

PROPIEDADES FUNCIONALES DE PELÍCULAS NANOCOMPUESTAS A BASE DE QUITOSANO

Marín-Silva, Diego^{1,2}, Rivero, Sandra¹; Pinotti, Adriana^{1,2}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET-CIC, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

²Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata (1900), Argentina
dm.alejandrosilva@live.com

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de recursos naturales renovables para la obtención de películas biodegradables representa una opción viable para el desarrollo de envases y la preservación del medio ambiente. Si bien los polímeros sintéticos ofrecen ventajas sobre los derivados naturales que pueden ser diseñados en función de las propiedades requeridas (*Middleton y Tipton, 2000; Thombre y Sarwade, 2005*), los polímeros naturales cubren un segmento importante de la investigación, en virtud de ventajas tales como biocompatibilidad, y factibilidad de ser modificados químicamente. El quitosano (Q) es un biopolímero derivado de la quitina, subproducto de la industria pesquera con capacidad de formar películas. La presencia de grupos amino distribuidos en la cadena polimérica ha hecho del Q uno de los polímeros más versátiles, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones químicas o físicas.

Por otra parte la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, encontrándose principalmente en las paredes celulares de las plantas como material estructural (*Funami et al. 2007*). Es un polímero de alto peso molecular cuyas cadenas tienen tendencia a formar agregados ordenados, como consecuencia de su constitución química y de su capacidad para formar enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares entre los grupos hidroxilo de las unidades de anhidroglucosa. Los enlaces de hidrógeno son los responsables de la alta cohesión molecular en la celulosa, lo que aparejado a la ausencia de ramificaciones, permite que las cadenas puedan alinearse en grupos, formando zonas ordenadas (cristalinas) unidas a regiones desordenadas (amorfas). Estas características limitan sus aplicaciones, motivo por el que se la modifica químicamente para hacerlo soluble y conferirle diversas propiedades de acuerdo al tipo de derivatización realizada (*Park y Ruckenstein, 2001*). Las nanocelulosas (NCC) se pueden sintetizar a partir de celulosa microcristalina (MCC) mediante la remoción de las regiones amorfas de las fibrillas de celulosa en medio ácido. La mezcla de biopolímeros como el Q y NCC da origen a los nanocompuestos, materiales formados por dos o más fases donde al menos una de sus tres dimensiones se encuentra en escala nanométrica. Las matrices nanocompuestas a base de quitosano y NCC como fase de relleno constituyen una alternativa interesante considerando su similitud estructural. En este contexto, los objetivos del trabajo fueron: i) aislar y caracterizar nanocristales de celulosa mediante hidrólisis ácida optimizando las condiciones del proceso; ii) incluir las NCC en matrices a base de quitosano estudiando sus propiedades de barrera, mecánicas y microestructurales.

PARTE EXPERIMENTAL

Elaboración de las nanofibras de nanocelulosa

Las nanofibras de celulosa (NCC) fueron obtenidas por hidrólisis ácida de la MCC usando H₂SO₄ con una concentración de 60% (p/p) y variando el tiempo de tratamiento (60, 120 y 180 min a una temperatura controlada de 45°C). La remoción del H₂SO₄ y el aislamiento de las NCC se realizaron luego de sucesivas etapas de centrifugado (12000 rpm), lavado de la muestra con agua destilada y finalmente un proceso de diálisis de la suspensión de nanocelulosa para facilitar la desulfonación de las nanopartículas y alcanzar un pH entre 5-6. La suspensión se trató con un procesador ultrasónico (Vibra CellSonics Modelo VCX750) para minimizar la agregación de las partículas.

Solución filmogénica y películas nanocompuestas

La solución filmogénica de Q se preparó por solubilización de polvo de Q 2% (p/p) en ácido acético 1,5% (v/v). Las soluciones nanocompuestas de Q se obtuvieron dispersando diferentes concentraciones de nanocelulosas (0,1, 0,25, 0,5 y 0,75% (p/p) NCC) en la solución de Q. Las muestras se homogeneizaron utilizando el equipo sonicador antes mencionado. Las películas se obtuvieron por moldeo y secado a 37 °C durante 12 horas.

Caracterización de las películas nanocompuestas

El tamaño de partículas de las NCC se determinó por medio de un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern). La caracterización morfológica de estas nanocelulosas se realizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para las suspensiones que fueron tratadas durante diferentes tiempos de hidrólisis. La solubilidad y el contenido de humedad de las películas fueron determinadas por inmersión de las muestras en agua durante 1 h de acuerdo al protocolo descrito por *Rivero et al.* (2013).

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó según el método descrito por *Rivero et al.* (2013). Las propiedades de barrera al oxígeno (PO₂) fueron medidas usando un MOCON OX-TRAN Modelo 2/21 (Minneapolis, USA). El espesor se cuantificó usando un medidor de espesor Digital meter Microprocessor CM-8822. El esfuerzo (MPa) y la elongación a la ruptura (%) de las películas nanocompuestas se determinaron usando un Texturómetro TA.XT2i–Stable Micro Systems (Surrey, Inglaterra). Para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) de los materiales se realizaron ensayos mediante análisis mecánico dinámico usando un DMA Q800 (TA Instruments, New Castle, EE.UU). El análisis microestructural fue llevado a cabo por microscopía electrónica de barrido (SEM, FEI m Quanta 200). Adicionalmente las películas se caracterizaron usando la técnica de FTIR (Nicolet, iS10 ThermoScientific).

Análisis estadístico

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las nanocelulosas

La determinación del tamaño de las partículas de las NCC obtenidas revelaron que con el aumento del tiempo de hidrólisis (60, 120 y 180 min) se obtuvieron partículas de menor tamaño centrándose la distribución alrededor de 100 nm, como consecuencia del ataque ácido experimentado por las regiones amorfas presentes en la MCC. Estos resultados se correlacionaron con el análisis morfológico de las suspensiones de NCC realizado por TEM (**Figura 1A y B**).

Dado que las áreas analizadas fueron muy pequeñas en comparación con el área total de la muestra, los resultados obtenidos por TEM deben considerarse como una estimación aproximada del tamaño real de las NCC (**Figura 1A y B**). Al aumentar el tiempo de hidrólisis se observó una tendencia a la disminución en la longitud de NCC. Similares resultados fueron informados por *Azizi et al.* (2005). *Martínez-Sanz et al.* (2011) informaron que el acortamiento de las NCC resultó más evidente al aumentar el tiempo de hidrólisis y que tratamientos prolongados con ácidos fuertes condujeron a materiales con una mayor cristalinidad. Por otra parte, a partir de la determinación del potencial zeta de las NCC se obtuvo un valor promedio de -72,8 mV, independientemente del tiempo de tratamiento.

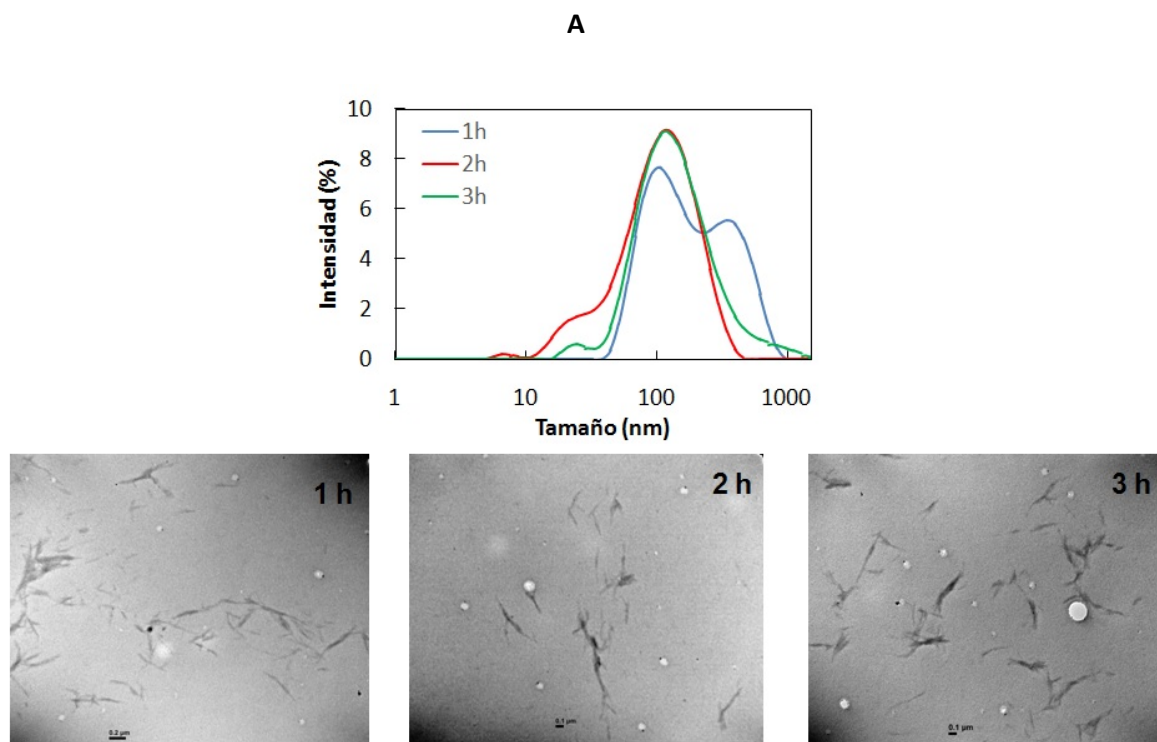


Figura 1. A Distribución de tamaño de partícula de la suspensión de MCC; **B** Imágenes obtenidas por TEM de muestras hidrolizadas durante 1, 2, y 3 h.

Propiedades fisicoquímicas de las películas nanocompuestas

Las películas nanocompuestas formuladas a partir de la suspensión Q-NCC presentaron espesores en el rango 70-100 μm . La solubilidad de las muestras disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con el incremento en el contenido de NCC, mantenido su integridad estructural en todas las concentraciones.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano (Q) con diferentes concentraciones de nanocelulosa obtenidas luego de la hidrólisis.

Formulaciones	Humedad ($\frac{\text{g}_{\text{AGUA}}}{100 \text{ g}_{\text{PELÍCULA SECA}}}$)	Solubilidad (%)	$\text{PO}_2 \times 10^{14}$ ($\text{cc s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)	$\text{PVA} \times 10^{11}$ ($\text{g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)
Q	19,04 ^a	58,54 ^{a*}	7,27 ^a	8,98 ^a
Q-NCC 0.1%	22,79 ^b	67,35 ^b	6,16 ^b	7,42 ^b
Q-NCC 0.25%	20,74 ^c	61,95 ^a	6,38 ^b	8,45 ^a
Q-NCC 0.5%	21,50 ^d	49,43 ^d	4,92 ^c	6,76 ^c
Q-NCC 0.75%	21,11 ^d	36,01 ^c	6,30 ^b	7,67 ^b

*Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de las medidas. Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas usando el test de comparación de Fisher ($p < 0,05$).

Como se observa en la **Tabla 1** con el incremento de la concentración de NCC de 0,1% a 0,25%, el contenido de humedad aumentó con respecto al control, con una posterior disminución no significativa ($p > 0,05$) para el caso de la formulación NCC 0,5%. Asimismo, las películas nanocompuestas de Q presentaron una disminución de la permeabilidad al vapor de agua alcanzando un mínimo para la concentración de 0,5% ($6,76 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). La presencia de NCC en las matrices de Q posibilitó la disminución de la PO_2 y la PVA como consecuencia del aumento de la tortuosidad y la consiguiente restricción a la transferencia de materia a través de la matriz (**Tabla 1**). Independientemente de la

concentración de NCC incorporada, las formulaciones presentaron diferencias significativas con respecto al control Q ($p < 0,05$) (de Moura, et al. 2009).

Propiedades mecánicas de las películas nanocompuestas

Los resultados de las propiedades mecánicas para las películas con agregado de NCC se presentan en la **Figura 2**, donde se puede evidenciar el aumento del esfuerzo (MPa) a medida que aumentó la proporción de NCC. A partir de estos resultados podría inferirse que el quitosano por sus características estructurales de polielectrolito catiónico es capaz de unirse a las NCC mediante interacciones electrostáticas formando complejos iónicos estables con la consiguiente mejora en las propiedades mecánicas

Por otro lado, la formulación conteniendo 0,75% de NCC presentó una disminución del % elongación con respecto a las otras formulaciones, debido a que el aumento de NCC generó películas significativamente más rígidas ($p < 0,05$) debido al mayor grado de asociación entre las partículas y la matriz de Q. Este parámetro guarda una estrecha relación con el contenido de humedad (**Tabla 1**).

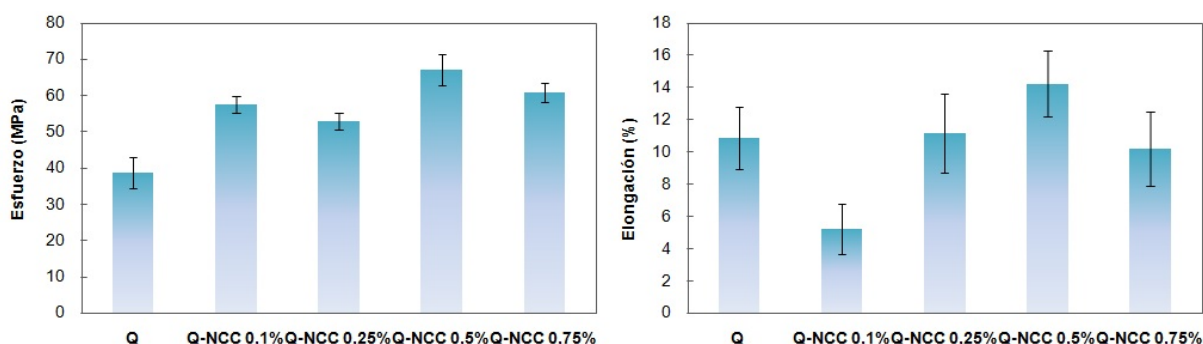


Figura 2. Propiedades mecánicas de películas de quitosano (Q) con agregado de nanofibras de celulosa (NCC) obtenidas luego de 2 h de hidrólisis.

*Las barras de error corresponden a la desviación estándar; letras diferentes indican diferencia significativa usando el test de comparación de Fisher ($p < 0.05$), $n=6$

Propiedades termo-físicas de las películas nanocompuestas

Los espectros dinámicos mecánicos de las películas de Q mostraron una ligera disminución de la T_g con el agregado de NCC con respecto a las películas de Q. La **Figura 3** muestra la relajación α asociada a la temperatura de transición vítrea T_g como se observa en las curvas de $\tan \delta$ (factor de pérdida) en función de la temperatura para las películas a base de Q. El valor máximo del factor de pérdida disminuyó con el aumento de la concentración de NCC, siendo 0,46, 0,34, 0,21 y 0,19, para NCC 0,1, 0,25, 0,5 y 0,75%, respectivamente.

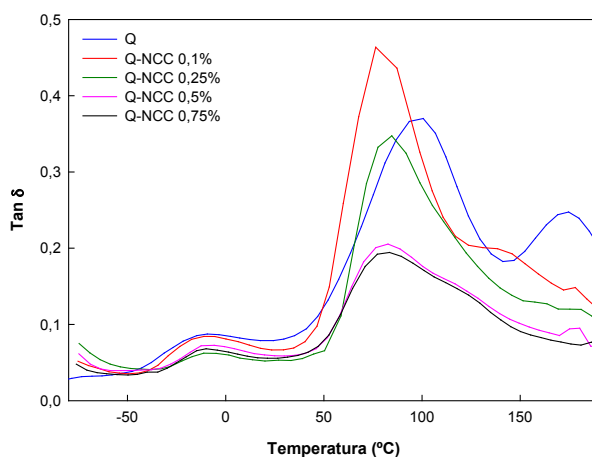


Figura 3. Espectros dinámicos mecánicos de las películas de quitosano (Q) con agregado de nanofibras de celulosa (NCC) obtenidos luego de 2 h de hidrólisis.

La $\tan \delta$ o factor de pérdida está relacionada con el amortiguamiento del material y es inversamente proporcional al número de ciclos necesarios para que la amplitud de vibración decaiga un factor igual al número e . Como puede observarse en la **Figura 3**, a una temperatura dada, el aumento del porcentaje de NCC disminuyó el número de ciclos (*Lakes, 2009*). Asimismo, los espectros dinámicos mecánicos revelaron una amplia transición en las curvas de $\tan \delta$, lo que indicaría la dispersión de las nanocelulosas en la matriz de Q y el grado de interacción existente entre la fase dispersa y matriz soporte (**Figura 3**).

Propiedades microestructurales

La **Figura 4** presenta los espectros de las matrices nanocompuestas con distinta concentración de NCC. Los espectros FTIR revelaron las similitudes estructurales entre el Q y las NCC, considerando la naturaleza química de estos polímeros.

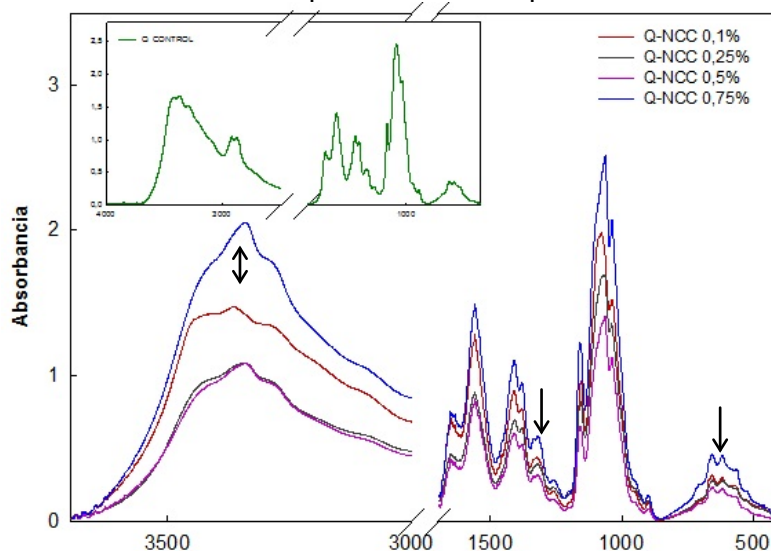


Figura 4. Espectro FTIR de las películas de Q con agregado de nanofibras de celulosa obtenidas luego de la hidrólisis de 2 h (NCC).

Los espectros FTIR evidenciaron en la región 3000- 3500 cm^{-1} un pico agudo característico de las vibraciones O-H de las NCC. Similares resultados fueron informados por *Khan et al. (2012)*. Se detectó la aparición de una banda a 1333 cm^{-1} en todas las matrices nanocompuestas intensificándose en presencia de mayor concentración de NCC. Por otra parte, los picos localizados a 1160 y 1055 cm^{-1} son asignadas a los enlaces C-O, C-C de los compuestos celulósicos. Asimismo, las bandas 800 y 650 cm^{-1} son adscriptas a las vibraciones de flexión de los enlaces O-H. En este sentido, *Rubentheren et al. (2015)* señalaron que estas observaciones indicarían la existencia de una buena miscibilidad entre las NCC y la matriz de quitosano.

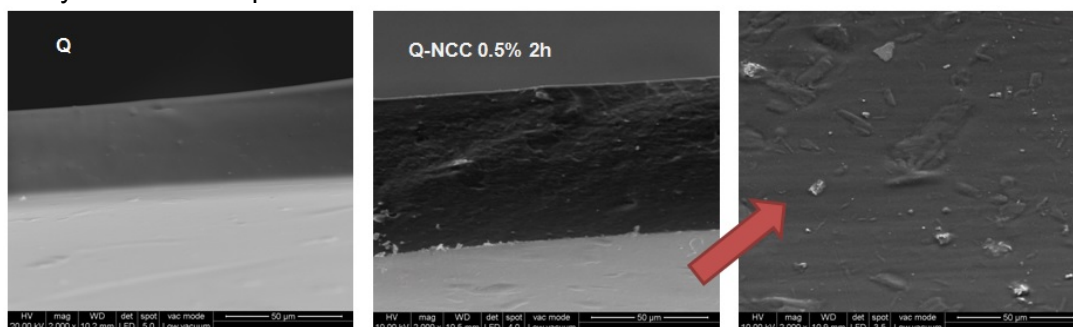


Figura 5. Imágenes obtenidas a partir de SEM de la película de quitosano y la película de Q-NCC al 0,5 %

Resulta interesante también examinar la matriz desde el punto de vista de la microestructura. La técnica de SEM se utilizó para analizar las secciones transversales y la morfología de la superficie de las películas a base de Q. El análisis micro estructural indicó que tanto en la superficie como en la sección transversal se pueden visualizar la dispersión de las nanopartículas en la matriz continua de Q con una distribución homogénea.

CONCLUSIONES

Las nanocelulosas aisladas fueron compatibles con la matriz de quitosano y su distribución en la misma resultó homogénea. Las interacciones establecidas con elementos de tamaño nanométrico fueron confirmadas por medio de la técnica de FTIR. Las mejoras en la solubilidad y en las propiedades mecánicas y de barrera se atribuyen a la formación de una red tridimensional interconectada y a las interacciones nanofibras-quitosano que determinaron las propiedades funcionales de los materiales obtenidos.

REFERENCIAS

- Azizi Samir, M.A.S., Alloin, F., Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6, 612–626.
- de Moura, M.R., Aouada, F.A., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Krochta, J.M., Mattoso, L.H. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92, 448-453.
- Funami, T., Hiroe, M., Noda, S., Asai, I., Ikeda, S., Nishinari, K. (2007). Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous system in the presence or absence of cations. *Food Hydrocolloids*, 21, 617–629.
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M.R., Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1601-1608.
- Lakes, R.S. (2009). *Viscoelastic Materials*, Cambridge University Press 153–61.
- Lu, J., Drzal, L.T. (2010). Microfibrillated cellulose/cellulose acetate composites: effect of surface treatment. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 48, 153–161.
- Martínez-Sanz, M., Olsson, R.T., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J.M. (2010). Development of electrospun EVOH fibres reinforced with bacterial cellulose nanowhiskers. Part I: Characterization and method optimization. *Cellulose*, 18, 335–347.
- Middleton, J., Tipton, A. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices *Biomaterials*, 21, 2335-2346.
- Ng, H-M., Sin, L.T., Tee, T-T., Bee, S-T., Hui, D., Low, C-Y., Rahmat, A-R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176–200.
- Park, J.S, Ruckenstein, E. (2001). Viscoelastic properties of plasticized methylcellulose and chemically crosslinked methylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 46, 373.
- Rivero, S., Garcia, M-A., Pinotti, A. (2013). Chitosan active films developed for pastry dough conservation. *Journal of Food Engineering*, 116, 524 – 531.
- Rubentheren, V., Ward, T.A., Chee, C.Y., Nair, P. (2015). Physical and chemical reinforcement of chitosan film using nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Cellulose*, 22(4), 2529-2541.

Thombre, S, Sarwade, B. (2007). Synthesis and biodegradability of polyaspartic acid: A critical review. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry Publication*, 42, 1299-1315.