trois domaines de température peuvent au moins être distingués clairement [Le Huy-92]:

A très haute température typiquement supérieure à la T_g (température de transition vitreuse), il est généralement reconnu que la thermolyse joue un rôle prédominant dans le procédé de dégradation et le taux dépend initialement des énergies de dissociation des liaisons les plus faibles.

A faible température, inférieure à T_g , les processus chimiques sont généralement trop longs et le vieillissement physique est la cause initiale des changements au niveau des propriétés des matériaux.

Dans la gamme de température intermédiaire, l'oxydation par l'oxygène de l'atmosphère joue généralement le rôle clé. L'oxydation conduit à une perte de masse et à la variation de différentes propriétés mécaniques, électriques, chimiques, etc. Pour la plupart des thermodurcissables, le phénomène de post-réticulation peut dominer dans un premier temps le vieillissement. Il est assez difficile de faire une synthèse sur les mécanismes de dégradation

thermo-oxydatifs rapportés, puisque la formulation des résines peut changer d'un auteur à un autre et les irrégularités structurales peuvent entrer en jeu.

3.4. Vieillissement accéléré

Pour observer le comportement des matériaux à moyen ou long terme, un vieillissement accéléré est souvent utilisé. Ces méthodes classiquement employées permettent aussi de prédire la durée de vie d'un matériau. Pour ce faire, de hautes températures sont souvent utilisées, et les données recueillies sont extrapolées pour prédire le comportement du dit matériau à des températures classiques d'utilisation.

La méthode de vieillissement accélérée est basée principalement sur la loi d'Arrhenius (Équation 2) qui décrit la variation de cinétique d'une réaction chimique en fonction de la température.

Bien que cette loi soit empirique, elle est majoritairement utilisée pour l'extrapolation des données de vieillissement accéléré.

$$k = A \cdot \exp \frac{-E_a}{R \cdot T}$$

Équation 2 : Loi d'Arrhenius

Où k : le coefficient de vitesse

T : la température en °K (Kelvin)

R : la constante des gaz parfaits ($R = 8,31 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

E_a : l'énergie d'activation d'Arrhenius donnée en $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$

A : le facteur de fréquence basé sur la fréquence des collisions et des effets stériques

Ce modèle implique que les mécanismes chimiques conduisant au vieillissement ne varient pas avec la température, et ainsi, que E_a ne change pas dans la région d'extrapolation.

Le modèle de Williams, Landel et Ferry (WLF) (Williams et al., 1955)

Il s'applique à divers cas de figures pour évaluer le comportement des élastomères en fonction de divers paramètres : temps, température, pression, fréquence...

Le modèle WLF sera le plus adapté pour de très nombreuses applications où les phénomènes viscoélastiques (fluage, relaxation, etc.) prédominent. Il prend notamment en compte le passage de la transition vitreuse pour les polymères amorphes ou semi-cristallins.

Pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le cas du modèle d'Arrhenius, la méthode WLF de superposition temps-température ne permet en aucun cas de prédire de façon rigoureuse les durées de vie des matériaux étudiés.

3.5. Influence des micro-ondes

En terme d'application du traitement micro-onde à des systèmes polymériques, on trouve dans la littérature plutôt des articles relatifs à la synthèse de polymère induite par micro-ondes.

Il existe en revanche peu de publications traitant de la dégradation des biopolymères au micro-onde. La plupart d'entre elles concernent plutôt les polymères traditionnels (Nerin and Acosta, 2002), et sont souvent relatives au relargage de bisphénol A du contenant vers le contenu, après le scandale sanitaire qui mène aujourd'hui à une modification de la législation. (Aschberger et al., 2010, Ehlert et al., 2008, Kubwabo et al., 2009, Lim et al., 2009, Maragou et al., 2008).

Par ailleurs, il a été montré l'intérêt d'utiliser les micro-ondes pour mettre en évidence ou pour exacerber des réactions organiques au sein d'un système (Cao et al., 2001). L'action du

micro-onde est en effet qualifiée de « chauffage interne » et pourrait augmenter de 1240 fois l'apparition de réactions classiques ([Shao et al., 2003](#)). En ce sens, utiliser le rayonnement micro-onde n'est pas seulement une façon de tester le matériau en conditions d'utilisation réelles, mais aussi de procéder à un vieillissement accéléré ([Chen et al., 2012](#)).

4. Les biopolymères utilisés pour ces travaux

4.1. Le Poly Lactic Acid (PLA)

4.1.1. Structure

Le PLA est un polyester aliphatique résultant de la polymérisation de monomères d'acides lactiques.

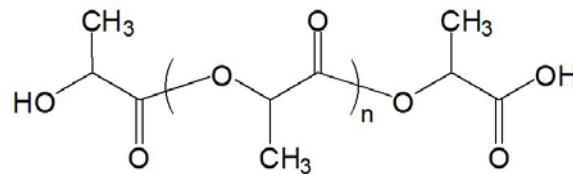


Figure 5 : Molécule de PLA -Poly Lactic Acid-

L'acide lactique (2-hydroxypropionic acid), découvert à la fin du XVIII^{ème} par le chimiste suédois Scheele est une molécule simple et largement répandue. La demande mondiale en acide lactique est forte du fait de ses nombreuses applications en industries alimentaire, pharmaceutique, textile ou encore en industrie chimique. Comme l'acide lactique est une molécule chirale, ne présentant aucune symétrie intrinsèque de sa structure, elle peut exister sous deux formes d'énantiomères : La forme L (le métabolite biologique) et la forme D. Le terme « Polylactic acid » fait en fait référence à un ensemble de polymères, selon les formes d'acide lactique polymérisées ensemble: L'homopolymère poly-L-lactic acid (L-PLA), l'homopolymère poly-D-lactic acid (D-PLA), et enfin, l'hétéropolymère, mélange de forme L et D d'acide lactique, le poly-D,L-lactic acid (DL-PLA) (Griffith, 2000)

Le PLA peut cristalliser sous trois formes (α , β , and γ) selon sa composition en différentes formes d'énantiomères (Lim et al., 2008).

4.1.2. Propriétés et Usages

La première utilisation commerciale de l'acide lactique a été dans le domaine biomédical avec la production de fibres utilisées pour obtenir des sutures résorbables (Auras et al., 2004). Devant ce matériau prometteur, de nombreuses applications ont été développées depuis. Le PLA est aujourd'hui approuvé par les autorités américaines (Food and Drug Administration) et européennes (European Food Safety Authority) pour toutes les applications alimentaires et certaines applications biomédicales (Lampe et al., 2009).

Pourtant, malgré ses qualités, la littérature souligne un temps de dégradation long couplé avec un fort taux de cristallisation qui peut causer des réactions inflammatoires in vivo. Pour pallier à ce problème, le PLLA peut-être utilisé en combinaison avec d'autres formes isomères, les monomères d'acide lactique L étant dégradé tardivement sans formation de fragments cristallins (Fukushima and Kimura, 2008).

Le PLA peut être mis en œuvre par les techniques classiques telles que l'injection, le soufflage ou l'extrusion. Il reste toutefois fragile et demande des conditions de séchage très strictes, la maîtrise de la cristallisation étant un point particulièrement sensible (pour l'injection par exemple).

Table 1 : Valeurs des paramètres thermiques (températures de transition vitreuse, de cristallisation et de fusion) du PLA selon différentes sources bibliographiques

Tg (°C)	Tc (°C)	Tf (°C)	Source Biblio.
55-65	-	150-175	(<u>Petinakis et al., 2013</u>)
60	124	153	(<u>Signori et al., 2009</u>)

La stéréochimie et l'historique thermique du PLA influencent grandement sa cristallinité et donc, ses propriétés en général. La température de fusion et la température de transition vitreuse du PLA diminue quand la quantité de PLLA diminue (Auras et al., 2004). Les

propriétés physiques du PLA dépendent de ses températures de transition (Henton et al., 2005)

4.1.3. Dégradation

Pour la forme amorphe du PLA, la température de transition vitreuse est l'un des paramètres les plus importants. En effet, c'est à partir de cette température, et au delà, que surviennent les changements les plus importants car c'est dans cette zone thermique que la mobilité des chaînes est la plus importante permettant des réarrangements. Pour les formes semi-cristallines de PLA, où coexistent des zones amorphes et des zones cristallines, la température de fusion et la température de transition vitreuse sont tout aussi importantes pour étudier le comportement du PLA (Bouapao et al., 2009, Yamane and Sasai, 2003). L'enthalpie de fusion (ΔH_m°) pour du PLA pur 100% cristallin est de 93 J/g. Cette valeur est la plus souvent utilisée et citée dans la littérature bien qu'on puisse trouver des valeurs supérieures (jusqu'à 148 J/g) (Södergård and Stolt, 2002)

Le taux de dégradation du polymère est principalement déterminé par la réactivité de celui-ci vis-à-vis de l'eau et des catalyseurs. Ainsi, tout facteur qui affecte la réactivité du polymère, tels que la taille, la conformation, la température, l'hydratation, le taux de cristallinité, la concentration en résidus d'acide lactique, le poids moléculaire ou des particules métalliques, affectent le taux de dégradation du polymère (Auras et al., 2004, Bleach et al., 2001, Cha and Pitt, 1990, Drumright et al., 2000, Tsuji and Ishida, 2003). La dégradation d'implants de PLA *in vivo* et *in vitro* a été étudiée pour des applications chirurgicales. Les études *in vitro* montre que le pH de la solution joue un rôle important et dans les études et que l'étude *in vitro* est un modèle prédictif acceptable pour le comportement *in vitro* du PLA (Mainil-Varlet et al., 1997).

La dégradation du PLA est dépendante de plusieurs critères tels que le poids moléculaire moyen, le taux de cristallinité, ou la pureté du polymère (Madhavan Nampoothiri et al., 2010). En effet, la purification du polymère, c'est à dire le fait de le débarrasser des éventuels

monomères résiduels ou impuretés, permet d'en améliorer la stabilité thermique (Södergård and Stolt, 2002).

La littérature fournit quelques travaux pour expliquer la dégradation thermique de ce matériau ou dans des conditions hydrolytiques. Les principaux mécanismes mis en évidence aboutissent rapidement à une réduction du poids moléculaire. Parmi les phénomènes reportés, on citera des phénomènes oxydatifs et de scission de la chaîne principale (Gupta and Deshmukh, 1982), de dépolymérisation et de transestérification (Hyon et al., 1999). Ces modifications structurales du polymère affectent directement ses propriétés de mise en œuvre. On notera ainsi une réduction des propriétés mécaniques. (Kopinke et al., 1996, Taubner and Shishoo, 2001)

Une fois le PLA dégradé, le phénomène s'auto entretient et se propage, à cause des extrémités de chaîne réactive, de la présence de monomère ou d'autres impuretés qui entretiennent le phénomène de dégradation.

4.1.4. Dégradation thermique

La dégradation thermique du PLA est une réaction qui suit une cinétique du 1er ordre (Gupta et al., 2007). Le principal mécanisme mis en jeu lors de la dégradation du PLA est la dépolymérisation qui est favorisée en conditions alcalines et qui consiste en la libération progressive de dimères d'acide lactique (De Jong et al., 2001). Il se produit des phénomènes d'oxydation aléatoire des chaînes principales et l'attaque des chaînes est privilégiée au niveau des liaisons C-O des carbonyles.

Lors de la dégradation thermique du PLA, on observe différents évènements tels que des phénomènes de dépolymérisation « zipper-like » et des phénomènes de trans-estérification inter et intra-chaînes (Södergård and Stolt, 2002).

Ces phénomènes de dépolymérisation entraînent une baisse du poids moléculaire moyen au cours de la dégradation ce qui influence directement la température de transition vitreuse du

polymère qui s'en trouve diminuée. Cette diminution de la Tg est un facteur impactant directement les propriétés de mise en œuvre du matériau dans ses applications industrielles.

4.1.5. Rôle de l'humidité

Même si le PLA est un polymère hydrophobe avec une forte résistance à l'eau, les variations en humidité relative affectent ses propriétés et son contenu en eau (Acioli-Moura and Sun, 2008).

Les premiers phénomènes de dégradation du PLA sont des phénomènes d'hydrolyse, après plusieurs mois d'exposition à l'humidité. La dégradation du PLA se déroule en deux étapes : En premier lieu, des phénomènes aléatoires de coupures de chaînes au niveau des liaisons ester, entraînant une réduction du poids moléculaire. Dans un second temps, les unités d'acide lactique ainsi que les oligomères de faible poids moléculaire peuvent être métabolisés par des micro-organismes en dioxyde de carbone et en eau (Oyama et al., 2009, Auras et al., 2004).

L'attaque des liaisons esters est d'autant plus importante qu'elle est couplée à une augmentation de la température concomitante à une augmentation de l'humidité relative du milieu ou à l'action de rayonnement ultraviolet (Copinet et al., 2004). Il y a donc un effet cumulatif des facteurs de dégradation.

La dégradation totale du PLA peut même survenir par action de la vapeur d'eau à haute température, permettant ainsi de revenir au monomère initial, l'acide lactique. Ce procédé permet ainsi le recyclage du PLA.

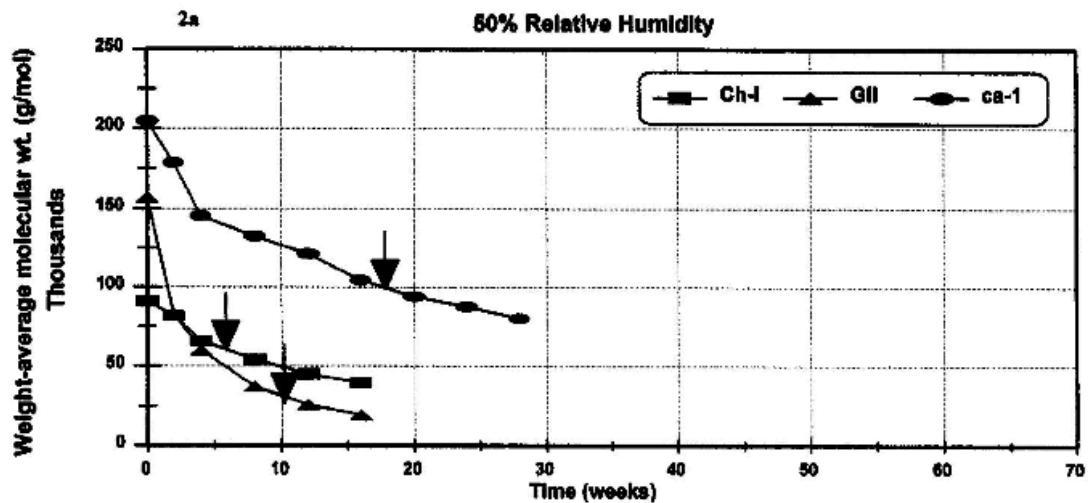


Figure 6: Suivi du poids moléculaire moyen de différents commerciaux de films de PLA soumis à 40°C et 50%RH d'après Ho, 1999

La Figure 6 représente les travaux de Ho (Ho et al., 1999) menés sur des films commerciaux de PLA produits par Chronopol (désigné par Ch-I) et Cargill Dow Polymers (désignés par GII and Ca-I). Ces films ont été soumis à une température de 40°C et de 50% d'humidité relative et le poids moléculaire moyen a été suivi au cours du temps.

On constate nettement la diminution de ce poids moléculaire moyen, reflétant encore les phénomènes de dépolymérisation.

Cette modification profonde de la structure du polymère a des conséquences directes sur les propriétés mécaniques de ces films, tel que montré en Figure 7 avec notamment un effondrement du pourcentage d'élongation avant rupture.

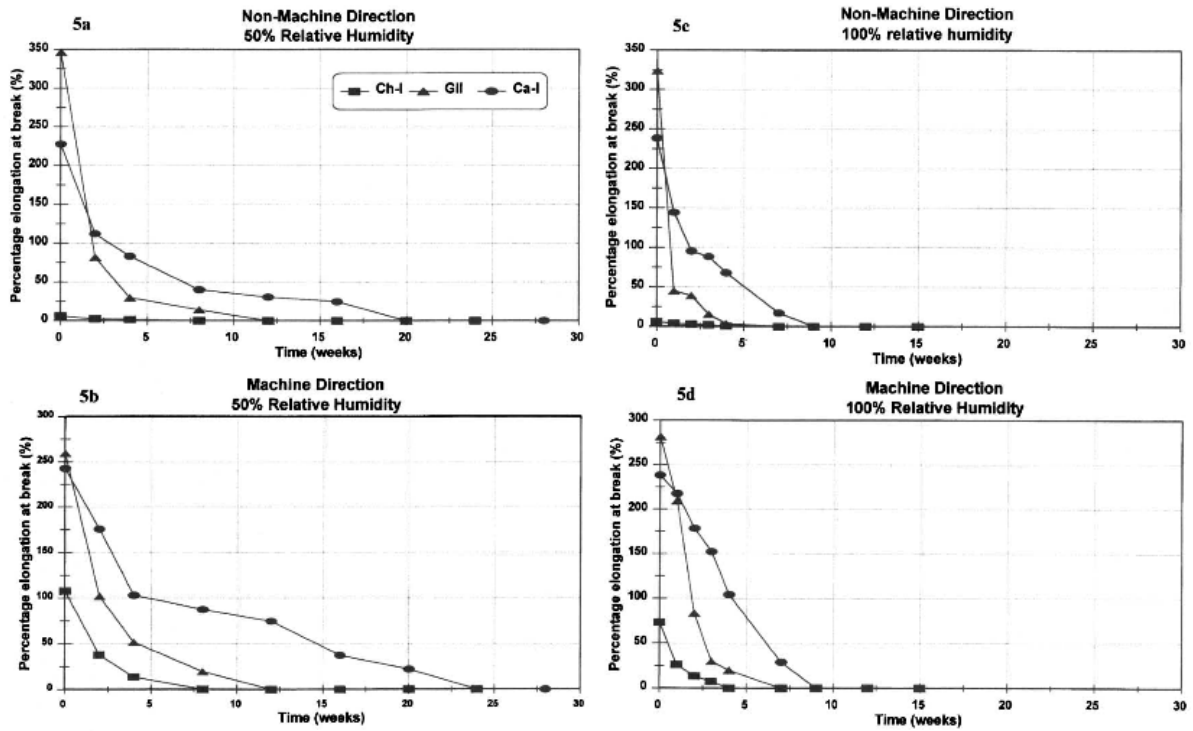


Figure 7: Suivi du % d'élongation à rupture de différents commerciaux de films de PLA soumis à 40°C et 50%RH d'après Ho, 1999

4.1.6. Influence de l'irradiation UV

La photo-oxydation du PLA a été décrite dans les travaux de Belbachir (Belbachir et al., 2010) qui décrivent les modifications de la structure chimique du polymère ayant subi une exposition à des rayonnements ultra-violets (Figure 8). Ces travaux montrent que ce type de vieillissement photo-induit provoque globalement les mêmes conséquences sur la structure polymérique, à savoir des scissions de chaînes, et donc une diminution du poids moléculaire moyen.

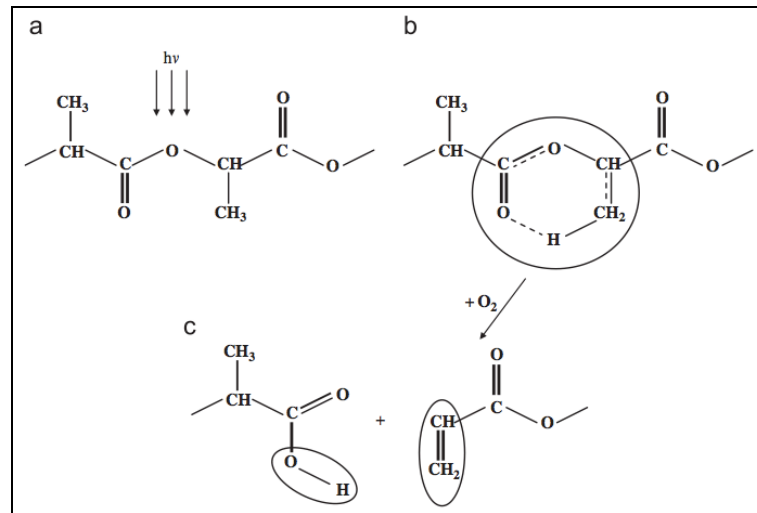


Figure 8: Photo-oxydation du PLA d'après Belbachir (2010). a) Attaque de la chaîne de PLA par les UV. b) Excitation photophysique. c) Oxydation et scission de la chaîne

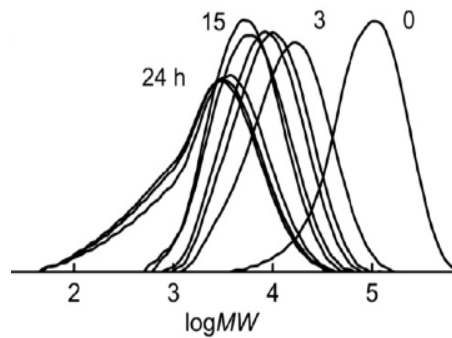


Figure 9 : Size-exclusion chromatography profils de PLA dégradé aux UV-C entre 0 et 24h d'après Yasuda (Yasuda et al., 2010)

La Figure 9 montre bien l'influence rapide des UV-C sur le PLA. On constate là encore une nette diminution du poids moléculaire moyen, signant la dépolymérisation du PLA et ce, dès les premières heures d'exposition aux rayonnements.

4.2. L'Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)

4.2.1. Structure

L'HPMC, est un éther cellulosique. Elle est obtenue à partir de pulpe de bois et fait donc partie des biopolymères issus de la biomasse.

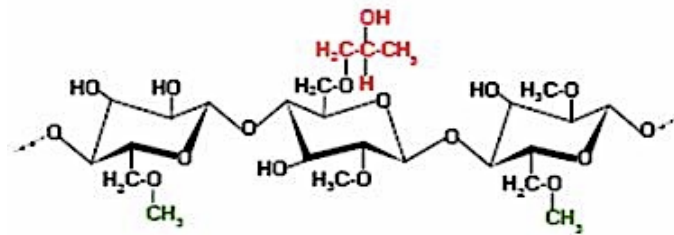


Figure 10 : Structure de l'HPMC

Comme indiqué sur la Figure 10, la chaîne principale est composée d'unités osidiques liées entre elles par des liaisons glucosidiques de type β 1-4. Greffés à la chaîne principale, on constate la présence de groupements hydroxyles, méthyles et hydroxypropyles. Les chaînes sont liées entre elles par des liaisons inter et intramoléculaires qui forment le réseau polymérique (Einfeldt et al., 2001)

4.2.2. Propriétés et Usages

L'HPMC se présente sous forme de poudre granuleuse ou fibreuse, blanche légèrement jaunâtre, elle est faiblement hygroscopique et présente une température de dégradation supérieure à 220°C. Sa température de transition vitreuse varie de 155°C à 180°C selon le type d'HPMC et la méthode de détermination (Siepmann and Peppas, 2001). L'HPMC est un polymère déjà largement utilisé comme additif (E464) dans l'industrie alimentaire pour ses propriétés d'agent de texture en particulier (émulsifiant, épaississant, stabilisant, gélifiant...). Issue de la cellulose, elle est non digestible et n'apporte aucune calorie. De plus, elle est sans

odeur ni saveur ce qui permet son ajout à un produit alimentaire sans risquer un rejet du consommateur.

Elle est soluble dans en solution aqueuse froide et présente la particularité de former un gel après chauffage au delà de 60°C. Ce gel est réversible si refroidi.

Ses propriétés font d'elle un bon agent de texture, un stabilisant d'émulsion, mais aussi une bonne barrière aux graisses comme à l'eau (Burdock, 2007).

Utilisée aussi en industrie alimentaire, on la retrouve dans les enrobages de médicaments, pour réaliser des capsules sans gélatine, ou comme émulsifiant dans les crèmes. Elle peut aussi être utilisée pour réaliser des capsules gastrorésistantes pour un principe actif dont la cible est l'intestin (Cole et al., 2002)

4.2.3. Dégradation

L'influence de l'irradiation par un faisceau d'électron de films d'HPMC a été décrite dans la littérature. Les travaux montrent des phénomènes de dépolymérisation et de rupture de chaînes. Ces scissions permettent la formation de fragments d'HPMC de faible poids moléculaire et la production de radicaux libres, CH_3 par exemple. Les conclusions de ces mêmes travaux mènent à l'hypothèse que des phénomènes de réticulation de l'HPMC sont induits par l'irradiation. Plus la dose est forte, plus la stabilité thermique du polymère est grande. La température de fusion augmente avec la dose tout comme la température de destruction de l'HPMC. (Asha et al., 2009)

Une étude menée sur de la poudre d'HPMC –identique à celle utilisée pour nos travaux– montre l'influence du traitement micro-onde sur la qualité des gels formés après hydratation de la poudre (Kowalczyk and Tritt-Goc, 2011). Il apparaît que l'énergie fournie par l'irradiation micro-onde est suffisante pour altérer les liaisons hydrogène qui maintiennent le réseau formant le gel d'HPMC. Ce constat est dépendant de la dose d'irradiation. La conséquence de ce traitement micro-onde est donc visible sur la qualité du gel obtenu après hydratation qui présente une viscosité moindre. En effet, le traitement micro-onde perturbe le

réseau polymérique, modifiant l'accessibilité des molécules d'eau lors de la réhydratation de la poudre ce qui altère les qualités du gel formé.

Une étude a été menée sur des films de méthylcellulose, à la structure très proche de l'HPMC, additivés de sorbitol comme agent plastifiant pour déterminer l'effet du stockage et de la congélation sur ces films. Cette étude montre que la température de transition vitreuse n'est pas modifiée au cours des différentes conditions de stockage testées. Les changements principaux retenus pour le vieillissement de ces films sont principalement attribués à l'action de l'eau congelable ou non congelable des films et de la présence d'un plastifiant (Tavera Quiroz et al.).

4.3. Le Chitosan

4.3.1. Structure

Le chitosan est obtenu par N-déacétylation partielle de la chitine - poly-[(1-4)- 2-deoxy-2-acetamido-D-glucose] – (Figure 11), découverte en 1884, contenue dans l'exosquelette des crustacés (crabes, crevettes...). La chitine est le polymère le plus abondant après la cellulose.

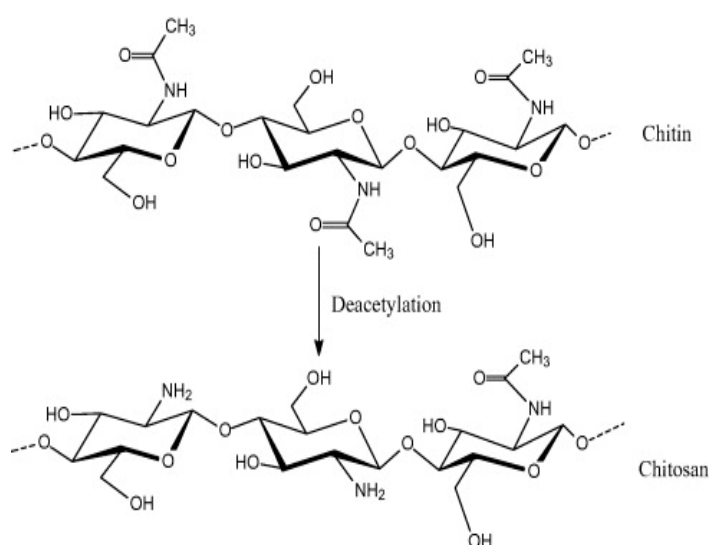


Figure 11 : Obtention du chitosan par N-déacétylation de la Chitine

Le chitosan est un copolymère principalement composé d'unités β-(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose. La structure globale du chitosan rappelle celle de la cellulose mais la présence de groupement amine -NH₂ sur le carbone 2 modifie beaucoup ses propriétés physico-chimiques, notamment sa solubilité et sa réactivité.

4.3.2. Propriétés et Usages

La chitine est le polysaccharide le plus abondant derrière la cellulose. La chitine est insoluble dans l'eau mais le devient lorsqu'elle est partiellement déacétylée ou sous la forme du chitosan.

Le chitosan est biocompatible, biodégradable et non toxique ce qui lui confère un large champ d'applications possibles. Le chitosan est utilisé comme flocculant, clarifiant, désépaississant, membrane sélective aux gaz. Le chitosan donne des films dont les propriétés de barrière aux gaz sont élevées. Son caractère cationique peut permettre des interactions avec divers éléments chargés négativement pour ensuite incorporer ou délivrer des composés actifs (Hoagland and Parris, 1996). Le chitosan peut aussi fixer environ 15 fois sa masse en lipides ce qui lui a permis des utilisations en formulation de produits diététiques (Jarroux, 2008).

4.3.3. Dégradation

Une étude a été menée sur des solutions à 1% de chitosan ayant subi un traitement micro-onde de 6,18 et 30 minutes au micro-onde (Mecwan et al., 2011). Un micro-onde domestique a été utilisé, à l'instar de notre étude, à une puissance moindre toutefois de 700W. Il apparaît dans cette étude que la solution de chitosan traitée par micro-onde présente un poids moléculaire moyen réduit, et que cette réduction est dépendante du temps de traitement. En revanche, l'étude de montre pas de modification du degré de déacétylation ni de la viscosité de la solution. Les auteurs étudient aussi les qualités du chitosan comme support d'adhésion de cellules dans le domaine de la bio-ingénierie et montrent que le micro-onde affecte aussi les propriétés biologiques du chitosan.

Dans cette étude, on note que le contenu en eau des échantillons n'est pas modifié au cours du traitement, insistant sur l'effet de l'irradiation micro-onde plutôt que sur l'effet de l'humidité.

Matériels et Méthodes

1. Matières premières

1.1. Biopolymères utilisés

1.1.1. HPMC

L'Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) utilisée dans ces expériences a été fournie par Fluka-Biochemika (Japan). Elle est de type 28-9 ce qui signifie qu'elle contient ~9% de groupements hydroxypropyles et ~28.18% de méthyles.

Sa viscosité est de ~15mPas et sa solubilité est de 2% en solution aqueuse à 25°C.

1.1.2. Chitosan

Le Chitosan utilisé lors de ces expériences a été fourni par Sigma–Aldrich (Saint-Quentin, France). Il s'agit d'un chitosan obtenu à partir de chitine extraite de carapace de crevettes. Il présente une viscosité <200 mPa.s dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1 % v/v à 20°C selon les données du fournisseur.

1.1.3. PLA

Le PLA utilisé pour l'ensemble de ces travaux a été acheté à NatureWorks[®] Co (Minnetonka, USA). Il est de référence 2002D et se présente sous forme de granulés. Il est à noter qu'il est le seul matériau polymère utilisé non pur pour ces travaux. En effet, la société NatureWorks[®] le commercialise sous une forme additivée prête à l'emploi pour ses clients industriels. Evidemment, la formulation de ce mélange est obscure mais contient, à n'en pas douter, des antioxydants pour protéger le matériau.

1.2. Solvants

L'éthanol (Pharmaceutics CARLO Erba, France) utilisé pour augmenter la solubilité de l'HPMC et pour réduire la formation de mousse a une pureté de 96.2% et est de qualité analytique.

Le chloroforme et l'acide acétique ont été achetés chez VWR International (France) et sont de pureté analytique.

1.3. Consommables

Les boîtes de Pétri (Optilux) ont été fournies par Nunclon™ Fisher (DK-4000 Roskilde, Danemark). Elles mesurent 1 cm de hauteur pour 8,5 cm de diamètre.

2. Production des films et tests d'homogénéité

2.1. Protocole général

Les différents films de biopolymères ont été réalisés par méthode de casting. Les polymères sous forme de poudre ou granulés ont été dissous dans le solvant adéquat, formant une solution filmogène. Cette solution est filtrée et dégazée et une masse constante de solution a été coulée dans des boîtes de Pétri. La première étape de formation des films consiste en un rapprochement des macromolécules dans la solution filmogène (solvant + polymère). La seconde étape consiste en la création de jonctions entre les chaînes (forces de cohésions). Une fois le solvant évaporé et le film formé, il n'est pas utilisable en l'état. En effet le contenu en humidité du film joue un rôle important dans ses propriétés physico-chimiques. Ainsi, le film obtenu est équilibré en humidité grâce à une boîte à humidité contrôlée à l'aide de sels de $Mg(NO_3)_2$. Une solution saturée de ce sel dans une boîte hermétique permet en effet d'obtenir

à 20°C une $A_w=0,54$. Le temps d'équilibrage nécessaire est de 2 semaines. Le protocole de formation des films est schématisé sur la Figure 12.

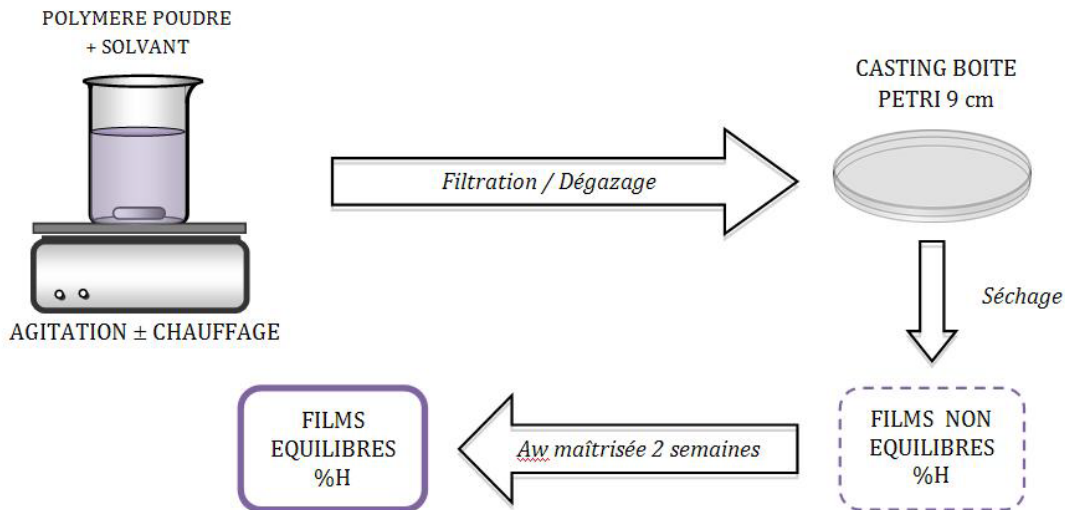


Figure 12 : Protocole de production des films de biopolymères par méthode de casting

2.1.1. Production des films d'HPMC

La solution filmogène d'HPMC a été réalisée selon le protocole décrit par Akhtar (Akhtar et al., 2009), en dissolvant 6g d'HPMC dans une solution composée d'un mélange eau/éthanol dans les proportions 65/35% respectivement. La poudre d'HPMC est mélangée au mélange eau/éthanol préalablement préchauffé à 40°C afin de faciliter la dissolution du polymère. Le mélange est ensuite chauffé à 60°C pendant 40 minutes sous agitation modérée (400 rpm).

Une fois la solution filmogène obtenue, homogène en apparence, dépourvue de grumeaux et bien transparent, elle est dégazée à l'aide d'une trompe à vide. Le dégazage est effectué à chaud pour une meilleure efficacité.

Le film est réalisé par casting : 6g de solution filmogène sont coulés dans une boîte de Pétri et laissés à sécher sur une surface plane (vérifiée au niveau), à 20°C, pendant au moins 48h.

2.1.2. Production des films de Chitosan

Le chitosan est un polysaccharide hautement basique, insoluble dans l'eau, mais qui devient soluble dans des solutions acides diluées (acide acétique ou acide formique par exemple) (Kumar, 2000). La solution filmogène de chitosan est obtenue en dissolvant 1g de poudre de chitosan dans une solution diluée d'acide acétique à 1% v/v. Le mélange est homogénéisé par agitation modérée (300-350 rpm) pendant 24h à 20°C . Après mélange, la solution est filtrée sur une membrane de nitrocellulose de porosité 5µm sous vide. Il est conseillé de réaliser cette étape après avoir tiédi la solution au bain marie à 35°C, afin d'en réduire la viscosité et de faciliter ainsi la filtration. Après dégazage, 25g de solution sont versés dans une boîte de Pétri et laissés à sécher pendant 48h à 20°C.

2.1.3. Production des films de PLA

Les films de PLA ont été réalisés à partir de granules de PLA (2002D) fournis par NatureWorks ® Co, Minnetonka (USA).

La solution filmogène à 3,5% est obtenue par dissolution des granulés de PLA dans du chloroforme, en prenant toutes les précautions inhérentes à l'utilisation de ce solvant classé CMR. La solution filmogène est laissée 1 à 2h sous agitation modérée (400rpm) jusqu'à complète solubilisation des granulés de PLA. La solution filmogène claire et limpide est prête à être coulée sans dégazage préalable, du fait encore de l'utilisation de chloroforme très volatile. Les films de PLA, à l'instar des films d'HPMC et de chitosan, sont réalisés par casting en versant 20g de solution filmogène dans une boîte de Pétri. La précaution particulière est d'utiliser un fond téflonné pour les boîtes de Pétri du fait de l'utilisation de chloroforme. Le séchage a lieu dans un endroit bien ventilé, à 20°C, pendant 48h.

2.2. Epaisseur

L'épaisseur des films a été déterminée selon la norme NF Q 03-016 avec un micromètre manuel équipé d'une tête de mesure de 5 mm de diamètre avec une sensibilité de 1µm. L'épaisseur de chaque film a été mesurée en 10 points du film de façon aléatoire. La moyenne et l'écart-type de l'épaisseur ont été calculés pour chaque film.

2.3. Contenu en eau

La mesure du contenu en eau des films a été réalisée en triplicat pour chaque type de film. Chaque échantillon est pesé (m_0) puis séché dans une étuve à 102°C pendant 3h (selon la norme ASTM D644-99). A la sortie de l'étuve, le film est immédiatement entreposé dans un dessiccateur afin d'éviter la reprise en eau, puis pesé à nouveau (m_f). Le contenu en eau (MC) exprimé en pourcentage est calculé tel que présenté dans l'Équation 3.

$$MC (\%) = \frac{m_f - m_0}{m_u} \times 100$$

Équation 3: Calcul du contenu en eau d'un film de biopolymère

3. Méthodes de Vieillessement

3.1. Pré-conditionnement des films

Parmi les trois types de biopolymères étudiés, deux sont hydrophiles (chitosan et HPMC) et donc, le paramètre humidité est particulièrement important à prendre en compte.

Concernant le traitement micro-onde, c'est l'agitation des molécules d'eau qui permet le dégagement de chaleur. Si, intuitivement, le contenu en eau paraît alors un paramètre important à contrôler, il était important de mettre en évidence ce phénomène et de comprendre comment standardiser le procédé d'obtention des films.

Le séchage des films au cours de ces travaux a été réalisé à température contrôlée, mais à une humidité relative variable selon les conditions atmosphériques, ce qui pourrait causer des disparités dans la structuration du polymère et son contenu en eau après séchage.

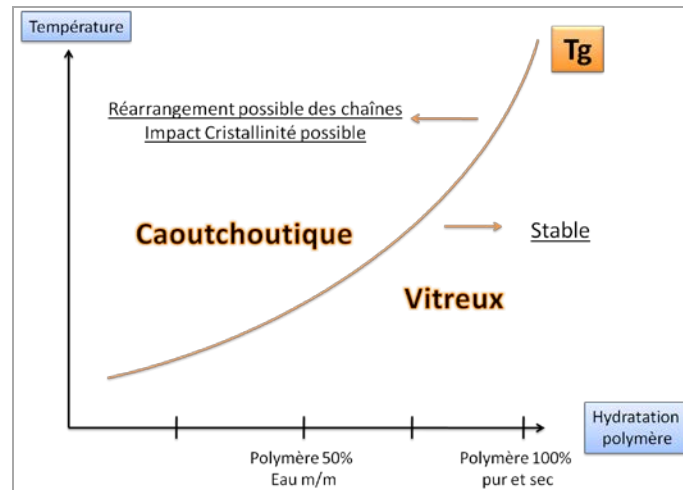


Figure 13: Influence de la température et du taux d'hydratation sur d'un polymère sur la mobilité des chaînes

Comme montré sur le schéma présenté en Figure 13, à un taux d'hydratation donné, selon la température d'utilisation, le polymère peut se trouver dans sa forme vitreuse (en dessous de la Tg), forme plutôt stable, ou dans son état caoutchoutique, après franchissement de la Tg. Dans ce cas, le polymère est susceptible de subir des remaniements structuraux.

Pour permettre de discuter correctement les travaux effectués, nous avons donc choisi de standardiser le contenu en eau des films en les entreposant après séchage pendant 2 semaines dans une boîte à 20°C et Aw contrôlée.

Pour ce faire, nous avons réalisé un montage (Figure 14) étanche avec une solution saturée en sel de Nitrate de Magnésium hexahydrate $Mg(NO_3)_2$. Ce sel a, en effet, la particularité de générer une atmosphère avec une Activité de l'eau (Aw) égale à 0,53.

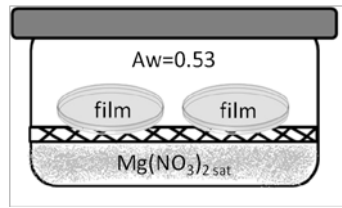


Figure 14: Boîte à A_w contrôlée pour équilibrage des films

Pour choisir le temps d'équilibrage nécessaire dans ce système, nous nous sommes basés sur les résultats préliminaires obtenus en DSC (Differential Scanning Calorimetry) sur les films d'HPMC.

Ces résultats préliminaires sont présentés sur la Figure 15.

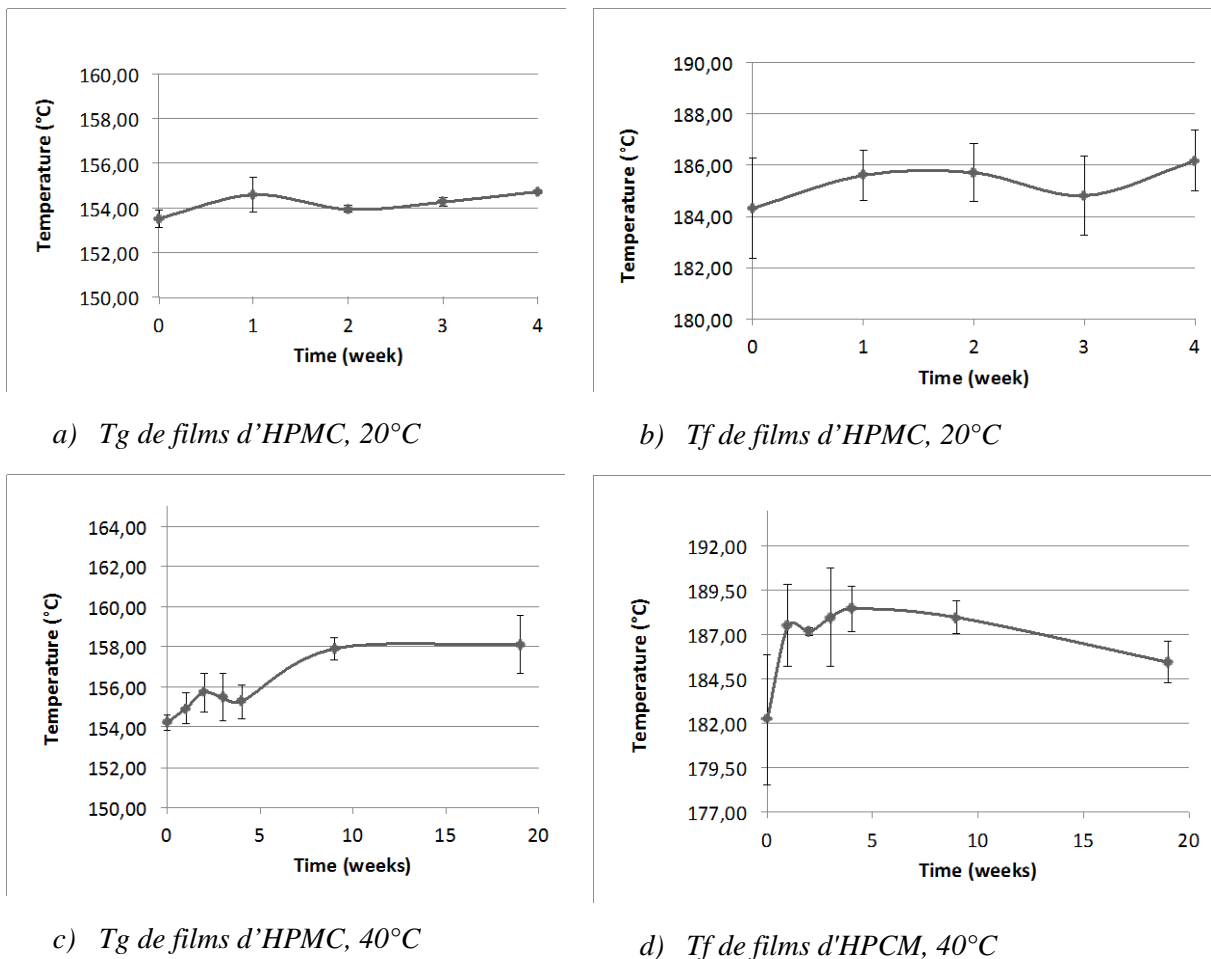


Figure 15 : Suivi par DSC de la température de transition vitreuse (T_g) et de la température de fusion (T_f) de films d'HPMC au cours des premières semaines de vieillissement à 20°C (a,b) et 40°C (c,d)

3.2. Vieillissement accéléré en enceinte climatique

Pour maîtriser au mieux les conditions environnementales de vieillissement, une enceinte climatique a été utilisée (Climacell, MMM Medcenter, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Cet équipement permet de contrôler la température, l'humidité relative ainsi que le taux d'éclairage. Nous avons choisi de fixer les paramètres suivant : 40°C, 50% d'humidité relative et dans l'obscurité.

3.3. Traitement par micro-ondes

Concernant le vieillissement par micro-onde, nous avons souhaité répondre à deux questions :

- Le micro-onde est-il un moyen rapide de mettre en œuvre le vieillissement d'un polymère ?
- Quels sont les comportements des biopolymères utilisés comme emballage alimentaire lorsqu'ils sont soumis à un usage domestique tel que le chauffage au micro-onde.

Un four micro-onde classique a donc été utilisé à différents temps de chauffe. La puissance a été réglée sur 800W pour l'ensemble des expérimentations. En termes de mécanisme d'action des micro-ondes, nous l'avons vu précédemment, l'eau joue un rôle prépondérant.

600 mL d'eau ont donc été introduits dans un bécher lors du chauffage micro-onde.

Cette quantité d'eau remplissait différents rôles :

- Permettre la simulation du chauffage d'un aliment humide
- Permettre de contrôler le taux d'humidité dans le micro-onde d'une expérience à l'autre. En effet, l'enceinte du four se retrouvait rapidement saturée en humidité.
- Permettre de réaliser des temps de chauffage longs de plusieurs dizaines de minutes puisqu'il est dangereux de faire tourner un micro-onde à vide. L'énergie doit pouvoir être absorbée par un support, l'eau dans notre cas.

Après le chauffage, la température de surface du film de biopolymère a été mesurée à l'aide d'un thermomètre infra-rouge (ThermoFlash).

4. Analyse structurale

4.1. Spectroscopie Infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR)

4.1.1. Principe

La spectrométrie infrarouge est la mesure de la diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Le rayonnement infrarouge dispense suffisamment d'énergie pour stimuler les vibrations moléculaires à des niveaux d'énergie supérieurs. La spectrométrie infrarouge s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule en mettant en évidence la présence de liaisons entre les atomes (fonctions et groupements). La majorité des applications se situe entre 2,5 et 15 μm soit en nombre d'ondes de 4000 cm^{-1} à 670 cm^{-1} (IR moyen).

Un spectre infrarouge est traditionnellement présenté en transmission (fraction de l'intensité transmise par rapport à l'intensité incidente) exprimée en pourcentage et l'axe des abscisses en fonction du nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde), sur un axe dirigé vers la gauche

4.1.2. Protocole utilisé

Les mesures FTIR ont été réalisées en mode de réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) au cours des différents traitements de vieillissement subis. Les mesures ont été réalisées à 20°C avec un spectromètre Tensor 27 mid-FTIR (Bruker, Karlsruhe, Germany) équipé avec une cellule optique Platine et un détecteur de type DTGS (Bruker, Karlsruhe, Germany). L'ouverture du diaphragme a été réglée à 6 mm. Le taux de balayage a été réglé à 10 kHz et 64 scans ont été réalisés pour chaque échantillon testé. Le balayage a été réalisé entre 3800 et 900 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

Les données obtenues ont traitées par le logiciel OPUS livré par le fournisseur (Bruker, Karlsruhe, Germany).

Le traitement des données brutes a été le même pour chaque expérience à savoir :

- Conversion spectrale
- Correction atmosphérique H₂O / CO₂
- Lissage neuf points (fonction de Savitsky-Golay)
- Correction de la ligne de base 1
- Normalisation vectorielle
- Correction de ligne de base 2

4.1.3. Traitement statistiques

Le traitement statistique des données FTIR pour les films a été réalisé grâce au logiciel Unscrambler[®]. Ce logiciel permet de réaliser une analyse en composante principale (ACP) sur le spectre entier des différents échantillons testés.

Une analyse dite de corrélation 2D a également été réalisée au logiciel 2D Shige[©] pour compléter cette étude statistique. Ce logiciel a été conçu par Dr. Shigeaki Morita de l'équipe de Pr. Yukihiro Ozaki à l'université de Kwansei-Gakuin.

Présentation des résultats : les données doivent être présentées dans un format .csv avec un format strictement défini : les échantillons pour la première colonne (*i.e.* les temps de traitement micro-ondes dans notre cas) et les nombres d'ondes en cm⁻¹ pour la première ligne.

4.2. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

4.2.1. Principe

La calorimétrie à balayage différentiel est une technique servant à étudier les transitions thermiques d'un polymère. On entend par là, les changements qui interviennent dans un

polymère quand il est chauffé (la fusion d'un polymère cristallin ou le passage de la transition vitreuse pour un polymère amorphe, par exemple) ou refroidi.

La méthode est basée sur la mesure des flux thermiques mesurés entre l'échantillon et le polymère, ces flux étant mesurés par des thermocouples reliés à un système informatique de traitement du signal.

La courbe obtenue permettra donc de mettre en évidence des phénomènes endothermiques consommateurs de chaleur (comme la fusion) et des phénomènes exothermiques qui produisent de la chaleur (tels que la cristallisation).

4.2.2. Protocole

L'analyse thermique a été menée en scellant 5,5 à 8 mg d'échantillon de films dans une capsule en aluminium, couvercle retourné pour permettre un contact optimal du film avec le fond de la capsule et assurer les meilleurs échanges thermiques lors de l'expérimentation.

La capsule est introduite dans un calorimètre à balayage différentiel (DSC, Netzsch, Germany).

L'analyse thermique est toujours réalisée en trois étapes. Une première montée en température pour éliminer l'historique thermique du matériau, suivi d'une phase de refroidissement puis une deuxième montée en température sur laquelle les mesures de températures de fusion ou de transition vitreuse pourront être relevées. Les mesures sont effectuées sous flux d'azote pour protéger l'échantillon.

Pour le chitosan, la première montée en température a été effectuée de 25°C à 180°C à une vitesse de 10°C/min. Le refroidissement a été réalisé de 180°C à 25°C à une vitesse de 30°C/min et la dernière montée en température de 25°C à 350°C à une vitesse de 10°C/min.

Pour l'HPMC, la première montée en température a été effectuée de 25°C à 130°C à une vitesse de 10°C/min. Le refroidissement a été réalisé de 130°C à 25°C à une vitesse de 30°C/min et la dernière montée en température de 25°C à 300°C à une vitesse de 10°C/min.

4.3. Diffractométrie de rayons X (DRX)

Les mesures en DRX ont été réalisées dans deux laboratoires différents équipés pour ce type d'expérimentations.

Premièrement à l'Institut Jean Lamour - UMR 7198 - Centre de Compétence X-gamma (Diffraction-Diffusion-Imagerie X et Spectroscopie Mössbauer), unité CNRS - Nancy-Université avec l'aimable collaboration de M. Ghouti MEDJAHDI.

Deuxièmement à l'ENSAM-Arts et Métiers ParisTech de Metz au Laboratoire LEM3 UMR CNRS 7239 avec l'aimable collaboration de M. Raphaël PESCI.

Un diffractomètre panalytical X'Pert Pro MPD à axe horizontal a été utilisé, monté en réflexion et en $2\theta/\theta$. Il est équipé d'une anticathode au cuivre et d'un détecteur rapide X'Celerator. La radiation K β est filtrée à l'aide d'un filtre en Nickel. L'échantillon est déposé sur un porte-échantillon qui est ensuite introduit dans une platine animée d'un mouvement de rotation sur son propre axe.

4.4. SEC MALLS

Cette technique permet la détermination de la masse moléculaire.

Nous l'avons employée pour confirmer les éventuelles ruptures de chaînes au cours du vieillissement, du chitosan en particulier dont nous possédions des étalons de différents poids moléculaires.

La SEC MALLS (Size exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering detectors) a été utilisée pour étudier la distribution de poids moléculaire d'échantillons de chitosan selon la méthode décrite par Nguyen ([Nguyen et al., 2009](#)). L'indice de réfraction (RI) ainsi qu'un micro-viscosimètre ont été utilisés. Le poids moléculaire moyen a été déterminé grâce à la courbe étalon réalisée grâce à des standards de chitosan au poids moléculaire connu (American Polymer Standard).

Pour chaque échantillon, une solution a été réalisée en solubilisant le film a testé à 1mg/L dans un tampon acétate (0,3M d'acide acétique; 0,3M d'acétate de sodium; pH=4,5) Ce tampon est filtré sur membrane de porosité 0,45 μm (Durapore[®] 47 mm diam. Millipore) à 20°C. Le tampon acétate sert également de phase mobile pour la chromatographie.

Les analyses ont été menées à 30°C à un débit de 0,7 mL/min avec un volume d'injection de 100 μL et en utilisant un viscosimètre de type Viscotek A4000M (colonne de 7,8mm de diamètre interne et 30 cm de long)

4.5. Microscopie Electronique à Balayage

La technique de microscopie électronique à balayage -Hitachi SEM instrument (Hitachi S-4800, Tokyo, Japan)- a été utilisée pour obtenir des images de la surface des films avant et après vieillissement. Les échantillons ont été métallisés avant observation pour améliorer le contraste. Les observations ont été réalisées à 10kV. Différents grossissements (x 2000, x 5000, x 10000 and x 20000) ont été utilisés, du général au particulier pour observer la surface des films.

5. Analyse fonctionnelle

5.1. Essais mécaniques

5.1.1. Système de traction

Un Lloyd Instrument (AMETEK, LRX, Leicester, UK) a été utilisé pour déterminer les propriétés mécaniques des films testés, conformément à la norme ASTM D882 « Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting ». Les essais ont été réalisés par fixation des films dans des mâchoires de serrage, et la traction exercée sur les film a été réalisée à une vitesse constante de 20 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à rupture. Le serrage et le maintien de ces éprouvettes fragiles est une partie délicate pour la bonne mise en œuvre de la technique.

Le serrage doit en effet empêcher le glissement du matériau mais sans le déchirer pour éviter une rupture prématurée de l'éprouvette.

5.1.2. Géométrie des éprouvettes et placement

Les éprouvettes ont été découpées conformément à la norme ASTM D882 « Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting » comme présenté sur la Figure 16.

On notera que les mesures ont été adaptées proportionnellement pour répondre à la contrainte de la technique de casting dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, limitant de fait la longueur des éprouvettes.

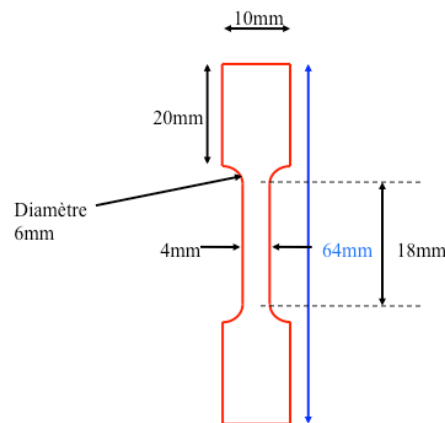


Figure 16 : Modèle de découpe des éprouvettes de biopolymères pour les essais de traction

5.1.3. Découpe des éprouvettes

Lors des essais mécaniques, une découpe précise est primordiale pour assurer une bonne mise en œuvre des essais de traction sur les polymères. Cette étape de découpe est d'autant plus importante que nos échantillons étaient fins (de l'ordre de 50 μ m).

Différentes solutions (coupe en eau pure uniquement) ont donc été testées pour la découpe des différents biopolymères au CRITT Techniques Jet Fluide et Usinage de Bar-Le-Duc.

La technique de découpe au jet d'eau fait actuellement partie des techniques préconisées pour l'usinage des polymères. En effet, elle permet une découpe à froid du polymère, sans endommagement thermique du matériau ni déformation.

Cette technique allie la vitesse et la pression d'un jet d'eau très fin. Le matériau est donc découpé par une action mécanique, par le dépassement de sa limite d'élasticité (Dessarthe, 2000).

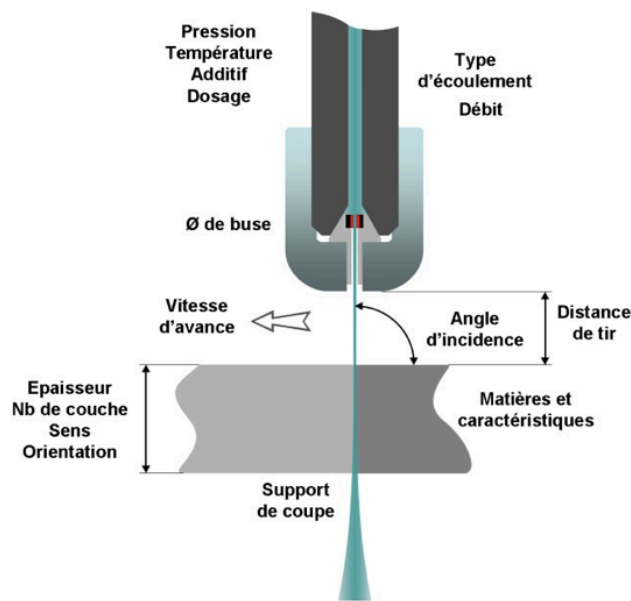


Figure 17 : Principe du montage de découpe au jet d'eau pure utilisé pour la découpe des films de biopolymères
(source : <http://www.crt-coupe.com>)

Des problèmes importants de découpes sont intervenus pour les films de chitosan et HPMC qui, quelques secondes après leur découpe, se sont enroulés complètement sur eux même, comme sous l'action du relâchement de tension interne. Différents paramètres de découpe ont été testés. Notamment le caractère hydrophile de ces deux biopolymères a été mise en cause. Théoriquement, les vitesses et pressions utilisées sont telles que la méthode ne devrait pas poser de problème pour la découpe de matériaux hydrophiles. Toutefois, pour lever définitivement ce questionnement, les films ont été découpés entre plusieurs couches pour les protéger d'une éventuelle humidité lors de la découpe.

Ont été testés les solutions suivantes :

- Entre des feuilles au dessus et en dessous
- Entre des feuilles absorbantes au dessus et en dessous
- Entre des couches de lino
- Entre des feuilles de PVC
- Dans une pochette plastique en Polypropylène
- Avec un emporte-pièce en acier découpé au jet d'eau abrasif.

Ils ont en outre testé différentes vitesses entre 200 et 600 mm/min.

Au final, aucune solution n'a été trouvée pour un découpage satisfaisant des échantillons d'HPMC et de chitosan, et ce, malgré l'expertise de l'équipe du CRITT.

Les éprouvettes de PLA, quant à elles, ont été découpées en eau pure avec des buses de 0.12 mm de diamètre à 600 mm/min entre 4 feuilles de papier (2 de part et d'autre).

5.2. Colorimétrie

La mesure de la couleur des films a été réalisée en utilisant un colorimètre Minolta CM, CR-210 (Minolta, Colombes, France) paramétré dans le système colorimétrique CIELab. Les valeurs représentées sont la moyenne des mesures réalisées en triplicat à différents endroits choisis aléatoirement sur chaque échantillon. Pour un temps de vieillissement donné, 3 films ont été testés afin de garantir la répétabilité des mesures.

Pour représenter la variation de couleur au cours du vieillissement, le paramètre ΔE , représentant l'écart de teinte entre deux échantillons, a été calculé tel que présenté dans l'Équation 4.

$$\Delta E = \sqrt{(L_t - L_{t_0})^2 + (a_t - a_{t_0})^2 + (b_t - b_{t_0})^2}$$

Équation 4: Calcul du paramètre ΔE pour représenter la variation de couleur entre différents échantillons dans l'espace colorimétrique CIELab

Dans l'Équation 4, le paramètre L^* représente la clarté, mesurée de 0 -noir- à 100 -blanc- . Le paramètre a^* se positionne sur un axe allant du vert (valeurs négatives de a^*) au rouge (valeurs positives de a^*). Le paramètre b^* se positionne quant à lui sur un axe allant du bleu (valeurs négatives de b^*) au jaune (valeurs positives de b^*). Les trois axes L^* , a^* et b^* se croise en un point 0 qui correspond au gris, tel que montré sur la Figure 18.

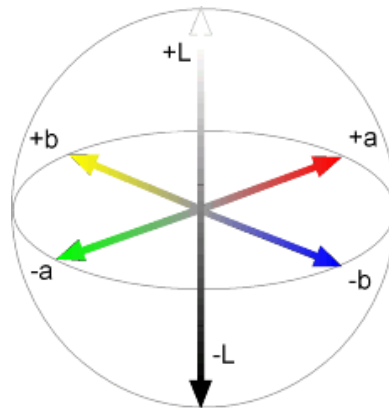


Figure 18: Espace colorimétrique CIE Lab

Nous l'avons évoqué, le paramètre ΔE permet d'obtenir une quantification de l'écart global de teinte entre deux échantillons. Concernant les résultats présentés ultérieurement, le ΔE a toujours été calculé entre l'échantillon référence non vieilli t_0 et un échantillon à un temps t de vieillissement.

Pour aller plus loin dans l'analyse colorimétrique de la couleur des films de biopolymères, on peut calculer l'index de jaunissement (YI) (Cao et al.) selon la norme ASTM D1925 comme décrit par l'Équation 5.

$$YI = \frac{100 \times (C_x X - C_x Z)}{Y}$$

Équation 5: Calcul de l'indice de jaunissement

On notera que le calcul de cet indice de jaunissement n'utilise pas les paramètres colorimétriques de l'espace CIE Lab mais les coordonnées X, Y et Z. On notera que les facteurs C_x et C_z dépendent de la nature de l'illuminant et de l'angle d'observation. Dans notre cas, pour un illuminant type lumière du jour D65 et un angle d'observation de 10° , les facteurs C_x et C_z sont de 1.3013 et 1.1498 respectivement.

6. Evaluation sensorielle

6.1. Analyse olfactive

6.1.1. Test de Robinson

L'analyse des propriétés olfactives des films de biopolymères testés a été réalisée selon le protocole du test de Robinson.

Ce test consiste à faire sentir au panéliste un échantillon référence puis un échantillon à tester. Le panéliste doit ensuite quantifier la différence d'odeur perçue sur une échelle de 0 à 4 selon les critères exposés dans le protocole ci-après.

Le film référence ainsi que le film testé sont placés dans un pot en verre fermé hermétiquement par un joint en Téflon[®], matériau qui a la propriété d'être à la fois étanche et inerte olfactivement, n'interférant donc pas avec l'odeur du matériau à tester.

Les pots en verre sont entreposés pendant 1h à 40°C (ils peuvent également être laissés à température ambiante pendant 24h). Après une heure à 40°C et environ 15 minutes à température ambiante, le test peut être réalisé tel que décrit ci-après.

« Vous avez devant vous 2 bocaux en verre. L'un est considéré comme le témoin et est annoté T et le second est l'échantillon annoté E.

- 1) Ouvrir le bocal témoin T et le sentir. Refermer immédiatement après le flairage.
- 2) Attendre 30 secondes
- 3) Ouvrir le bocal échantillon E et le sentir. Refermer immédiatement après le flairage.

Il s'agit de qualifier la différence perçue entre le témoin et l'échantillon selon l'échelle proposée ci-après. »

0= aucune différence

1= différence avec le témoin difficilement perceptible

2= légère différence avec le témoin (à peine définissable)

3= différence significative avec le témoin

4= différence forte avec le témoin

Ce test, de réalisation rapide et facile d'accès pour les panélistes est largement utilisé dans l'industrie des matériaux d'emballage, et ce à divers usages : détecter une odeur de solvant résiduelle, une odeur de colle (matériaux multicouches), vérifier la qualité de la production, vérifier l'influence d'un nouveau process...

6.1.2. Nez électronique

Un "nez électronique" de type Heracles II (Alpha MOS, Toulouse, France) a été utilisé pour mettre en évidence et caractériser les off-flavours libérés lors du chauffage des polymères. Ce système consiste en une chromatographie en phase gazeuse à double colonnes. La phase mobile est de l'hydrogène de qualité analytique.

Pour l'analyse, un film coupé en morceaux (soit une masse de 0.30 g) a été scellé hermétiquement dans un Vial et chauffé à 40°C pendant une heure pour permettre la volatilisation et la libération dans l'espace de tête du Vial des composés volatiles. 1mL d'espace de tête a été injecté via une seringue dans le détecteur de l'appareil. Se produit alors une évaporation éclair permettant la libération des composés. Ces derniers vont alors passer au travers d'un système de trap absorbant où ils sont piégés et concentrés, puis injectés successivement dans deux colonnes capillaires courtes (2m chacune). La première colonne - DB5- est apolaire alors que la seconde -DB1701- est de polarité moyenne. Deux détecteurs à ionisation de flamme (en anglais FID - Flame Ionization Detectors -) travaillent en parallèle, permettant d'obtenir deux chromatogrammes grâce au logiciel Heracles. C'est le croisement

d'informations de ces deux colonnes, couplé à une base de données chimique, qui va permettre une identification plus pointue des composés volatiles libérés.

6.2. Analyse visio-tactile

6.2.1. Contexte et outil SensoTact®

Pour cette étude, nous avons utilisés un outil mis au point par l'Ecole Nationale Supérieure de Mécanique et des Microtechniques (ENSM) : le SensoTact®. Cet outil, permet d'évaluer la sensation tactile de la surface d'un matériau. Mis au point au départ pour l'industrie automobile afin de caractériser le toucher des matériaux plastiques de l'habitacle automobile, le SensoTact® est applicable à de nombreux autres domaines comme celui de l'agroalimentaire, de la cosmétique, mais également du textile.

L'outil se compose de dix descripteurs pour caractériser la sensation tactile. A chaque descripteur est associé un type de geste exploratoire. Pour décrire la sensation thermique du matériau, on utilise un geste statique. Un mouvement orthogonal est utilisé pour les descripteurs que sont le collant, la dureté, la nervosité et l'effet mémoire. Enfin, un mouvement tangentiel permet de décrire le bloquant, le glissant, le relief, le râpeux et le fibreux.

Pour chaque descripteur, une échelle ordonnée de 8 cases permet au panéliste de positionner l'intensité de la sensation perçue tel que présenté en Figure 19



Figure 19 : Echelle tactile ordonnée de l'outil SensoTact® pour le descripteur collant

Concernant l'interaction entre le toucher et la vision, une étude ([Whitaker et al., 2008](#)) a été effectuée afin de montrer le lien de dépendance entre le toucher et la vision pour la perception de la texture. Cette étude montre que la texture d'un objet est d'abord envisagée et estimée

visuellement par sa forme et sa couleur par exemple. Le toucher intervient ensuite et permet de préciser les premières impressions, pour décrire les propriétés de surface de l'objet. De plus, dans des expériences conduites par (Lederman et al., 1986) il a été montré que dans l'évaluation de la densité spatiale des éléments d'une surface, la vision dominait le toucher, alors que le toucher domine la vision dans l'évaluation des propriétés de surface comme la rugosité.

Au niveau cérébral le lien entre la vision et le toucher a été démontré par (Stein and Meredith, 1993). En effet, dans une partie du cerveau appelée colliculus supérieur sont organisées les représentations visuelles et tactiles. Une grande partie des neurones des cartes sensorielles de la vision et du toucher du colliculus supérieur est multisensorielle : des stimuli visuels et tactiles y sont détectés. C'est pourquoi la vision et le toucher sont considérés comme une carte multisensorielle unique et intégrée et sont deux sens complémentaires dans la description d'un objet (Pasquinelli, 2003).

Dans l'idée de mettre au point un outil innovant de caractérisation des modifications structurales tout en vérifiant l'acceptabilité des biopolymères vieillissants dans le cadre de leur utilisation comme matériaux d'emballage, nous avons souhaité réaliser l'analyse visio-tactile de nos films. Concrètement, il s'agit de vérifier si le vieillissement des films étudiés est perceptible visuellement et tactilement. Il s'agit ensuite de montrer, si elle existe, l'influence de la vue sur la perception tactile.

Un panel de 69 jurys volontaires a été recruté pour ces séances. Les séances ont eu lieu dans une salle d'analyse sensorielle, dédiée à cet effet, et conçue selon les exigences de la norme ISO 8589:2007 concernant les directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse sensorielle.

6.2.2. Choix des échantillons

Trois sessions de test ont été utilisées pour qu'à chaque session corresponde un seul type de film testé. Pour chaque biopolymère (HPMC, Chitosan et PLA), 3 films ont été testés à différents temps de traitement micro-onde (0, 8 et 15minutes). Ces temps ont été choisis car ils correspondent à des temps réalistes d'utilisation domestique du micro-onde tout en provoquant sur le film des modifications qui nous paraissaient sensibles en terme de transparence, d'aspect et de rugosité de surface par exemple.

6.2.3. Choix des descripteurs

Le nombre de descripteurs est fonction de la durée de la séance, en effet, une séance d'analyse sensorielle ne doit pas être longue pour permettre une participation des panélistes efficaces sans fatigue sensorielle. C'est pourquoi trois descripteurs ont été choisis pour analyser les différents films.

Parmi les descripteurs tactiles, trois descripteurs ont été choisis: le glissant, le collant et la rigidité. Le glissant décrit la facilité à déplacer son doigt sur le matériau, le collant décrit la capacité d'adhérence du doigt sur le matériau et la rigidité décrit la résistance du matériau à la flexion.

Avant les séances d'évaluation à proprement parler, les panélistes ont été familiarisés et entraînés sur l'outil SensoTact et en particulier, sur les descripteurs choisis pour notre étude.

Le caractère « **glissant** » du film décrit la facilité à déplacer son doigt sur le matériau en suivant un mouvement tangentiel avec l'index.

Le caractère « **collant** » décrit la capacité d'adhérence du doigt sur le matériau, jugé grâce à un mouvement orthogonal au film.

Enfin, la « **rigidité** » décrit la capacité du matériau à résister à un mouvement de flexion.

Les mouvements tangentiel et orthogonal sont décrits sur la Figure 20.

Concernant l'évaluation de la rigidité, on a demandé aux panélistes de réaliser une flexion modérée du film testé tenu dans chaque main entre le pouce et l'index.

Avant chaque séance, les panélistes ont également été invités à se laver les mains pour que rien ne puisse perturber leur perception tactile des films.

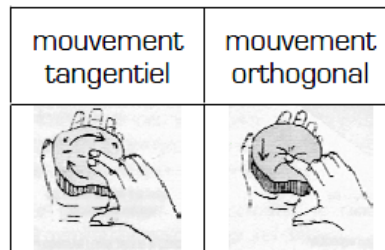


Figure 20 : Mouvements exploratoires tangentiel et orthogonal utilisés dans l'évaluation tactile des films selon la méthode SensoTact®

La préparation des séances d'analyse sensorielle (codages des échantillons, plan de présentation des échantillons, questionnaires d'évaluation...) a été réalisée sur l'outil informatique Fizz.

6.2.4. Traitement statistique

Pour chaque descripteur, les panélistes ont été invités à classer les échantillons de films en rang 1, 2 ou 3 par ordre d'intensité du descripteur ($1 < 2 < 3$).

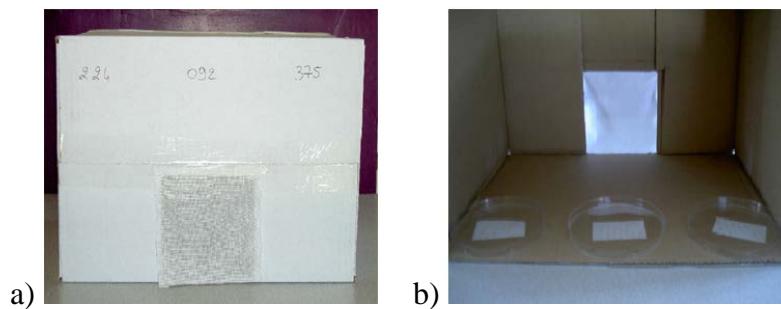
On utilise donc le test de Friedman, test non paramétrique utilisé pour la comparaison de k échantillons appariés. Dans notre cas, $k=3$ correspondant aux trois temps de traitement micro-ondes testés (0, 8 et 15 minutes). Les échantillons sont appariés puisque le test est organisé par type de biopolymère. On considère un degré de liberté (ddl) égal à $k-1$ soit un $ddl=2$ dans notre cas. Le traitement statistique a été effectué grâce au logiciel XLSTAT.

6.2.5. Organisation de la séance

Les échantillons ont été codés par un nombre à 3 chiffres et proposés aux panélistes selon un plan de présentation qui suit un double carré latin.

Au début des séances, tous les participants ont été invités à se laver et se sécher les mains afin de ne pas contaminer les films (mains humides, grasses ou collantes) et de permettre une évaluation tactile optimale.

Une boîte de présentation a été conçue (Figure 21) pour permettre à chaque panéliste d'évaluer les films en aveugle, c'est-à-dire pour la première partie de la séance, l'évaluation tactile pure.



*Figure 21 : Boîte de présentation pour l'analyse visio-tactile des films de biopolymères
a) côté panéliste b) côté expérimentateur*

La deuxième partie de la séance consiste en l'évaluation visuelle des films placés sur fond blanc, et enfin, la troisième et dernière étape consiste en une analyse visio-tactile où les panélistes sont libres d'explorer et d'ordonner les films en utilisant la vue et le toucher.

Résultats et Discussion

1. Influence du vieillissement accéléré sur des films de Biopolymères

1.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous évoquerons les conséquences du vieillissement accéléré sur les films de biopolymères. Nous testerons l'HPMC, le chitosan et le PLA dans différentes conditions de vieillissement, en testant notamment l'influence de la température.

Pour ce type de méthode de vieillissement, nous nous sommes intéressés à des températures inférieures à 50°C (30, 40 et 50°C), donc en dessous des températures de transition vitreuse des matériaux considérés. En effet, nous cherchons ici à montrer les conséquences d'un vieillissement sur du moyen et long terme, pour mimer par exemple, l'évolution des polymères au cours de leur stockage. Il s'agit de montrer l'évolution naturelle du polymère, en dehors des processus de mise en œuvre plus agressifs à plus haute température.

En effet, dans le cadre d'une utilisation industrielle, il est important que le matériau possède une certaine stabilité intrinsèque afin de garantir une constance de performance en termes de propriétés mécaniques ou barrières, comme une certaine inertie vis à vis d'un éventuel contact alimentaire pour des emballages alimentaires (relargage de monomères susceptibles de migrer vers l'aliment..).

1.2. Vieillissement de films d'HPMC en enceinte climatique

Des films d'HPMC d'une épaisseur de $48 \pm 2 \mu\text{m}$ ont été entreposés pour vieillissement dans une enceinte climatique régulée à 40°C, 50% d'humidité relative et dans l'obscurité. Le vieillissement s'est poursuivi pendant une durée totale de 6 mois et des échantillons ont été régulièrement prélevés pour analyse.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence, si elles existent, les modifications subies par l'HPMC au cours de plusieurs mois de vieillissement. Cela permet d'accéder à des informations nouvelles qui aideront à déterminer l'opportunité d'utiliser ce type de matériau pour des applications en packaging par exemple.

1.2.1. Suivi de la couleur des films au cours du vieillissement

La couleur des films a été suivie au cours du vieillissement. Les résultats des mesures L^* , a^* et b^* sont présentés en Figure 22 et Figure 23.

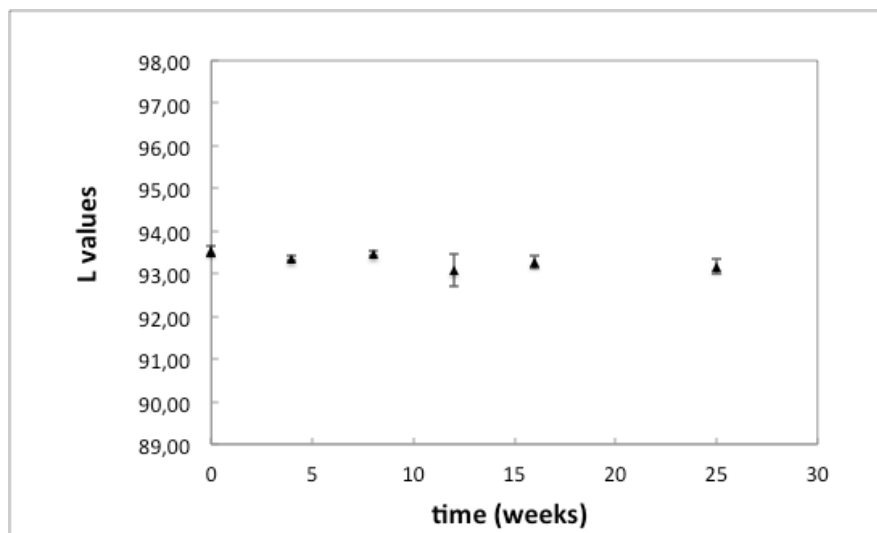


Figure 22 : Evolution du paramètre colorimétrique L^* des films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C/50%RH/obscurité)

La Figure 22 montre que le paramètre L^* reste constant au cours du vieillissement. En effet, le film d'HPMC initial est incolore et transparent ce qui explique une valeur élevée du paramètre L . Ce paramètre est préservé lors du vieillissement.

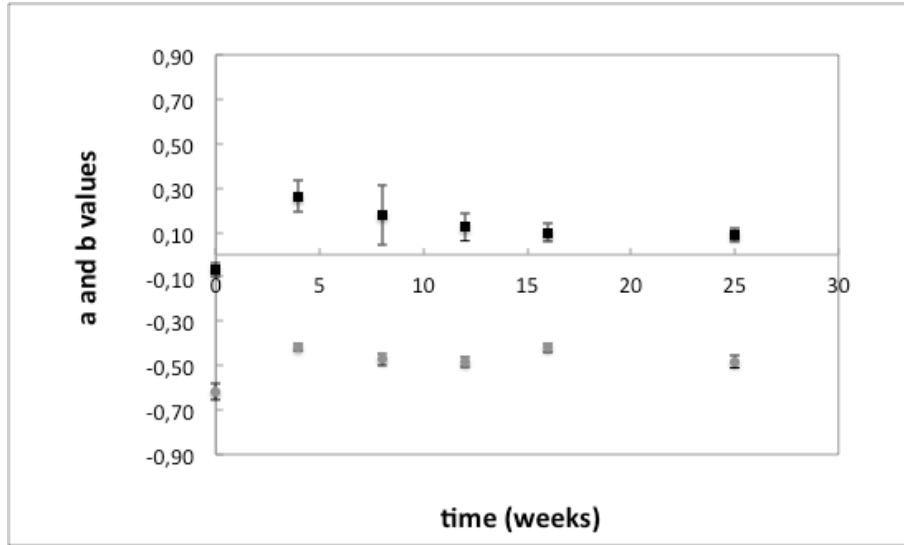


Figure 23 : Evolution des paramètres colorimétriques a (en gris) et b (en noir) des films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C/50%RH/obscurité)

Les valeurs a^* (axe vert-rouge) et b^* (axe bleu-jaune) sont également peu sensibles au vieillissement. Nous ne détectons pas de changement de couleur, de jaunissement par exemple, du film.

Cette mesure quantitative permet d'objectiver l'observation macroscopique des films, dont la couleur ne paraît effectivement pas altérée au cours de ces semaines de vieillissement.

En effet, les paramètres L^* , a^* et b^* restent stables au cours du vieillissement. Cela signifie par exemple qu'on n'observe pas de jaunissement du film par exemple. Cela contribue à la fois à rendre le matériau acceptable pour une utilisation sur du moyen terme, mais cela présage aussi d'une certaine stabilité structurale. En effet, le changement de couleur d'un film peut être un élément diagnostique de modifications importantes, comme par exemple la production de composés néoformés potentiellement néfastes pour une utilisation en packaging alimentaire.

1.2.2. Suivi de la structure du polymère par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

Le spectre obtenu par mesure spectroscopie infrarouge des films d'HPMC au cours de leur vieillissement permet d'approcher les modifications structurales du film au cours du temps.

1.1 Vieillissement de films d'HPMC en enceinte climatique

La Table 2 permet d'identifier les pics d'intérêt en spectroscopie infra-rouge pour l'HPMC.

Table 2: Analyse des groupements fonctionnels de l'HPMC tel que décrit par (Subhashree et al., 2011) en FTIR

Nombre d'onde théorique (en cm^{-1})	Nombre d'onde observé sur mes films (en cm^{-1})	Groupes impliqués
3500-3400	3437	Hydroxyle
2900	2900	Méthyl et Hydroxypropyl
1650-1600	1643	Cycle à 6 carbones
1500-1450	1454	Méthyl dans CH_3O
1100-1000	1053	C-O-C
1000-950	945	Cycle pyranose

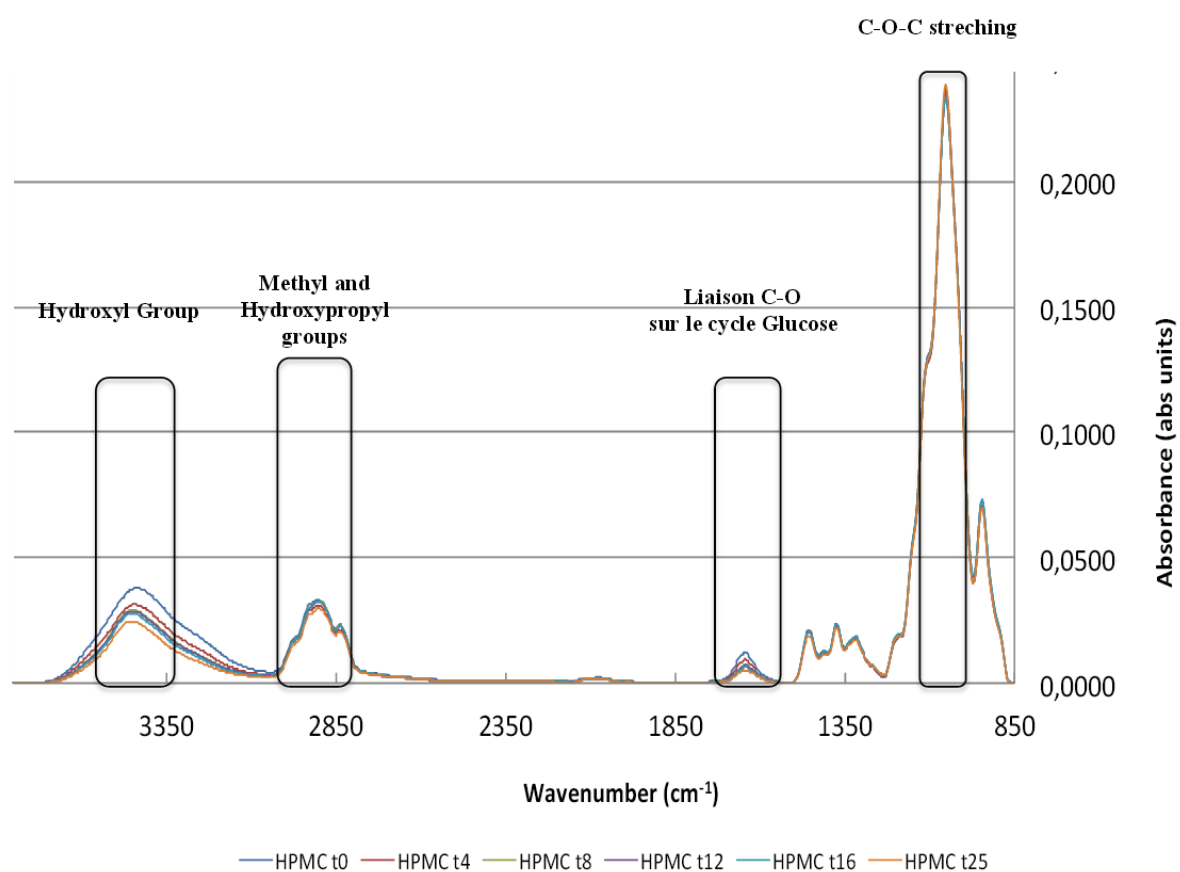


Figure 24 : Spectres infra-rouges des films d'HPMC soumis à différents temps de vieillissement en enceinte climatique (de 0 à 25 semaines) à 40°C et 50%HR

La Figure 24 donne une vue d'ensemble du spectre FTIR des films d'HPMC ainsi que des zones d'intérêt. On constate sur cette figure que certaines zones sont modifiées au cours du vieillissement. Comme nous le verrons dans la suite de l'étude, certaines modifications sont plus discrètes et méritent une visualisation plus précise des spectres pour être mis en évidence.

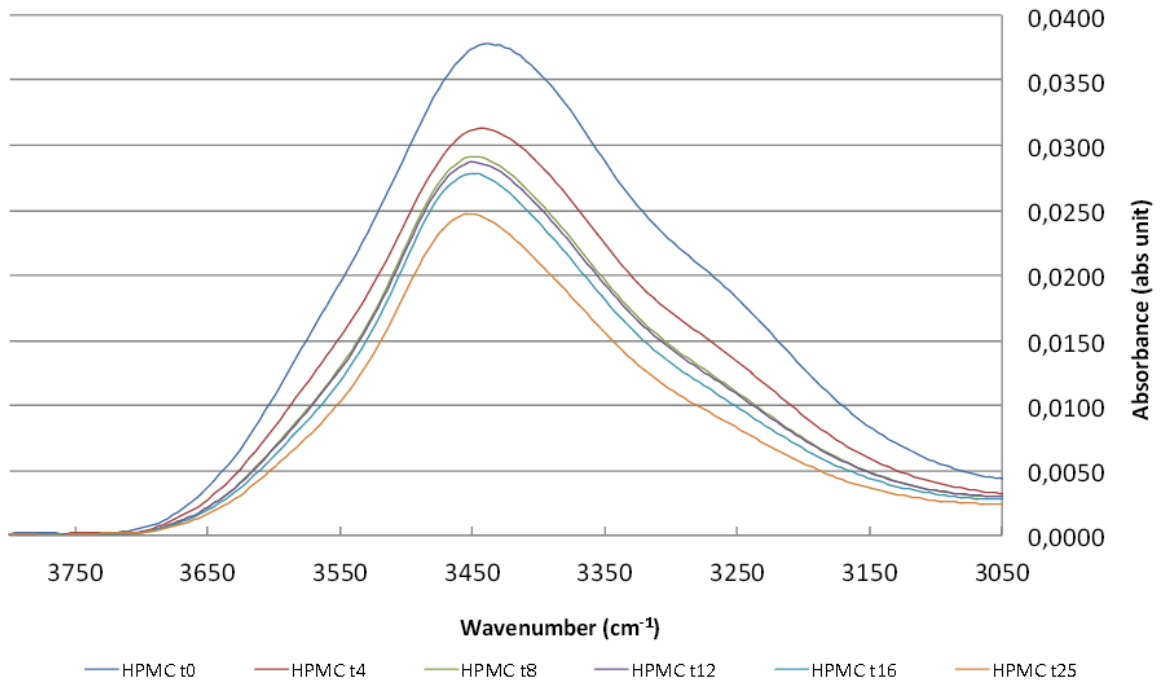


Figure 25 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 3440 cm⁻¹

La Figure 25 permet l'observation de la zone 3050 à 3750 cm⁻¹. Ce pic est généralement attribué à la vibration de la liaison O-H, notamment celle de la molécule d'eau. L'observation de ce pic peut ainsi rendre compte du niveau d'hydratation de notre film au cours du traitement.

Ce pic décroît en intensité au cours du temps, signant une perte en eau du film au cours du vieillissement, ce qui est un résultat attendu lors d'un stockage à 40°C comme c'est le cas ici.

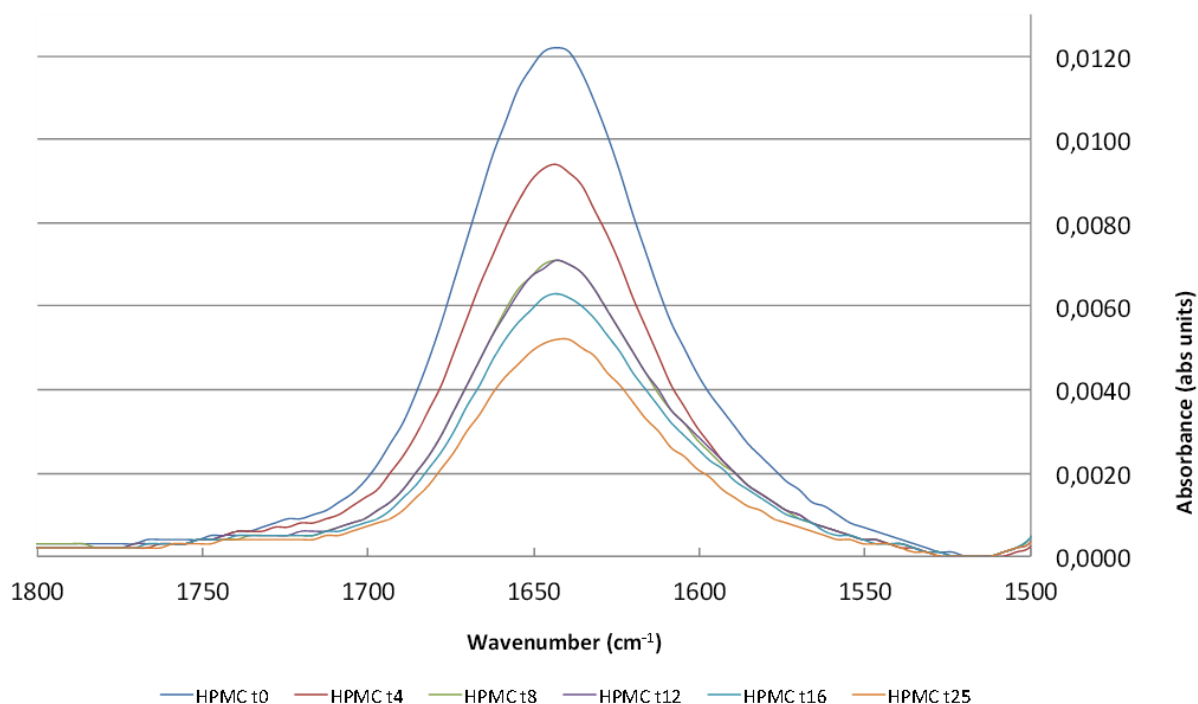


Figure 26 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 1643 cm⁻¹

La Figure 26 présente un agrandissement de la zone 1500 à 1800 cm⁻¹ centrée sur le pic à 1643 cm⁻¹. On constate que l'intensité de ce pic décroît au cours du vieillissement des films. Ce pic est attribué à la vibration de la liaison C-O des cycles à 6 carbones, en l'occurrence les unités glucoses de l'HPMC dans notre cas. La diminution de l'intensité de vibration de cette liaison est en faveur d'une possible rétractation des unités osidiques, possiblement due à un encombrement stérique dans l'environnement proche. Cet encombrement stérique pourrait être expliqué par des phénomènes locaux de cristallisation de l'HPMC, créant des phénomènes de tension locale et limitant la mobilité des chaînes polymériques de la phase amorphe.

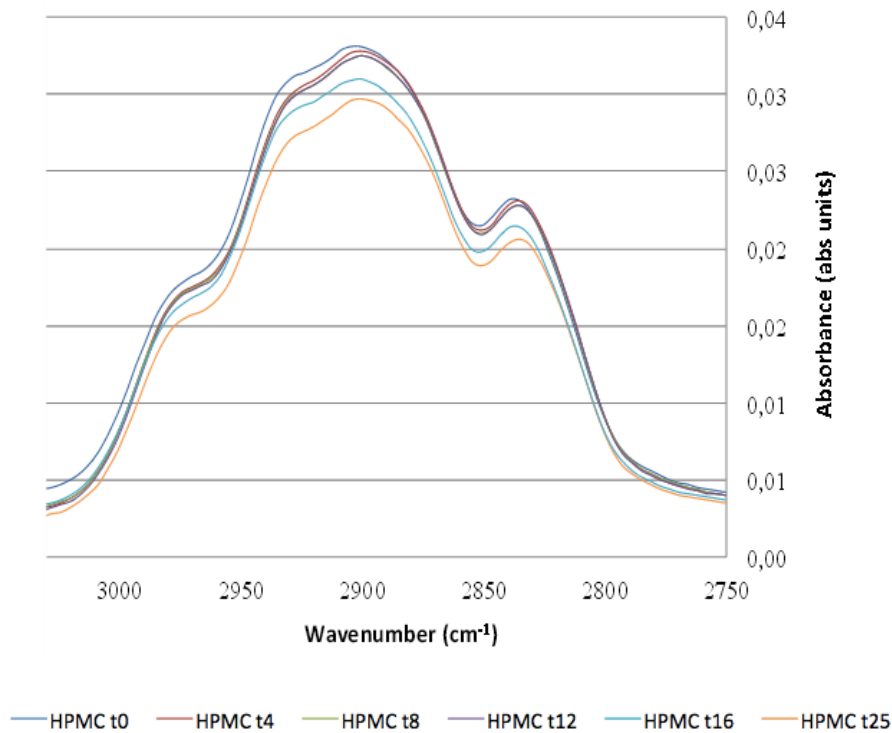


Figure 27 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 2900 cm⁻¹

La Figure 27 permet de visualiser la zone des spectres concernant les groupements méthyles et hydroxypropyles de l'HPMC. On constate une diminution sensible des vibrations concernées, notamment après 16 et 25 semaines de traitement, laissant supposer une perte de ces groupements substitués sur la chaîne principale lors du vieillissement. On notera toutefois que si ces phénomènes sont visibles, ils restent d'intensité très modérée.

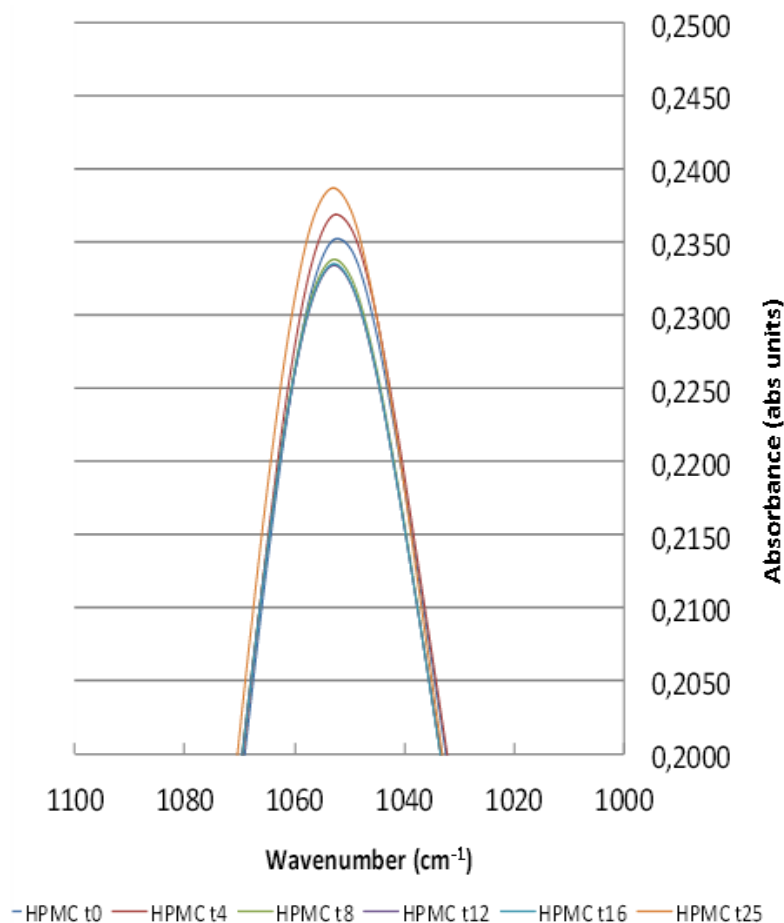


Figure 28 : Spectre FTIR de films d'HPMC de 0 à 25 semaines stockées à 40°C et 50% RH, zoom sur le pic à 1053 cm⁻¹

Enfin, la Figure 28 permet l'observation du pic centré à 1053 cm⁻¹ qui est caractéristique de la liaison C-O-C entre les unités osidiques de l'HPMC. Ici, on remarque des différences, mais très faibles, non significatives et ne suivant pas la cinétique de vieillissement. Ces variations ne permettent pas de tirer de conclusion. On peut estimer que dans les conditions testées, le vieillissement n'atteint pas cette liaison.

1.2.3. Suivi des paramètres thermiques par calorimétrie différentielle à balayage

La Figure 29 montre l'allure générale d'un thermogramme obtenu par la méthode DSC pour un film d'HPMC. Le thermogramme présente 3 courbes représentant les 3 phases de montée/descente/montée en température de l'échantillon au sein de l'équipement DSC.

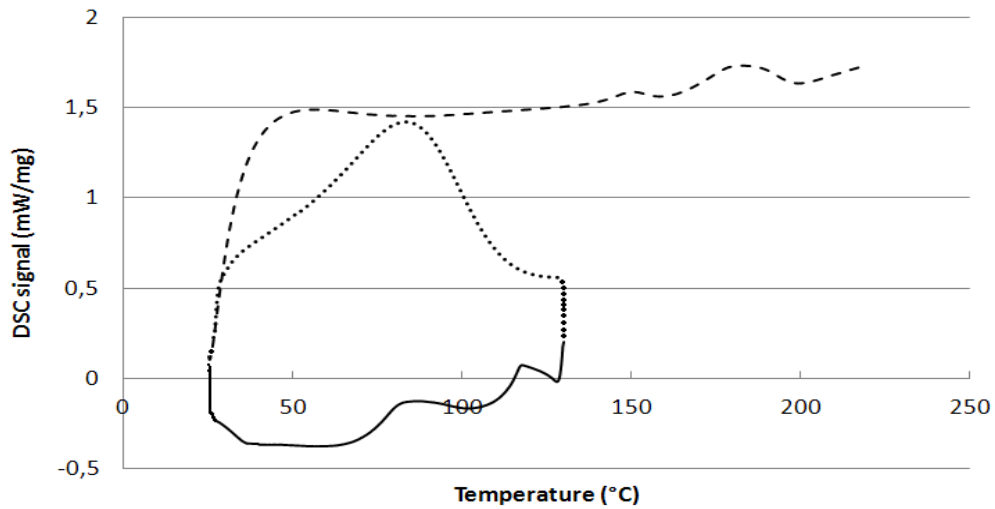


Figure 29 : Thermogramme DSC obtenu à partir d'un film d'HPMC

..... First heating — Cooling - - - Second heating

La troisième courbe correspondant à la 2^{ème} montée en température permet d'observer deux évènements de type endothermique. Le flux de chaleur ici présenté sur l'axe des ordonnées est présenté par valeurs croissantes, signifie qu'un pic orienté vers le haut représente un événement endothermique (transition vitreuse, fusion) alors qu'un pic vers le bas représente un événement exothermique (cristallisation)

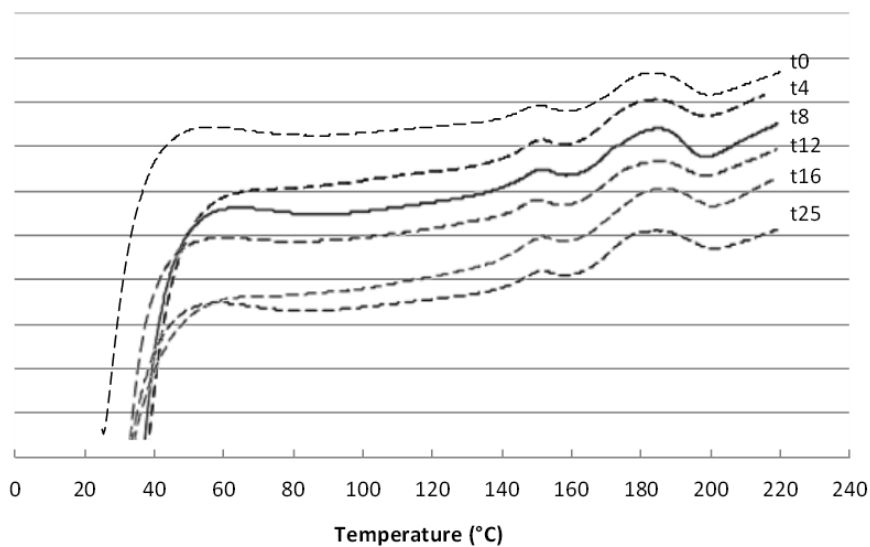


Figure 30 : Thermogrammes obtenus lors de la seconde montée en température pour les films d'HPMC vieillis de 0 à 25 semaines à 40°C, 50% d'Humidité Relative et dans l'obscurité en enceinte climatique

1.1 Vieillissement de films d'HPMC en enceinte climatique

La Figure 30 présente les courbes de thermogrammes obtenues lors de la seconde montée en température pour les films d'HPMC au cours de leur vieillissement en enceinte climatique en conditions contrôlées de température (40°C), d'humidité relative (50%) et dans l'obscurité. On constate que le vieillissement ne modifie pas l'allure des thermogrammes au cours des semaines et que les températures de transition vitreuses et de fusion ne semblent pas affectées.

Table 3 : Evolution de la température de transition vitreuse (Tg), de fusion (Tm) et de cristallisation (Tc) de films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique (40°C, 50%RH et obscurité)

Temps de vieillissement (semaines)	Tg (°C)	Tm (°C)	Tc (°C)
0	154 ± 1	183 ± 1	128 ± 1
4	155 ± 2	183 ± 1	127 ± 1
8	154 ± 1	184 ± 1	129 ± 0
12	154 ± 1	182 ± 0	128 ± 1
16	155 ± 2	181 ± 2	126 ± 2
25	155 ± 1	181 ± 1	127 ± 0

La Table 3 présente les valeurs des évènements notables sur les thermogrammes des films d'HPMC au cours du vieillissement et confirme les observations des courbes présentées en Figure 30. Comme on le constate, les valeurs de température de transition vitreuse, de température de fusion et de cristallisation (155 ± 1°C, 182 ± 1°C et 128 ± 1°C respectivement) restent stables au cours du traitement. Le vieillissement n'affecte donc pas les paramètres thermiques de l'HPMC. Ce résultat était attendu, considérant les faibles variations structurales mises en évidence dans l'analyse en FTIR précédemment exposée. Ces paramètres thermiques, outre le fait qu'ils représentent l'état structural du polymère, sont d'une importance cruciale pour sa mise en œuvre dans un procédé industriel par exemple. On constate ici que l'HPMC est stable au cours du vieillissement ce qui est un argument favorable pour son emploi en industrie.

1.2.4. Evaluation des phases amorphe / cristalline par diffraction aux rayons X

La méthode de diffraction aux rayons X permet de mettre en évidence la phase amorphe et la phase cristalline d'un polymère. Nous l'avons évoqué précédemment, cette répartition de phase amorphe et cristalline au sein du polymère conditionne beaucoup ses propriétés et donc ses usages.

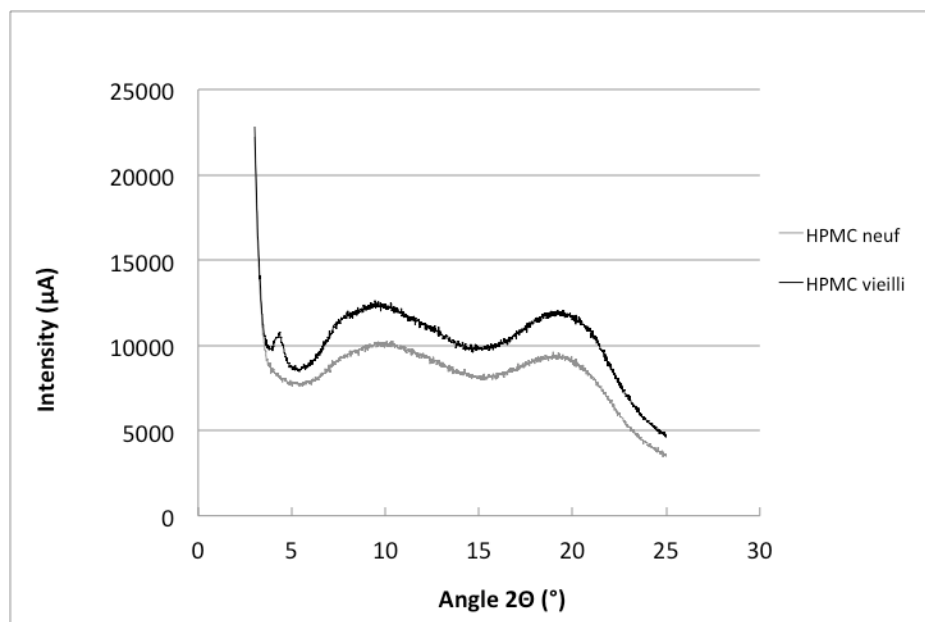


Figure 31 : Diffractogramme aux rayons X d'un film d'HPMC neuf comparé à un film d'HPMC vieilli pendant 6 mois en enceinte climatique à 40°C et 50%RH

La Figure 31 présente les diffractogrammes obtenus pour deux échantillons de films d'HPMC. Le premier est un film d'HPMC dit neuf, c'est à dire juste après sa production et son équilibrage en humidité relative. Le second est celui d'un film d'HPMC dit vieilli qui a subi un vieillissement en enceinte climatique à 40°C et 50% d'humidité relative, dans l'obscurité, pendant une durée de 6 mois. Si les allures globales des diffractogrammes sont semblables, on note toutefois un pic plus marqué sur l'échantillon d'HPMC vieilli, signant la présence d'une zone cristalline sur cet échantillon que l'on ne retrouve pas sur le film à l'état neuf. Cette observation est cohérente avec l'hypothèse posée suite aux résultats de l'analyse

infrarouge, qui laissait supposer des phénomènes de cristallisation qui engendraient un encombrement stérique.

1.2.5. Observation de la surface des films par Microscopie Electronique à Balayage

Pour confirmer les résultats obtenus en DRX, nous avons procédé à l'étude de surface des films d'HPMC avant, à l'état initial, et après vieillissement (6 mois en enceinte climatique).

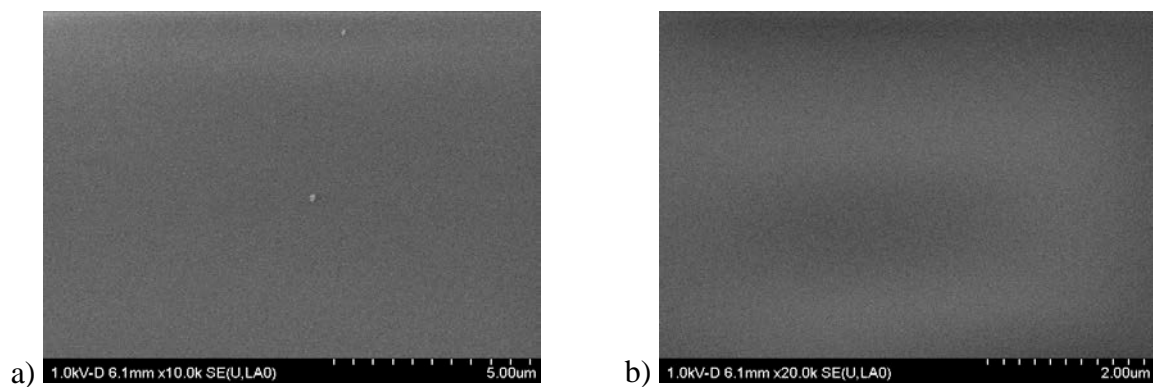


Figure 32 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de films d'HPMC neufs, grossissements a) X 10000 et b) X 20000

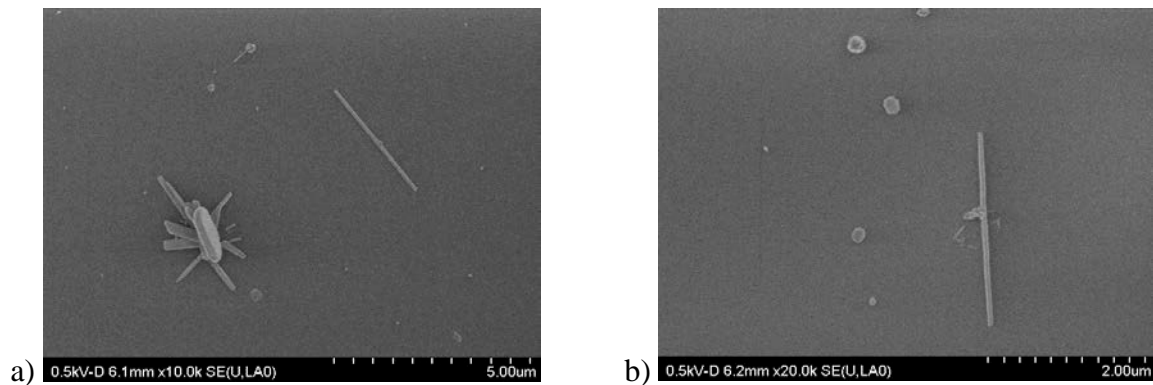


Figure 33 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de films d'HPMC vieillis 6 mois en enceinte climatique (40°C, 50%RH et dans l'obscurité), grossissements a) X 10000 et b) X 20000

Les images de microscopie présentées en Figure 32 montrent la surface des films d'HPMC à l'état neuf, et ce, à différents grossissements (X 10000 et X 20000). Ces images sont conformes à l'ensemble de la surface du film qui a été balayée. La surface est lisse, sans

irrégularité, sans particularité ni élément notable. Cela permet de constater que le procédé de fabrication de nos films est performant et permet l'obtention de films homogènes par casting. La Figure 33 montre la surface d'un film d'HPMC qui a subi un vieillissement accéléré en enceinte climatique à 40°C et 50% d'humidité relative pendant 6 mois, à des grossissements semblables aux images de films neufs. La surface montre des éléments corpusculaires ronds dispersés sur la surface du film. Ces inclusions ont parfois été le point d'initiation de phénomènes de cristallisation bien visibles sur la Figure 33.

Deux types de cristaux sont visibles à la surface des films vieillis. Des cristaux de structure assez élaborée, composés de plusieurs feuillets assemblés, mais aussi des cristaux en forme de bâtonnets. Cette structure fibrillaire n'est pas sans rappeler les whiskers de cellulose, forme cristalline fibrillaire de cellulose, d'échelle nanométrique et qui bénéficie d'un intérêt croissant pour ses propriétés utilisées dans le domaine des nanocomposites (Favier et al., 1995) La plupart des études reportées dans la littérature font référence aux nanocristaux de cellulose, bien que des nanocristaux polysaccharides puissent également être obtenus à partir de chitine (Paillet and Dufresne, 2001, Gopalan Nair et al., 2003) ou d'amidon (Wang et al., 2010).

1.2.6. Essais de traction

Les résultats des essais de traction réalisés sur les films d'HPMC au cours du vieillissement en enceinte climatique à 40°C et 50% d'Humidité relative sont présentés en Figure 34 par le suivi du module d'Young au cours des semaines du temps. Ce paramètre permet une appréciation de la rigidité du matériau testé, en particulier au niveau de son élasticité, de sa capacité de résistance à la contrainte. Il est obtenu graphiquement sur le diagramme contrainte-déformation du matériau. La pente de la phase linéaire dite « élastique » donne la valeur du module d'Young.

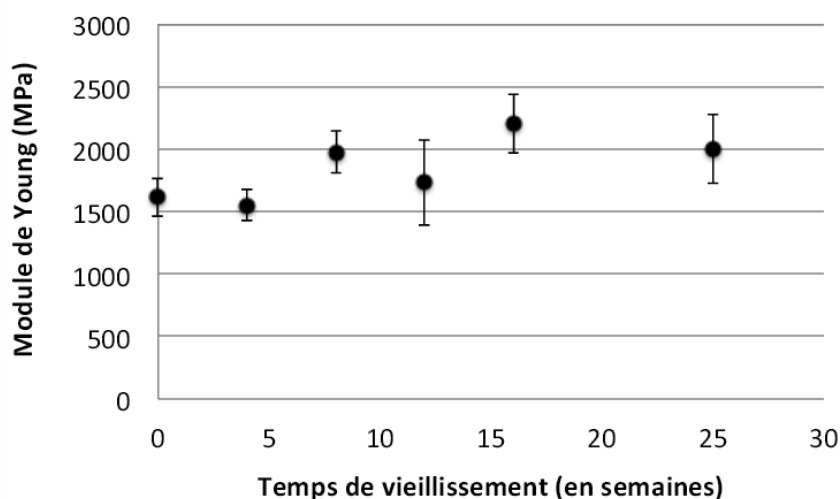


Figure 34 : Module de Young de films d'HPMC au cours du vieillissement de 0 à 25 semaines à 40°C 50% d'Humidité relative et dans l'obscurité

Ici, le module d'Young montre une tendance à l'augmentation au cours du vieillissement. Cette augmentation est en faveur d'une perte des propriétés mécaniques des films d'HPMC au cours des semaines de stockage en enceinte climatique. Cette analyse est en accord avec les observations décrites précédemment. En effet, les phénomènes décrits en FTIR comme la cristallisation des films d'HPMC mise en évidence par microscopie et diffraction des rayons X, et la perte en eau des films sont autant d'éléments qui concourent à la baisse des performances mécaniques des films d'HPMC, les rendant plus rigides.

Toutefois, si ces conclusions sont à pondérer par la discussion sur la méthode des essais de traction employés. En effet, on constate sur la Figure 34 des écart-types élevés sur les valeurs de modules de Young, de l'ordre de plusieurs dizaines voire centaines de MPa. Ces écart-types ont été obtenus sur les répétitions des essais de tractions sur des films d'HPMC à un temps donné de vieillissement et sont attribuables à plusieurs facteurs. Parmi eux, on notera en particulier la forte influence du système de découpage manuel des éprouvettes, ainsi que la variabilité en humidité relative atmosphérique lors des essais.

1.2.7. Conclusions

Les films d'HPMC qui ont été entreposés plusieurs mois en enceinte climatique ont subi un vieillissement à 40°C et 50% d'humidité relative, ce qui correspond à un processus classique de vieillissement accéléré.

L'étude de ces films a permis de mettre en évidence des modifications structurales de ces films lors du stockage. En particulier, les films montrent des phénomènes de cristallisation très localisés, visibles en spectroscopie infrarouge comme en diffraction aux rayons X et qui ont été confirmés par l'observation de la surface des films en microscopie. Etant donné que les films sont conservés en dessous de leur transition vitreuse, ces phénomènes de cristallisation sont surprenants et pourraient être dus à une modification locale de l'humidité durant le stockage.

Ces modifications structurales ont des conséquences sur les propriétés des films d'HPMC. Ainsi, on a observé une diminution des qualités mécaniques des films au cours du vieillissement avec une augmentation du module d'Young (de 1614 pour un film neuf à 2005 MPa après 25 semaines de vieillissement). Cette diminution des propriétés mécaniques est attribuable, à la fois à la perte en eau des films, puisque l'eau joue un rôle de plastifiant, mais aussi aux phénomènes de cristallisation mis en évidence.

Les films d'HPMC se sont néanmoins montrés résistants aux conditions de vieillissement testées. Les modifications structurales mises en évidence sont toutefois limitées et ne sont pas suffisantes pour détériorer l'aspect ou les propriétés thermiques du matériau, ne remettant pas en cause son utilisation.

Les premiers résultats sont en faveur d'une certaine stabilité des films d'HPMC sous forme de films au cours du vieillissement, rendant ce matériau intéressant pour des fonctions d'emballage alimentaire, sous forme de films multicouches en association avec un autre matériau pour compenser le caractère hydrophile de l'HPMC.

1.3. Influence du temps et de la température de vieillissement sur la structure des films de biopolymères

Cette étude, menée sur des films d'HPMC, chitosan et PLA, vise à comprendre les modifications structurales mises en jeu lors du stockage des films dans différentes conditions de température et au cours du temps. Les films ont été entreposés dans un environnement contrôlé en humidité relative à une valeur de $A_w=0,53$ grâce à une solution saturée de Magnésium hexahydrate. Le vieillissement a été mesuré après 15, 30, 75 et 90 jours et 3 températures de stockage ont été testées (30, 40, $50^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'étuve en température contrôlée.

1.3.1. Films d'HPMC

Les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge FTIR présentés en Figure 35 concernent des films d'HPMC au cours du vieillissement (15, 30, 75 et 90 jours) à différentes températures (30, 40, 50°C).

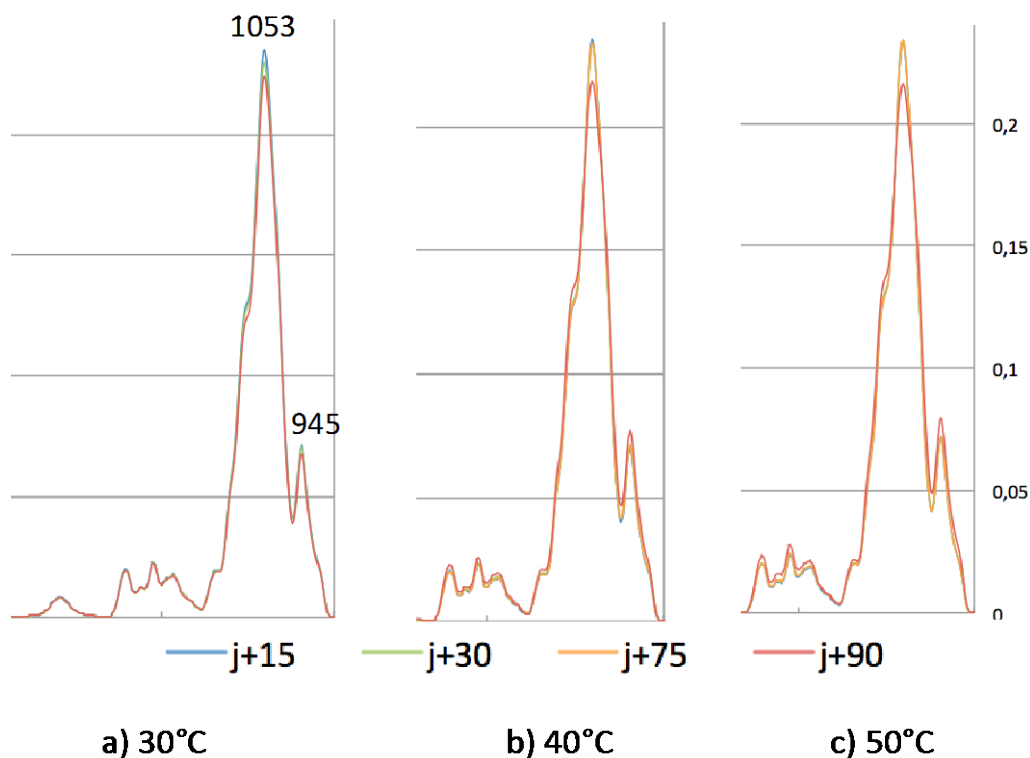


Figure 35 : Zoom sur la zone d'intérêt $850-1500\text{ cm}^{-1}$ des spectres FTIR obtenus pour des films d'HPMC stockés à $A_w=0,53$ à différentes températures a) 30°C , b) 40°C et c) 50°C pendant 15, 30, 75 et 90 jours

La Figure 35 permet d'observer le pic à 1053 cm^{-1} sur le thermogramme des films d'HPMC soumis à différents vieillissements. Ce pic représente la liaison C-O-C et est représentatif des phénomènes de dépolymérisation de l'HPMC. Ici, le pic diminue au cours du temps, ce qui signifie qu'il y a, au cours du vieillissement des phénomènes de rupture de chaînes..

On remarque que ce phénomène est amplifié par l'augmentation de la température. En effet, sur la Figure 35 a) à 30°C la diminution du pic se fait régulièrement au cours du temps après 15 à 90 jours de stockage. On observe une différence, fine mais présente, entre les films stockés pendant 15 jours, 30 à 75 jours et 90 jours.

En comparaison, sur la Figure 35 b) et la Figure 35 c) à 40°C et 50°C respectivement, l'intensité du pic reste constante que ce soit après 15, 30 ou 75 jours, puis diminue fortement après 90 jours de stockage. Ces observations semblent signifier qu'à plus hautes températures, le

phénomène de vieillissement ne devient visible qu'après 90 jours. On peut imaginer une réorganisation profonde du polymère à ces températures entre 75 et 90 jours.

Ces résultats sont toutefois à relativiser car les spectres infra-rouge présentent des modifications fines, attestant que si le matériau évolue en fonction du temps et de la température, il existe une certaine stabilité des films d'HPMC dans les conditions de vieillissement testés.

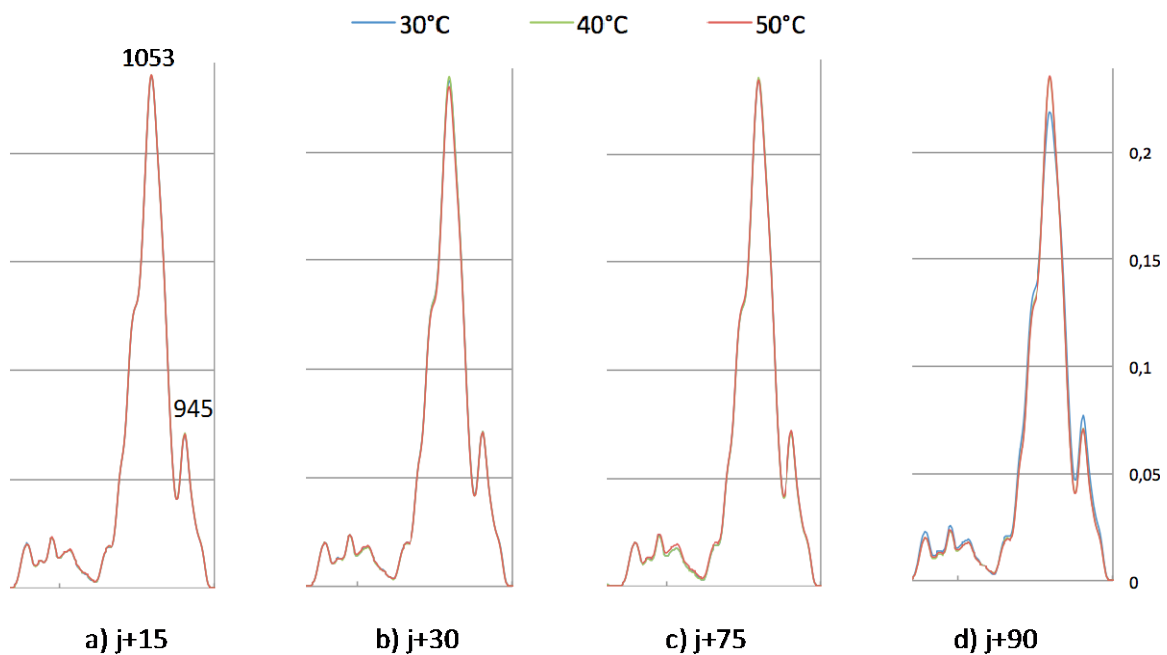


Figure 36 : Zoom sur la zone d'intérêt $850-1500\text{ cm}^{-1}$ des spectres FTIR obtenus pour des films d'HPMC stockés à $A_w=0,53$ pendant a) 15 jours b) 30 jours c) 75 jours et d) 90 jours à différentes températures (30, 40 et 50°C)

La Figure 36 présente les spectres obtenus par spectroscopie FTIR sur des films d'HPMC. On remarque sur la Figure 36 a) que les films d'HPMC, après 15 jours de stockage ne présentent pas de différence significative, qu'ils aient été stockés à 30, 40 ou 50°C , les spectres sont superposables. Il en est de même pour les films stockés pendant 30 ou 75 jours dans les mêmes conditions, dont les spectres sont présentés en Figure 36 b) et Figure 36 c).

1.2 Influence du temps et de la température de vieillissement

On observe une modification discrète mais significative du spectre FTIR sur la Figure 36 d). Sur cette figure, on constate en effet qu'après 90 jours de stockage, les films d'HPMC stockés à 50°C sont différents de ceux stockés à 30 ou 40°C. Pour ces films d'HPMC stockés pendant 90 jours à 50°C, on observe une diminution du pic à 1053 cm⁻¹, pic attribué à la vibration de groupements C-O-C dans le matériau. Cette observation est en faveur de phénomènes de rupture entre les chaînes polymériques, rendus possibles par un apport énergétique d'origine thermique pendant une période de temps prolongée.

La Figure 36 nous renseigne donc sur la stabilité des films d'HPMC au cours du stockage. La structure des films d'HPMC reste stable pour des températures de stockage modérées (30 à 40°C) au cours des 90 premiers jours. Il faudra une température d'au moins 50°C pendant une période prolongée pour voir apparaître des modifications structurales de l'HPMC.

1.3.2. Films de Chitosan

La même démarche a été effectuée sur des films de Chitosan, dans les mêmes conditions de vieillissement.

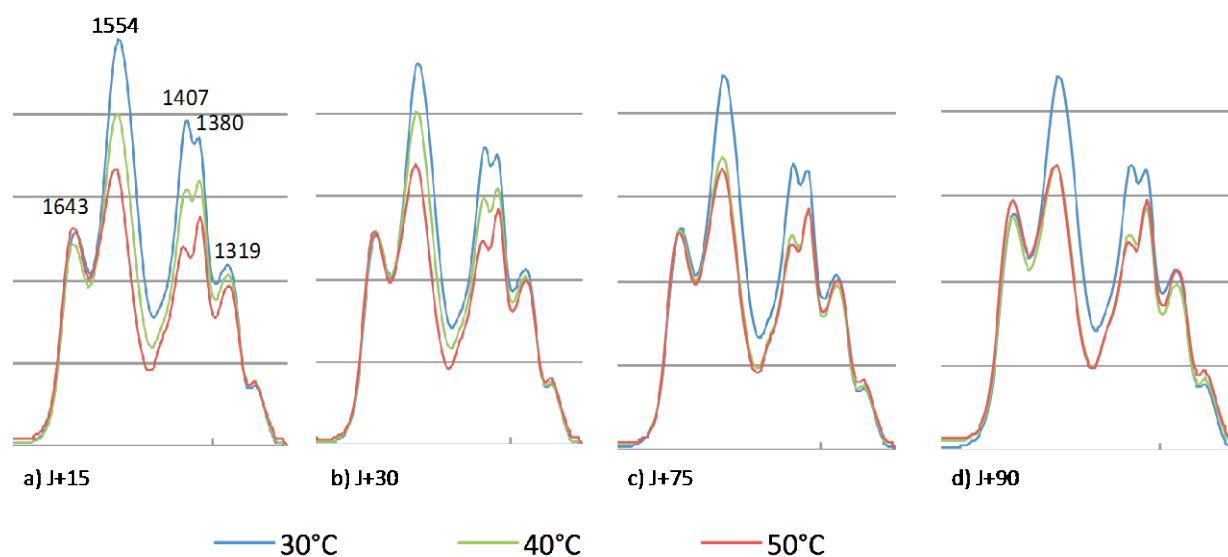


Figure 37 : Zoom sur la zone d'intérêt 1180-1720 cm⁻¹ des spectres FTIR obtenus pour des films de chitosan stockés à Aw=0,53 pendant a) 15 jours b) 30 jours c) 75 jours et d) 90 jours à différentes températures (30, 40 et 50°C)

La Figure 37 montre l'évolution des films de chitosan en fonction de la température de stockage. Les Figure 37a) à d) permettent de comparer l'influence du temps de vieillissement sur les films stockés à différentes températures.

Sur la Figure 37 a) on distingue nettement une modification du pic à 1554 cm^{-1} représentant la bande Amide II. Après 15 jours de vieillissement, l'intensité de vibration diminue régulièrement avec l'augmentation de la température de stockage. Le pic à 1407 cm^{-1} évolue de même et diminue au fur et à mesure que la température augmente. Ce pic est attribué à la vibration des groupements carboxylate -COO^- (Manjubala et al., 2006). Ces modifications signent des phénomènes de déacétylation du chitosan.

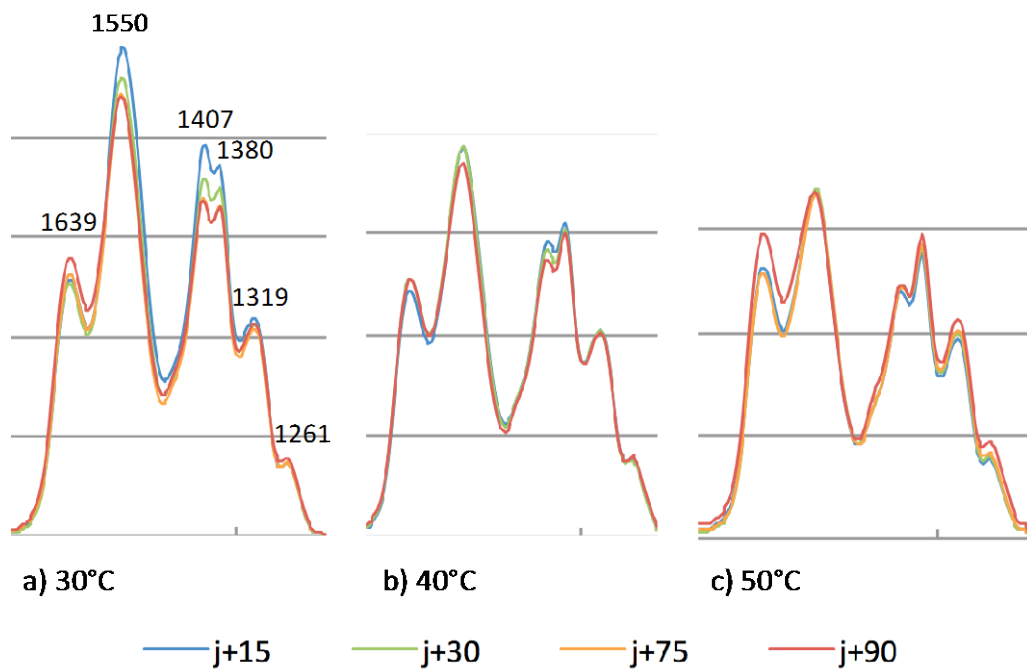


Figure 38 : Zoom sur la zone d'intérêt $1180\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ des spectres FTIR obtenus pour des films de chitosan stockés à $A_w=0,53$ à différentes températures a) 30°C , b) 40°C et c) 50°C pendant 15, 30, 75 et 90 jours.

La Figure 38 permet de visualiser l'influence de la température sur le comportement au stockage des films de chitosan. A 30°C , les phénomènes de déacétylation (suivi notamment

par le pic à 1542 cm^{-1} , représentant l'Amide II, et le pic à 1407 cm^{-1} représentant les COO^-) se produisent graduellement. On remarque que ces mêmes événements sont comme précipités à des plus hautes températures (40°C et 50°C) avec l'observation de spectres infra-rouge qui se « tassent ». La température est donc un élément favorisant la déacétylation du chitosan.

1.3.3. PLA

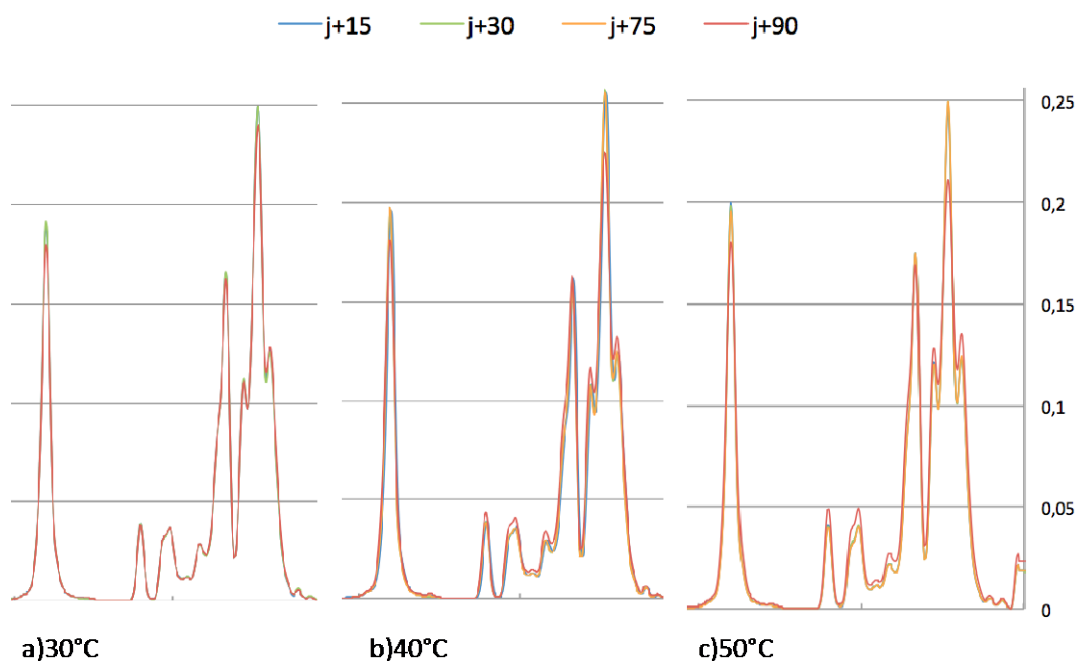


Figure 39 : Zoom sur la zone d'intérêt $850-1900\text{ cm}^{-1}$ des spectres FTIR obtenus pour des films de PLA stockés à $A_w=0,53$ à différentes températures a) 30°C , b) 40°C et c) 50°C pendant 15, 30, 75 et 90 jours.

La Figure 39 montre l'évolution des spectres infra-rouge obtenus pour des films de PLA au cours de leur stockage et ce, à différentes températures. On constate que les pics les plus affectés par le stockage et la température sont ceux situés à 1083 cm^{-1} et 1751 cm^{-1} . Ces deux pics sont représentatifs des liaisons de type C-O-C. Leur diminution laisse envisager des phénomènes de rupture de chaînes et ces phénomènes sont amplifiés au cours du stockage et par la température.

1.3.4. Conclusions

Les expériences menées sur les films de chitosan, HPMC et PLA montrent qu'au cours du vieillissement, les phénomènes de dégradation mis en jeu sont globalement les mêmes. On assiste à des phénomènes de rupture de chaînes. Ces phénomènes se produisent à une température faible à modérée au cours du stockage et sont amplifiés pour des conditions de température plus élevées. La chaleur apporte alors l'énergie nécessaire à l'augmentation des phénomènes observés et joue le rôle de catalyseur de vieillissement. C'est sur ce principe que repose le vieillissement accéléré, permettant d'augmenter la vitesse d'apparition de phénomènes qui auraient eu lieu à température ambiante à plus long terme.

2. Influence d'un post-traitement micro-onde sur des films de Biopolymères

2.1. Tests préliminaires : Influence de l'humidité dans le traitement micro-onde

Dans cette partie seront présentés les résultats préliminaires obtenus pour montrer le rôle que joue l'eau lors du traitement micro-onde des films de biopolymères.

Ces résultats préliminaires nous ont permis de mettre au point le traitement micro-onde qui a ensuite été utilisé pour la suite des expérimentations.

Pour ce faire, 3 méthodes de traitement micro-onde ont été testées, telles que décrit ci-après.

1) Condition dite « humide »

Dans ce cas de figure, nous avons utilisé un bécher d'eau pour simuler la présence d'un aliment humide. Rien n'a été entrepris afin de limiter la diffusion de vapeur d'eau dans l'enceinte du micro-onde et au contact du film de biopolymère testé.

2) Condition dite « sèche »

Ici, les conditions sont similaires au traitement dit « humide » à la seule différence que le récipient d'eau était fermé par un film pour limiter la diffusion de vapeur dans l'enceinte du four.

3) Condition dite « à vide »

Le film de biopolymère seul a été entreposé dans l'enceinte du micro-onde. Cette dernière méthode impose un traitement micro-onde très court pour éviter de faire tourner l'appareil à vide.

Après avoir testé ces trois méthodes sur les différents films de biopolymères (HPMC, Chitosan et PLA), une analyse FTIR a été menée pour comprendre les modifications structurales induites par les différentes méthodes. Il apparaît que le traitement « humide »

ainsi que le traitement « à vide » montrent des modifications significatives des spectres obtenus par méthode FTIR. En revanche, les films traités en condition « sèche » ne présentent pas de modification.

A partir de ce constat, plusieurs hypothèses ont été formulées et ont conditionné le procédé utilisé pour la suite des expérimentations :

- l'eau apportée, simulant la présence d'un aliment, joue un rôle important dans les modifications subies au cours du traitement micro-onde, notamment en tant que plastifiant
- le rayonnement micro-onde est générateur de chaleur et contribue à lui seul à apporter des modifications du biopolymères
- lors du traitement en condition « sèche », la majorité du rayonnement est absorbée par l'eau, donc la génération de chaleur au niveau du film est limitée. De plus, le film n'est pas en contact avec de la vapeur d'eau et donc ce type de traitement micro-onde ne permet pas d'observer le vieillissement du film.

Partant de ces hypothèses, nous avons choisi de poursuivre les expérimentations en condition dite humide. Elle permet d'observer les phénomènes de vieillissement tout en simulant au plus proche l'usage du film de biopolymère utilisé comme emballage au contact d'un aliment humide, soit un usage domestique classique. Les modifications observées avec ce type de post-traitement relèvent donc de l'action combinée des micro-ondes (de la température) et de l'humidité du film.

2.2. Influence of microwave heating time on structure and properties of Chitosan films

C. Jacquot, M. Jacquot, P. Marques, J. Jasniewski, S. Desobry.

Les résultats présentés ci-après concernent l'étude menée sur l'évolution des propriétés films de chitosan lors d'un passage au four à micro-ondes.

Ce travail fait l'objet d'une publication scientifique soumis au **Journal of Applied Polymer Science** en août 2013. Ce chapitre est présenté en anglais et correspond au texte soumis pour publication.

Le but de cette étude est d'étudier le comportement de films de chitosan soumis à un traitement micro-ondes pendant 10 temps de chauffage différents, de 0 à 40 minutes.

Les films de chitosan, obtenus par méthode de casting, ont subi un traitement micro-onde en conditions humides, notamment pour simuler leur utilisation en conditions réelles de traitement au contact d'un aliment humide. La structure des films a été étudiée par différentes méthodes telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la calorimétrie différentielle à balayage. Les propriétés des films ont été évaluées au cours du traitement par suivi de la couleur dans l'espace colorimétrique CIELab, mais aussi par l'étude rhéologique des films réhydratés. Une technique originale de « nez électronique » a été utilisée pour analyser les composés volatiles générés lors du processus de chauffage micro-ondes, dus à la production de composés de Maillard.

Les résultats obtenus montrent des modifications qui se déroulent en deux étapes, avec notamment des phénomènes de cristallisation, de ruptures de chaînes ou encore l'apparition de composés néoformés. Ces modifications montrent que le traitement micro-onde modifie en profondeur les films de chitosan et que ces modifications sont susceptibles d'altérer leurs propriétés et de remettre en question l'innocuité de ce matériau utilisé comme emballage au contact alimentaire.

2.2.1. Introduction

Nowadays, with the increased environmental concerns and the growing questioning about oil-based materials future, there is a huge development of bioplastic industry. Supposed to be more “eco-friendly”, with a lower impact on environment, dozen of “green plastics” have emerged in the past 15 years (Mooney, 2009, Scott, 2000). If those materials represent a great opportunity and meet the demands of greener chemistry, “biopolymer” doesn’t necessarily mean “safe” or “inert” (Mülhaupt, 2013).

Considering the opportunity for these materials to be used as food packaging materials (Dutta et al., 2009), their behavior during aging or during processing such as microwave heating have to be investigated to guarantee consumer safety. Due to the bisphenol-A crisis (Aschberger et al., 2010, Ehlert et al., 2008, Kubwabo et al., 2009, Lim et al., 2009, Maragou et al., 2008), concerns about polymer materials behavior used as food packaging have increased and if traditional oil-based polymers have already been tested under microwave irradiation (Begley et al., 1990, Bhunja et al., 2013, Alin and Hakkarainen, 2010, Nerin and Acosta, 2002, Nerin et al., 2003), biopolymers behavior is still barely known. Only a few publications reported chitosan molecular weight degradation using microwave irradiation (Wasikiewicz and Yeates, 2013, Li et al., 2012).

Furthermore, microwave irradiation using commercial domestic microwave oven has received increasing interest due to noticeable enhancements of chemical reactions and significant effects over conventional reaction (Cao et al., 2001, Kappe et al., 2008). Microwave heating is qualified as “internal heating” and is supposed to increase reactions rate compared to classical methods (Shao et al., 2003). Studying biopolymers behavior under microwave irradiation is not only a way to test the material in actual using conditions but also a way to simulate accelerated aging (Chen et al., 2012). Chitosan is a biodegradable and biocompatible biopolymer (Dodane and Vilivalam, 1998), allowing its use in a wide range of applications such as pharmaceuticals, biotechnology, food, agriculture, or tissue engineering (Khor et al., 2003). Chitosan is a polysaccharide (copolymer of 1-4 linked β -D-glucosamine and β -D-N-acetylglucosamine) obtained from chitin deacetylation extracted from crustacean shells such

as crabs or shrimps ([Rinaudo, 2006](#)). This material has been widely studied due to its pretended properties to act as an antimicrobial film ([Aider, 2010](#)) and opportunities to be used in food contact.

The aim of this study was to identify microwave treatment consequences on chitosan films. The materials structure was investigated before and after treatment and consequences on structure and properties were evaluated.

2.2.2. Materials and Methods

2.2.2.1. Materials

Chitosan (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin, France) used during experiments was a biochemical product extracted from shrimp cells and had a viscosity <200mPa.s in 1 % acetic acid (99% pure, Chem-Lab, Belgium) at 20°C according to supplier. Petri-dishes (optilux), provided by Nunclon™ (Fisher, Roskilde, Denmark), were 10mm high with a diameter of 90mm.

2.2.2.2. Film production

Chitosan is a highly basic polysaccharide, insoluble in water, which becomes soluble in diluted acids such as acetic or formic acids ([Kumar, 2000](#)). Film forming solution was prepared by dissolving 1g of chitosan in a 1% v/v acetic acid 99% pure (Chem-Lab, Belgium) aqueous solution with a heating magnetic stirrer (Fisher Bio-block scientific) during 24 hours at 20°C and 350rpm. After mixing, the solution was filtered under vacuum on a 5µm nitro-cellulose filter (Millipore, France) and finally degassed before being poured into Petri-dishes and dried at 20°C and 50% of Relative Humidity for at least 48 h.

2.2.2.3. Film conditioning

Microwave treatment involves water molecules agitation and this agitation phenomenon causes heating. As humidity plays an important role during microwave processing, this parameter was very important to control. After a 48-hour drying period, each film was conditioned in controlled Activity Water (Aw) atmosphere at 20°C and in darkness. Mg(NO₃)₂ salt was used to adjust water activity at 0.53 in a climatic chamber at 20°C.

2.2.2.4. Microwave processing

A microwave device (Matfer, France) was used with different heating time (0, 4, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min) at controlled power (800 W). 600mL of distilled water at 20°C was put into a beaker and nothing was done to avoid vapor production and diffusion into the microwave oven during heating. Chitosan films were put individually in the microwave device and heating treatment was applied. Finally, surface temperature of the film before and after microwave treatment was measured with an infra-red thermometer (ThermoFlash). This process simulated microwave heating of a highly humid food product.

2.2.2.5. Film thickness measurement

Films thicknesses were determined according to the standard NF Q 03-016 with a manual micrometer (Mitutoyo, Kawasaki, Japan), equipped with a head of 5 mm in diameter with a 1 µm sensitivity. Thickness was measured in 10 randomly selected points on each film and average value was calculated.

2.2.2.6. Moisture content measurement

Three samples of each microwave heating time tested were weighed (m_0) and then dried in oven at 102°C for 3 h (according to ASTM method D644-99). Films were then weighed again (m_f) to determine their moisture content (MC). Moisture content (1) was calculated as the percentage of weight loss relative to the original weight.

$$MC(\%) = \frac{(m_f - m_0)}{m_c} * 100 \quad (1)$$

2.2.2.7. Film color measurement

Measurements were carried out with a Minolta CM, CR-210 colorimeter (Minolta, Colombes, France) using CIE-Lab color scale. Results are the average of at least 10 points on each film and 3 films for each heating time were tested. Color differences were calculated (2) as:

$$\Delta E = \sqrt{(L_t - L_{t0})^2 + (a_t - a_{t0})^2 + (b_t - b_{t0})^2} \quad (2)$$

where L^* value is assigned to lightness (from 0 –black– to 100 –white–). The a^* value is assigned to redness (positive a^* values) or greenness (negative a^* values) in the sample. Finally the b^* value describes yellowness (positive b^* values) or blueness (negative b^* values) in the sample.

Yellowing index (Cao et al.) was measured (3) in accordance with ASTM D1925 standard as:

$$YE = \frac{100 * (C_x X - C_z Z)}{Y} \quad (3)$$

Where X, Y and Z were CIE tristimuli values and the coefficients C_x and C_z depend on illuminant and observation angle. Illuminant used is D65 and observation angle is 10° involving C_x and C_z were worth 1.3013 and 1.1498 respectively in this case.

2.2.2.8. Electronic nose / Headspace Chromatography associated with Volatiles Compounds Library

An electronic nose Heracles II (Alpha MOS, Toulouse, France) was used to detect the off-odors produced during heating. It consisted in double columns gas-chromatography, with hydrogen (FID Grade) used as gas carrier.

0.30g of chitosan film was sealed hermetically in a vial and heated at 40°C for 1 hour to allow volatile compounds release. 1mL of headspace atmosphere was injected into the device *via* syringe to an injector where a flash evaporation process happened. Volatile compounds from the sample headspace then passed through an adsorbent trap to be concentrated. The system was finally reheated to release trapped compounds that were subsequently injected in two short capillary columns (2m long each), one apolar DB-5 and the second one with a medium polarity DB-1701. Two Flame Ionization Detectors (FID) in parallel provided two chromatograms later analyzed with Heracles Software. Coupling two columns allowed a sharper identification of volatile compounds.

2.2.2.9. Film FTIR analysis

Biopolymer films structure was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy in total attenuated reflection mode (ATR-FTIR) before and after microwave treatment. Measurements were performed at 20°C with a Tensor 27 mid-FTIR Bruker spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a Platinum ATR optical cell and an RT-DLa TGS detector (Bruker, Karlsruhe, Germany). The diaphragm was set to 6mm. The scanning rate was 10kHz, and 64 scans were performed both for reference (t_0) and samples (microwave

heated) from 3800 to 900 cm^{-1} with 4 cm^{-1} of resolution. All data treatments were carried out using OPUS software (Bruker, Karlsruhe, Germany). Raw absorbance spectra were smoothed using a nine-point Savitsky-Golay smoothing function. Elastic baseline correction was applied to spectra.

2.2.2.10. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Thermal analysis was performed by sealing 5.5 to 8 mg of chitosan film sample in an aluminum pan. The pan was put in the DSC device (Netzsch, Germany) and heated under protective nitrogen in three steps. First one consisted in heating the sample from 25°C to 180°C at a rate of 10°C.min⁻¹ to eliminate thermal history of the sample. Then, it was cooled from 180°C to 25°C at a rate of 30°C.min⁻¹. Final step consisted in a heating from 20°C to 350°C at the same rate of 10°C.min⁻¹.

2.2.2.11. Rheological behavior

Rheological measurements were performed with a Kinexus Rotational Rheometer (Malvern Instruments, KNX 2100, UK) on rehydrated films solutions. The rheometer Kinexus (Malvern Instruments, Orsay, France) was equipped with a temperature control unit (Peltier effect) for a very accurate temperature ramp. Rheological properties (viscous and elastic components as well as angle phase) were measured at 20°C with a cone (CP2/50 SC0029SS) and plate (PL65 SO381SS) geometry. Solutions were prepared in 1% v/v acetic acid solution at 2% w/v chitosan film concentration.

Various shear rates ($\dot{\gamma}$) were applied on samples from 10⁻¹ to 10² s⁻¹. The Power-law model (4) (Lapasin and Pricl, 1995) was applied on raw data:

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n \quad \sigma = \mathbf{K} (\dot{\gamma})^n \quad (4)$$

Where σ is the shear stress (Pa), K the consistency coefficient and n the flow-behavior index. The n parameter is representative of the viscosity and the rheological behavior of the solution, i.e. $n=1$ when Newtonian fluid, $n<1$ when pseudo-plastic fluid (shear thinning) and $n>1$ when dilatant fluid (shear-thickening).

2.2.2.12. Molecular weight determination of chitosan

Size exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering detectors (SEC-MALLS) was used to study the molecular weight distributions of chitosan according to the method described by Nguyen *et al* (Nguyen *et al.*, 2009). Refractive index (RI) was measured with a microviscosimeter and molecular weights were determined relative to chitosan standards (American Polymer Standard). For every sample, chitosan solutions (1mg/ml) were prepared by direct dissolution in acetate buffer (0.3 M acetic acid; 0.3 M sodium acetate, pH = 4) at room temperature. The acetate buffer used for dissolution was from the same batch as the mobile phase used for SEC. Mobile phase was filtered before use through a hydrophilic Millipore membrane with 0.45 μm pore size (47 mm diameter, Millipore). Analyses were performed at 30°C at a flow rate of 0.7 ml/min with sample injection volume of 100 μl using a Viscotek A4000M column (7.8 mm ID and 30 cm length). Chitosans with different molecular weights were used as a standard to determine the molecular weight of chitosan.

2.2.2.13. Statistical analysis

Experimental values were given as means \pm standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean differences of the samples. Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

2.2.3. Results and Discussion

The microwave heating process was designed to simulate a humid food cooking and to limit influence of water and temperature on the study. Indeed, film surface temperature increased with microwave treatment time. It reached 100°C at 15 min of heating and finally stabilized around 110°C from 20 min of treatment. Thus, the inside of the microwave oven was full of steam, allowing us to assume that relative humidity remained constant during the whole heating (100%). This hypothesis was confirmed by film humidity measurement at each heating time that remained constant around 11% (Table 4). Moreover, chitosan film thickness was not affected by microwave heating time and remained stable at $47 \pm 0.7 \mu\text{m}$, meaning that chitosan films did not swell (Table 4).

Table 4: Films characteristics during microwave treatment (800W – 100%RH)

Microwave treatment time (min)	0	4	8	12	15	20	25	30	35	40	
Film Thickness (μm)	48 ± 5	47 ± 3	46 ± 4	46 ± 4	46 ± 3	47 ± 7	46 ± 4	46 ± 5	47 ± 4	46 ± 4	
Film water content (%)	12.8 ± 0.3	11.1 ± 1.1	11.9 ± 2.1	9.9 ± 0.7	9.6 ± 0.7	10.0 ± 1.0	10.4 ± 0.9	12.4 ± 2.6	11.1 ± 2.8	9.9 ± 1.4	
Film surface temperature ($^{\circ}\text{C}$)	20	50 ± 5	83 ± 1	98 ± 1	100 ± 2	108 ± 2	111 ± 3	117 ± 0	111 ± 3	115 ± 1	
DSC	Moisture peak temp. ($^{\circ}\text{C}$)	79.7	Not measured	Not measured	92.1	Not measured	94.0	Not measured	93.3	Not measured	96.4
	Degradation peak temp ($^{\circ}\text{C}$)	297.4	Not measured	Not measured	295.8	Not measured	295.9	Not measured	291.9	Not measured	286.7
	Glass Transition temp. ($^{\circ}\text{C}$)	-----	Glass Transition not observable on DSC thermogram					-----	142	Not measured	Not measured

2.2.3.1. Thermal properties of chitosan films

Thermograms obtained by DSC measurement on chitosan films showed 3 events (Figure 40). During first heating, the unique endothermic peak could be attributed to absorbed moisture evaporation in chitosan film. The cooling curve showed an exothermal peak corresponding to partial polymer crystallization. Glass transition was hard to detect in chitosan. During the second heating, a slight change of baseline inclination at 140°C indicated film glass transition.

This result was consistent with glass transition temperature found in literature even several different values (Ogura et al., 1980, Ahn et al., 2001) were reported (Dong et al., 2004). Finally, when temperature increased, chitosan films degradation occurred, starting at 290°C.

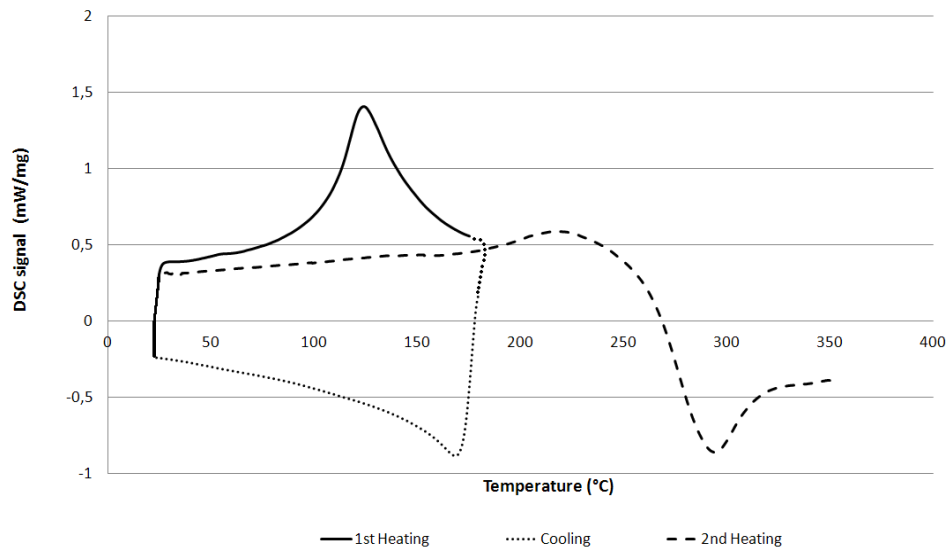
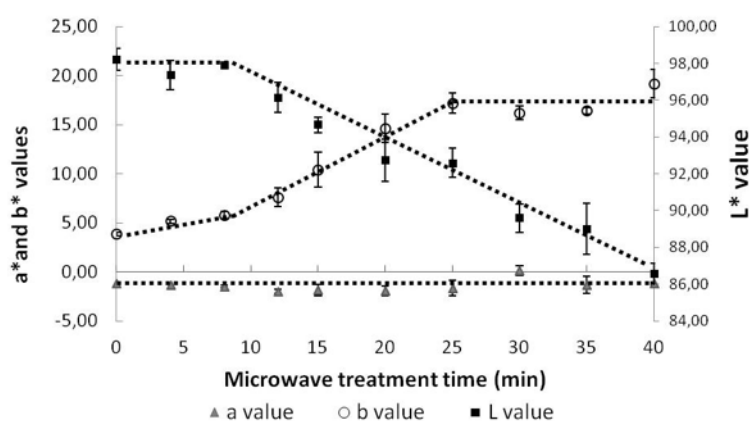


Figure 40: Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram of chitosan film obtained with a first heating step, cooling and a second heating step

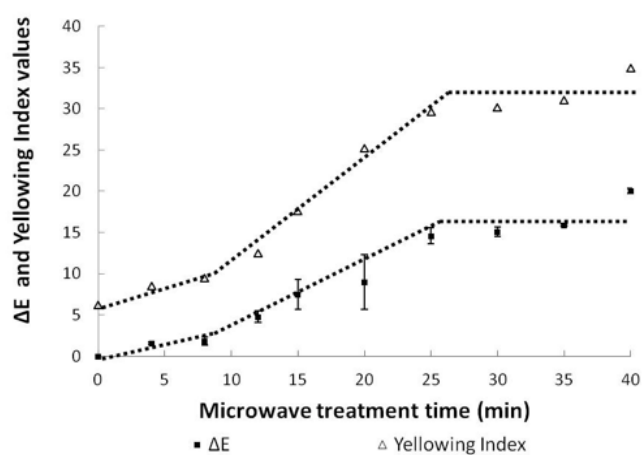
Chitosan is mainly amorphous, so a clearly defined glass transition could be expected on DSC thermogram. However, glass transition remained non measurable until long time heating. The main hypothesis for this phenomenon is a polymeric chain size homogenization. Indeed, DSC device used had a limited sensitivity and was not able to detect a discreet heating flow. We can assume that chitosan film is initially made of different size chains. During microwave treatment, small chains easily tend to join each other while long polymeric chains seemed to be broken. It led to polymeric chain sizes homogenization, with a more accurate glass transition temperature that became detectable by the DSC device. The hypothesis of depolymerization occurring during microwave heating is consistent with previous work showing that chitosan is susceptible to depolymerization, and that the phenomenon is enhanced with increased temperature (Morris et al., 2009). Thus, several studies showed that low mass chitosan is more soluble at neutral pH, making it potentially more available in vivo (Harish Prashanth and Tharanathan, 2007), explaining why it has been reported as causing more cell damage (Aspden et al., 1996) (Fei Liu et al., 2001).

2.2.3.2. Films color

During treatment, films remained macroscopically intact but turned to yellow. This macroscopic observation was confirmed by L^* , a^* and b^* colorimetric measurement (Figure 41a). For each microwave heating time, ΔE parameter was calculated and represented the difference in color between heated samples and non heated reference (Figure 41b).



41a)



41b)

Figure 41 : Chitosan film color measurement during microwave treatment a) following a^* , b^* and L^* values and b) following ΔE et Yellowing Index

It appeared that a^* values, slightly negative and close to zero remained stable during heating while positive b^* values increased, confirming film yellowing. On the contrary, L^* value tended to decrease, due to film darkening that became stronger during heating. To be more

accurate, the *b* value didn't increase linearly. The curve showed 3 slopes corresponding to 3 steps of yellowing. First step, from 0 to 8 min showed the beginning of film yellowing. The phenomenon accelerated from 8 to 25 min, described by the second slope on Figure 41b. Finally, for long time heating (from 25 to 40 minutes), the yellowing was intense, and became stable.

To confirm this hypothesis, the yellowing index was calculated in accordance with ASTM D1925 standard and was represented on Figure 41b and compared to the ΔE showing the global difference in color during heating. Both ΔE and YI increased during heating, their respective slope showing same behavior.

The ΔE increased with the microwave heating time up to 20. It is important to point out that a ΔE value below 2 is considered as imperceptible by human eye. In this case, the film yellowing was perceptible after 4 minutes of microwave heating.

This phenomenon leads us to conclude that film color significantly changed during microwave heating. The yellowing was the main component of color change and was initiated from the very beginning of heating, first slowly, then more quickly and finally, remained stable for long duration heating. This result has implication both in consumer confidence and safety. A film color change, even for short heating time, means that film endures chemical changes possibly detrimental for its quality and maybe, its use safety. It can be assumed that neoformed compounds could appear, for instance Maillard reaction products responsible for film coloration as previously described in the literature ([Rao et al., 2011](#), [Huang et al., 2007](#), [Chang et al., 2011](#)).

2.2.3.3. Film structure changes

FTIR has been shown to be a powerful, rapid, easy to apply and non-destructive tool to study polysaccharides structure. Figure 2 displays chitosan films spectra obtained for 0 and 40 minutes of microwave heating. Each spectrum is the average spectra of at least 3 spectra and standard deviation is not pictured because of the perfect superposition of the different repetitions for each heating time.

PCA analysis of FTIR spectra (0, 4, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 min of heating) was performed using The Unscrambler[®] software. Data set for PCA calculation contains 10 rows corresponding to the number of samples studied and 814 columns referring to wavenumbers in cm^{-1} . Score plot obtained is shown on Figure 42. On this chart, each point corresponds to each different sample from different heating time. It revealed that each spectrum was significantly different from reference (non heated chitosan film, t_0), meaning that FTIR spectra was modified, even for short microwave heating time.

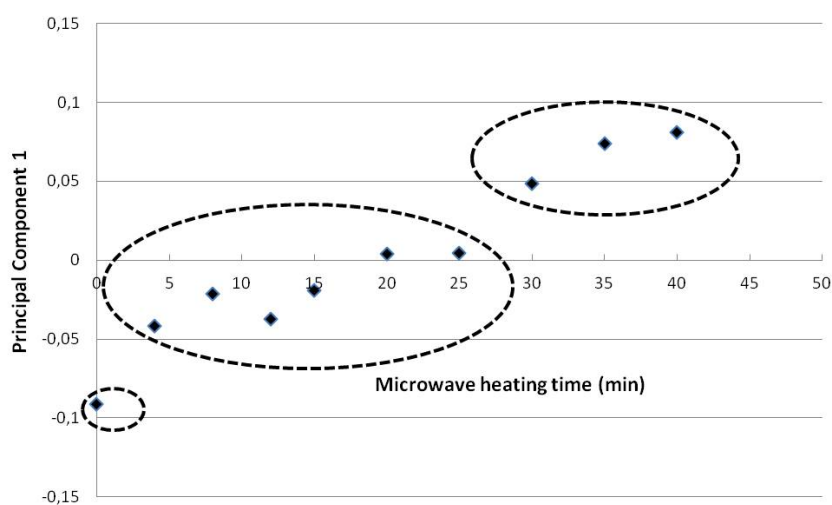


Figure 42 : Score plot extracted from the Principal Component Analysis from 10 FTIR average spectra corresponding to different heating time from 0 to 40 minutes

The longer the chitosan film was heated, the statistically more different the sample was from reference. This phenomenon was amplified with increased microwave heating time, *i.e.* the longer a chitosan film was heated, the more FTIR spectra was modified. From PCA analysis, 3 groups of sample were emerging as represented on Figure 42. The first group only contained reference sample, t_0 . Second group contained samples heated from 4 to 25 minutes, and were statistically close from each other from the FTIR spectra analysis point of view. Finally, the third and last group included samples heated 30, 35 and 40 minutes. This categorization into 3 groups was based on the statistical analysis performed on films FTIR spectra. Interestingly, this 3 groups of samples were observable on the color analysis,

especially following b^* values (*i.e.* the yellowing of the chitosan film), leading to the conclusion that some structural changes highlighted by FTIR spectroscopy were responsible for film color change.

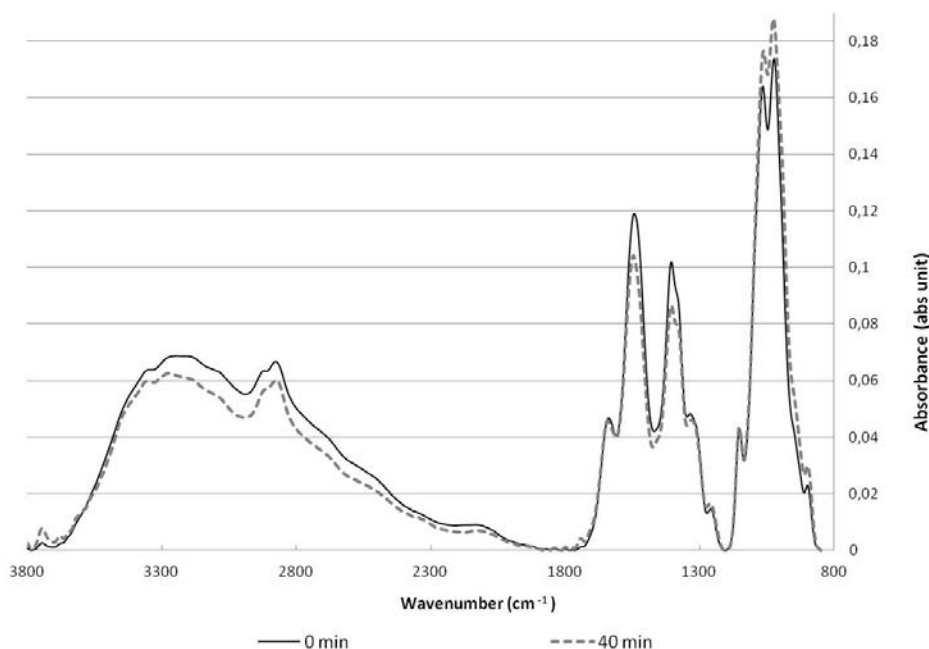


Figure 43: FTIR spectra between 800 and 3800 cm^{-1} during chitosan films microwave heating from 0 to 40 minutes as an example of the 10 heating times studied. The spectrum shown for each heating time is the average spectrum obtained with at least 3 samples.

On a qualitative point of view, spectra global shape remained the same between 0 and 40 minutes of heating (Figure 43). Some peaks appeared to be modified by microwave heating and changes followed heating treatment time. Particularly, large wave around 3232 cm^{-1} corresponding to hydroxyl bonds remained quite stable with heating time. These hydroxyl bonds are usually related to water in the sample. Microwave process did not affect significantly sample humidity, in agreement with films water contents (Table 4).

The peak at 1026 cm^{-1} was identified as -OH elongation vibration and increased during microwave heating. The breaking of C-O-C glycosidic bond led to chain scission on chitosan polymeric chain. This phenomenon was confirmed by following the 1060 cm^{-1} peak corresponding to the -OH that increased with microwave heating time. It is consistent with

the former hypothesis of polymeric chain scission and creation of hydroxyl groups and is also consistent with previous work on chitosan solutions showing molecular weight degradation using microwave irradiation according to Wasikiewicz et Yeates ([Wasikiewicz and Yeates, 2013](#)).

Peak at 1542 cm^{-1} corresponds to Amide-II band and decreased during microwave treatment, which is consistent with chitosan deacetylation ([Dong et al., 2001](#)) As previously shown, this decrease occurred into 2 steps corresponding to a slow decrease between 4 and 25 min, then, a steeper slope for 30, 35 and 40 minutes of microwave heating. The peak at 898 cm^{-1} increased by almost 60% between 0 and 40 minutes. This peak is related to ring stretching. In the meantime, peak at 1405 cm^{-1} related to $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ decreased by 15%. All these information led to the hypothesis that chitosan was deacetylated during heating.

To confirm this hypothesis, the degree of N-acetylation (DA) was calculated. Previous works investigated the possibility to determine the D.D. using IR spectra and showed good correlation ([Dong et al., 2001](#)) *e.g.* with ratio between the absorbance at 1539 cm^{-1} corresponding to the $-\text{NH}$ bending in amide group and the absorbance at 2869 cm^{-1} corresponding to $-\text{CH}$ stretching band ([Beil et al., 2012](#)).

Two different methods were used to calculate the D.D. according to ([Beil et al., 2012](#)) and ([Brugnerotto et al., 2001](#)). These methods are based on different peaks of interest in FTIR spectra.

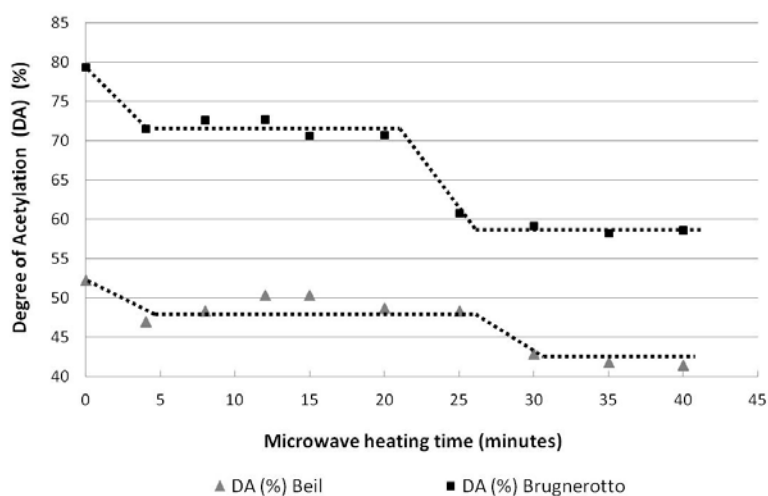


Figure 44 : Calculation of the degree of N-acetylation (DA) of chitosan films during microwave heating according to Beil and Brugnerotto

As shown on Figure 44, N-acetylation degree tended to decrease with microwave heating time. Deacetylation degree was not the same depending on method of calculation but, in both case, it decreased. Again, we can discern 3 steps. First step was the beginning of deacetylation, from 0 to 4 minutes of microwave heating. Degree of acetylation remained stable while heating continued until 20 or 25 minutes (depending on the method of calculation) where deacetylation decreased again and reached a second equilibrium for long heating time.

2.2.3.4. Rheological behavior

To confirm chain scission hypothesis, rheological study was performed on rehydrated film, as solution obtained by film dissolution should show viscosity modification if the polymer structure was degraded.

Table 5 : Rheological behaviour of solution of chitosan as a function of microwave heating time

time (min)		K	n	Khi ²	R ²
0	avg.	0,170	0,946	418	0,999
	sd.	0,001	0,022	91	
15	avg.	0,550	0,896	259	0,999
	sd.	0,033	0,018	11	
30	avg.	0,313	0,790	307	0,996
	sd.	0,004	0,021	53	

K= consistency coefficient; n= power law index

Table 5 shows rheological results obtained on solution of rehydrated chitosan films after different microwave heating time (0, 15 and 30min). The Power-law model was applied on raw data where n is the power law index.

The n parameter was always below 1, indicating a non-Newtonian pseudo-plastic fluid in every case. The n parameter decreased with increased microwave heating time. Two parameters affect chitosan solution viscosity: molecular weight and deacetylation degree. According to Mucha *et al*, this could indicate that deacetylation degree (DD) decreases (Mucha, 1997). As chain scission phenomenon had a higher impact on the viscosity than DD,

apparent viscosity decreased although chitosan deacetylation increased (*i.e.* acetylation degree decreased).

2.2.3.5. Molecular Weight Determination of Chitosan

Size Exclusion Chromatography Multi-Angle Laser Light Scattering was used in order to determine the mass average molecular mass (M_w) before and after microwave heating to confirm the chain scission hypothesis. It decreased from 271 kDa (before microwave heating) to a value of 175 kDa after 40 minutes of microwave heating. Moreover, polydispersity index also decreased from 41 (before heating) to 16 (after 40-minute heating). This lead us to confirm the previous hypothesis, *i.e.*, polymer chain scission and homogenization in size of polymeric chains, strongly linked to chain scission.

2.2.3.6. Electronic nose – Headspace Chromatography associated with Volatiles Compounds Library

Off-flavor in chitosan films could be responsible for a loss of consumer confidence. Moreover, considering the fact that polymer structure was modified by microwave heating, neoformed compounds could be produced and potentially hazardous. To check this point, electronic nose analysis was performed not only on odorous volatiles but also on non-odorous compounds, allowing the analysis of potential hazardous non-odorous compounds.

On the chromatograms obtained after electric nose analysis, several peaks were observed as displays in Table 6.

Table 6 : Identified Volatile Compounds in microwave heating of chitosan films

Compounds	RI	Formula	Olfactive notes (when identified)	Peak area	
				t0	t30
Acetaldehyde	431	C ₂ H ₄ O	-	6633 ± 850	3722 ± 945
Trimethylamine	490	C ₃ H ₉ N	ammoniacal, fish	2708 ± 422	810 ± 195
Non identified compound	566	-	-	1465 ± 482	ND
Pyridine	750	C ₅ H ₅ N	-	ND	308 ± 74
2-methylpyridine	816	C ₆ H ₇ N	hazelnut popcorn	ND	1142 ± 291
4-Pyridine carbonitrile	978	C ₆ H ₄ N ₂	-	670 ± 159	980 ± 3
Pyrazine trimethylisopentyl	1386	C ₁₂ H ₂₀ N ₂	-	ND	5273 ± 3659

ND: Not Detected

The first identified peak corresponded to acetaldehyde, and α -aminoacetaldehyde has been found in literature to be an intermediate product of glucosamine degradation in water leading to final production of pyrazine (Shu, 1998). This explains the high amount of acetaldehyde found for non-heated chitosan. Acetaldehyde peaks decreased between 0 and 30min of microwave heating, which is consistent with the pyrazine formation observed and described hereafter. Trimethylamine (Laksmana et al., 2010), a volatile compound found in sea products, was strongly present in chitosan film before microwave heating, but vanished after treatment.

A third peak was not identified by electric nose. Indeed, the software used volatile compounds library and crossed information obtained on the two columns of the system, and proposed numerous possibilities to identify this unknown peak. None of these propositions could have been crossed with literature data to formally identify this peak. This is one of the weaknesses of the electric nose based on literature data.

After microwave heating, several pyrazine or pyridine derivatives were found resulting from thermal processing of glucosamine (Chen and Ho, 1998, Koehler et al., 1969, Martin and Ames, 2001, Shu, 1998, Wang and Odell, 1973). These molecules consist in a heterocyclic aromatic organic compound, with one or several nitrogen atom in different position on the aromatic ring. These compounds are strongly correlated with the occurrence of Maillard reaction and are responsible for aroma development in processed food (Klocker et al., 2002). To allow Maillard reaction, 3 elements are needed: amine, reductor sugar and heat. A Fehling liquor test was performed confirming the presence of reductor sugars, amines were present due to chitosan structure itself and films reached 100-110°C during microwave heating time. Moreover, as some residual acetic acid in films could enhance reaction kinetic, Maillard reaction products could be produced. Those compounds were already identified in literature for high temperature heating of glucosamines until pyrolysis of chitosan or chitin (Chen and Ho, 1998, Knorr et al., 1985, Zeng et al., 2011).

The presence of these compounds was consistent with previous FTIR results highlighting ring stretching vibration strongly increased with heating time. Indeed, pyrazine and derivatives were the aromatic compounds observed at 898 cm^{-1} in FTIR spectra.

2.2.4. Résultats additionnels hors publication

Les résultats suivants ont été obtenus sur cette étude après la soumission de la publication dans le cadre de la poursuite du travail et feront l'objet d'une autre publication en 2014.

2.2.4.1. SEC-MALLS

Les résultats obtenus par SEC-MALLS sont disponibles en Annexe 3 et Annexe 4. Parmi les valeurs particulièrement intéressantes, on peut noter le poids moléculaire moyen. Pour un film de chitosan neuf (T0), $M_w = 271299$ Daltons contre $M_w = 175301$ Daltons pour un film de chitosan après un traitement micro-onde de 40 minutes (T40).

Par ailleurs, on constate que l'indice de polydispersité (M_w/M_n) est de 41 pour le film de chitosan neuf contre 16 pour le film de chitosan qui a subi un traitement micro-onde de 40 minutes. Ces deux informations confirment les hypothèses posées précédemment à savoir : les phénomènes de rupture de chaîne et l'homogénéisation des tailles de chaînes réduisant ainsi l'indice de polydispersité.

2.2.4.2. Corrélation 2D à partir des données infra-rouge

La Figure 45a présente la carte dite synchrone obtenue par le logiciel 2D Shige. Le traitement en corrélation 2D se décompose en plusieurs étapes selon la méthode mise au point et décrite par Noda ([Noda, 1990](#)). Cette méthode a, par exemple, été utilisée sur des protéines plasmatiques et permet d'accéder à une chronologie d'évènements d'assemblage ou de dégradation ([Saguer et al., 2009](#)).

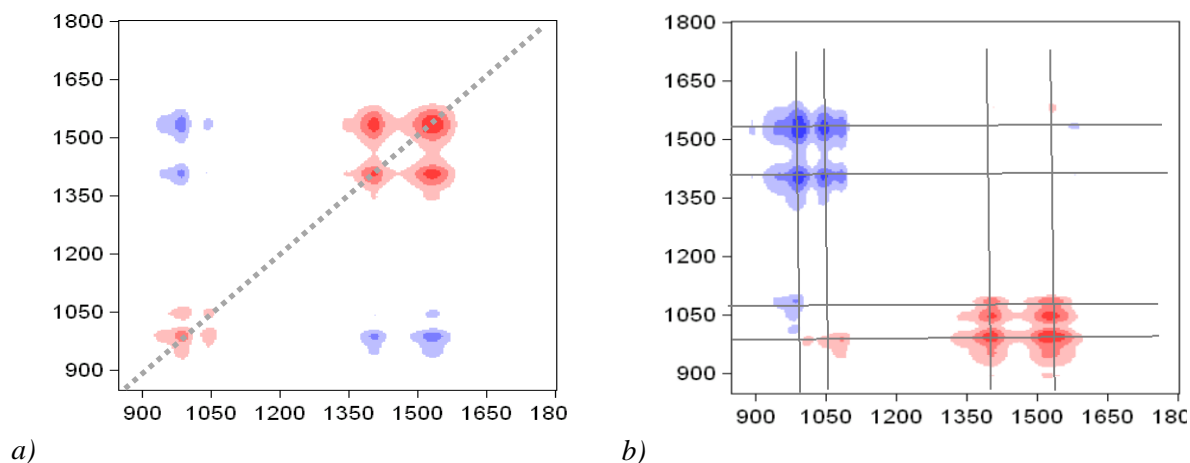


Figure 45 : Corrélation 2D obtenue sur les spectres FTIR des films de chitosan chauffés de 0 à 40 minutes au micro-ondes a) carte synchrone et b) carte asynchrone

Dans un premier temps, la carte synchrone est analysée. Ici, on observe sur la diagonale (ligne en pointillés), 4 auto-pics à 1542, 1405, 1045 et 983 cm^{-1} . Ces 4 pics ont été identifiés comme étant significativement différents d'un échantillon à l'autre. Pour poursuivre l'analyse, on compare les pics deux à deux. Quand l'intersection des coordonnées de deux pics est rouge, on parle de cross-pic positif, à l'inverse, dans le bleu, c'est un cross-pic négatif.

Sur la Figure 45a), les cross-pics positifs (en rouge) sont identifiés à 983/1045 cm^{-1} , 1405/1542 cm^{-1} , 1045/983 cm^{-1} , et à 1542/1405 cm^{-1} . Cela signifie que ces couples de pics évoluent dans le même sens au cours du traitement micro-onde. Attention, cela ne présume pas du fait qu'ils diminuent ou augmentent au cours du temps, mais seulement qu'ils évoluent de façon synchrone au sein d'un même couple. En l'occurrence pour nos échantillons, les pics 1045 et 983 cm^{-1} augmentent au cours du temps alors que les pics 1542 et 1405 cm^{-1} , quant à eux, diminuent au cours du temps.

Les cross-pics négatifs (en bleu) suivants sont identifiés : 983/1405 cm^{-1} , 983/1542 cm^{-1} , 1405/983 cm^{-1} , 1405/1045 cm^{-1} , 1045/1405 cm^{-1} , 1045/1542 cm^{-1} , 1542/983 cm^{-1} et 1542/1045 cm^{-1} . La logique est la même que pour les cross-pics positifs, la différence vient seulement du fait que cette fois, les pics d'un même couple évoluent dans des sens opposés.

Ces données sont conformes à l'analyse menée avec le logiciel Unscrambler[®] comme présenté sur la Figure 46. Cette figure peut-être considérée comme un spectre témoin des modifications

subies par les films de chitosan au cours du traitement micro-onde. Les pics de plus grande amplitude montrent les nombres d'ondes pour lesquels de grandes différences sont mises en valeur lors de l'analyse statistique des données. Plus le score de composante principale est élevé, plus la variation d'aire du pic est significative au cours du traitement micro-onde.

On retrouve sur cette figure les 4 pics d'intérêts évoqués précédemment et mis en évidence par l'analyse en corrélation 2D.

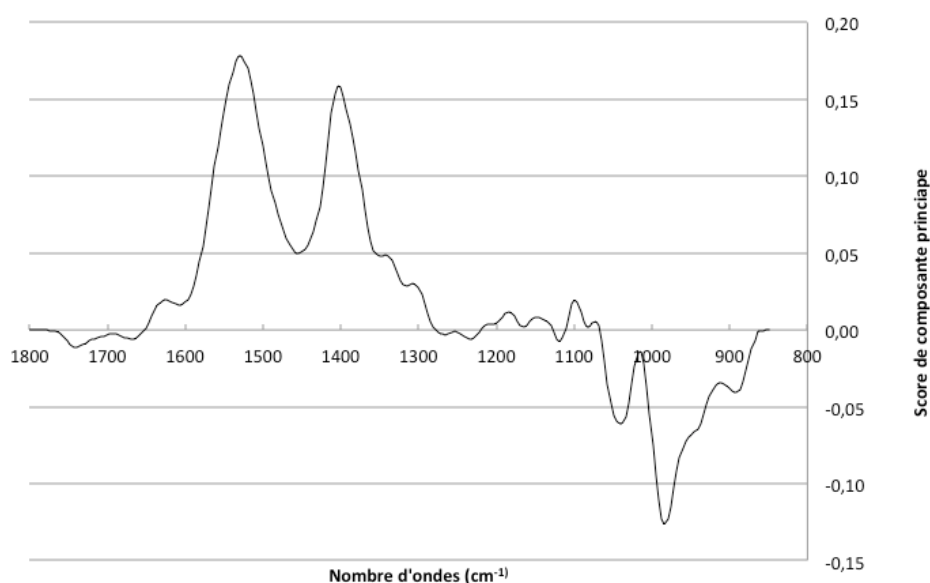


Figure 46 : Loading plot obtenu avec le logiciel Unscrambler[®] pour l'analyse en composante principale menée sur les échantillons de film de chitosan au cours du traitement micro-onde

Pour aller plus loin dans l'analyse de corrélation 2D, il faut maintenant s'intéresser à la carte asynchrone, présentée en Figure 45 b), fournie par le logiciel à partir des données infra-rouges. Cette carte asynchrone montre des cross-pics positifs (en rouge) à 1405/983 cm⁻¹, 1405/1045 cm⁻¹, 1405/1542 cm⁻¹, 1542/1045 cm⁻¹ et 1542/983 cm⁻¹.

A l'inverse, elle présente des cross-pics négatifs (en bleu), 983/1405 cm⁻¹, 1045/1405 cm⁻¹, 983/1542 cm⁻¹ et 1045/1405 cm⁻¹.

Ces constatations permettent ainsi d'accéder à la chronologie des événements visibles sur les spectres infra-rouges. Pour ce faire, il faut croiser les informations de la carte synchrone avec celle de la carte asynchrone tel que présenté dans la Table 7.

2. Influence d'un post-traitement micro-onde sur des films de biopolymères

Table 7 : Eléments d'interprétation des informations croisées entre les cartes synchrone et asynchrone afin d'accéder à la chronologie des événements

NB : +pour cross-pic positif / - pour cross-pic négatif lus sur les cartes synchrone et asynchrone

Lecture des cross-pics sur les cartes		Interprétation de la lecture croisée
Synchrone	Asynchrone	
+	+	L'événement en X se produit avant l'événement en Y
+	-	L'événement en X se produit après l'événement en Y
-	-	L'événement en X se produit avant l'événement en Y
-	+	L'événement en X se produit après l'événement en Y

Table 8 : Lecture croisée des cartes synchrone et asynchrone pour les films de chitosan

		Coordonnées X →				
		cm ⁻¹	1542	1405	1045	983
Coordonnées Y ↓	983		- / +	- / +	+ / +	
	1045		- / +	- / +		+ / -
	1405				- / -	- / -
	1542				- / -	- / -

Exemple de lecture de la Table 8, case 1: Le cross-pic ayant pour coordonnées les nombres d'onde (983;1542) cm-1 est négatif sur la carte synchrone (- / .) et négatif sur la carte asynchrone (. / -).

La Table 7 permet d'interpréter ces informations: Le cross-pic ayant pour coordonnées les nombres d'onde (983;1542) cm-1 étant de type - / - , cela permet de dire que l'évènement en X (983 cm-1) se produit avant l'évènement en Y (ici 1542 cm-1). On procèdera de même pour tous les cross-pics identifiés, par croisement de lecture des cartes synchrone et asynchrone et référence à la table d'interprétation (Table 7).

Pour rappel concernant le traitement FTIR du chitosan, la vibration à 1542 cm^{-1} est attribuée à la bande amide II, la vibration à 1404 cm^{-1} est attribuée aux groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$, les vibrations à 1045 cm^{-1} peuvent être assimilées aux phénomènes de ruptures de chaîne et à la création de groupement $-\text{OH}$. Enfin, la vibration à 983 cm^{-1} peut être attribuée aux phénomènes de ring stretching, ici nous avons posé l'hypothèse qu'elle reflétait la création de composés de Maillard avec un noyau pyranne.

Des informations contradictoires concernant les pics à 1542 et 1405 cm^{-1} peuvent être expliquées de même. En effet, l'étude de la Table 8 amène à la conclusion à la fois que 1405 se produit avant 1542 et que 1542 se produit avant 1405 . Cette conclusion contradictoire pourrait également s'expliquer par le fait que les événements se produisant à ces deux nombres d'ondes sont concomitants et se produisent aléatoirement à tour de rôle.

En conclusion, l'étude en corrélation 2D à partir des spectres infra-rouge semble nous orienter vers cette chronologie des événements : Des ruptures de chaînes dans un premier temps avec la création de groupements $-\text{OH}$ libre en extrémité de chaînes, une accumulation de tension dans le matériau alors que le traitement micro-onde se poursuit, des phénomènes de ring stretching signant la présence des composés de Maillard, et enfin, une déacétylation au niveau de la bande amide II.

2.2.4.3. Test de Robinson

Un panel de 20 sujets a testé olfactivement des films de chitosan ayant subi un traitement micro-onde lors d'un test de Robinson. Nous avons choisi un temps de traitement modéré de 1 minutes, afin que le changement de couleur du film ne soit pas trop important entre l'échantillon et le témoin (film de chitosan neuf) pour ne pas induire le panel en erreur.

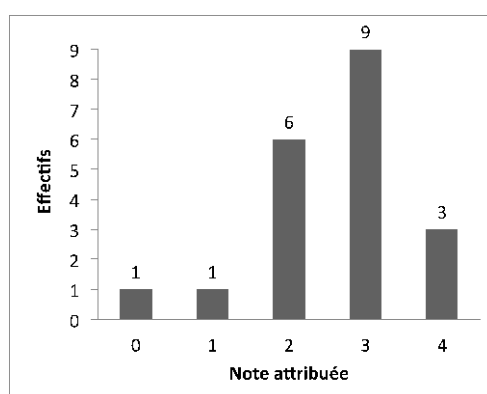


Figure 47 : Résultats du test de Robinson pour des films de chitosan après 10 minutes de traitement micro-onde

La Figure 47 montre qu'une différence olfactive est nettement perçue par le panel, signifiant que les composés de Maillard identifiés dans cette étude sont perçus même pour des temps de traitement modérés.

2.2.4.4. Détermination des propriétés mécaniques

Les essais mécaniques suivants ont été réalisés avec l'aimable collaboration de l'équipe de ProViSys Engineering (Anne-Sophie Didelot et Kamel Ledra), start-up hébergée à l'école des Mines de Nancy – Université de Lorraine, spécialisée dans la caractérisation de matériaux.

Des essais de traction ont été réalisés sur les films de chitosan avant traitement micro-onde et après 10, 20 et 40 minutes de chauffage micro-onde à 20°C à une vitesse de 10^{-4} s^{-1} . Le

2.2 Influence du traitement micro-onde sur des films de chitosan

le module de Young est calculé linéairement entre 0,05 et 0,25% de déformation selon la norme ISO 527-4 « Plastiques : Détermination des propriétés en traction »

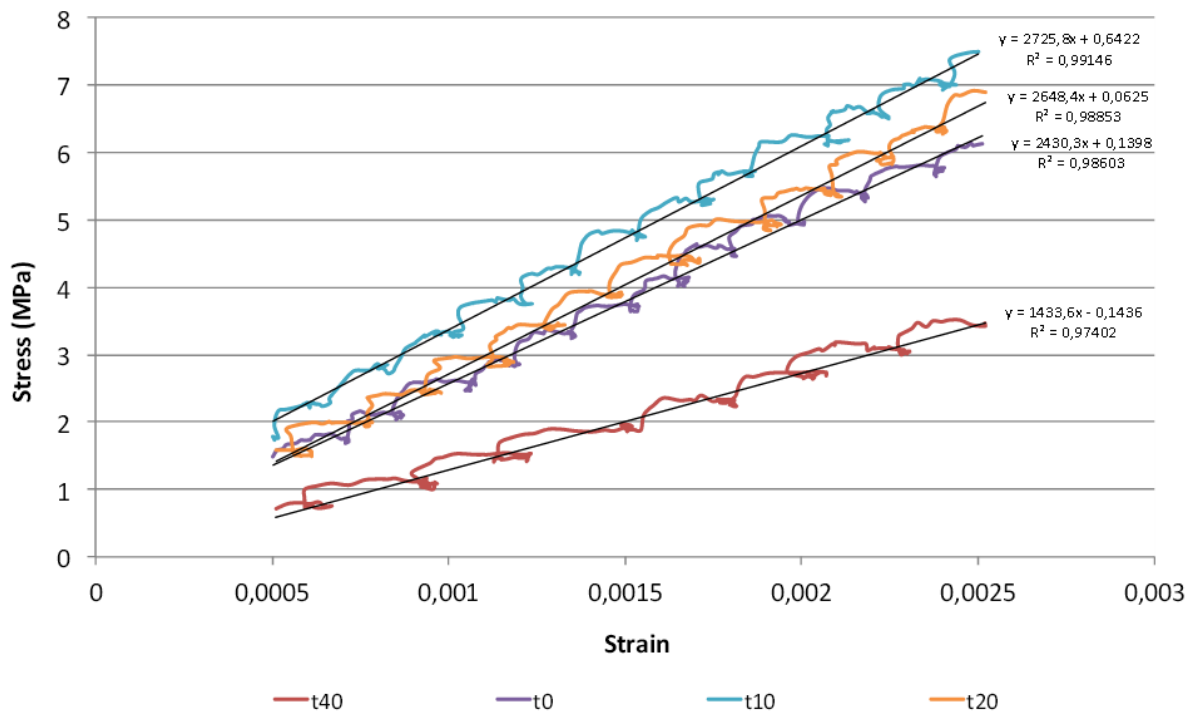


Figure 48: Courbes contrainte-déformation des films de chitosan avant traitement, après 10, 20 et 40 minutes de traitement micro-onde

La Figure 48 présente un exemple de courbe contrainte-déformation pour différents temps de micro-ondage, permettant de déterminer le module de Young. On constate que les valeurs de contrainte sont faibles, du fait de la faible résistance du matériau et de la finesse des films testés (de l'ordre de 45 μm).

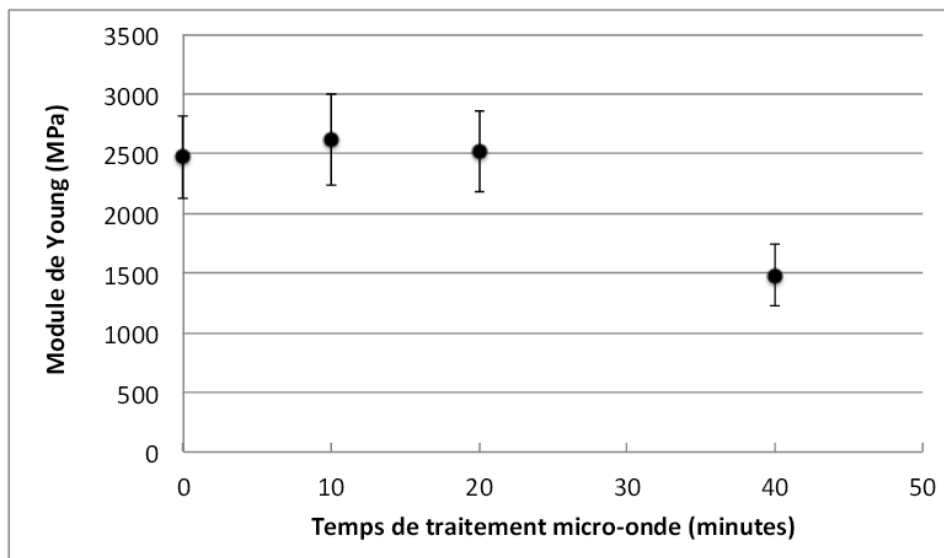


Figure 49 : Suivi du module de Young de film de chitosan au cours du traitement micro-onde

La Figure 49 montre l'évolution du module de Young au cours du traitement micro-onde. On note d'une part que les écarts-types sont élevés, probablement dûs aux difficultés de réaliser des essais de traction dans des conditions idéales d'humidité relative et de découpe des éprouvettes. Les essais ont en effet été réalisés ici avec des éprouvettes découpées à la main, sur des films fins, induisant nécessaire des fragilités des éprouvettes et beaucoup d'échantillons inexploitable.

Toutefois, malgré ces difficultés opérationnelles, on constate grâce à la Figure 49 que le module de Young semble stable pendant les premières minutes de traitement micro-onde (de 0 à 20 minutes) puis diminue à 40 minutes de traitement. Ces résultats rappellent la catégorisation des échantillons en 3 groupes réalisée précédemment avec l'analyse PCA des spectres FTIR obtenus sur les films de chitosan au cours du traitement micro-onde, les films traités pendant 4 à 25 minutes étant considérés comme significativement différents des échantillons traités pendant 30 à 40 minutes (Figure 42). Ces résultats suggèrent que les modifications structurales, révélées notamment par l'étude en spectroscopie infra-rouge, ont une influence sur les propriétés mécaniques des films de chitosan, évaluées ici par le module de Young.

On peut imaginer qu'avant 20 minutes de traitement, le niveau d'hydratation et de chaleur du film lui permet de rester en dessous de sa transition vitreuse. Au delà, on peut supposer que la transition vitreuse est franchie, et que le polymère subit un remaniement tel que ces propriétés s'en trouvent fortement modifiées, d'où cette chute marquée du module de Young.

2.2.5. Conclusions

Thanks to the different techniques used and the results crossed during this study, different modifications were shown to occur in chitosan films during microwave treatment.

The first important modification was the polymeric chain scission, observed on FTIR results, and confirmed by rheological study. Depolymerization led to a deep change in polymer structure and was confirmed with DSC. The second important modification occurring in chitosan film during microwave heating is the chitosan deacetylation, which followed 3 steps: one decrease, a equilibrium and a final decrease. It can be assume that depolymerization happened first, followed by Maillard compounds release inducing film yellowing and finally, chitosan deacetylation.

As seen, volatile compounds were produced, highlighted by film yellowing, responsible for off-flavor and potentially hazardous for food contact.

In this study, we showed that several modifications happened during microwave heating of chitosan film and changed its structure and properties. It also means that, although chitosan is a biopolymer widely used with a wide range of applications, some chemical reactions could occur and may potentially affect consumer satisfaction or safety. It is crucial to go further in qualification and in quantification of these phenomena, especially as we showed that these phenomena started since the first minute of microwave heating.

2.3. Influence d'un post-traitement micro-onde sur des films d'HPMC

2.3.1. Contenu en eau et température de surface des films d'HPMC

Nous l'avons évoqué précédemment, l'eau joue un rôle important, à la fois dans les propriétés du polymère (elle joue le rôle d'un plastifiant) mais aussi dans le post-traitement micro-onde puisque la molécule d'eau est assimilée à un dipôle électrique et réagit donc au rayonnement micro-onde. L'agitation moléculaire qui en résulte est génératrice de chaleur et c'est l'action combiné de la chaleur et de l'humidité qui engendre la plupart des phénomènes de vieillissement.

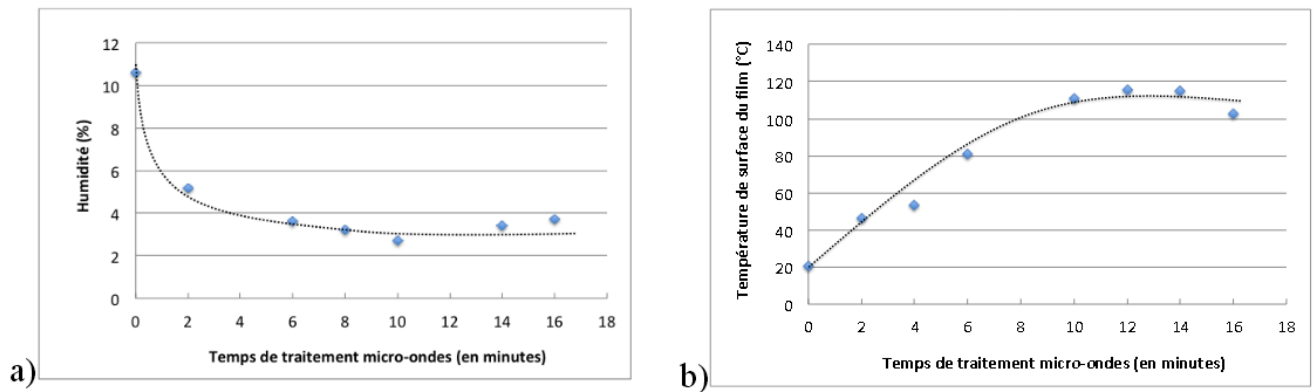


Figure 50 : a) Contenu en eau (en %) des films d'HPMC et b) Température de surface (°C) des films d'HPMC au cours du traitement micro-ondes

Le contenu en eau des films d'HPCM au cours des 16 premières minutes de traitement a été représenté sur la Figure 50 a). Il se stabilise rapide après 4 minutes de traitement à environ 3%. La température de surface du film, quant à elle, augmente régulièrement dans les premières minutes de traitement pour atteindre 100°C à 8 minutes et se stabiliser à 110°C pour la suite du traitement micro-onde. Ces valeurs sont cohérentes avec les observations réalisées sur les films de chitosan

2.3.2. Etude structurale par Spectroscopie infra-rouge FTIR

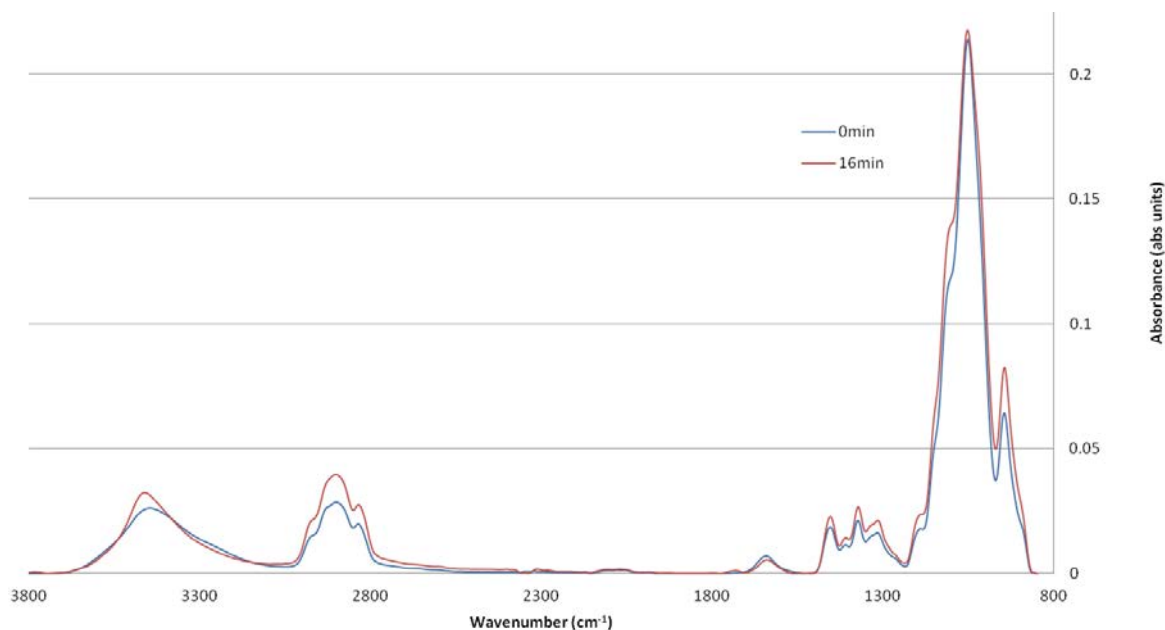


Figure 51 : Spectres FTIR moyens de films d'HPMC obtenus avant et après 16 minutes de traitement micro-onde

Le pic à 945 cm^{-1} augmente progressivement au cours du traitement micro-onde. Ce pic a été utilisé dans la littérature pour investiguer les microstructures cristallines de la cellulose (Wray et al., 2013) et laisse donc envisager des phénomènes de vieillissement.

Le pic à 1053 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-O-C (Pawar et al., 2012). Elle est représentative des phénomènes de rupture de chaînes et n'est pour ainsi dire pas altérée par le traitement micro-onde.

Le pic à 1373 cm^{-1} augmente au cours du traitement. Il correspond à la production de radicaux libres CH_3 créés lors de la dégradation de l'HPMC par les phénomènes de ruptures de chaîne (Sangappa et al., 2008).

Un pic, situé aux alentours de 1640 cm^{-1} diminue au cours du traitement et on constate un léger shift sur le nombre d'ondes (1643 cm^{-1} pour t0, 1639 cm^{-1} pour t2 à t10, 1635 cm^{-1} pour t12 à t16). Ce pic correspond à la vibration de la liaison C-O d'un cycle à 6 carbones. Cette observation pourrait être cohérente avec un encombrement stérique au sein du matériau.

Le pic à 2835 cm^{-1} ainsi que le pic à 2900 cm^{-1} augmentent au cours du traitement. Ces pics correspondent aux vibrations caractéristiques des liaisons des groupements méthyles et hydroxypropyles de l'HPMC (Pedley and Davies, 2009).

Enfin, la zone située aux alentours de 3450 cm^{-1} reste constante tout au long du traitement, et augmente à t16. On constate un shift du nombre d'onde (3448 cm^{-1} pour t0, 3452 cm^{-1} pour t2, 3456 cm^{-1} pour t4, 3460 cm^{-1} pour t6 et t8 et 3463 cm^{-1} pour t10 à t16). Ces zones est généralement attribué à la vibration des liaisons -OH impliqué dans l'eau et signe une légère prise en eau du film d'HPMC.

2.3.3. Analyse statistique avec le logiciel The Unscrambler®

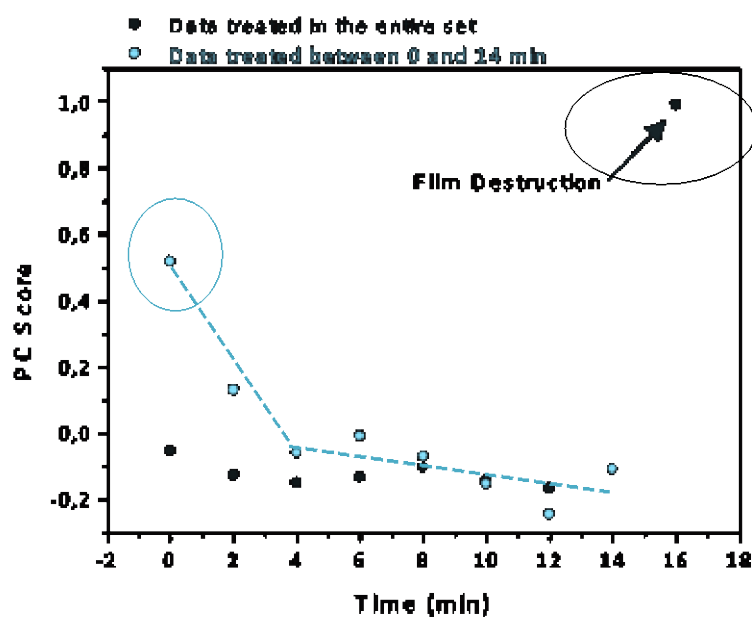


Figure 52: Score plot obtenu par l'ACP des spectres moyens de films d'HPMC au cours des 14 (en bleu) ou 16 (en noir) premières minutes de traitement micro-onde par le logiciel The Unscrambler

Figure 52 présente l'étude statistique en Analyse en Composantes Principales (ACP) obtenue pour les films d'HPMC traités au micro-onde. Cette figure présente deux analyses en parallèle. La première analyse présentée en Figure 52 considère l'ensemble des échantillons de 0 à 16 minutes de traitement micro-onde, étant posé qu'au bout de 16 minutes, le film est fortement dégradé. On remarque que globalement, les échantillons sont statistiquement

répartis en deux groupes : Le premier contient tous les échantillons de 0 à 14 minutes inclus, et le dernier groupe n'est constitué que du dernier échantillon traité 16 minutes.

On pose alors l'hypothèse que la dégradation du film d'HPMC à 16 minutes est telle que le spectre FTIR en est forcément très marqué et ressort très différent de l'ensemble des autres échantillons.

Pour confirmer cette hypothèse, on procède à la même ACP mais en excluant le dernier échantillon traité pendant 16 minutes (tracé clair). On constate effectivement une tendance différente. L'échantillon neuf t_0 est représenté à part, puis, dès la 2^{ème} minute de traitement, la structure est modifiée. On constate une pente rapide de t_0 à t_4 puis, à partir de 6 minutes, une pente plus douce. Ces résultats laissent penser que les modifications se poursuivent mais sont moins importantes alors que le traitement se poursuit. Ces deux pentes étaient masquées sur l'ACP réalisée en prenant en compte le temps 16 minutes. L'analyse ACP sur les 14 premières minutes laissent envisager des modifications des films d'HPMC, rapides dans un premier temps puis plus modérée lors de la poursuite du traitement.

2.3.4. Etude de la cristallinité par Diffractométrie aux Rayons X

La Figure 53 présente le diffractogramme DRX obtenu pour 3 types de films HPMC.

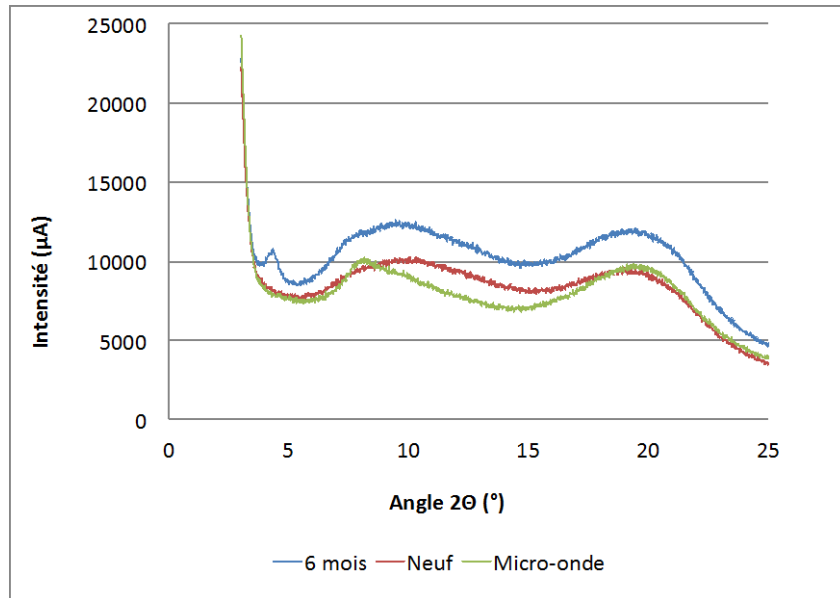


Figure 53 : Diffractogrammes aux rayons X obtenus pour des films d'HPMC neuf (en rouge), traité au micro-onde pendant 15 minutes (en vert) et vieilli 6 mois à 40°C et 50% d'humidité relative (en bleu)

La courbe rouge représentant le film d'HPMC neuf est caractéristique d'un matériau amorphe, ne présentant pas de pic de diffraction qui se produisent lorsque le faisceau de rayons X vient heurter une zone cristalline, comme on peut le constater sur la courbe verte qui représente le film d'HPMC qui a subi un vieillissement en enceinte climatique pendant 6 mois. Ce pic laisse supposer la présence d'une zone cristalline sur ce film.

La courbe DRX obtenue pour un film d'HPMC ayant subi 15 minutes de traitement micro-ondes, ne présente pas ce genre de pic, mais plutôt une allure de matériau amorphe. Le diffractogramme n'est toutefois pas superposable à celui obtenu pour un film neuf.

Partant de ce diffractogramme, on peut formuler plusieurs hypothèses :

- il ne s'est pas produit de phénomène de cristallisation mais la phase amorphe du matériau micro-ondé a subi un remaniement dû à des phénomènes de tensions internes
- il s'est effectivement produit des événements de cristallisation mais de façon trop sporadique et on arrive aux limites de détections de la méthode, les zones cristallines étant peut-être trop rares et/ou trop petites pour être détectées à cette puissance de faisceau.

2.3.5. Etude de la surface des films d'HPMC par Microscopie Electronique à Balayage

Pour mettre en évidence d'éventuels phénomènes de cristallisation, une observation de la surface des films par microscopie électronique à balayage a été réalisée avant et après traitement micro-onde.

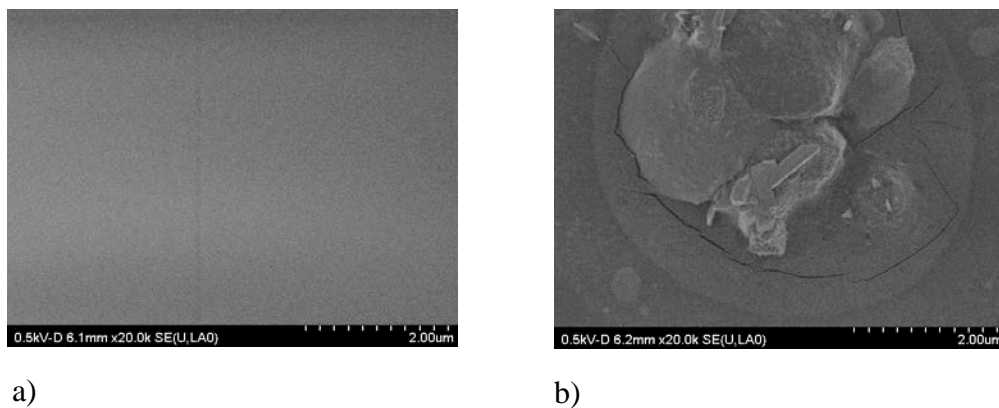


Figure 54: Images de microscopie électronique à balayage obtenues pour a) un film d'HPMC neuf b) un film d'HPMC après 15 minutes de traitement micro-onde

La Figure 54 a) présente la surface d'un film d'HPMC neuf, elle est lisse, sans particularité observable, homogène.

La Figure 54 b) présente quant à elle la surface d'un film après le traitement micro-onde d'une durée de 15 minutes. Le film présente une surface non-homogène, des structures qui évoquent une organisation cristalline ainsi que des zones de fissures.

Cette observation semble coïncider avec l'hypothèse de phénomènes de cristallisation et de dégradation du film d'HPMC. Toutefois, comme évoqué précédemment, cette cristallisation est trop sporadique pour être vraiment mise en évidence par la méthode DRX.

2.3.6. Comportement mécanique en traction

Nous l'avons vu précédemment, la structure des films a été modifiée au cours du traitement micro-onde. Les essais de traction réalisés permettent d'évaluer les conséquences de ces modifications structurales sur les propriétés mécaniques des films au cours du traitement micro-onde.

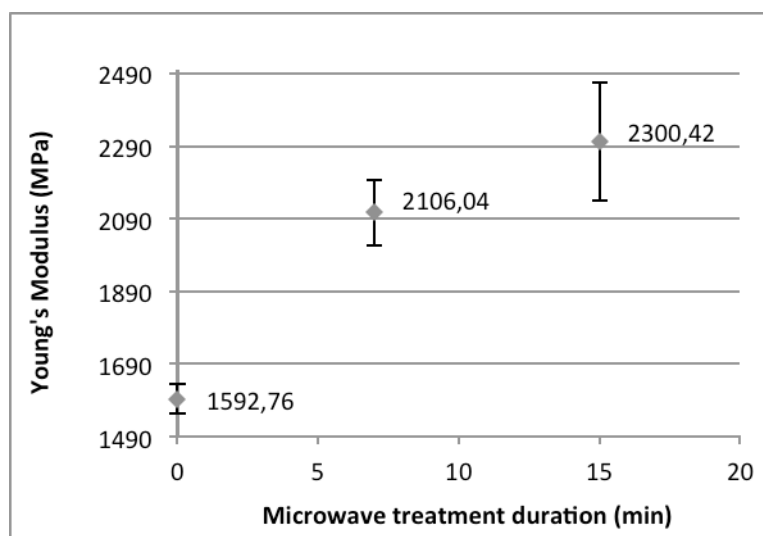


Figure 55 : Valeurs du module de Young obtenues après essais de traction sur des films d'HPMC à 0, 8 et 15 minutes de traitement micro-onde

La Figure 55 présente les résultats obtenus pour les essais mécaniques de films d'HPMC neufs, traités 8 ou 15 minutes au micro-onde. Le module de Young a été déterminé graphiquement comme la pente de la partie linéaire de la courbe représentant. Son augmentation au cours du traitement signe la perte de souplesse du film probablement du fait de sa déshydratation.

2.3.7. Spectrométrie UV-Visible : Transparence

Les propriétés barrières des films d'HPMC à la lumière visible et aux ultra-violet ont été mesurées par balayage de longueur d'ondes entre 200 et 900 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 4000 UV/visible, PHARMACIA BIOTECH, Orsay, France) selon la méthode décrite par Fang ([Fang et al., 2002](#)).

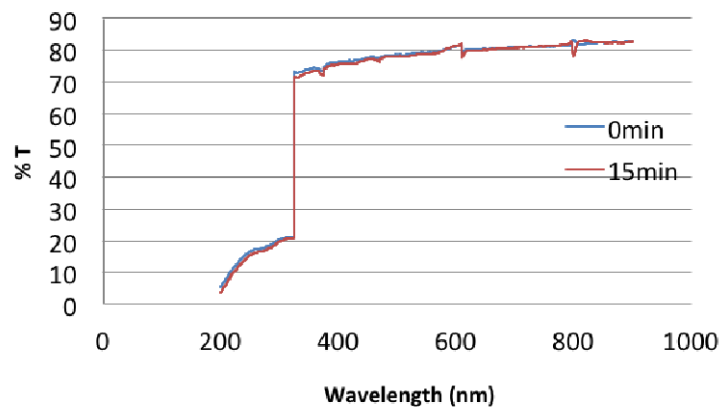


Figure 56 : Pourcentage de transmission obtenu par spectrophotométrie sur des films d'HPMC avant (film neuf) et après 15 minutes de traitement micro-onde

La Figure 56 montre que la transparence des films d'HPMC n'est pas modifiée par le traitement micro-onde. Les phénomènes de cristallisation mis en évidence précédemment auraient pu laisser penser à une opacification même mégère du film mais ce n'est pas le cas. Cette mesure de la transparence montre que la cristallisation du film d'HPMC reste sporadique et n'affecte pas les propriétés optiques du film. Ceci représente un avantage certain lors de l'utilisation de ce matériau pour un emballage alimentaire.

2.3.8. Conclusions

Il apparaît au cours de cette étude que les films d'HPMC résiste plutôt bien au chauffage micro-onde. On note toutefois que des phénomènes sporadiques de cristallisation ont lieu, perturbant la phase amorphe avoisinante, et créant des tensions dans le matériau qui mènent à des fissures. Ces phénomènes restent toutefois limités, n'affectant pas les propriétés optiques du film dont la transparence est préservée au cours du traitement.

En revanche, le film subit une déshydratation qui modifie ses propriétés mécaniques, se traduisant notamment par une perte de souplesse mise en évidence par une augmentation du module de Young.

On notera aussi qu'au delà d'un traitement de 15 minutes, le film d'HPMC brûle et est détruit.

On peut donc imaginer une application d'emballage alimentaire pour ce type de biopolymère, mais probablement en association avec d'autres matériaux, et pour des durées de chauffage courtes.

2.4. Extension de l'étude de l'influence du post-traitement micro-onde sur des films de PLA

Les résultats présentés ci-après font suite aux deux études menées précédemment sur le chitosan et l'HPMC. Nous avons partiellement repris la même démarche expérimentale sur le PLA afin de voir si le post-traitement micro-onde impactait aussi un biopolymère utilisé non pur, sous sa forme commerciale additivée en anti-oxydants notamment.

2.4.1. Etude structurale par spectroscopie infra-rouge FTIR

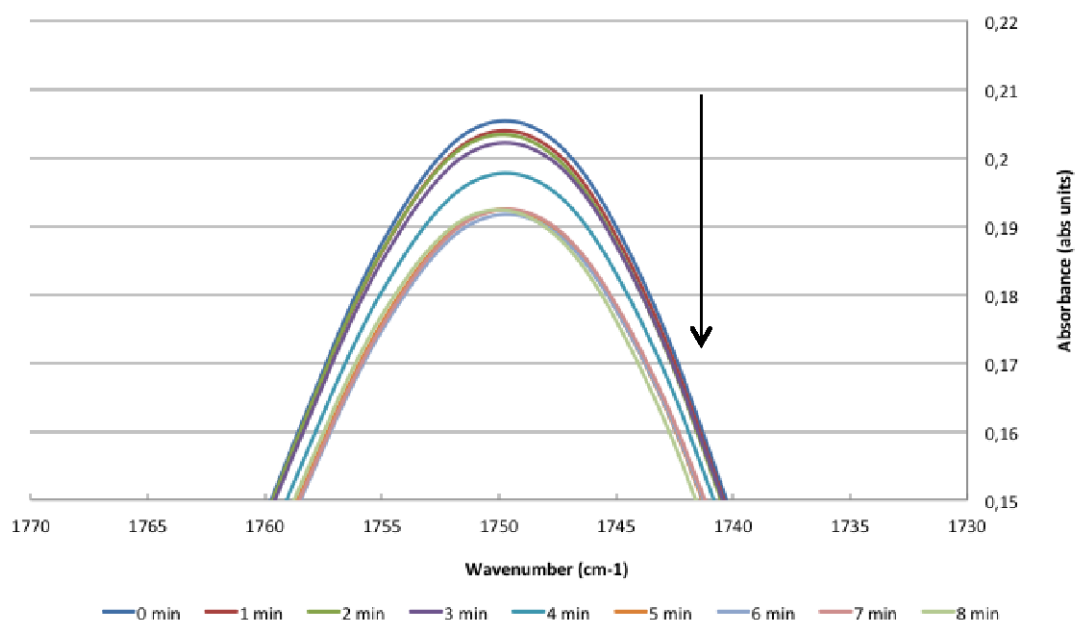


Figure 57 : Spectres FTIR des échantillons de PLA traités de 0 à 8 minutes au micro-onde (chaque spectre à un temps donné correspond à la moyenne de 3 spectres pour ce temps donné). La flèche représente le sens d'évolution de l'intensité du pic au cours du traitement micro-onde.

Les spectres obtenus par FTIR pour les films de PLA au cours des 8 premières minutes de post-traitement micro-onde sont sans différence notable, si ce n'est au niveau du pic à 1751 cm^{-1} présenté Figure 57. On constate que le pic obtenu à ce nombre d'onde tend à diminuer au cours du temps, de façon non régulière. En effet une tendance en 3 groupes se dessine. Le premier groupe englobe les spectres des échantillons traités de 0 à 3 minutes. Ensuite,

2.4 Extension de l'étude micro-onde sur des films de PLA

l'échantillon t4 se démarque du premier ensemble, constituant un deuxième groupe unitaire. Enfin, les échantillons t5 à t8 sont superposés.

La Figure 58 montre seulement les spectres moyens extrêmes t0 et t8 et fait également figurer les écart-types obtenus pour la répétabilité des résultats. Comme on peut le constater, ces écarts-types sont très faibles et montrent que la diminution de l'intensité du pic à 1751 cm^{-1} décrite précédemment est significative.

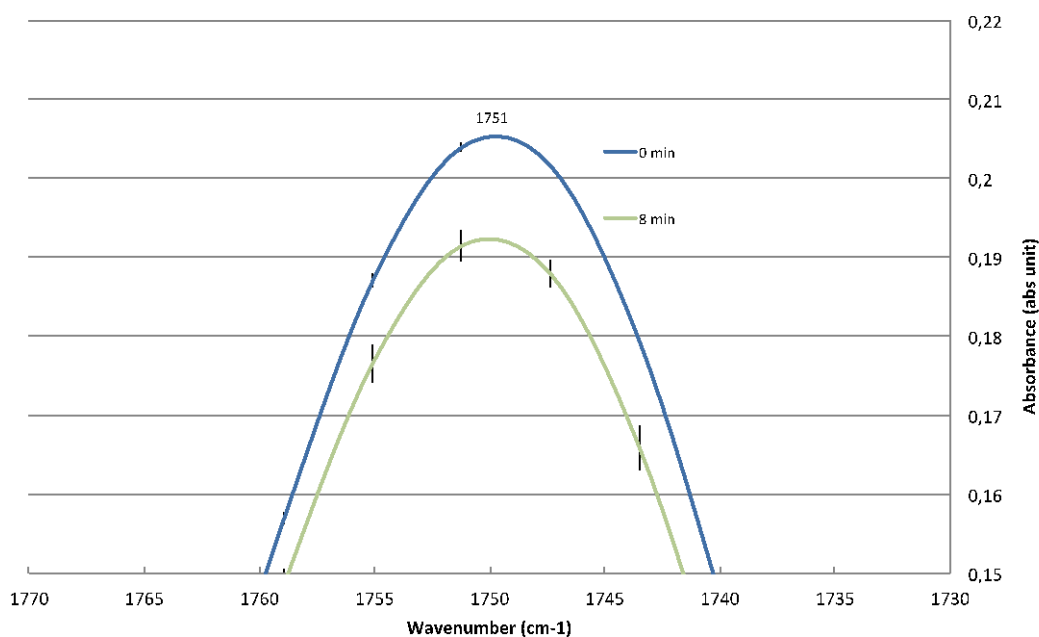


Figure 58 : Spectres FTIR moyens et écarts-types obtenus pour les échantillons de PLA avant (0 min) et après 8 minutes de traitement micro-ondes

Ce nombre d'onde correspond à la vibration de la liaison C-O-C et donc, sa diminution signe des phénomènes de ruptures de chaînes au cours du traitement micro-ondes. Ce résultat est cohérent avec les résultats publiés dans la bibliographie.

2.4.2. Etude de l'état de surface par Microscopie Electronique à Balayage

Les films de PLA à l'état « neuf », avant traitement micro-onde, présente une surface lisse et transparente. Après traitement micro-onde, les films de PLA présentent une opacification bien visible à l'œil nu.

Nous avons procédé à l'observation de la surface des films de PLA avant et après traitement par Microscopie Electronique à Balayage.

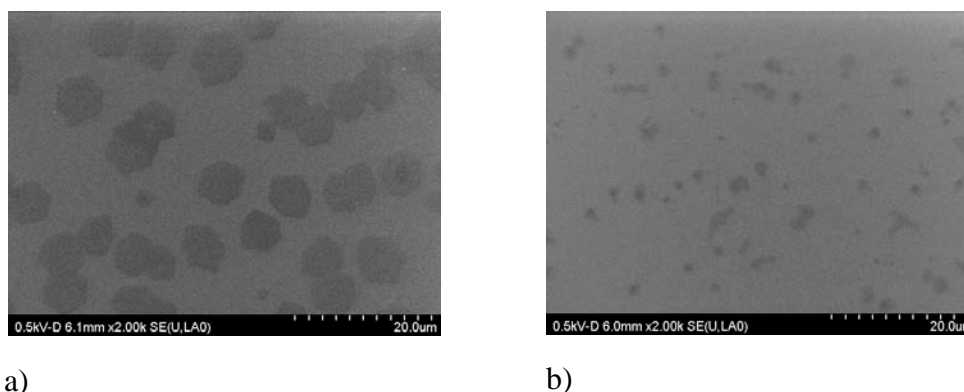


Figure 59 : Image de Microscopie Electronique à Balayage de la surface de films de PLA a)neuf et b) ayant subi un traitement micro-onde de 10 minutes

Sur la Figure 59a) représentant la surface avant traitement micro-onde présente un réseau peu dense. En effet, le contraste en imagerie MEB fait que la matière paraît gris clair alors que les zones moins denses ou de vide paraissent plus foncées. On constate, en comparant cette image à la Figure 59b) que les zones foncées sont plus petites et qu'à l'inverse, la majorité de la surface du film apparaît en gris clair, signe que le réseau de PLA est plus dense. Ce résultat pourrait être expliqué par des phénomènes de cristallisation.

2.4.3. Essais de traction en température contrôlée

Les essais de traction présentés en Figure 60 présente les courbes contrainte-déformation pour des films de PLA soumis à différentes températures (20°C, 40°C et 100°C). Les températures testées ont été choisies afin d'observer le comportement du polymère à température ambiante

2.4 Extension de l'étude micro-onde sur des films de PLA

(20°C), lors d'un vieillissement accéléré (40°C) et lors d'un post-traitement micro-onde (100°C).

Les éprouvettes de PLA ont été les seules qui ont pu être découpées grâce à la technique jet d'eau présentée dans la partie Matériels et Méthodes.

Sur les 3 graphiques, on peut constater une certaine variabilité des résultats, notamment au niveau de la limite d'élasticité. Elle est de 43 ± 11 MPa à 20°C, 27 ± 5 MPa à 40°C et de 4 ± 2 MPa à 100°C. Plus que les valeurs de limite d'élasticité qui sont discutables du fait de l'allure des courbes, on constate quand même une nette diminution de la valeur moyenne de limite d'élasticité, signant la perte de souplesse des films de PLA au fur et à mesure que la température augmente. Ce phénomène a pu être constaté notamment lors du traitement micro-onde des films, on peut observer la rigidification du film après traitement, sachant que celui-ci induit une augmentation de la température jusqu'à 100°C du fait de la vapeur d'eau.

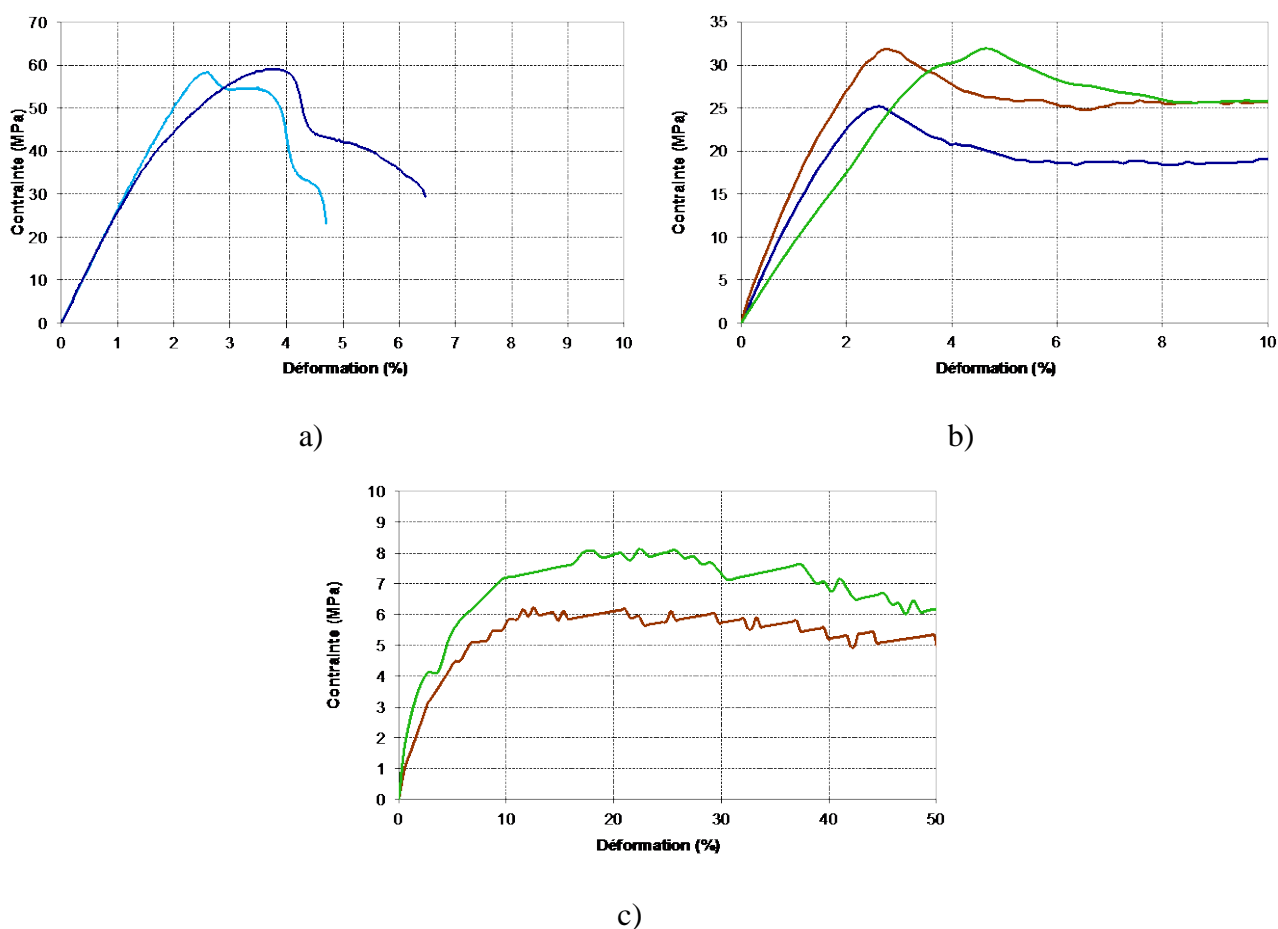


Figure 60 : Essais de traction réalisés sur des films de PLA en température contrôlée
a) 20°C b) 40°C et c) 100°C

Pour gagner en précision, et pour obtenir des valeurs probantes, il aurait fallu disposer d'un capteur de force sur le système de traction avec une valeur beaucoup plus basse, en adéquation avec les forces mesurées.

2.4.4. Etude de la cristallinité par Diffraction à Rayons X avant et après traitement micro-onde

Les observations microscopiques de la surface des films ainsi que la dégradation des propriétés mécaniques du film nous menait à l'hypothèse de modifications structurales de type cristallisation. Une étude en diffractométrie à rayons X a donc été menée pour investiguer la cristallinité du PLA et vérifier cette hypothèse.

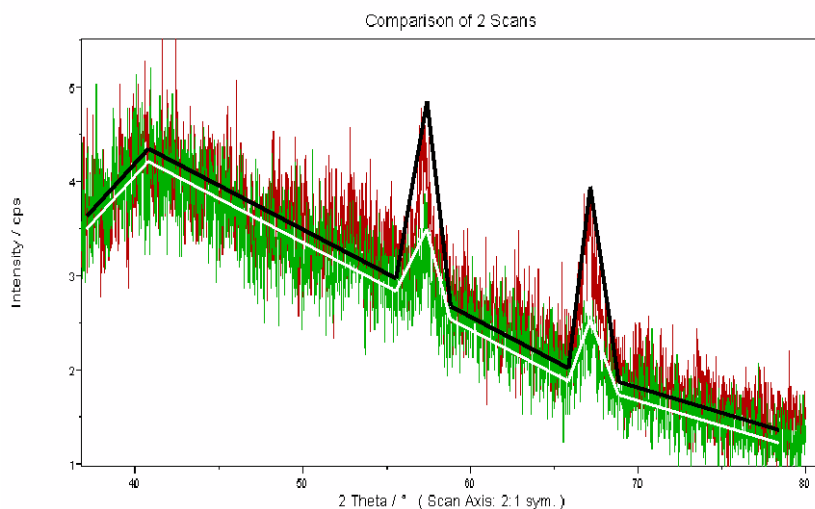


Figure 61: Superposition des diffractogrammes de PLA neuf (en vert) et de PLA micro-ondé 30 minutes (en rouge)

La Figure 61 présente les pics de diffraction obtenus avant et après traitement micro-onde et on constate effectivement une augmentation de la diffraction après traitement. Ces pics ne sont pas nouvellement créés, ils sont déjà présents sur le diffractogramme du film de PLA neuf, mais sont bien amplifiés par le chauffage au micro-onde, ce qui appuie l'hypothèse de la cristallisation du PLA pendant le post-traitement.

2.4.5. Conclusions

Les films de PLA soumis à un traitement micro-onde présentent des altérations faibles de leur structure, notamment des phénomènes de rupture de chaînes, probablement dues à des phénomènes de thermo-oxydation du fait de l'augmentation de chaleur au cours du traitement micro-onde. Les films de PLA perdent leur transparence et deviennent opaques par augmentation de la cristallinité du film, confirmée en diffraction aux rayons X.

Ces modifications structurales altèrent les qualités optiques des films (opacification) mais aussi leurs propriétés mécaniques puisqu'on observe nettement une rigidification des films. De plus, lors du traitement au four à micro-ondes, la température monte vite, et le franchissement de la température de transition vitreuse est facilité car celle-ci est relativement basse par rapport aux autres biopolymères considérés (de l'ordre de 55-60°C).

Ces conclusions sont plutôt en défaveur d'une utilisation du PLA pour des emballages micro-ondables, d'autant que, contrairement aux autres biopolymères testés, le PLA utilisé est déjà additivé d'antioxydants pour limiter ces phénomènes.

2.5. Etude visio-tactile de l'influence d'un post traitement micro-onde sur des films de PLA, Chitosan et HPMC

Cette partie souhaite répondre à la question suivante : les modifications structurales des films de biopolymères induites par le traitement micro-onde sont-elles perceptibles aux sens du consommateur ?

2.5.1. Caractéristiques des films utilisés.

L'épaisseur moyenne de chaque type de biopolymère utilisé pour cette étude a été déterminée par la mesure aléatoire de l'épaisseur du film en 10 points.

Les films utilisés, produits par casting selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes, avaient une épaisseur moyenne de $50,7 \pm 4,7 \mu\text{m}$, $52,4 \pm 3,8 \mu\text{m}$ et $54,8 \pm 1,0 \mu\text{m}$ pour l'HPMC, le PLA et le Chitosan respectivement.

Le contenu en eau des films a été calculé avant traitement et après 8 et 15 minutes de traitement micro-onde. Les résultats sont présentés dans la Table 9.

Table 9 : Contenu en eau des films de biopolymères au cours du traitement micro-ondes

Type de biopolymère	Temps de traitement micro-ondes		
	0 minute	8 minutes	15 minutes
HPMC	8,24 %	7,10 %	8,34 %
PLA	11,50 %	10,50 %	12,64 %
Chitosan	21,45 %	22,05 %	21,44 %

On constate que le traitement micro-ondes n'affecte pas le contenu en eau des films d'HPMC, de PLA et de chitosan. La valeur reste constante au cours du traitement micro-onde. Cela

s'explique par le mode de traitement micro-onde choisi « humide » qui consiste à laisser l'enceinte de l'appareil se saturer en vapeur d'eau. Les films, malgré l'augmentation de la température, ne sèchent pas.

2.5.2. Résultats

La Table 10 présente la p-value obtenue pour les tests de Friedman effectués sur les différents types de biopolymères, selon les trois étapes de l'évaluation et selon les 3 descripteurs choisis. Pour rappel, la p-value est à comparer avec le risque α qui est correspond à la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle H_0 à tort. Dans notre cas, l'hypothèse nulle H_0 est « il n'existe pas de différence de perception entre les échantillons d'un même type de polymère selon le temps de traitement micro-onde pour le descripteur considéré ».

On choisit la valeur communément admise de $\alpha = 5\%$ (0,05).

Si $pvalue < \alpha$ alors on rejette l'hypothèse nulle H_0 .

Si $pvalue > \alpha$ alors on ne rejette pas l'hypothèse nulle H_0 .

Table 10 : p-values obtenues pour le test de Friedman sur les 3 descripteurs collant, glissant et rigidité sur les films d'HPMC, PLA et Chitosan. Les valeurs significatives sont présentées en gras.

		Collant	Glissant	Rigidité
HPMC	Tactile	0,387	0,705	0,387
	Visuelle	0,705	0,287	0,247
	Visio-tactile	0,638	0,387	0,086
PLA	Tactile	0,887	0,080	< 0,0001
	Visuelle	0,026	0,035	0,021
	Visio-tactile	0,527	0,006	< 0,0001
Chitosan	Tactile	0,275	0,607	0,130
	Visuelle	0,747	0,002	0,582
	Visio-tactile	0,687	0,021	0,058

Concernant les résultats obtenus pour l'HPMC, on remarque que les p-values sont toutes au dessus du seuil fixé de 5%. On ne peut donc pas rejeter H_0 et donc, les échantillons n'ont pas été correctement discriminés par le panel. Ce qui est intéressant, au delà de cette première information, c'est de se pencher sur l'intérêt de croiser les perceptions sensorielles dans cette étude.

Concernant le descripteur « collant », la p-value la plus faible est celle obtenu pour l'évaluation tactile pure « à l'aveugle ». Sans surprise, la p-value la plus forte est celle obtenue sur l'évaluation visuelle pure. Difficile en effet, d'évaluer le caractère collant du matériau seulement par l'observation. Ce qui peut paraître surprenant, c'est que la p-value obtenue pour l'étude visio-tactile soit aussi haute, plus proche de celle obtenue par l'évaluation visuelle pure. Cela pourrait indiquer que le sens du toucher a été partiellement perturbé et induit en erreur par l'ajout de la dimension visuelle.

Pour le descripteur « glissant », les résultats peuvent surprendre. L'évaluation tactile de ce descripteur donne une p-value haute, signifiant que les panélistes n'ont pas perçu de différence entre les échantillons. On constate en revanche que les analyses visuelle et visio-tactile qui ont suivi montrent des p-values plus basses. Si on ne passe pas le seuil de significativité, on peut dire que le caractère glissant est mieux évalué par la vision que par le toucher. Dans le cas des films d'HPMC, on peut supposer que ce descripteur glissant est aussi appréhendé par un autre descripteur, visuel, comme la brillance.

Enfin, concernant l'évaluation de la rigidité des films d'HPMC, là encore, les résultats sont inattendus. La rigidité est un descripteur que l'on pourrait envisager comme purement tactile et pas du tout visuel. Pourtant, les p-values des évaluations tactiles et visuelles sont proches, ce qui signifie que les panélistes n'estiment pas mieux la rigidité par le toucher que par la vue. L'association des deux perceptions, en revanche, améliorent nettement l'évaluation et permet d'obtenir une p-value basse qui, si elle ne passe pas le seuil de significativité de 5%, s'en rapproche fortement.

Dans les cas où on ne rejette pas l'hypothèse nulle, on peut supposer qu'il existe une différence entre les échantillons testés. On peut alors procéder à des comparaisons multiples avec la correction de Bonferroni pour mettre en évidence des groupes au sein des échantillons testés.

Ces comparaisons multiples concernent uniquement le PLA (Table 11, Table 12, Table 13) et le chitosan (Table 14).

Table 11 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses visuelle et visio-tactile pour le descripteur glissant des films de PLA

Echantillon	Effectif	Visuelle		Visio-tactile	
		Somme des rangs	Moyenne des rangs	Somme des rangs	Moyenne des rangs
PLA 0 min	25	58,000	2,320 ^a	55,000	2,200 ^a
PLA 8 min	25	52,000	2,080 ^{a,b}	58,000	2,320 ^a
PLA 15 min	25	40,000	1,600 ^b	37,000	1,480 ^b

La Table 11 présente la comparaison multiple des résultats obtenus pour le descripteur GLISSANT obtenus sur les échantillons de PLA. Pour l'analyse visuelle, on constate qu'il n'existe pas de différence statistique entre un échantillon neuf et un échantillon traité 8 minutes, ainsi qu'entre un échantillon traité 8 et 15 minutes. Il existe en revanche une différence significative entre un échantillon non traité et traité 15 minutes.

En visio-tactile, pour ce même descripteur, les conclusions sont légèrement différentes. Si l'échantillon neuf et celui traité 15 minutes ressortent également comme différents, l'échantillon traité 8 minutes est assimilé à l'échantillon neuf mais considéré comme différent de l'échantillon traité 15 minutes.

Globalement, l'échantillon de PLA neuf a été considéré comme moins glissant que l'échantillon traité pendant 15 minutes au micro-onde. Cette différence n'avait pas été marquée significativement pour une analyse tactile pure (Table 10) mais devient évidente dès qu'on introduit la dimension visuelle dans l'évaluation, associée ou non à l'analyse tactile.

Ceci confirme que, même pour un descripteur que l'on pourrait considérer comme purement tactile, la vision joue un rôle important pour appréhender la sensation tactile

La Table 12 montre les comparaisons multiples pour l'analyse visuelle du descripteur COLLANT pour les films de PLA. Etonnement, c'est l'analyse visuelle qui a permis de montrer une différence entre les échantillons pour ce descripteur et non l'analyse tactile. L'analyse visio-tactile n'a pas non plus permis de rejeter l'hypothèse nulle d'égalité entre les échantillons.

Table 12 : Test de comparaisons multiples par paires pour l'analyse visuelle pour le descripteur collant pour les films de PLA

Echantillon	Effectif	Somme des rangs	Moyenne des rangs
PLA 0 min	25	40,000	1,600 ^a
PLA 8 min	25	51,000	2,040 ^{a,b}
PLA 15 min	25	59,000	2,360 ^b

La comparaison multiple permet de dire que pour ce descripteur Collant, les films de PLA traités 15 minutes au micro-onde sont significativement différents des films neufs non traités. Les films traités 8 minutes, quant à eux, ne sont pas considérés comme différents, ni des films neufs, ni des films de 15 minutes. Les films de PLA neufs sont considérés comme moins collant que les films traités pendant 15 minutes.

Il apparaît que pour ce test du descripteur collant des films de PLA, la première analyse – tactile- n'a pas permis de montrer une différence. La seconde analyse –visuelle– permet en revanche de discriminer et classer les échantillons. Il y a donc bien une appréhension visuelle avant la sensation tactile. Ici, les panélistes ont cherché à transcrire visuellement ce qu'ils attendaient d'une surface « collante » et ont classé les échantillons en fonction, et avec succès. La dernière analyse –visio-tactile– réintègre la dimension tactile et vient perturber le classement des échantillons.

On pourrait en conclure que ce n'est pas vraiment le COLLANT en tant que perception tactile qui a été modifié par le traitement micro-onde. En revanche, on peut poser l'hypothèse que ce traitement a provoqué l'apparition de défauts de surface perceptibles visuellement de façon

marquée chez les panélistes et qui constituent un critère de non acceptabilité du film, notamment dans un usage de packaging alimentaire.

Table 13 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses tactile, visuelle et visio-tactile pour le descripteur rigidité pour les films de PLA

Echantillon	Effectif	Tactile		Visuelle		Visio-tactile	
		Somme des rangs	Moyenne des rangs	Somme des rangs	Moyenne des rangs	Somme des rangs	Moyenne des rangs
PLA 0 min	25	31,000	1,240 ^a	39,000	1,560 ^a	30,000	1,200 ^a
PLA 8 min	25	54,000	2,160 ^b	53,000	2,120 ^{a,b}	58,000	2,320 ^b
PLA 15 min	25	65,000	2,600 ^b	58,000	2,320 ^b	62,000	2,480 ^b

La Table 13 présente les résultats obtenus par comparaisons multiples des échantillons de PLA pour le descripteur RIGIDITE. Il apparaît que lors de la première phase d'évaluation, en tactile, les panélistes ont évalué l'échantillon de PLA non traité comme étant moins rigide que les échantillons traités 8 ou 15 minutes. En visuelle, l'échantillon t0 est considéré comme plus rigide que l'échantillon t15 mais le t8 n'est pas significativement différent, ni du t0, ni du t15. L'analyse visio-tactile, dans un troisième et dernier temps, vient appuyer les conclusions de l'analyse tactile et préciser celles de l'analyse visuelle. L'échantillon t0 est considéré comme plus rigide que les échantillons t8 et t15 qui sont assimilés comme identiques.

Cette étude montre qu'un descripteur qui pourrait être considéré comme purement tactile, ici, la rigidité, peut être correctement interprétée visuellement par un consommateur.

Après ce focus sur les différences significatives mises en évidence entre les échantillons de PLA, procédons aux comparaisons multiples sur le descripteur GLISSANT sur les films de chitosan.

Table 14 : Test de comparaisons multiples par paires pour les analyses visuelle et visio-tactile pour le descripteur glissant pour les films de chitosan

Echantillon	Effectif	Visuelle		Visio-tactile	
		Somme des rangs	Moyenne des rangs	Somme des rangs	Moyenne des rangs
Chitosan 0 min	24	55,000	2,292 ^a	55,000	2,292 ^a
Chitosan 8 min	24	55,000	2,292 ^a	52,000	2,167 ^{a,b}
Chitosan 15 min	24	34,000	1,417 ^b	37,000	1,542 ^b

La Table 14 montre que les films de chitosan neufs sont perçus comme étant moins glissants que les films de chitosan ayant subi un traitement micro-ondes.

Pour l'analyse visuelle, le chitosan traité pendant 8 minutes est apparié au film non traité mais est considéré comme différent du film traité pendant 15 minutes.

Dès les premières minutes du traitement du film, nous avons vu que la couleur du film était modifiée avec l'apparition d'un phénomène de jaunissement. Sur la Figure 41 2b), présentant l'évolution de la couleur des films de chitosan au cours du traitement micro-ondes, on remarque que le phénomène de jaunissement s'intensifie mais selon deux pentes différents. La première pente, de t0 à t8 marque une progression du jaunissement continue et plutôt lente. Au delà de 8 minutes, la pente de la droite augmente, signant l'accélération des phénomènes de jaunissement avec une intensification de la couleur pour les films.

Pour en revenir à l'analyse visuelle pure, l'hypothèse que le panel ait été influencé par la couleur pour estimé le caractère glissant du film de chitosan permet d'expliquer que les films t0 et t8 ait été appariés (jaunissement modéré) et considérés comme différents de l'échantillon t15 (jaunissement plus intense).

On peut poser s'interroger sur pourquoi les panélistes ont choisi le jaunissement pour estimer le caractère glissant du film ? Parmi les explications possibles, on peut estimer que le panel, face à une évaluation visuelle exclusive forcée, à chercher à assimiler un descripteur plutôt tactile (le collant) à un descripteur plutôt visuel (ici, le jaunissement qui était le paramètre discriminant entre les échantillons). Le jaunissement peut en effet évoquer une surface plus grasse, et donc, pourquoi pas, plus collant.

2.5.3. Conclusions

L'analyse visio-tactile des biopolymères révèle plusieurs phénomènes. En premier lieu, le panel n'a pas mis en évidence de différence sur les descripteurs considérés entre les échantillons d'HPMC au cours du micro-ondage. Cela signifie que les modifications structurales subies par l'HPMC sont suffisamment fines pour ne pas altérer ses propriétés sensorielles, et donc, son acceptabilité consommateur en cas d'utilisation pour un emballage alimentaire, ce qui n'est pas le cas pour les films de chitosan ou de PLA.

Pour ces biopolymères, le panel a perçu des différences significatives signant l'altération des propriétés sensorielles des films au cours du traitement micro-onde. Il s'avère que ces différences de perception ont pu être mises en parallèle avec des modifications structurales et fonctionnelles des films (opacification, perte de souplesse, jaunissement...).

Cette étude a, en outre, permis de montrer l'étroit lien entre les perceptions visuelle et tactile, confirmant que ces deux sens interagissent l'un avec l'autre, allant jusqu'à influencer les perceptions du consommateur. Ces conclusions appuient le fait que l'analyse sensorielle est un outil puissant pour caractériser un matériau, et *a fortiori*, un matériau qui pourra être utilisé en tant qu'emballage alimentaire. La dégradation du profil sensoriel du film est aussi un outil pour diagnostiquer des modifications structurales et risque de porter atteinte tant à l'acceptabilité qu'à l'innocuité, et donc l'utilisation de ce polymère.

Conclusions et Perspectives

Face aux enjeux environnementaux, il est apparu urgent de trouver des solutions pour développer une industrie moins impactante. En particulier, les matériaux plastiques sont souvent montrés du doigt en raison des quantités de déchets générés et de la grande dépendance de cette industrie au pétrole. C'est dans ce contexte que les biopolymères se sont fortement développés.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse de doctorat ont permis d'investiguer les comportements de trois biopolymères au cours de leur vieillissement. Globalement, les phénomènes mis en évidence sont ceux déjà décrits pour les polymères traditionnels. On retrouve principalement des phénomènes de ruptures de chaîne et de cristallisation. Ces modifications structurales sont limitées en intensité et n'affectent que peu les propriétés des films dans les conditions testées. On assiste néanmoins à une perte significative de souplesse des films qui deviennent, de ce fait, plus difficiles à mettre en œuvre, dans l'optique d'une utilisation industrielle.

Pour aller plus loin dans la caractérisation des phénomènes de cristallisation observés, nous avons souhaité utiliser le rayonnement Synchrotron et avons soumis une demande pour des expériences à l'ERSF de Grenoble (Annexe 5).

Cette proposition n'a malheureusement pas abouti pour la session de qualification à laquelle nous avons postulé, mais il pourrait être intéressant de soumettre une deuxième demande. Cet outil très puissant nous permettrait d'évaluer plus précisément les phénomènes de cristallisation et de réorganisation structurale.

On remarque aussi que les phénomènes mis en évidence lors du vieillissement accéléré sont du même type que ceux mis en évidence lors du post traitement micro-onde. Ainsi, il serait particulièrement intéressant de pouvoir établir un modèle prédictif du vieillissement des biopolymères en utilisant le chauffage micro-onde, facile à mettre en œuvre et plus rapide.

L'étude des films de chitosan soumis à un post-traitement micro-onde a permis de montrer des altérations significatives de la structure des films de type ruptures de chaîne et

déacétylation. Ces modifications ont une action délétère directe sur les qualités des films, tant au niveau optique (jaunissement) que mécanique. Plus grave, il se produit rapidement au sein des films des réactions de Maillard et la création de composés néoformés susceptibles de migrer vers un aliment au contact. Il serait intéressant d'étudier ces phénomènes de migration pour les mettre en évidence, et le cas échéant, les quantifier.

Il a été intéressant de montrer que l'analyse sensorielle est aussi un bon moyen de mettre en évidence des modifications structurales même fines. Par cette étude, nous avons aussi pu constater que l'utilisation de l'analyse sensorielle en visio-tactile apportait une évaluation plus fine que par l'utilisation d'un sens unique.

Ces travaux de thèse sont inédits et ne font, à notre connaissance, pas l'objet d'autres études publiées dans la littérature, on pourrait donc les qualifier d'exploratoires. Ils permettent de poser des bases pour des futurs travaux, en vue de mieux connaître ces matériaux d'avenir que sont les biopolymères.

REFERENCES

A

- ACIOLI-MOURA, R. & SUN, X. S. 2008. Thermal degradation and physical aging of poly(lactic acid) and its blends with starch. *Polymer Engineering & Science*, 48, 829-836.
- AHN, J.-S., CHOI, H.-K. & CHO, C.-S. 2001. A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of chitosan. *Biomaterials*, 22, 923-928.
- AIDER, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837-842.
- AKHTAR, M. J., JACQUOT, M., ARAB-TEHRANY, E., GAIANI, C., LINDER, M. & DESOBRY, S. P. 2009. Control of salmon oil photo-oxidation during storage in HPMC packaging film: Influence of film colour. *Food Chemistry*, 120, 395-401.
- AL MAHDI, R. 2006. *Mise au point et caractérisation de films comestibles à base de polysaccharides et de matières grasses*.
- ALIN, J. & HAKKARAINEN, M. 2010. Type of polypropylene material significantly influences the migration of antioxidants from polymer packaging to food simulants during microwave heating. *Journal of applied polymer science*, 118, 1084-1093.
- ASCHBERGER, K., CASTELLO, P., HOEKSTRA, E., KARAKITSIOS, S., MUNN, S., PAKALIN, S. & SARIGIANNIS, D. 2010. Bisphenol A and baby bottles: challenges and perspectives. *JRC Scientific and Technical Reports, European Union*.
- ASHA, S., DEMAPPA, T., SANJEEV, G., PARAMESWARA, P. & SOMASHEKAR, R. 2009. Spectroscopic and thermal studies of 8MeV electron beam irradiated HPMC films. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 267, 2385-2389.

ASPDEN, T. J., ILLUM, L. & SKAUGRUD, Ø. 1996. Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 23-31.

AURAS, R., HARTE, B. & SELKE, S. 2004. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*, 4, 835-864.

B

BEGLEY, T., DENNISON, J. & HOLLIFIELD, H. 1990. Migration into food of polyethylene terephthalate (PET) cyclic oligomers from PET microwave susceptor packaging. *Food Additives & Contaminants*, 7, 797-803.

BEIL, S., SCHAMBERGER, A., NAUMANN, W., MACHILL, S. & VAN PÉE, K.-H. 2012. Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 87, 117-122.

BELBACHIR, S., ZAÏRI, F., AYOUB, G., MASCHKE, U., NAÏT-ABDELAZIZ, M., GLOAGUEN, J. M., BENGUEDIAB, M. & LEFEBVRE, J. M. 2010. Modelling of photodegradation effect on elastic & viscoplastic behaviour of amorphous polylactic acid films. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 58, 241-255.

BHUNIA, K., SABLANI, S. S., TANG, J. & RASCO, B. 2013. Migration of Chemical Compounds from Packaging Polymers during Microwave, Conventional Heat Treatment, and Storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 523-545.

BLEACH, N., TANNER, K., KELLOMÄKI, M. & TÖRMÄLÄ, P. 2001. Effect of filler type on the mechanical properties of self-reinforced polylactide-calcium phosphate composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12, 911-915.

BOUAPAO, L., TSUJI, H., TASHIRO, K., ZHANG, J. & HANESAKA, M. 2009. Crystallization, spherulite growth, and structure of blends of crystalline and amorphous poly (lactide) s. *Polymer*, 50, 4007-4017.

BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F. M., ARGÜELLES-MONAL, W., DESBRIÈRES, J. & RINAUDO, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.

BURDOCK, G. A. 2007. Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and chemical toxicology*, 45, 2341-2351.

C

CAO, Z., GE, H. & LAI, S. 2001. Studies on synthesis and adsorption properties of chitosan cross-linked by glutaraldehyde and Cu(II) as template under microwave irradiation. *European Polymer Journal*, 37, 2141-2143.

CASTELAN, G. 2007. *Polymères biodégradables*, Ed. Techniques Ingénieur.

CHA, Y. & PITT, C. 1990. The biodegradability of polyester blends. *Biomaterials*, 11, 108-112.

CHANG, H., CHEN, Y. & TAN, F. 2011. Antioxidative properties of a chitosan-glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. *Food chemistry*, 124, 589-595.

CHEN, J. & HO, C.-T. 1998. Volatile Compounds Formed from Thermal Degradation of Glucosamine in a Dry System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1971-1974.

CHEN, Q., XIAO, W., ZHOU, L., WU, T. & WU, Y. 2012. Hydrolysis of chitosan under microwave irradiation in ionic liquids promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquids. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 49-53.

COLE, E. T., SCOTT, R. A., CONNOR, A. L., WILDING, I. R., PETEREIT, H.-U., SCHMINKE, C., BECKERT, T. & CADE, D. 2002. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. *International journal of pharmaceutics*, 231, 83-95.

COPINET, A., BERTRAND, C., GOVINDIN, S., COMA, V. & COUTURIER, Y. 2004. Effects of ultraviolet light (315 nm), temperature and relative humidity on the degradation of polylactic acid plastic films. *Chemosphere*, 55, 763-773.

D

DE JONG, S., ARIAS, E. R., RIJKERS, D., VAN NOSTRUM, C., KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. & HENNINK, W. 2001. New insights into the hydrolytic degradation of poly (lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*, 42, 2795-2802.

DESSARTHE, A. 2000. *Usinage des polymères*, Ed. Techniques Ingénieur.

DODANE, V. & VILIVALAM, V. D. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1, 246-253.

DONG, Y., RUAN, Y., WANG, H., ZHAO, Y. & BI, D. 2004. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 1553-1558.

DONG, Y. M., XU, C. Y., WANG, J. W., WANG, M., WU, Y. S. & RUAN, Y. H. 2001. Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B-Chemistry*, 44, 216-224.

DRUMRIGHT, R. E., GRUBER, P. R. & HENTON, D. E. 2000. Polylactic acid technology. *Advanced materials*, 12, 1841-1846.

DUTTA, P. K., TRIPATHI, S., MEHROTRA, G. K. & DUTTA, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.

E

EHLERT, K., BEUMER, C. & GROOT, M. 2008. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Additives and Contaminants*, 25, 904-910.

EINFELDT, J., MEISSNER, D. & KWASNIEWSKI, A. 2001. Polymerdynamics of cellulose and other polysaccharides in solid state-secondary dielectric relaxation processes. *Progress in Polymer Science*, 26, 1419-1472.

F

FANG, Y., TUNG, M. A., BRITT, I. J., YADA, S. & DALGLEISH, D. G. 2002. Tensile and Barrier Properties of Edible Films Made from Whey Proteins. *Journal of Food Science*, 67, 188-193.

FAVIER, V., CHANZY, H. & CAVAILLE, J. 1995. Polymer nanocomposites reinforced by cellulose whiskers. *Macromolecules*, 28, 6365-6367.

FEI LIU, X., LIN GUAN, Y., ZHI YANG, D., LI, Z. & DE YAO, K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335.

FUKUSHIMA, K. & KIMURA, Y. 2008. An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly (lactic acid) s with high molecular weight. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46, 3714-3722.

G

GOPALAN NAIR, K., DUFRESNE, A., GANDINI, A. & BELGACEM, M. N. 2003. Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. 3. Effect of chemical modification of chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 4, 1835-1842.

GRIFFITH, L. G. 2000. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 48, 263-277.

GUPTA, B., REVAGADE, N. & HILBORN, J. N. 2007. Poly (lactic acid) fiber: an overview. *Progress in Polymer Science*, 32, 455-482.

GUPTA, M. & DESHMUKH, V. 1982. Thermal oxidative degradation of poly-lactic acid. *Colloid and Polymer Science*, 260, 514-517.

H

- HARISH PRASHANTH, K. V. & THARANATHAN, R. N. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential, An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 117-131.
- HENTON, D. E., GRUBER, P., LUNT, J. & RANDALL, J. 2005. Polylactic acid technology. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 527-577.
- HO, K. L. G., POMETTO, A. L. & HINZ, P. N. 1999. Effects of temperature and relative humidity on polylactic acid plastic degradation. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7, 83-92.
- HOAGLAND, P. D. & PARRIS, N. 1996. Chitosan/pectin laminated films. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 44, 1915-1919.
- HUANG, J.-R., HUANG, C.-Y., HUANG, Y.-W. & CHEN, R.-H. 2007. Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products. *LWT-Food science and technology*, 40, 1287-1291.
- HYON, S. H., JAMSHIDI, K. & IKADA, Y. 1999. Effects of residual monomer on the degradation of dl-lactide polymer. *Polymer international*, 46, 196-202.

J

- JARROUX, N. 2008. *Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications*, Ed. Techniques Ingénieur.

K

- KALE, G., KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., SELKE, S. E. & SINGH, S. P. 2007. Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromolecular bioscience*, 7, 255-277.

- KAPPE, C. O., DALLINGER, D. & MURPHREE, S. S. 2008. *Practical microwave synthesis for organic chemists*, John Wiley & Sons.
- KHOR, E., LIM, L. Y. L. Y., KHOR, E. & LIM, L. Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339.
- KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., SELKE, S., NGOUAJIO, M. & FERNANDEZ, R. T. 2010. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2641-2647.
- KLOCKER, J., WAILZER, B., BUCHBAUER, G. & WOLSCHANN, P. 2002. Aroma Quality Differentiation of Pyrazine Derivatives Using Self-Organizing Molecular Field Analysis and Artificial Neural Network. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4069-4075.
- KNORR, D., WAMPLER, T. P. & TEUTONICO, R. A. 1985. Formation of Pyrazines by Chitin Pyrolysis. *Journal of Food Science*, 50, 1762-1763.
- KOEHLER, P. E., MASON, M. E. & NEWELL, J. A. 1969. Formation of pyrazine compounds in sugar-amino acid model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 393-396.
- KOPINKE, F. D., REMMLER, M., MACKENZIE, K., MÖDER, M. & WACHSEN, O. 1996. Thermal decomposition of biodegradable polyesters—II. Poly(lactic acid). *Polymer Degradation and Stability*, 53, 329-342.
- KOWALCZUK, J. & TRITT-GOC, J. 2011. Effect of microwave irradiation on the hydroxypropyl methylcellulose powder and its hydrogel studied by Magnetic Resonance Imaging. *Carbohydrate Polymers*, 83, 166-170.
- KUBWABO, C., KOSARAC, I., STEWART, B., GAUTHIER, B., LALONDE, K. & LALONDE, P. 2009. Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants*, 26, 928-937.
- KUMAR, M. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.

L

- LAKSMANA, F. L., KOK, P. J. A. H., FRIJLINK, H. W., VROMANS, H. & VAN DER VOORT MAARSCHALK, K. 2010. Gas permeation related to the moisture sorption in films of glassy hydrophilic polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 116, 3310-3317.
- LAMPE, K. J., NAMBA, R. M., SILVERMAN, T. R., BJUGSTAD, K. B. & MAHONEY, M. J. 2009. Impact of lactic acid on cell proliferation and free radical-induced cell death in monolayer cultures of neural precursor cells. *Biotechnology and bioengineering*, 103, 1214-1223.
- LAPASIN, R. & PRICL, S. 1995. *Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications*, Blackie Academic & Professional London.
- LEDERMAN, S. J., THORNE, G. & JONES, B. 1986. Perception of texture by vision and touch: multidimensionality and intersensory integration. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 12, 169.
- LI, K., XING, R., LIU, S., QIN, Y., MENG, X. & LI, P. 2012. Microwave-assisted degradation of chitosan for a possible use in inhibiting crop pathogenic fungi. *International journal of biological macromolecules*, 51, 767-773.
- LIM, D. S., KWACK, S. J., KIM, K.-B., KIM, H. S. & LEE, B. M. 2009. Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72, 1285-1291.
- LIM, L.-T., AURAS, R. & RUBINO, M. 2008. Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33, 820-852.

M

- MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K., NAIR, N. R. & JOHN, R. P. 2010. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, 101, 8493-8501.
- MAINIL- VARLET, P., CURTIS, R. & GOGOLEWSKI, S. 1997. Effect of in vivo and in vitro degradation on molecular and mechanical properties of various low- molecular- weight polylactides. *Journal of biomedical materials research*, 36, 360-380.
- MANJUBALA, I., SCHELER, S., BÖSSERT, J. & JANDT, K. D. 2006. Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique. *Acta Biomaterialia*, 2, 75-84.
- MARAGOU, N. C., MAKRI, A., LAMPI, E. N., THOMAIDIS, N. S. & KOUPPARIS, M. A. 2008. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Additives and Contaminants*, 25, 373-383.
- MARTIN, F. L. & AMES, J. M. 2001. Formation of Strecker Aldehydes and Pyrazines in a Fried Potato Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3885-3892.
- MECWAN, M. M., RAPALO, G. E., MISHRA, S. R., HAGGARD, W. O. & BUMGARDNER, J. D. 2011. Effect of molecular weight of chitosan degraded by microwave irradiation on lyophilized scaffold for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97, 66-73.
- MERCIER, J. P. & MARÉCHAL, E. 1993. *Chimie des polymères: synthèses, réactions, dégradations*, PPUR presses polytechniques.
- MOONEY, B. P. 2009. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *The Biochemical Journal*, 418, 219-232.

MORRIS, G. A., CASTILE, J., SMITH, A., ADAMS, G. G. & HARDING, S. E. 2009. The kinetics of chitosan depolymerisation at different temperatures. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 1344-1348.

MUCHA, M. 1997. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 198, 471-484.

MÜLHAUPT, R. 2013. Green Polymer Chemistry and Bio-based Plastics: Dreams and Reality. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214, 159-174.

N

NERIN, C. & ACOSTA, D. 2002. Behavior of Some Solid Food Simulants in Contact with Several Plastics Used in Microwave Ovens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 7488-7492.

NERIN, C., FERNANDEZ, C., DOMENO, C. & SALAFRANCA, J. 2003. Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 5647-5653.

NGUYEN, S., WINNIK, F. O. M. & BUSCHMANN, M. D. 2009. Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 75, 528-533.

NODA, I. 1990. Two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy: theory and applications. *Applied spectroscopy*, 44, 550-561.

O

OGURA, K., KANAMOTO, T., ITOH, M., MIYASHIRO, H. & TANAKA, K. 1980. Dynamic mechanical behavior of chitin and chitosan. Springer.

OYAMA, H. T., TANAKA, Y. & KADOSAKA, A. 2009. Rapid controlled hydrolytic degradation of poly(l-lactic acid) by blending with poly(aspartic acid-co-l-lactide). *Polymer Degradation and Stability*, 94, 1419-1426.

P

PAILLET, M. & DUFRESNE, A. 2001. Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. *Macromolecules*, 34, 6527-6530.

PASQUINELLI, E. 2003. Aux frontières du toucher. *Voir Barré*, 26, 27, 74-86.

PAWAR, H., TETTEH, J. & BOATENG, J. 2012. Preparation, optimisation and characterisation of novel wound healing film dressings loaded with streptomycin and diclofenac. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

PEDLEY, M. E. & DAVIES, P. B. 2009. A polarised ATR study of structural orientation in dry and humid thin HPMC films. *Vibrational Spectroscopy*, 49, 229-236.

PETINAKIS, E., YU, L., SIMON, G. & DEAN, K. 2013. Natural Fibre Bio-Composites Incorporating Poly (Lactic Acid).

R

RAO, M., CHAWLA, S., CHANDER, R. & SHARMA, A. 2011. Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan-glucose solution. *Carbohydrate Polymers*, 83, 714-719.

RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.

S

- SAGUER, E., ALVAREZ, P., SEDMAN, J., RAMASWAMY, H. & ISMAIL, A. 2009. Heat-induced gel formation of plasma proteins: New insights by FTIR 2D correlation spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 23, 874-879.
- SANGAPPA, DEMAPPA, T., MAHADEVAIAH, GANESH, S., DIVAKARA, S. & SOMASHEKAR, R. 2008. Microstructural parameters in electron-irradiated hydroxypropyl methylcellulose films using X-ray line profile analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 3983-3990.
- SCOTT, G. 2000. 'Green' polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 68, 1-7.
- SHAO, J., YANG, Y. & ZHONG, Q. 2003. Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 82, 395-398.
- SHU, C.-K. 1998. Degradation Products Formed from Glucosamine in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1129-1131.
- SIEPMANN, J. et PEPPAS, N. A. 2001. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews*, vol. 48, no 2, p. 139-157.
- SIGNORI, F., COLTELLI, M.-B. & BRONCO, S. 2009. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 74-82.
- SÖDERGÅRD, A. & STOLT, M. 2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 27, 1123-1163.
- STEIN, B. E. & MEREDITH, M. A. 1993. *The merging of the senses*, The MIT Press.
- SUBHASHREE, S., CHAKRABORTI, C., MISHRA, S. & NAIK, S. 2011. Qualitative analysis of controlled release ofloxacin/HPMC mucoadhesive suspension. *International Journal*.

T

- TAUBNER, V. & SHISHOO, R. 2001. Influence of processing parameters on the degradation of poly(L-lactide) during extrusion. *Journal of applied polymer science*, 79, 2128-2135.
- TAVERA QUIROZ, M. J., LECOT, J., BERTOLA, N. & PINOTTI, A. Stability of methylcellulose-based films after being subjected to different conservation and processing temperatures. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2918-2925.
- TSUJI, H. & ISHIDA, T. 2003. Poly (L-lactide). X. Enhanced surface hydrophilicity and chain-scission mechanisms of poly (L-lactide) film in enzymatic, alkaline, and phosphate buffered solutions. *Journal of applied polymer science*, 87, 1628-1633.

W

- WANG, P.-S. & ODELL, G. V. 1973. Formation of pyrazines from thermal treatment of some amino-hydroxy compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 868-870.
- WANG, Y., TIAN, H. & ZHANG, L. 2010. Role of starch nanocrystals and cellulose whiskers in synergistic reinforcement of waterborne polyurethane. *Carbohydrate Polymers*, 80, 665-671.
- WASIKIEWICZ, J. M. & YEATES, S. G. 2013. "Green" molecular weight degradation of chitosan using microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 98, 863-867.
- WHITAKER, T. A., SIMÕES-FRANKLIN, C. & NEWELL, F. N. 2008. Vision and touch: Independent or integrated systems for the perception of texture? *Brain Research*, 1242, 59-72.

WILLIAMS, M. L., LANDEL, R. F. & FERRY, J. D. 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass-forming liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 3701-3707.

WRAY, P. S., CLARKE, G. S. & KAZARIAN, S. G. 2013. Dissolution of tablet-in-tablet formulations studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Y

YAMANE, H. & SASAI, K. 2003. Effect of the addition of poly (D-lactic acid) on the thermal property of poly (L-lactic acid). *Polymer*, 44, 2569-2575.

Z

ZENG, L., QIN, C., WANG, L. & LI, W. 2011. Volatile compounds formed from the pyrolysis of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1553-1557.

ANNEXES

ANNEXES

<i>Annexe 1 : Article Vieillissement des biopolymères. Industries Alimentaires et Agricoles (IAA), Dossier spécial Emballages, Novembre/Décembre 2011.....</i>	<i>169</i>
<i>Annexe 2 : Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract</i>	<i>173</i>
<i>Annexe 3 : Rapport SEC-MALLS du film de chitosan neuf t0 (pas de traitement micro-onde).....</i>	<i>183</i>
<i>Annexe 4 : Rapport SEC-MALLS du film de chitosan t40 (après 40 minutes de traitement micro-onde)</i>	<i>184</i>
<i>Annexe 5 : Proposal soumis à l'ERSF de Grenoble pour l'investigation poussée de la cristallinité des biopolymères</i>	<i>186</i>

DOSSIER

Vieillessement et biodégradabilité des bio-polymères

Charlotte JACQUOT, Muriel JACQUOT, Stéphane DESOBRY

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy

RÉSUMÉ

Le plastique n'a pas bonne presse. Accusé d'être polluant et d'encombrer nos poubelles, il est, de surcroît, fortement associé au pétrole, ce qui ne contribue pas à redorer son image dans l'esprit des consommateurs. Depuis quelques années, les espoirs se portent sur les « bio-polymères », ces nouveaux matériaux issus de ressources renouvelables.

Pour autant, si ces matériaux connaissent une croissance forte, que sait-on vraiment de leur vieillissement ? De la dégradation structurale à la diminution des propriétés fonctionnelles, cet article propose un aperçu des connaissances actuelles sur le vieillissement des bio-polymères et sur les perspectives dans le domaine.

1. EMERGENCE DES MATÉRIAUX BIO-POLYMÈRES, LE CONTEXTE.

Les matériaux plastiques sont omniprésents dans le secteur de l'emballage et dans le quotidien des consommateurs. Ils arrivent, en effet, en tête des matériaux utilisés pour l'emballage, devant le verre et le papier carton. On le retrouve à tous les niveaux, de l'emballage primaire au tertiaire, de la bouteille au film de banderolage (Figure 1).



Figure 1 : Utilisations des polymères plastiques

En 2009, l'emballage souple représentait 1,45 milliards d'euros de chiffre d'affaire. Pourtant l'ensemble de ces matériaux plastiques souffre d'une image très négative et ce, pour plusieurs raisons. A l'heure où les considérations environnementales sont au cœur des préoccupations, tant des consommateurs que des industriels, le plastique est particulièrement visé.

En premier lieu, l'étendue de l'utilisation du plastique le rend particulièrement visible dans les déchets ménagers comme dans les déchets industriels. On estime que quelques 2 500 000 tonnes de déchets de matières plastiques sont produites chaque année en France. De plus, le plastique est fortement associé, de part son mode de production, à l'industrie pétrochimique, ce qui ne contribue pas à améliorer son capital sympathie et ce qui pose des questions sur l'approvisionnement en carbone d'origine fossile à moyen terme.

Dans ce contexte où mettre en œuvre des démarches de développement durable est devenu autant une obligation légale qu'un argument commercial, les industriels investissent dans les biopolymères pour répondre aux attentes du marché et opérer la transition nécessaire du secteur de la plasturgie. Bien que plus chers, ils bénéficient de propriétés comparables aux matériaux traditionnels, tout en apportant un axe d'amélioration au niveau environnemental et jouissant d'une image très positive auprès du grand public. Le marché reste toutefois encore restreint (0,3% du marché des plastiques en Europe en 2008) mais les prévisions de croissance sont optimistes, atteignant 5 à 10% en volume d'ici 2015.

Si le vieillissement des polymères dits « traditionnels » tels que le polyéthylène (PE), le polyamide (PA) ou le polyéthylène téréphthalate (PET) sont aujourd'hui bien connus, le vieillissement des bio-polymères non issus de la pétrochimie est assez peu étudié.

2. BIO, VOUS AVEZ DIT « BIO » ?

Le qualificatif « bio » peut renvoyer à différentes notions et peut être source de confusion dans les esprits. Parler de « bio-polymères », est-ce parler de « bio-dégradabilité », de « bio-fragmentation », de « bio-compostabilité », de l'agriculture biologique, « de bio-sourcing »... ? En bref, ce préfixe couvre un trop grand champ de possibilités pour qu'il ne soit pas nécessaire de le préciser.

En réalité, on parle de bio-polymère dès lors qu'un matériau plastique remplit deux critères, basés sur la nature des ressources utiles à sa production et sur la gestion de sa fin de vie :

- « Bio » parce que produit à partir de ressources renouvelables : il peut contenir 40 à 100% de composants issus du renouvelable. Par cela, on entend la valorisation de matières premières agricoles, utilisées pour l'extraction d'amidon ou de cellulose, sources de carbone végétal.
- « Bio » parce que « biodégradable » dans des conditions bien déterminées.

Le terme **biodégradabilité** renvoie à la capacité d'un matériau à être dégradé par des micro-organismes dans un environnement favorable en température, humidité et oxygénation sans production de produits dont l'action pourrait se révéler dommageable pour l'environnement.

Ce dernier critère exclut de fait les mécanismes de « bio-fragmentation », aussi appelés « oxo-biodégradation » de la définition de biodégradation. Dans ce cas, il s'agit d'une décomposition du matériau plastique en une multitude de petits résidus plastiques mais non visibles. Ces résidus invisibles sont pourtant encore bien présents et ont un potentiel de nocivité vis-à-vis de l'environnement.

La qualification d'un matériau « biodégradable » est strictement encadrée par la norme **NF EN 13432 « Exigences relatives aux emballages valorisables par compostage et biodégradation – Programme d'essai et Critères d'évaluation de l'acceptation finale des emballages »**.

Cette norme prévoit plusieurs critères réglementaires pour la qualification d'un matériau :

- Composition du matériau, notamment les seuils de présence de métaux lourds et de fluor tolérés
- Biodégradabilité évalué par des essais en laboratoire et en conditions maîtrisées : le matériau doit être dégradé à hauteur de 60 à 90% en masse en 6 mois
- Qualité et innocuité du compost obtenu.

La biodégradabilité est évaluée en conditions *in vitro*, c'est le test de Sturm en milieu liquide qui repose sur l'observation de l'activité respiratoire des micro-organismes du milieu de biodégradation. On suit ainsi la production de CO₂, la consommation d'O₂, ainsi que la croissance microbienne.

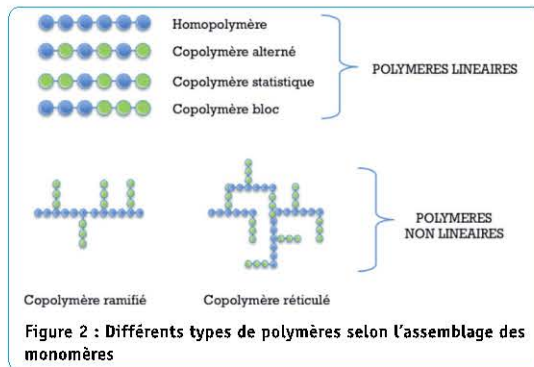
Pour poursuivre l'étude *in vitro*, des études de biodégradabilité sont menées en laboratoire dans un milieu-test puis *in situ* sur le terrain avec des mesures de perte de masse d'échantillons abandonnés dans le sol. Cette dernière méthode reste difficile à maîtriser du fait de la multitude de paramètres mis en jeu mais est en cours de normalisation.

Traçabilité

3. LA CHIMIE DES POLYMÈRES, QUELQUES NOTIONS...

Parler de vieillissement, c'est parler de la modification de la structure du polymère et donc, pour en comprendre les mécanismes, il est nécessaire de revenir sur quelques termes importants de chimie des polymères.

Un polymère est une molécule de haut poids moléculaire constituée par l'assemblage de sous-unités de plus petites tailles, appelées monomères, liées entre elles par des liaisons covalentes. On distingue différentes formes de polymère, tel que présenté sur la Figure 2.



Les polymères linéaires ne sont constitués que d'une chaîne principale formée de monomères tous identiques (homopolymères) ou différents (copolymères) et enchaînés selon différentes distributions : alternée, aléatoire ou par bloc. D'autres polymères présentent une structure plus complexe avec la présence de chaînes latérales greffées sur la chaîne principale. On distingue les polymères ramifiés des polymères réticulés qui se déploient dans les trois directions de l'espace.

Les liaisons mises en jeu dans l'organisation spatiale d'un polymère peuvent être de différentes natures, soit des liaisons fortes de type covalentes C-C, soit des liaisons plus faibles de type liaisons H.

Nous verrons que la cohésion de ses chaînes et la résistance des liaisons tiennent une place importante dans la mise en évidence des phénomènes de vieillissement.

Plusieurs paramètres permettent le suivi de l'évolution de la structure du polymère, et donc la visualisation des phénomènes de vieillissement.

La température de fusion (Tf) correspond, à une pression donnée, à la température à laquelle un corps passe de l'état solide à l'état gazeux.

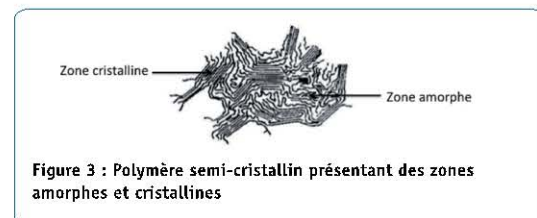
La température de transition vitreuse (Tg) est caractéristique des matériaux amorphes ou semi-cristallins et représente un changement d'état de la matière. Ce phénomène repose sur le changement de mobilité des chaînes macromoléculaires avec la température. Au dessus de la température de transition vitreuse, le matériau est souple, on dit qu'il est dans un état « caoutchoutique ». A l'inverse, en dessous de la température de transition vitreuse, le matériau est dur et cassant comme du verre, il est dit « vitreux ». La température de transition vitreuse est un paramètre propre à chaque matériau.

La cristallinité est également un paramètre très important. En effet, plusieurs niveaux d'arrangement de la matière sont possibles et peuvent coexister au sein d'un matériau, influençant fortement ses comportements au vieillissement ou à la mise en œuvre.

La phase cristalline correspond à un haut niveau d'organisation de la matière. Les chaînes s'organisent en faisceaux ordonnés.

La phase amorphe, quant à elle, sous-entend un désordre des chaînes de polymères par rapport aux autres.

Un matériau peut être 100% cristallin, 100% amorphe ou mixte avec des proportions variables des phases cristalline et amorphe. On parle alors de polymère semi-cristallin (Figure 3).



4. LE VIEILLISSEMENT DES BIO-POLYMÈRES

S'intéresser au vieillissement de ces nouveaux matériaux, c'est en comprendre les mécanismes d'évolution et les implications tant en matière de sécurité que d'optimisation des utilisations.

Alors que les professionnels de l'emballage doivent faire face à la crise du Bisphénol A, il est important de mettre en œuvre tous les moyens nécessaires pour garantir la sécurité lors de l'emploi de ces matériaux. D'autre part, comprendre, voire modéliser, les phénomènes de vieillissement en conditions contrôlées permettra une utilisation optimale des bio-polymères.

4.1 Qu'entend-t-on par vieillissement ?

Le vieillissement d'un matériau correspond à la modification lente et irréversible de sa structure chimique.

Le vieillissement intervient sous la pression de différents événements :

- de part la nature même du polymère, lui conférant une certaine instabilité intrinsèque
- sous l'influence de facteurs de l'environnement avec lequel il interagit : humidité, température, rayonnements UV...
- par des sollicitations extérieures du matériau : compression, flexion, étirement, extrusion...

Il existe deux principaux types de vieillissement : chimique et physique.

Le vieillissement chimique implique une modification profonde de la structure avec notamment, des remaniements au niveau des groupements fonctionnels.

Le vieillissement physique, quant à lui, consiste en un réarrangement spatial des molécules sans atteinte à la structure chimique. C'est un phénomène naturel qui affecte significativement les propriétés physiques de la phase amorphe dans des polymères vitreux ou partiellement vitreux.

4.2 Les facteurs de vieillissement.

Nombreux, nous l'avons évoqué, sont les paramètres qui peuvent provoquer le vieillissement des polymères. Toutefois, parmi ces différents facteurs, deux principaux ont plus particulièrement été étudiés dans la littérature, sont déjà reconnus comme agent du vieillissement physique des polymères et sont présentés sur la Figure 4.

Le premier paramètre est la température. Comme nous l'avons vu précédemment, ce facteur température a une influence directe sur la mobilité des chaînes les unes par rapport aux autres selon que l'on se place avant ou après la température de transition vitreuse. Dans l'état vitreux, le matériau est comme figé et peu de changements peuvent s'opérer. A l'inverse, dans l'état caoutchoutique, des réarrangements sont possibles et c'est dans cet état que le

DOSSIER

matériau va subir les modifications du vieillissement physiques. Le second paramètre important est l'humidité. En effet, l'eau joue un rôle de plastifiant, permettant des phénomènes de glissement des chaînes de polymère les unes par rapport aux autres.

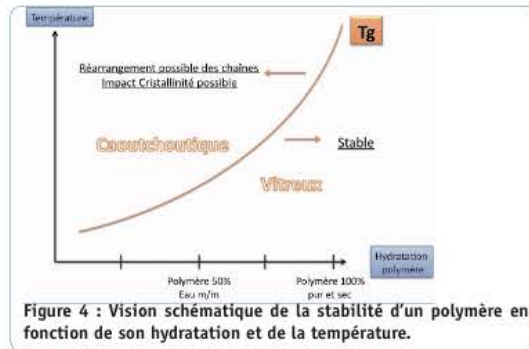


Figure 4 : Vision schématique de la stabilité d'un polymère en fonction de son hydratation et de la température.

La Figure 4 montre l'importance de ces deux paramètres l'un par rapport à l'autre. On constate que la température de transition vitreuse sera d'autant plus basse que le polymère sera humide. Cela implique qu'un matériau humide atteindra plus vite sa température de transition vitreuse et donc, sera exposé aux phénomènes de vieillissement à une température plus faible qu'un polymère plus sec.

Ce constat a une implication directe pour l'industriel, par exemple pour le stockage des films de bio-polymères avant leur utilisation.

D'autres paramètres ont été identifiés comme influençant la dégradation des bio-polymères. Par exemple, des études menées sur le PLA (Poly Lactic Acid), ont montré que le degré de pureté du bio-polymère influence son degré de dégradation. En effet, la purification du polymère, c'est à dire le fait de le débarrasser des éventuels monomères résiduels ou impuretés, permet d'en améliorer la stabilité thermique. (Södergård et Stolt, 2002)

4.3 Les conséquences du vieillissement sur les bio-polymères.

Le vieillissement des bio-matériaux peut être observé à différents niveaux, de la structure chimique du polymère jusqu'à ses fonctionnalités.

4.3.1 Modifications structurales

Plusieurs travaux menés sur le PLA (Poly Lactic Acid) tendent à montrer des modifications de la structure du bio-polymère au cours du vieillissement. La structure du PLA est présentée en Figure 5.

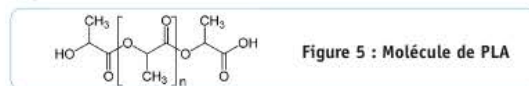


Figure 5 : Molécule de PLA

Le principal mécanisme mis en jeu lors de la dégradation du PLA est la **dépolymérisation** qui est favorisée en conditions alcalines et qui consiste en la libération progressive de dimères d'acide lactique (de Jong et al., 2001). Lors de la dégradation thermique du PLA, on observe différents événements tels que des phénomènes de dépolymérisation « zipper-like » et des phénomènes de trans-estérification inter et intra-chaînes (Södergård et Stolt, 2002).

D'autres paramètres de dégradations ont été décrits dans la littérature comme l'influence des rayonnements ultra-violet. Leur influence a été étudiée et montre également la mise en jeu de phénomènes de scission de chaînes du bio-polymère comme résumé en Figure 6.

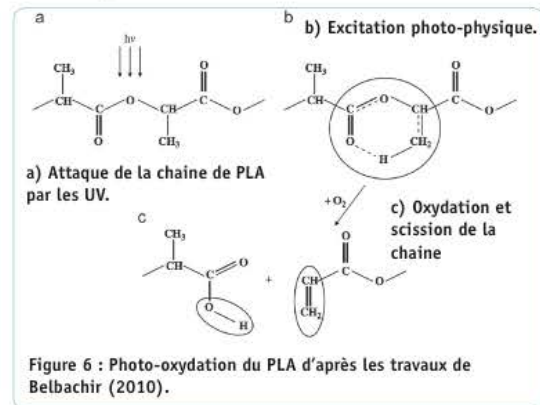


Figure 6 : Photo-oxydation du PLA d'après les travaux de Belbachir (2010).

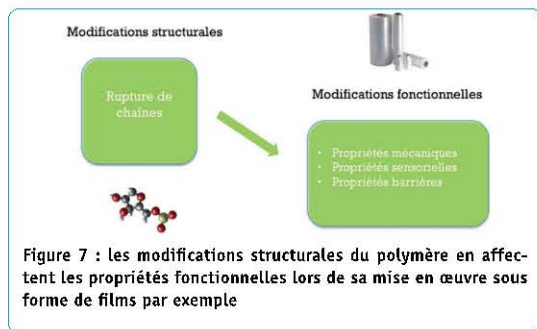
Même si le PLA est un polymère hydrophobe avec une forte résistance à l'eau, les variations en humidité relative affectent ses propriétés et son contenu en eau (Acioli-Moura et Sun, 2008). Les phénomènes de dégradation concernent en premier lieu une attaque des liaisons esters qui sont hydrolysées. Cette dégradation est d'autant plus importante qu'elle est couplée à une augmentation de la température concomitante à une augmentation de l'humidité relative du milieu ou à l'action de rayonnement ultraviolet (Copinet et al., 2003).

La dégradation totale du PLA peut même survenir par action de la vapeur d'eau à haute température, permettant ainsi de revenir au monomère initial, l'acide lactique. Ce procédé permet ainsi le recyclage du PLA (Auras et al., 2004).

Ces phénomènes de dépolymérisation entraînent une baisse du poids moléculaire moyen au cours de la dégradation ce qui influence directement la température de transition vitreuse du polymère qui s'en trouve diminuée. Nous avons vu précédemment que cet abaissement de la température de transition vitreuse rend le polymère sensible aux phénomènes de vieillissement à une température inférieure par rapport à un polymère moins humide.

4.3.2 Modifications fonctionnelles

Il existe un lien étroit entre la structure du polymère et la fonctionnalité du matériau (Figure 7). Il est donc aisé de comprendre que les modifications structurales engendrées par le vieillissement telles que nous les avons citées précédemment vont avoir des conséquences sur les propriétés fonctionnelles du matériau. En l'occurrence, si les travaux menés jusqu'à présent sur le vieillissement des bio-polymères s'attachent surtout à montrer leur biodégradabilité ou leur dégradation structurale, quasiment aucune étude ne cherche à montrer les conséquences de ces modifications structurales sur les propriétés fonctionnelles. Ce travail trouvera pourtant des applications directes pour les industriels dans la mise en œuvre de ces matériaux. En effet, outre le fait de garantir une innocuité et une biodégradabilité conformes aux exigences réglementaires, il est primordial de maîtriser la qualité du bio-polymère tout au long de son cycle de vie. Ce critère de qualité est d'autant plus important qu'il conditionne le niveau d'acceptation de ces bio-matériaux par les industriels comme par les utilisateurs finaux, et donc, conditionne aussi les débouchés et la croissance de ce secteur.



Influence du vieillissement sur les propriétés mécaniques des bio-polymères.

Des travaux (Ho, Pometto, et Hinz, 1999) pour montrer le lien entre structure et fonction ont été menés sur des films commerciaux de PLA. Ces films ont été soumis à une température de 40°C et de 50% d'humidité relative et le poids moléculaire moyen a été suivi au cours du temps. On a constaté la diminution du poids moléculaire moyen, permettant de mettre une fois encore les phénomènes de dépolymérisation en évidence. Parallèlement à l'acquisition de cette donnée structurale, des essais de traction ont été réalisés sur les films de PLA vieillis. Il en ressort que cette modification profonde de la structure polymérique a des conséquences directes sur les propriétés mécaniques de ces films, avec notamment un effondrement du pourcentage d'élongation avant rupture, signant la perte de souplesse des films.

Influence du vieillissement sur les propriétés sensorielles des bio-polymères.

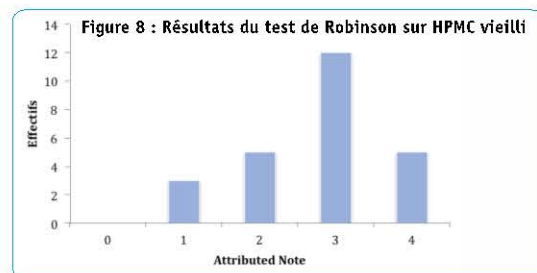
Il est intéressant de regarder l'évolution des propriétés sensorielles d'un film de bio-polymère au cours du temps. En effet, celui-ci peut voir sa couleur changer, une odeur apparaître ou encore devenir rugueux. Outre le fait que ces modifications sont le signe de changements dans la structure du bio-polymère au cours de son vieillissement, elles peuvent aussi compromettre l'acceptabilité du film bio-polymère dans le cadre de son utilisation en emballage par exemple. Ainsi, des essais ont été menés au Laboratoire d'Ingénierie des Bio-Molécules (LIBio, Nancy) avec des films d'HPMC (HydroxyPropyl MéthylCellulose) qui est un bio-polymère déjà présent sur le marché, notamment utilisé comme texturant alimentaire ou en industrie pharmaceutique pour la réalisation de gélules. Des films d'HPMC ont été réalisés par casting et stockés dans une enceinte climatique à 40°C et 50% d'humidité relative pendant 6 mois. Un test de Robinson a ensuite été réalisé entre des témoins « Films d'HPMC frais » et des échantillons « Films d'HPMC vieillis ». Lors de ce test, 2 flacons l'un contenant le film « témoin » et l'autre « l'échantillon » sont présentés à chaque panéliste. Le panéliste ouvre le flacon et sent le « témoin ». Dans un second temps, il procède de même avec « l'échantillon ».

La différence d'odeur perçue par les panélistes est cotée sur une échelle de 0 à 4 :

- 0= aucune différence
- 1= différence avec le témoin difficilement perceptible
- 2= légère différence avec le témoin (à peine définissable)
- 3= différence significative avec le témoin
- 4= différence forte avec le témoin.

Les résultats présentés sur la Figure 8 montrent la présence d'une différence d'odeur significative entre le film témoin et le film échantillon vieilli.

L'apparition d'une odeur pour les films d'HPMC vieillis pose plusieurs questions. Cette odeur signe-t-elle la présence de monomères issus de phénomènes de dépolymérisation comme évoqué



précédemment ? Est-elle révélatrice de la présence de composés d'oxydation ? De composés néo-formés ? Ces molécules présentent-elles un caractère de toxicité ? Dans le cadre de l'utilisation de ces films de bio-polymères pour des emballages alimentaires, il est nécessaire de quantifier le potentiel de migration de ces molécules vers l'aliment et d'établir les conséquences en termes de sécurité alimentaire mais aussi de qualités organoleptiques du produit.

5. CONCLUSION

En conclusion, les matériaux bio-polymères sont une des solutions envisagées par l'industrie pour palier aux problèmes posés par les polymères traditionnels. Pour autant, leur comportement au cours du vieillissement reste mal connu. Les premiers travaux montrent des phénomènes de dépolymérisation qui altèrent les propriétés mécaniques et fonctionnelles de ces matériaux utilisés sous forme de films. Ces études devront être approfondies afin de compléter les connaissances sur le domaine, et permettre un meilleur développement de ces matériaux, améliorer le traitement de leur fin de vie, optimiser leur utilisation et bien sûr, garantir une sécurité aux utilisateurs. De plus, l'étude de l'impact du vieillissement sur les propriétés fonctionnelles et sensorielles permet une approche originale dans le domaine et promet d'apporter des réponses et des solutions innovantes pour l'utilisation de ces matériaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Acioi-Moura R., Sun X. S. « Thermal degradation and physical aging of poly (lactic acid) and its blends with starch ». *Polymer Engineering & Science*. 2008., Vol. 48, n°4, p. 829-836.
- Auras R., Harte B., Selke S. « An Overview of Polylactides as Packaging Materials ». *Macromol. Biosci.* [En ligne]. septembre 2004., Vol. 4, n°9, p. 835-864.
- Belbachir S., Zaïri F., Ayoub G., Maschke U., Naït-Abdelaziz M., Gloaguen J. M., Benguediab M., Lefebvre J. M. « Modelling of photodegradation effect on elastic-viscoplastic behaviour of amorphous polylactic acid films ». *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* [En ligne]. février 2010., Vol. 58, n°2, p. 241-255.
- Copin A., Bertrand C., Longieras A., Coma V., Couturier Y. « Photodegradation and Biodegradation Study of a Starch and Poly (Lactic Acid) Coextruded Material ». *Journal of Polymers and the Environment*. 2003., Vol. 11, n°4, p. 169-179.
- Elipso, l'emballage plastique et souple, les chiffres clés. [en ligne]. Site disponible sur : <http://www.elipso.org/?page=chiffres-cles>. (Page consultée le 10/10/11)
- Ho K. L., Pometto A. L., Hinz P. N. « Effects of temperature and relative humidity on polylactic acid plastic degradation ». *Journal of Polymers and the Environment*. 1999., Vol. 7, n°2, p. 83-92.
- De Jong S., Arias E., Rijkers D. T., Van Nostrum C., Kettenes-van den Bosch J., Hennink W. « New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus ». *Polymer* [En ligne]. mars 2001., Vol. 42, n°7, p. 2795-2802.
- Södergård A., Stolt M. « Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition ». *Progress in Polymer Science* [En ligne]. juillet 2002., Vol. 27, n°6, p. 1123-1163.

Annexe 2 : Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract

Author's personal copy

Carbohydrate Polymers 89 (2012) 1150–1158



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract

Muhammad Javeed Akhtar, Muriel Jacquot*, Jordane Jasniewski, Charlotte Jacquot, Muhammad Imran, Majid Jamshidian, Cédric Paris, Stéphane Desobry

Université de Lorraine, ENSAIA-INPI, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2012

Received in revised form 22 March 2012

Accepted 29 March 2012

Available online 5 April 2012

Keywords:

Hydroxypropyl methylcellulose
Natural red color (betacyanins)
Biodegradable & edible packaging
Trolox® equivalent antioxidant capacity (TEAC)
FTIR
Photo-aging

ABSTRACT

The aims of this work were to functionalize edible hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) films with natural coloring biomolecules having antioxidant capacity and to study their photo-aging stability in the films. HPMC films containing a natural red color compound (NRC) at the level of 1, 2, 3 or 4% (v/v) were prepared by a casting method. A slight degradation of films color was observed after 20 days of continuous light exposure. The antioxidant activity of NRC incorporated films was stable during different steps of film formation and 20 days of dark storage. On the other hand, antioxidant activity of samples stored under light was significantly affected after 20 days. FTIR (Fourier Transformed Infrared) spectroscopy was used to characterize the new phenolic polymeric structures and to study the photo-degradation of films. The results showed a good polymerization phenomenon between NRC and HPMC in polymer matrix giving a natural color to the films. NRC showed an ability to protect pure HPMC films against photo-degradation. This phenomenon was directly proportional to the concentration of NRC.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Environment and food safety have been at the forefront of research concern in recent years. Currently, there is an increasing trend to employ environmental friendly materials with the intention of substituting non-degradable materials. To deal with environmental issues, extend the food quality and to reduce non-degradable packaging wastes has catalyzed the use of new bio-based packaging materials in edible food packaging (Burke, 2006). In edible coating, use of bio-degradable polymers such as polysaccharides, proteins, lipids and their complexes derived from natural origin (Ray & Bousmina, 2005), depends on their barrier properties against light, water vapor and oxygen (Turhan & Sahbaz, 2004).

Cellulose based materials are widely used due to their biocompatibility, edibility, barrier properties, non-polluting and being more economical (Vasconez, Flores, Campos, Alvarado, & Gerschenson, 2009). The use of hydroxypropyl methylcellulose is attractive because it is a readily available non-ionic edible plant derivative shown to form transparent, odourless, tasteless, oil resistant, and water soluble edible films (Akhtar et al., 2010). HPMC is approved for food uses by the FDA (21 CFR 172.874) and the EU (EC 1995); its safety in food use has been affirmed by the JECFA

(Burdock, 2007). The tensile strength of HPMC films is high and flexibility neither too high nor too fragile, which make them suitable for edible coating purposes (Brindle & Krochta, 2008).

In the scope of natural active agents, recently, fruit and vegetable extracts have gained a considerable market in food industries (Stintzing & Carle, 2004). To consider the natural bioactive colors as the colorants, stability, yield and price are mostly constrains. The natural coloring agents in comparison with artificial colors show less stability against light, oxidation, temperature or pH change and other factors (Fabre et al., 1993; Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameei, & Zare, 2006). In spite of such factors, these natural colorants are gaining importance due to their coloring potential, hygiene, nutrition, pharmaceutical activities, bioactivity and environmental consciousness, which indicates relative dependence on natural products (Frank et al., 2005; Hari, Patel, & Martin, 1994).

Although anthocyanins are less stable in various environmental conditions, they include varieties of colors such as orange, red, maroon and blue which make them an attractive alternative as coloring agents in food industries (Markakis, 1982). Moreover, anthocyanins have many health benefits, including reduced risk of cardiovascular diseases (Bell & Goehenaur, 2006) and decreased risk of cancer (Dai, Patel, & Mumper, 2007). These benefits make them essential to provide a healthier food for consumers. Several studies on the antioxidant and antiradical activity of betalains (mainly betanin) from red beetroot extract (*Beta vulgaris* L.) have been published (Escribano, Pedreño, Garcia-Carmona, & Munoz,

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 58 49; fax: +33 3 83 59 58 04.
E-mail address: muriel.jacquot@ensaia.inpl-nancy.fr (M. Jacquot).

1998; Kanner, Harel, & Granit, 2001; Pedreño & Escribano, 2000). In addition to their coloring properties, they are supposed to provide protection against oxidation stress related disorders in humans when being part of the regular diet (Kanner et al., 2001). Betalains are reported to exhibit anti-inflammatory effects (Gentile, Tesoriere, Allegra, Livrea, & Alessio, 2004) and antiradical activities (Cai, Sun, & Corke, 2003; Stintzing & Carle, 2004). These bioactive color compounds can be added into edible films to give them additional properties such as color, antioxidant and gas barrier capacity. As previously reported, the red color of HPMC films allows very good control against photo-oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in salmon oil (Akhtar et al., 2010). Such edible films would also provide additional benefits to traditional edible film forming materials by providing unique sensory and antioxidant capacity, thus attracting more potential applications as localizing functional effect at the food surface.

The scientific objectives of this study were to functionalize HPMC films with natural red color compound to give them additional properties and to investigate the impact of aging on color stability, light transmission, antioxidant capacity and HPMC oxidation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Hydroxypropyl methylcellulose (Fluka-Biochemika, Japan) is a biochemical product containing 9% hydroxypropoxyl and 28% methyl radicals. It had a viscosity of 15 mPas and a water solubility of 2% at 25 °C. Ethanol 96.2% (Pharmaceutics Carlo Erba) was used to improve HPMC solubilisation, reduce air bubbles in film forming solution (FFS) and accelerate film drying. Petri-dishes (optilux) were provided by Nunclon™ Fisher (DK-4000 Roskilde, Denmark). Height and diameter of Petri-dishes were 1 cm and 8.5 cm respectively. A red liquid "natural color blend" of beetroot juice (E162) and Purple Carrot Extract (E163) containing about 20% glycerin was obtained from ColorMaker, CA, USA. It was used as an active coloring agent to investigate the improvement of antioxidant and color properties of HPMC films. HPLC grade reagents and solvents (ethanol & acetonitrile) were purchased from Pharmaceutics Carlo Erba (France).

2.2. Methods

2.2.1. HPLC analysis

The HPLC equipment was a Shimadzu (Tokyo, Japan) with auto sampler (SIL-20AC), communication bus module (CBM-20A), pump (LC-20AD), column-oven (CTO-20AC) with ULFC (Shimadzu) cooling module in series with a diode array detector (SPD-M20A). Optimum separation of anthocyanins and betalains was achieved on an analytical scale (250 mm × 4.6 mm i.d.) Agilent C18 (5 μM) reversed phase column with a particle size of 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA), fitted with a security guard C18 ODS (4 mm × 3.0 mm i.d.) at a flow rate of 0.5 mL/min and a constant temperature of 25 °C. Eluent A was 5% formic acid and B was MeCN/H₂O (60/40, v/v). Separation was accomplished starting with 3% B, followed by a linear gradient to 20% B for 30 min and then to 50% B for 40 min. Maximum absorption of betalains tended to be higher than those of the anthocyanins. Therefore, an intermediate monitoring wavelength of 530 nm was chosen for both pigment groups. Aliquots mixed samples of 20 μL were injected for analyzes. Duplicate determinations were performed throughout.

2.2.2. Mass spectrometric conditions

The LC-MS equipment includes a binary solvent delivery pump and a linear ion trap mass spectrometer (LTQ-MS, Thermo

Finnigan, San Jose, CA, USA). LC analysis parameters were the same as described above except use of a specific LCMS C18 column (150 mm × 2.1 mm and 5 μm – Alltima, Alltech, France) at a smaller flow rate of 0.2 mL/min. LTQ equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in electro spray positive mode (ESI positive). Data were processed using Xcalibur 2.1 software. The operational parameters of mass spectrometer were as follows. Spray voltage was 4.20 kV and the temperature of heated capillary was set at 300 °C. Flow rates of sheath gas, auxiliary gas, and sweep gas were set (in arbitrary units min⁻¹) to 35, 10, and 10, respectively. Capillary voltage was -48 V, tube lens was -13 V, split lens was -38 V and the front lens was -4.25 V. All parameters were optimized by using a standard rutin solution as representative glycosylated flavonoid (0.1 g/L) in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of 5 μL/min. The compounds of interest were monitored through specific MS2 scans in addition of MS full scan (50–1000 m/z): MS2 (743), MS2 (581), MS2 (949), MS2 (919), and MS2 (889) for the screening of anthocyanins compounds and MS2 (551), MS2 (507), MS2 (389), and MS2 (549) for screening of betanin compounds.

2.2.3. Preparation of film forming solution and films casting

Film forming solutions were prepared according to Akhtar et al. (2010) by dissolving 6 g of HPMC in a 35% ethanol solution for 40 min at 65 °C using a heating magnetic stirrer (Fisher Bio-block Scientific). For better dissolving and avoiding heat oxidation, NRC was dissolved separately in 35% ethanol solution at 20 °C. Both, HPMC and NRC solutions were then mixed and stirred for 30 min at 20 °C to obtain homogeneous solution. NRC solutions pH was adjusted at 3.17 ± 0.1 with HCl (0.1 M). After stirring, the solutions were degassed at room temperature under vacuum "Handy Aspirator WP-15 (Yamato®)" for 30 min. Films were made by pouring 6 g of each film forming solution (FFS) in the lids of the Petri-dishes. Films were then left in a dark room (pre-equilibrated at 20 °C, 50% RH) for drying on a levelled surface for 48 h. Composition of HPMC films, glycerin and NRC concentrations are shown in Table 2.

2.2.4. Film thickness measurement

Film thickness was measured according to the standard NF Q 03-016 with a manual micrometer (Messmer, London, England) equipped with a measuring head of 1 cm in diameter and a sensitivity of 2 μm. Thicknesses were measured in 10 randomly selected points on each film and an average value was calculated.

2.2.5. Film aging

For photo-aging, the films were conditioned under the fluorescent light (OSRAM L36W/640) or darkness for 20 days in an experimental chamber with controlled conditions of temperature (20 °C) and relative humidity (50%). The distance of fluorescent tube from the films was 14 cm.

2.2.6. Color measurements

Color measurements were carried out with a Minolta CM, CR-210 colorimeter (Minolta, Colombes, France) using the Hunter and CIE scale. A black standard color plate ($L^* = 24.60$, $a^* = 0.16$, $b^* = -0.28$) was used as a background for color measurements. Value L^* describes lightness (0 = black to 100 = white). Value a^* describes the amount of redness (positive) or greenness (negative) present in the specimen, while value b^* describes the amount of yellowness (positive) or blueness (negative) present in the specimen. Combined values a^* and b^* define the hue and intensity (saturation) of the color (Moslemi, 1967). The L , a , and b values of each film were taken as the average of at least five points. Color difference (ΔE) is the magnitude of the resultant vector of three component

Table 1
Peak assignments for betalains and anthocyanins of natural red colour (NRC).

	Compound name	Rt (min)	UV-vis _{max} (nm)	m/z [M+H] ⁺	m/z MS ² of [M+H] ⁺	(%) Area at 530 nm
1	Betd 5-glc (betanin)	7.69	271.9/293.6/538.9	551.16	389.12	48.78
2	Isobetd 5-glc (iso-betanin)	11.95	271.9/293.6/538.9	551.16	389.13	47.91
3	Cyd 3-xyl-glc-gal	22.53	283.7/514.3	743.1	287.0	0.23
4	Cyd 3-xyl-gal	24.38	283.7/514.3	581.1	287.0	1.11
5	Cyd 3-xyl-glc-gal-sin	27.81	287.8/335.5/523.8	949.2	287.0	0.29
6	Cyd 3-xyl-glc-gal-fer	29.58	287.8/334.3/519.0	919.2	581.1/287.0	1.19
7	Cyd 3-xyl-glc-gal-coum	30.88	287.8/319.0/519.0	889.2	287.0	0.49

Aglycons: Betd, betanidin; Cyd, cyanidin; Xyl, xylose; Glc, glucose; Gal, galactose; Fer, ferulic acid; Sin, sinapic acid; Coum, p-coumaric acid.

differences. Total color difference (ΔE_{ab}), was calculated by following equation:

$$\Delta E_{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (1)$$

where $\Delta a = a_i - a_0$, $\Delta b = b_i - b_0$ and $\Delta L = L_i - L_0$. The index i , indicates the values observed after storage period and index 0, indicates initial values observed before samples storage (Jutaporn, Suphitchaya, & Thawien, 2011).

2.2.7. Light transmission

The barrier properties of HPMC films against ultraviolet (UV) and visible light were measured at selected wavelengths between 200 and 900 nm, using UV-visible recording spectrophotometer (Ultraspac 4000 UV/visible, Pharmacia Biotech, Orsay, France) according to Fang, Tung, Britt, Yada, and Dalglish (2002).

2.2.8. ABTS radicals scavenging activity

The evaluation of 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}) radical scavenging activity was based on the ability of antioxidants to inhibit the long-life ABTS radical cation (Sigma, Germany), a blue/green chromophore with characteristic absorption at 734 nm, in comparison with that of Trolox. ABTS radical cation was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate and allowing the mixture to stand in darkness, at room temperature, for 12–16 h before use. To study antiradical activity of NRC, ABTS^{•+} solution was diluted with ethanol at 30 °C, to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. After addition of 1.0 mL of diluted ABTS^{•+} solution to 10 μ L of sample or standard Trolox in ethanol (concentration between 0 and 16 μ M), the absorbance was measured at 30 °C exactly 6 min after initial mixing. Appropriate solvent blanks were run in each assay. All experiments were performed in triplicate. A standard curve was obtained by using Trolox standard solution at various concentrations. The absorbance of reaction samples was compared to that of Trolox standard and results were expressed in terms of Trolox equivalents (Re et al., 1999). TEAC value is defined as the concentration of standard Trolox with the same antioxidant capacity as a 1 mM concentration or 1 mg/mL of the antioxidant compound under investigation (Maisuthisakul, Pongsawatmanit, & Gordon, 2007).

2.2.9. FTIR analysis of HPMC films

Changes in structure of HPMC composite films after 20 days of continuous light exposure were followed by Fourier transform infrared spectroscopy in total attenuated reflection mode (ATR-FTIR). Measurements were performed at 25 °C with a Tensor 27 mid-FTIR Bruker spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a Platinum ATR optical cell and an RT-D1a TGS detector (Bruker, Karlsruhe, Germany). The diaphragm was set at 4 mm. The scanning rate was 10 kHz, and 80 scans were performed both for the reference and the sample from 4000 to 800 cm^{-1} with 4 cm^{-1} of resolution. All data treatments were carried out using OPUS software (Bruker, Karlsruhe, Germany). Raw absorbance

spectra were smoothed using a nine-point Savitsky-Golay smoothing functions. Elastic baseline correction was applied to spectra, which were further cut between 1800 and 800 cm^{-1} , centered and normalized.

The stability of NRC compounds was calculated by spectral deconvolution using second derivative resolution enhancement and the curve-fitting procedure of 1800–1500 cm^{-1} region. Second derivative spectra were calculated on centered and normalized data with an additional nine-points Savitsky-Golay smoothing function. The second derivative spectra were used only for identifying individual peak positions. The spectra were then deconvoluted by a non linear regression curve fitting program of Gaussian peaks to the original spectra (Opus Software). Optimal Fits were supported by favorable RMS (root mean square) values on the order of 10^{-5} , which were less than baseline noise. The resulting curves fitted were analyzed and percentage of each covalent bond was quantified.

2.2.10. Statistical analysis

A factorial design was used to characterize the composite films. Experimental values were given as means \pm standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean differences of the samples. If the differences in mean existed, multiple pairwise comparisons were performed using XL STAT software. Differences at $P < 0.05$ were considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1. HPLC-MS/MS characterization of NRC

Various analytical methods have been reported to differentiate betalains and betacyanins (Charron et al., 2009; Nielson & Harley, 1996). An official HPLC method providing fingerprints of common fruit juices to characterize betacyanins has been published (IFU, 1998). In the present study, newly established HPLC-DAD-MS/MS method (Stintzing et al., 2005) was used allowing simultaneous determination of betacyanins. Betanin and iso-betanin were previously detected in prickly pear (*Opuntia* spp.) by Castellanos-Santiago and Elhadi (2008) and anthocyanin in purple carrots by Kurilich, Clevidence, Britz, Simon, and Novotny (2005). Based on comparison with the standards and bibliographical data (Stintzing et al., 2005), betalains and anthocyanin were readily identified by their retention time order, spectral and mass characteristics including daughter ion and neutral loss scanning (Table 1). As previously reported (IFU, 1998), betacyanins were generally more polar than anthocyanins therefore betanin (betanidin-5-O- β -glucoside) and iso-betanin (isobetanidin-5-O- β -glucoside) eluted considerably earlier than the minor components such as anthocyanins (Fig. 2a).

3.1.1. Identification of major components (betanin & isobetanin)

Major components of NRC, betanin (1) and its C₁₅ epimer iso-betanin (2) amounted to 96.69% together were identified on UV-visible chromatogram and single ion chromatogram at

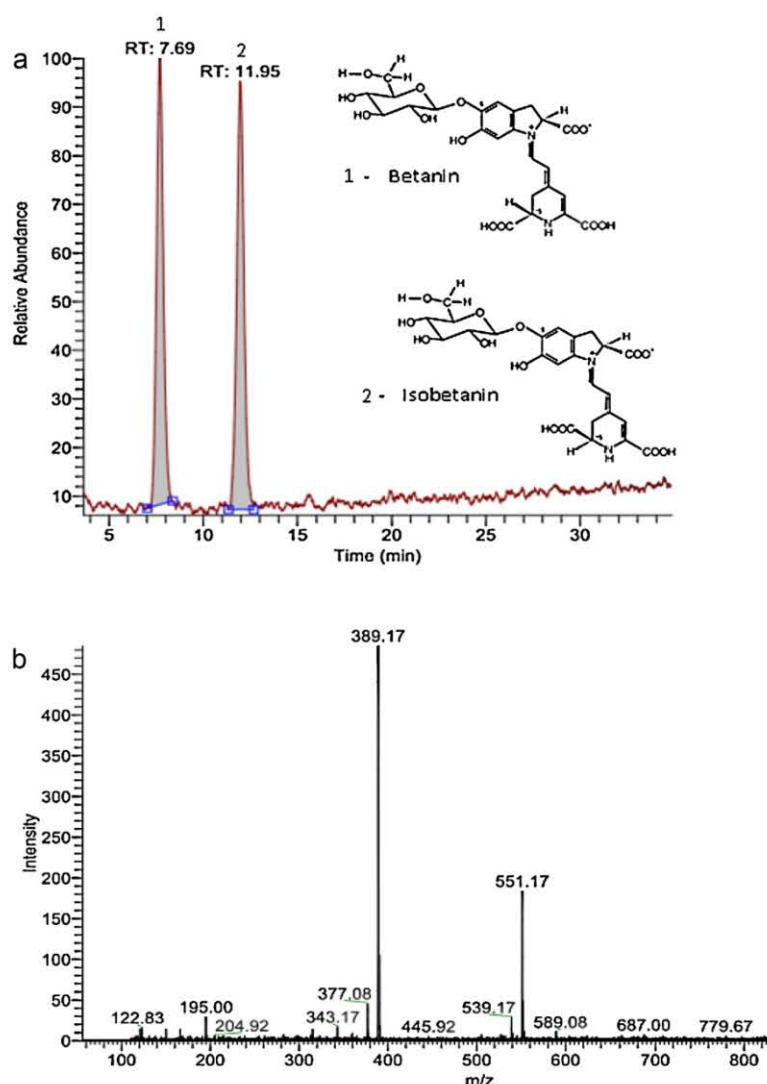


Fig. 1. Identification of major components (betanin & isobetanin) of natural red colour (NRC). Peak assignment is given in Table 1. (a) Single ion chromatogram (SIC) of NRC at $m/z=551$. Betanin & isobetanin structures were adopted from Herbach et al. (2006a,b). (b) NRC Full MS spectrum at 7.69 min (same at 11.95 min) with parent ion $m/z=551$ $[M+H]^+$ and source fragmentation ion $m/z=389$.

retention time of 7.69 min and 11.95 min, respectively (Fig. 1a). They were further confirmed with MS and MS² steps.

3.1.2. Identification of minor components (anthocyanins)

NRC showed the minor components such as anthocyanins typically cyanidin derivatives (3–6) along with a couma-royl-derivative (7) as also described by Stintzing et al. (2005) and Glässgen, Seitz, and Metzger (1992). Presence of these anthocyanins was confirmed by comparing their specific retention times (Fig. 2a) with those of a standard anthocyanin mixture chromatogram (Fig. 2b).

3.2. Film thickness measurement

The thickness of edible films is an important parameter because it directly affects the biological properties and the shelf life of the coated food. Thickness is dependent on the type of dry matter and

film preparation methods (Sebti, Chollet, Degraeve, Noel, & Peyrol, 2007). HPMC films incorporated with NRC at the level of 1, 2, 3, or 4% (v/v) were compared for their thickness with 3 types of control HPMC films; composition is shown in Table 2. No significant change in film thickness was found by the addition of glycerin (1% or 4% w/w of film dry matter). Similar results were reported by Imran, El-Fahmy, Revol-Junelles, and Desobry (2010) by the addition of 10% (w/w) plasticizer into HPMC films. A slight increase in film thickness may be associated with the property of glycerin to retain high moisture content at the end of film drying (Chen & Lai, 2008). However, a gradual but non-significant increase in the thickness of films containing NRC may be combined effect of glycerin and betacyanin molecules containing lots of hydrophilic groups (Díaz, López, Kerstupp, Ibarra, & Scheinvar, 2006). A slight increase in thickness of films containing 4% NRC compared to films containing 1% of glycerin confirmed the plasticizing effect of phenolic compounds on film thickness.

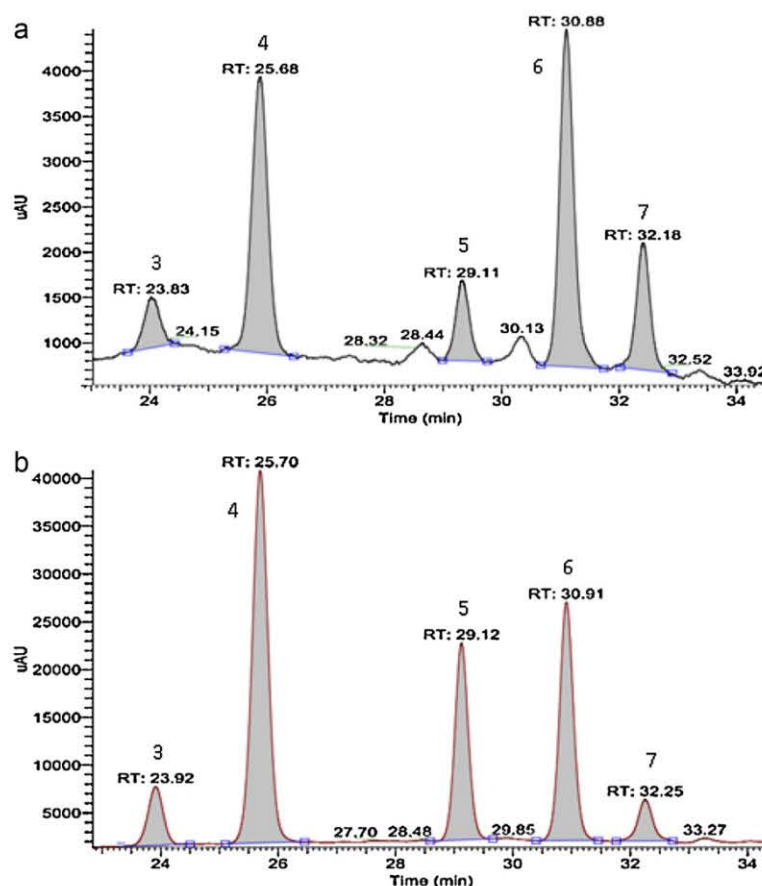


Fig. 2. Identification of NRC minor components (anthocyanins): comparison between NRC UV-visible chromatogram (a) and standard anthocyanins UV-visible chromatogram (b) at 530 nm. Peak assignment is given in Table 1.

3.3. Optical properties of film: color and transparency

Optical properties are the first ones detected by human vision and could affect food quality (Fabra, Talens, & Chiralt, 2009).

3.3.1. Color stability

Color parameters of control and NRC films were analyzed (Table 3). Control HPMC films without NRC and glycerin appeared clear and transparent which showed complete solubilisation of HPMC powder in 35% ethanol solution. Incorporation of NRC into HPMC films modified their appearance in both color and transparency. A decrease in L values and an increase in a values were observed in NRC films. Hunter L , a and b values were statistically

identical for control HPMC films but they were significantly different for the films containing NRC up to 4% (v/v). Significant increase in redness (a) of NRC films was observed representing its good coloring ability.

Similar results were observed by Park and Zhao (2006) by the addition of Cranberry Pomace Extracts in low methoxyl pectin (LMP) and high methoxyl pectin (HMP) films.

Color stability was studied by conditioning the films under fluorescent light at 20 °C for 20 days. The control samples, HPMC films alone or containing 1 or 4% (w/w) of glycerin exhibited non significant color difference over 20 days of light storage. A significant decrease in a values was observed for all NRC films causing fading of the red surface color (Table 3). The visual color changes observed

Table 2

Thickness and composition of HPMC–NRC–plasticizer composite films and pH values of FFS (mean and standard deviation of triplicate analysis).

Film type	Film composition glycerin, G% (w/w) of dry matter	pH of film forming solutions (FFS)	Film thickness (μm)
HPMC	0.00	7.61 \pm 0.50	48.25 \pm 3.48 ^a
HPMC+G1%	1.00	7.30 \pm 0.50	49.03 \pm 4.15 ^a
HPMC+G4%	4.00	7.35 \pm 0.50	49.50 \pm 5.03 ^a
HPMC+NRC1%	0.20	3.17 \pm 0.50	49.38 \pm 3.39 ^a
HPMC+NRC2%	0.40	3.17 \pm 0.50	52.29 \pm 3.92 ^a
HPMC+NRC3%	0.60	3.17 \pm 0.50	53.09 \pm 4.85 ^a
HPMC+NRC4%	0.80	3.17 \pm 0.50	54.29 \pm 5.62 ^a

Test conditions (temperature 20 \pm 2 °C; RH, 50 \pm 2%). NRC, natural red colour; HPMC, hydroxypropyl methylcellulose. Same letters within the column (film thickness) indicate non-significant difference at $P < 0.05$.

Table 3Colour parameters (L^* , a^* , b^*) of edible HPMC films as a function of NRC concentration and 20 days of aging under fluorescent light (mean values of triplicate analysis).

Films types	L^* (lightness)		a^* (redness/greenness)		b^* (yellowness/blueness)		ΔE_{ab}^* (0–20 d)
	0 d (P.A.)	20 d (P.A.)	0 d (P.A.)	20 d (P.A.)	0 d (P.A.)	20 d (P.A.)	
HPMC	32.18 \pm 0.05 ^{Aa}	32.16 \pm 0.09 ^{Ab}	−0.067 \pm 0.006 ^{Ac}	−0.10 \pm 0.01 ^{Bc}	−0.48 \pm 0.04 ^{Ad}	−0.46 \pm 0.03 ^{Ar}	0.06 \pm 0.02 ^b
HPMC + G1%	32.17 \pm 0.02 ^{Ba}	32.25 \pm 0.02 ^{Ad}	−0.097 \pm 0.021 ^{Ac}	−0.11 \pm 0.01 ^{Bc}	−0.44 \pm 0.01 ^{Ad}	−0.50 \pm 0.01 ^{Bc}	0.10 \pm 0.03 ^b
HPMC + G4%	32.16 \pm 0.03 ^{Aa}	32.17 \pm 0.22 ^{Aa}	0.093 \pm 0.006 ^{Ac}	0.10 \pm 0.02 ^{Bc}	0.44 \pm 0.02 ^{Ad}	0.52 \pm 0.04 ^{Bc}	0.08 \pm 0.03 ^b
HPMC + NRC1%	31.78 \pm 0.16 ^{Ab}	31.91 \pm 0.04 ^{Aa}	0.997 \pm 0.085 ^{Ad}	0.66 \pm 0.04 ^{Bd}	2.34 \pm 0.19 ^{Ac}	1.99 \pm 0.20 ^{Ad}	0.56 \pm 0.32 ^b
HPMC + NRC2%	29.39 \pm 0.19 ^{Bc}	30.40 \pm 0.08 ^{Ab}	5.013 \pm 0.267 ^{Ac}	3.27 \pm 0.11 ^{Bc}	5.99 \pm 0.18 ^{Ab}	5.77 \pm 0.15 ^{Ac}	2.03 \pm 0.27 ^a
HPMC + NRC3%	28.87 \pm 0.16 ^{Bd}	30.03 \pm 0.15 ^{Ac}	5.930 \pm 0.267 ^{Ab}	4.18 \pm 0.29 ^{Bb}	6.35 \pm 0.05 ^{Aa}	6.52 \pm 0.08 ^{Ab}	2.11 \pm 0.27 ^a
HPMC + NRC4%	27.96 \pm 0.02 ^{Be}	28.88 \pm 0.17 ^{Ad}	6.943 \pm 0.051 ^{Aa}	5.86 \pm 0.24 ^{Ba}	6.31 \pm 0.03 ^{Aa}	6.95 \pm 0.04 ^{Ba}	1.56 \pm 0.22 ^a

0 d (P.A.), 0 day photo-aging; 20 d (P.A.), 20 days photo-aging; ΔE_{ab}^* (0–20 d), total colour change during 20 days of photo-aging. Different small letters within each column and different capital letters within each row indicate significant differences among the values of the same colour property at $P < 0.05$.

for light stored films appeared in L values, significantly increased by photo-aging. The lightening of initial red surface color of films was due to photo-degradation of betacyanins (Herbach, Stintzing, & Carle, 2006).

The changes in L , a and b values were summarized by calculating total color difference (ΔE_{ab}). There was an increase in ΔE values of NRC added films under fluorescent light conditions (Table 3). The increase in ΔE values was higher for the films incorporated with NRC 2, 3 or 4% over 20 days of photo-aging. This increase in ΔE resulted from a decrease in a values and increase in L values. The

ΔE value of 1.0 is the smallest color difference a normal human eye can detect so any ΔE less than 1.0 is imperceptible (Jonathan Sachs, 2001–2002). Some color differences even greater than 1 are perfectly acceptable, may be even unnoticeable, depending on the color, shade and density. For example, the ΔE color difference between two reds may be the same but may not look like same difference to the human eye (Jonathan Sachs, 2001–2002). Keeping in view this statement, the films other than those containing 2, 3 and 4% NRC were stable for their color properties after 20 days of photo-aging.

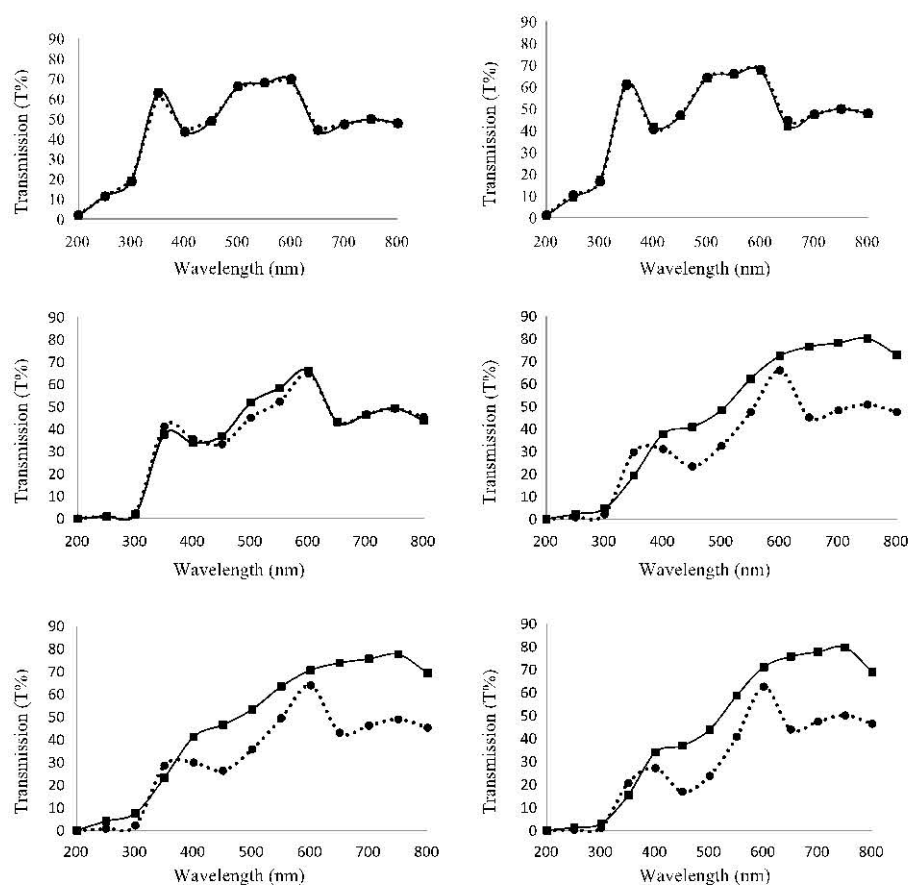


Fig. 3. Light transmission (%) of UV–visible for HPMC–NRC–plasticizer composite films before and after 20 days of photo-aging. (a) HPMC 0 d (●), HPMC 20 d (■). (b) HPMC + G1% 0 d (●), HPMC + G1% 20 d (■). (c) HPMC + NRC1% 0 d (●), HPMC + NRC1% 20 d (■). (d) HPMC + NRC2% 0 d (●), HPMC + NRC2% 20 d (■). (e) HPMC + NRC3% 0 d (●), HPMC + NRC3% 20 d (■). (f) HPMC + NRC4% 0 d (●), HPMC + NRC4% 20 d (■).

3.3.2. Light transmission

For use as packaging materials, transparency of HPMC films is required to fulfill consumer eagerness to see food through packaging. Comparing the effect of each mixture component on % transmission, NRC concentration was the main factor reducing film transparency. The lowest transmission through films was noticed for the greatest concentration of NRC. Fig. 3 shows transmission of UV and visible light, at selected wavelength between 200 and 700 nm, through films before and after 20 days of light exposure.

Increase in NRC contents of HPMC films showed a decrease in light transmission of films for both UV and visible regions. This result was in accordance with Jutaporn, Suphitchaya, and Thawien (2011) who observed that HPMC films became less transparent with the increase of phayom wood extract contents. No change in transmission of HPMC films alone and with glycerin 1% was noticed after photo-aging as shown in Fig. 3a and b. It is clear that NRC films became more transparent after light exposure due to color degradation. Increase in light transmission after photo-aging was more pronounced in films containing high concentration of NRC and was confirmed by total change in color (ΔE). Indeed, the reflected and transmitted spectrum of a colored layer was based on a material dependent scattering and absorption of light in visible spectra (Hutchings, 1999).

3.4. ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical scavenging activity method is based on the ability of molecules to scavenge the ABTS radical cation, in comparison with that of Trolox. The ABTS assay was calibrated with the water soluble alpha-tocopherol analog, Trolox. Antioxidant stability of NRC was investigated for different stages of film formation and light-aging (Fig. 4). All the samples containing NRC displayed antioxidant activities as they were able to scavenge ABTS^{•+} radical cation. They were shown to be antiradical agents compared to the Trolox. FFS, fresh films, films stored under darkness or under light, displayed less free radical scavenging activities than pure NRC solution (TEAC = 0.0133 ± 0.0005). No significant change in TEAC value was observed for FFS (0.0123 ± 0.0004), fresh film (0.0121 ± 0.0005) and those stored under darkness (0.012 ± 0.0004) as compared to pure NRC (0.0133 ± 0.0005), showing their antioxidant stability. The film samples stored under light were significantly different from pure NRC samples for their

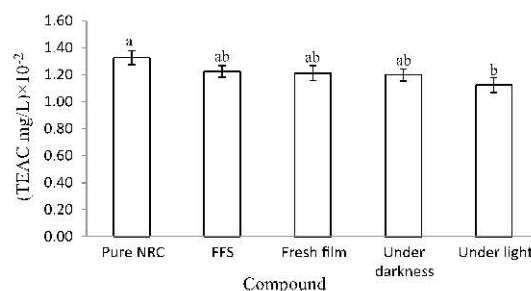


Fig. 4. Antioxidant activities of pure NRC solution, film forming solution (FFS) and NRC incorporated films against ABTS^{•+} radical, expressed as TEAC values. Means within the same column with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

antioxidant activity (Fig. 4). These results suggested that Trolox equivalent antioxidant activity of NRC was slightly decreased during FFS preparation but no significant change was observed during film casting and film aging after darkness or light exposure. This phenomenon indicated that NRC compound was slightly modified or degraded during aging process. However, the degradation products have conserved some antioxidant capacity. Moreover, NRC was more stable in FFS, fresh films and films stored in darkness. These results were in accordance with those of Díaz et al. (2006) who studied the effect of light and darkness on betalains stability.

3.5. FTIR analysis of HPMC films

FTIR spectroscopy is a rapid technique with minimum samples preparation requirements. It allows qualitative and quantitative determination of organic compounds in samples because intensities of spectrum bands are proportional to concentration (Vlachos et al., 2006). Control and NRC composite films were analyzed by FTIR spectroscopy to characterize new phenolic polymeric structures and light storage effect. FTIR spectra for control and HPMC films colored with NRC (betacyanins), ranging between 1800 and 800 cm^{-1} are shown in Fig. 5. All samples had very strong absorption bands at 1060 cm^{-1} related with a pronounced shoulder at 1115 cm^{-1} attributed to a combination band of C–O stretches and secondary hydroxyl group (O–H).

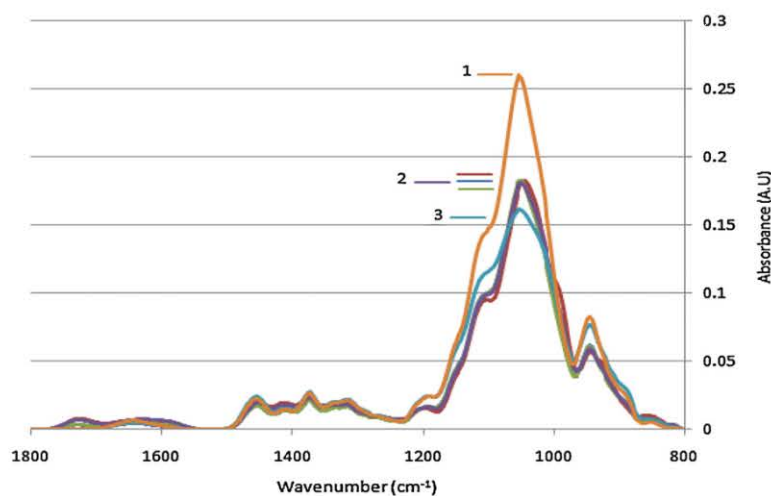


Fig. 5. FTIR spectra of control HPMC films; without light exposure (3), after light exposure (1) and films containing NRC 1% or 4% before and after 20 days of photo-aging (2).

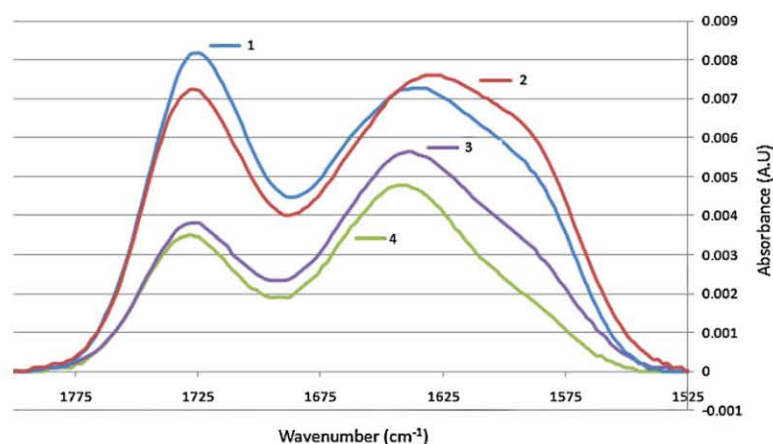


Fig. 6. FTIR spectral region (1525–1775 cm^{-1}) of HPMC films containing 1% NRC; without light exposure (4), after light-ageing (3) and with 4% NRC; without light exposure (1) and after light-ageing (2).

Table 4

Peak assignment of deconvolution FTIR spectra of NRC incorporated HPMC films (HPMC+NRC1% & HPMC+NRC4%) before and after 20 days of photo-aging.

Resonant frequency(cm^{-1})	HPMC + NRC1%			HPMC + NRC4%			Bond types
	% age of covalent bond			% age of covalent bond			
	0 day aging	20 days aging	Variations	0 day aging	20 days aging	Variations	
1581.140	5.38 ± 0.22 ^b	9.64 ± 0.39 ^a	-4.260	9.465 ± 1.51 ^a	13.07 ± 0.18 ^b	3.603	NH
1609.688	16.51 ± 0.18 ^b	20.34 ± 0.15 ^a	3.829	16.84 ± 2.75 ^a	19.80 ± 0.17 ^a	2.967	COO ⁻
1636.439	9.48 ± 0.110 ^a	7.39 ± 0.390 ^b	-2.086	2.213 ± 0.59 ^b	3.344 ± 0.11 ^a	1.130	COO
1654.688	36.50 ± 0.19 ^a	35.60 ± 0.45 ^b	0.903	37.33 ± 0.34 ^a	33.11 ± 0.05 ^b	4.220	NH ₂
1699.986	0.000 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.027 ^a	0.081	1.115 ± 0.76 ^a	0.000 ± 0.00 ^a	1.115	C=O
1726.441	32.13 ± 0.41 ^a	26.95 ± 0.48 ^b	-5.181	33.036 ± 4.6 ^a	30.67 ± 0.43 ^a	-2.365	C=O

Different letters within each row indicate significant differences among the values of the same NRC percentage at $P < 0.05$.

3.5.1. Changes in absorption band at 1060 cm^{-1}

Absorption band at 1060 cm^{-1} is associated with the hydroxyl group indicating formation of intermolecular hydrogen bonds. In case of pure HPMC films after 20 days of photo-aging, the absorption of this band was increased due to OH groups formation. Increase in peak area in this region was due to the availability of more OH groups of glycerin interacting with cellulosic OH groups. The stretching vibration at 1060 cm^{-1} causing an increase in peak surface indicated light degradation of pure HPMC films after photo-aging (Fig. 5). The increasing slopes of the curves were due to availability of OH groups of phenolic compounds present in NRC for cross-linking with cellulosic OH groups. Same results were observed by Kim, López, Güebitz, and Cavaco-Paulo (2008) from coloration of flax fabrics with flavonoids.

NRC Films were compared with control HPMC films for their FTIR spectra. Absorption band at 1060 cm^{-1} for films incorporated with NRC was stable over 20 days of fluorescent light exposure, which indicated that NRC had an ability to protect pure HPMC films against photo-degradation.

3.5.2. Changes in the region between 1525 cm^{-1} and 1775 cm^{-1}

The comparison between the spectra showed an additional peak around 1726 cm^{-1} for NRC films (Fig. 6). This band was attributed to C=O stretching vibrations and indicated the presence of phenolic compounds (betacyanins) on treated HPMC films. The 1726 cm^{-1} band was attributed to C=O ester absorption and could be generated by flavonoids oxidation after 20 days of light exposure. NRC compounds stability was calculated by spectral deconvolution using second derivative resolution enhancement and curve-fitting procedure of 1800–1500 cm^{-1} region. The resulting curves were

then analyzed and percentage of each covalent bond was quantified.

Fitting the bands to a variable number of individual contributing vibration modes was most successful using six peaks (Table 4). Stretching vibration of NH bond was reported at 1581 cm^{-1} and increased after light exposure due to NH₂ oxidative breakdown. The increase % in NH groups was greater in films containing 1% NRC (4.26%) as compared to those containing 4% NRC (3.60%) after light exposure showing NRC oxidation. Similarly, stretching vibration of COO⁻ was reported at 1609 cm^{-1} and increased after light exposure due to C=O oxidative breakdown. The increase in COO⁻ groups was greater in films containing 1% NRC (3.82) as compared to those containing 4% NRC (2.96%) after light exposure which indicated NRC oxidation. It could be concluded from Table 4 that NRC was slightly oxidized after 20 days of light exposure.

4. Conclusion

This study demonstrated that natural plant extracts could be used to functionalize edible films with additional benefits. Such films provide unique fruit flavor, color and antioxidant capacity, which would significantly enhance its potential applications in both food and nonfood industries. Miscibility of HPMC and NRC in composite films was confirmed by infrared spectroscopy analysis. Absorption bands in FTIR spectra suggested interactions through hydrogen bonding between components. The additional peak observed for NRC films was due to compounds OH groups interaction with cellulosic OH groups. Increased peak area in this region was directly proportional to NRC concentration making films more hydrophilic. NRC antioxidant capacity during the steps of film

preparation was stable. Color of edible films became darker and redder as NRC increased, while an increase effect of light exposure was noticed on color stability. Results pointed that NRC films has good potential for food applications due to their color, plasticizing property, good antioxidant stability and ability to protect HPMC from photo-degradation. Nevertheless, films stability in respect to color, transparency, microbial growth, and flavor retention needs further studies.

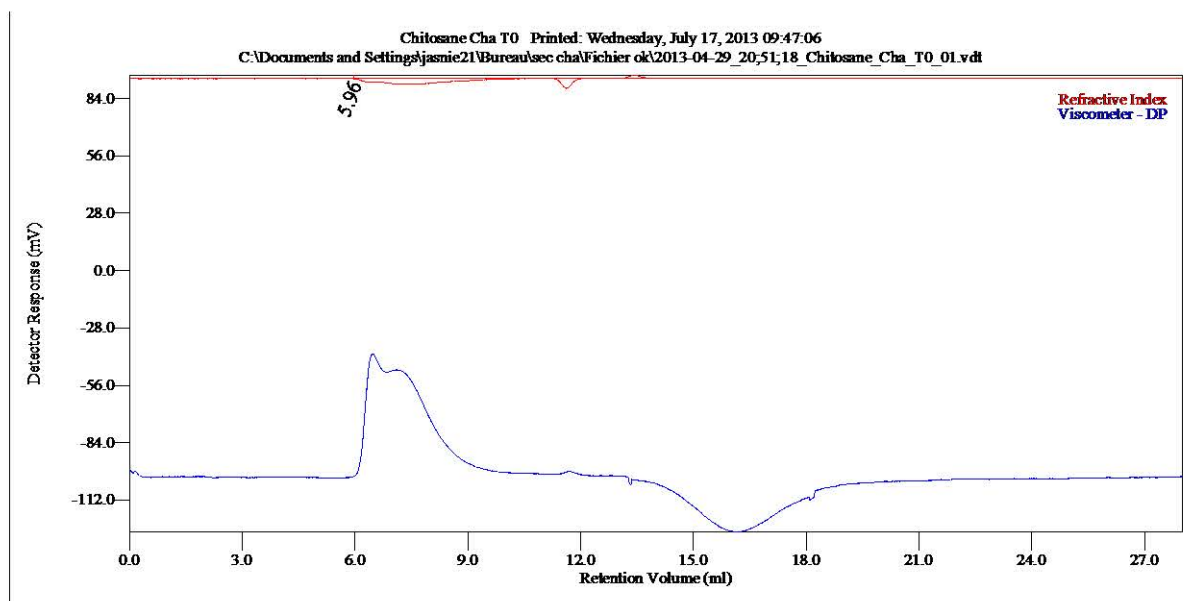
Acknowledgements

The authors would like to thank Carole Jeandel, Céline Charbonnel and Carole Perroud for their technical assistance.

References

- Akhtar, M. J., Jacquot, M., Tehrani, E. A., Gaiani, C., Linder, M., & Desobry, S. (2010). Control of salmon oil photo-oxidation during storage in HPMC packaging film: Influence of film color. *Food Chemistry*, *120*, 395–401.
- Bell, D. R., & Gochenaour, K. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *Journal of Applied Physiology*, *100*, 1164–1170.
- Brindle, I. P., & Krochta, J. M. (2008). Physical properties of whey protein hydroxypropyl methylcellulose blend edible films. *Journal of Food Science*, *73*, 446–454.
- Burdock, G. A. (2007). Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, *45*, 2341–2351.
- Burke, J. R. (2006). Biodegradable-compostable packaging: The promise and the problems. *Paper and Packaging*, *47*, 5.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 2288–2294.
- Castellanos-Santiago, E., & Elhadi, M. Y. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 5758–5764.
- Charron, C. S., Kürilich, A. C., Clevidence, B. A., Simon, P. W., Harrison, D. J., Britz, S. J., et al. (2009). Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: Effects of acylation and plant matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1226–1230.
- Chen, C. H., & Lai, L. S. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsiang-tiao leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, *22*, 1584–1595.
- Dai, J., Patel, J. D., & Mumper, R. J. (2007). Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*, *10*, 258–265.
- Díaz, F. S., López, E. M. S., Kerstupp, S. F., Ibarra, R. V., & Scheinvar, L. (2006). Colorant extraction from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *5*, 1330–1337.
- Escribano, J., Pedreño, M. A., Garcia-Carmona, F., & Muñoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical analysis*, *9*, 124–127.
- Fabre, C. E., Santeri, A. I., Lorete, M. O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., et al. (1993). Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, *58*, 1099–1111.
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloid*, *23*, 676–683.
- Fang, Y., Tung, M. A., Britt, I. J., Yada, S., & Dalgleish, D. G. (2002). Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. *Journal of Food Science*, *67*, 188–193.
- Frank, T., Conrad, F., Carle, S. R., Bitsch, I., Daniela, Q., Gabriele, B., et al. (2005). Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacological Research*, *52*, 290–297.
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibits endothelial ICAM-expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1028*, 481–486.
- Glassgen, W. E., Seitz, H. U., & Metzger, J. W. (1992). High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of anthocyanins from plant tissues and cell cultures of *Daucus carota* L. *Biological Mass Spectrometry*, *21*, 271–277.
- Hari, R. K., Patel, T. R., & Martin, A. M. (1994). An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis and applications in food industry. *Food Reviews International*, *10*, 49–70.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation: Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, *71*, 41–50.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Elss, S., Preston, C., Schreier, P., & Carle, R. (2006). Isotope ratio mass spectrometry analysis of betanin and isobetanin isolates for authenticity evaluation of purple pitaya-based products. *Food Chemistry*, *99*, 204–209.
- Hutchings, J.-B. (1999). *Food color and appearance*. Maryland: Aspen Publisher, USA.
- Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.-M., & Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of niacin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, *81*, 219–225.
- International Federation of Fruit Juice Producers. (1998). *IFU method 71: Anthocyanins by HPLC*. Zug, Switzerland: IFU.
- Jonathan Sachs Color Management Terms Copyright© 2001–2002 Digital Light & Color.
- Jutaporn, C. T., Suphitchaya, C., & Thawien, W. (2011). Antimicrobial activity and characteristics of edible films incorporated with Phayom wood (*Shorea toulou*) extract. *International Food Research Journal*, *18*, 39–54.
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 5178–5185.
- Kim, S., López, C., Güebitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Biological coloration of flax fabrics with flavonoids using laccase from *trametes hirsute*. *Engineering in Life Sciences*, *8*, 324–330.
- Kürilich, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W., & Novotny, J. A. (2005). Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 6537–6542.
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H., Heidary, R., Jameei, R., & Zare, S. (2006). The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, *5*, 90–92.
- Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H. (2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratogeomys formosum* Dyer). *Food Chemistry*, *100*, 1620–1629.
- Markakis, P. (1982). *Introduction in anthocyanin in fruits, vegetables and grain*. Boca Roton, FL: CRC Press. (Chapter 1).
- Moslemi, A. A. (1967). Quantitative color measurement for black walnut wood. US Forest Service, Research Paper NC-17. St. Paul, Minnesota: USDA, Forest Service, North Central Forest Experiment Station. 15 p.
- Nielson, L. R., & Harley, S. M. (1996). Chemotaxonomy: Simple test for distinguishing between anthocyanins and betacyanins. *Journal of Biological Education*, *30*, 88–90.
- Park, S., & Zhao, Y. (2006). Development and characterization of edible films from cranberry pomace extracts. *Journal of Food Science*, *71*, 95–101.
- Pedreño, M. A., & Escríbano, J. (2000). Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. *Journal of Biological Education*, *35*, 49–51.
- Ray, S. S., & Bousmina, M. (2005). Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science*, *50*, 962–1079.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*, 1231–1237.
- Sebt, L., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C., & Peyrol, E. (2007). Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 693–699.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, *15*, 19–38.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Moshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., et al. (2005). Color, betalains pattern and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* sp.) clone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 442–451.
- Turhan, K. N., & Sahbaz, F. (2004). Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose based edible films. *Journal of Food Engineering*, *61*, 459–466.
- Vasconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, *42*, 762–769.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantimdou, V., Chatzilarou, A., & Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, *573–574*, 459–465.

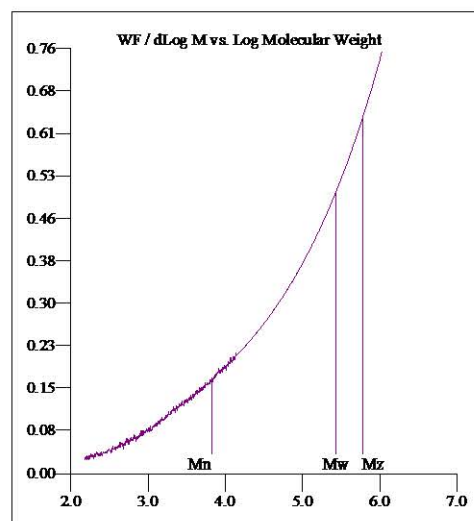
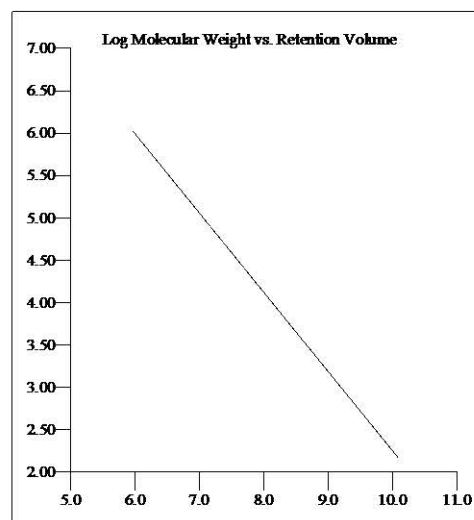
Annexe 3 : Rapport SEC-MALLS du film de chitosane neuf t0 (pas de traitement micro-onde)



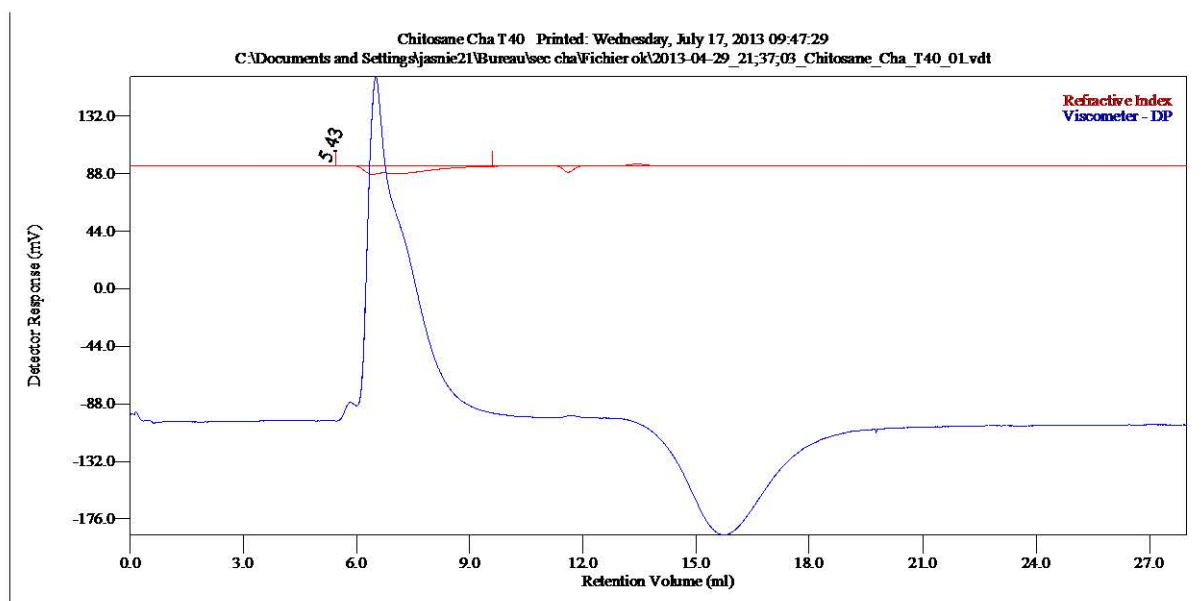
Conventional Calibration - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	5.959
Mn - (Daltons)	6 585
Mw - (Daltons)	271 299
Mz - (Daltons)	604 970
Mp - (Daltons)	1.059 e 6
Mw / Mn	41.197
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.005
Mw 10.0% Low	142
Mw 10.0% High	1.347 e 6
RI Area - (mvm)	-6.65
UV@0mm Area - (mvm)	0.00

Annotation	
Method File	calibr-0000.vcm
Limits File	20;51;18_Chitosane_Cha_T0_01-calibr-0000-0001.lim
Date Acquired	Apr 29, 2013 - 21:51:18
Solvent	tampon acetate 0,3M pH4
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	A4000
System	System 1
Flow Rate - (ml/min)	0.700
Inj Volume - (ul)	100.0
Volume Increment - (ml)	0.00233
Detector Temp. - (deg C)	30.0
Column Temp. - (deg C)	30.0
OmniSEC Build Number	354



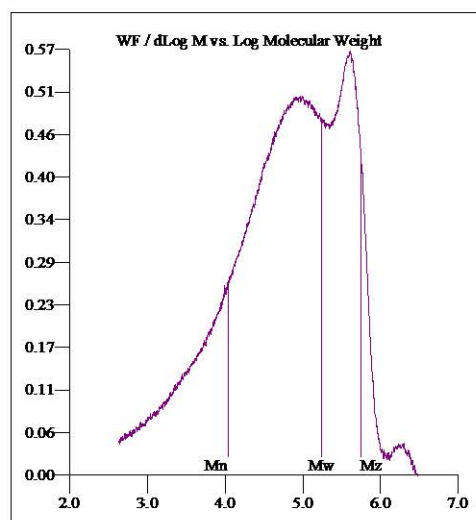
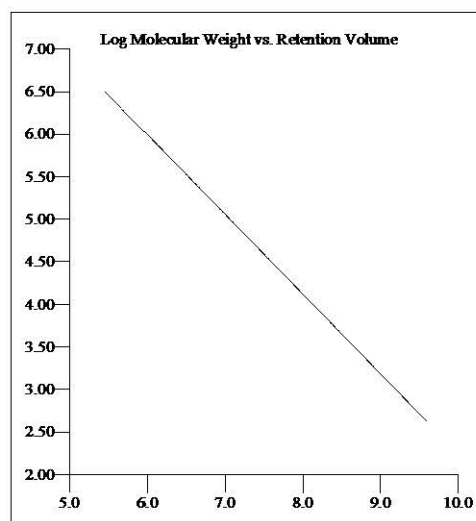
Annexe 4 : Rapport SEC-MALLS du film de chitosan t40 (après 40 minutes de traitement micro-onde)



Conventional Calibration - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	5.430
Mn - (Daltons)	10 724
Mw - (Daltons)	175 301
Mz - (Daltons)	562 454
Mp - (Daltons)	3 312 e 6
Mw / Mn	16.346
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.000
Mw 10.0% Low	424
Mw 10.0% High	3 571 e 6
RI Area - (mVml)	-12.83
UV@0nm Area - (mVml)	0.00

Annotation	
Method File	calibr-0000.vcm
Limits File	1;37;03 Chitosane Cha T40 01-calibr-0000-0002.lim
Date Acquired	Apr 29, 2013 - 22:37:03
Solvent	tampon acetate 0,3M pH4
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	A4000
System	System 1
Flow Rate - (ml/min)	0.700
Inj Volume - (ul)	100.0
Volume Increment - (ml)	0.00233
Detector Temp. - (deg C)	30.0
Column Temp. - (deg C)	30.0
OmniSEC Build Number	354



Annexe 5 : Proposal soumis à l'ERSF de Grenoble pour l'investigation poussée de la cristallinité des biopolymères

EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY

ESRF User Office

BP 220, F-38043 GRENOBLE CEDEX, France

Delivery address: 6 rue Jules Horowitz, 38043 GRENOBLE, France

Tel: +33 (0)4 7688 2552; fax: +33 (0)4 7688 2020; email: useroff@esrf.fr; web: <http://www.esrf.fr>



Application for beam time at ESRF – Experimental Method

This document should consist of a maximum of two A4 pages with a minimal font size of 12 pt.

Study of the crystallinity of biopolymer films after aging

Proposal Summary (should state the aims and scientific basis of the proposal) :

Today's increased environmental concerns contribute to the development of the biopolymer industry. Despite positive perception of biopolymers as a promising substitute for oil-based plastics, their properties remain unknown. The Bisphenol A crisis has shown how crucial it is to investigate the behavior of materials in food contact to preserve consumer safety. Furthermore, better knowledge of these biomaterials leads to an optimal use considering their specificity, and will contribute to increase their use and benefit to their promotion.

Specifically, this work proposes to investigate the influence of aging on biopolymer films structure. For this study, 3 biopolymers were chosen for their different properties and behavior: Poly Lactic Acid (PLA), first hydrophobic biopolymer used in industry, Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) hydrophilic cellulose-based biopolymer, used in food industry as a texture agent for food formulation, and finally Chitosan, biopolymer mainly studied for its potential antimicrobial activity.

Two different aging methods were employed: controlled aging in climatic chamber and microwave heating. Indeed, microwave irradiation using commercial domestic microwave oven has received increasing interest due to noticeable enhancements of the rates of some organic reactions and significant effects over conventional reaction [1]. It is qualified as "inside heating" and is supposed to make the rate of the reactions 1240 times higher than that of conventional methods [2]. In this case, the biopolymer films were heated from 0 to 40 minutes in a domestic microwave at 800W. For the second aging method in a climatic chamber, biopolymer films were stored at 40°C, 50% of Relative Humidity and in the darkness during 10 months. After these 2 aging treatments, the structure of the biopolymer films was investigated by different methods such as DSC, FTIR, SEM, XRD... It appears that several changes occurred, maybe crystallization and chain scission.

The aim of this proposal is to go further in our investigation and to better understand how aging affects biopolymer films structure, especially, how the crystalline part changes in the studied biopolymer films. Indeed, crystallinity plays an important part in determining a polymer's properties as it affects mechanical, thermal and optical properties, establishing the range of possible uses.

Scientific background :

The biopolymers films used for experiments are mainly amorphous. First experiments showed that there are, indeed, some structural modifications occurring during biopolymer aging. The FTIR spectra highlighted chain scission phenomenon, and it is known that molecular weight affects crystallinity. The DSC analysis showed modification of the glass transition temperature, confirming the hypothesis that the amorphous state is reorganized. SEM observations have been done; it seems that a few crystals are present on the surface of aged samples, but it is very complicated to characterize through SEM images. XRD in laboratory has also been used, but this phenomenon seems too sporadic to be quantified. Indeed, the diffractograms obtained on films showed mainly a shape modification in the amorphous phase before and after aging and little peaks that could be attributed to crystallisation but it remains to be confirmed with a more adapted method, that is why we need a powerful tool as synchrotron since the X-ray flux is much higher.

Experimental technique(s), required set-up(s), measurement strategy, sample details (quantity...etc):

For the experiments expected, the responsible of BM2-D2AM beamline has been contacted. Diffraction measurements could be done in reflection and transmission mode using a 2D detector and a 200 μm *100 μm beam. This will enable us to test the crystallinity of the biopolymers through different volumes. In transmission mode, the whole thickness of the specimens can be analyzed but only considering an area equivalent to the beam size at the surface of the specimens; in reflection mode, by changing the incidence angle, it will be possible to characterize the whole material along the beam. If the crystals/grains are big, it could be interesting to vary the orientation of the specimens to be in diffraction conditions and to determine the possible texture induced.

Several biopolymers must be tested (HPMC, PLA and Chitosan) considering 2 aging modes (climatic chamber and microwaves) and different aging times.

Beamline(s) and beam time requested with justification :

We therefore request at least 15 shifts with a maximum flux on BM2-D2AM beamline: 1 to 3 for the setting up of the experiments (tests to determine the better technique for such analyses considering the biopolymer supposed to be very crystallized: reflection or transmission mode), the rest for the experiments themselves. Depending on the time necessary to analyze one specimen, the biopolymers more prone to be crystallized will be investigated first and a selection among all the specimens will be made considering the different parameters in decreasing order of importance (biopolymer, aging technique and time).

Results expected and their significance in the respective field of research :

Even if biopolymers have received growing interest in research or industrial fields, these materials remain unknown. The crystallinity is one of the most important criteria in the study of polymers, affecting many properties and it is crucial to investigate this point. The crystallization phenomenon that would be highlighted by this study will allow us to increase knowledge about these biomaterials. This information coupled with other structure and properties investigations could offer us the opportunity to propose a model for different types of biopolymer while aging. This kind of study has never been done until now and will strongly contribute to a better understanding of these new biomaterials with a promising future in a wide range of use e.g . food industry, pharmaceuticals, packaging, bioengineering...

References

- [1] Cao, Z., Ge, H., & Lai, S. (2001). Studies on synthesis and adsorption properties of chitosan cross-linked by glutaraldehyde and Cu(II) as template under microwave irradiation. *European Polymer Journal*, 37(10), 2141-2143.
- [2] Shao, J., Yang, Y., & Zhong, Q. (2003). Studies on preparation of oligoglucosamine by oxidative degradation under microwave irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, 82(3), 395-398.

Résumé

Les inquiétudes concernant la gestion des déchets sont croissantes dans un contexte environnemental préoccupant. De ce fait, il est apparu urgent de trouver des substituts aux plastiques conventionnels et les biopolymères semblent être une réponse prometteuse. Leurs propriétés leur permettent des usages très divers, de l'emballage alimentaire à la bio-ingénierie tissulaire en passant par la formulation cosmétique ou la pharmaceutique. S'ils jouissent d'une image positive et de l'intérêt croissant des scientifiques comme des industriels, on ne connaît encore que peu leur comportement lors du vieillissement. Ce travail de thèse se propose d'étudier d'une part le vieillissement en enceinte climatique à paramètres contrôlés de certains polymères bio-sourcés et biodégradable (HPMC, Chitosan, PLA) et d'autre part, l'influence d'un traitement micro-onde sur des films de chitosan dans le cadre d'une utilisation comme le packaging alimentaire.

Au cours du vieillissement, les biopolymères subissent plusieurs modifications structurales telles que des ruptures de chaînes et des phénomènes de cristallisation. Ces modifications altèrent les propriétés mécaniques des films de biopolymères. Par ailleurs, les films de chitosan, exposés au micro-onde, vont présenter un phénomène de jaunissement, révélateur de la production de composés néo-formés issus de la réaction de Maillard et susceptibles de migrer vers l'aliment en cas de contact avec le film de biopolymère.

Mots-clés : *HPMC – Chitosan – PLA – vieillissement – emballage alimentaire – chauffage micro-onde*

Abstract

Today's increased environmental concerns and the growing questions about disposal management are contributing to growth in biopolymer industry. These materials are used in various fields such as pharmaceutical, bioengineering or tissue engineering as cell support, food formulation or packaging. In spite of a positive perception of biopolymers to improve environmental issues, biopolymers properties remain unknown, even though their biodegradability is well documented. Here we consider the influence of aging in climatic chamber on different biopolymers (HPMC, Chitosan and PLA) and in to what extent it could modify their structure and properties. Moreover, considering the opportunity for these materials to be used as food packaging, influence of microwave heating was also tested on chitosan films. The food consumption trends tend, indeed, to the development of ready-to-eat meal that is why it is crucial to investigate these biopolymers behavior when used in microwave oven in food contact.

The aim of this study is to bring new knowledge of these materials and to guarantee an optimal and safe use as a food contact packaging. The results showed several deep modifications in the biopolymers structure such as chain scissions or crystallization. These modifications involved a decrease in the polymer's properties.

Chitosan films, exposed to increasing microwave heating times, showed gradually increasing yellowing. Maillard neofomed compounds are responsible for this color change and could be deleterious for consumer safety because of the possibility of migration in case of food contact.

Key-words : *HPMC – Chitosan – PLA – aging – food packaging – heating – microwave heating*