

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural



FILMS BIODEGRADABLES ANTIMICROBIANOS A BASE DE ALMIDÓN Y GELATINA

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS
Trabajo de final de máster

Autor:
Raúl Díaz González

Directora académica:
Amparo Chiralt Boix

Directora Experimental:
Olga Moreno Marro

Valencia, Septiembre 2015

FILMS BIODEGRADABLES ANTIMICROBIANOS A BASE DE ALMIDÓN Y GELATINA

Raúl Díaz González, Olga Moreno Marro, Amparo Chiralt Boix¹

Resumen: Se elaboraron films biodegradables utilizando almidón de maíz (CS), gelatina bovina (BG) y glicerol (GL) como plastificante, con incorporación de agentes activos antimicrobianos lisozima (LZ) y etil lauroil arginato (LAE), mediante extensión-secado (*casting*) de las dispersiones acuosas y por termoprocesado. Se caracterizaron las propiedades físicas (microestructurales, mecánicas, barrera, ópticas y humedad de equilibrio), comportamiento térmico, actividad antimicrobiana de los films, así como la actividad enzimática de la LZ. La falta de miscibilidad entre CS y BG dio lugar a separación de fases, con formación de dominios ricos en cada uno de los polímeros. En los films por *casting* se dio una estructura estratificada debida a la diferencia de densidad de los polímeros mientras que por termoformado se observó una distribución aleatoria de los dominios. La adición tanto de LAE como LZ favoreció la adhesión interfacial entre dominios de los diferentes polímeros. Este comportamiento afectó al resto de propiedades consideradas. Los films termoprocesados fueron más maleables y extensibles, y menos rígidos, con una menor capacidad barrera. Además, presentaron pardeamiento, comparados con los obtenidos por *casting*. Se observó actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* sólo en el caso de las formulaciones con LAE, mostrando un efecto bactericida total.

Palabras clave: Films biodegradables, almidón de maíz, gelatina bovina, lisozima, LAE, antimicrobianos.

Resum: Es van elaborar films biodegradables utilitzant midó de dacsa (CS), gelatina bovina (BG) i glicerol (GL) com a plastificant, amb la incorporació d'agents actius antimicrobians lisozima (LZ) i etil lauroil arginat (LAE), mitjançant extensió - secat (*casting*) de les dispersions aquoses i per termoprocessat. Es van caracteritzar les propietats físiques (microestructurals, mecàniques, barrera, òptiques i humitat d'equilibri), comportament tèrmic, activitat antimicrobiana dels films, així com l'activitat enzimàtica de la LZ. La falta de miscibilitat entre CS i BG va donar lloc a una separació de fases amb formació de dominis rics en cadascun dels polímers. Als films per *casting* es va donar una estructura estratificada debut a la diferència de densitat dels polímers, mentre que als termoformats es va observar una distribució aleatòria dels dominis. L'adició de LAE i LZ va afavorir l'adhesió interfacial entre dominis dels diferents polímers. Aquest comportament va afectar a la resta de propietats considerades. Els films termoprocessats van ser més maleables i extensibles, i menys rígids, amb una menor capacitat barrera. A més, van presentar pardejament, en comparació amb aquells obtinguts per *casting*. Es va observar activitat antimicrobiana contra *Listeria innocua* solament a les formulacions amb LAE, mostrant un efecte bactericida total.

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València (Camino de Vera s/n).

Paraules clau: Films biodegradables, midó de dacsá, gelatina bovina, lisozima, LAE, antimicrobians.

Abstract: Biodegradable films were prepared using corn starch (CS), bovine gelatin (BG), glycerol (GL) as a plasticizer, with the incorporation of lysozyme (LZ) and ethyl lauroyl arginate (LAE) as antimicrobial agents, by extension-drying (*casting*) of the aqueous dispersions and thermoprocess. The physical properties (microstructure, mechanical, barrier, optical, and equilibrium moisture), thermal behaviour, antimicrobial activity of the films and the enzymatic activity of LZ were characterized. The lack of miscibility between CS and BG resulted in phase separation with formation of rich domains of each polymer. For the films obtained by *casting*, the different density of the polymers led to a layered structure, while thermoprocessed films showed a random distribution of the domains. The addition of LAE and LZ favored the interfacial adhesion between the domains of different polymers. This behavior affected the rest of the properties considered. Thermoprocessed films were softer and more extensible, less rigid, and showed poorer barrier capacity. They also presented browning, compared with those obtained by *casting*. Antimicrobial activity against *Listeria innocua* was observed only in the case of formulations containing LAE, which showed a total bactericidal effect.

Keywords: Biodegradable films, corn starch, bovine gelatin, lysozyme, LAE, antimicrobials.

1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos sintéticos derivados del petróleo se han utilizado tradicionalmente como material de envase en distintos ámbitos industriales, dadas sus características (elevada disponibilidad, bajo coste, buena resistencia mecánica, baja permeabilidad al oxígeno, termosellables, etc.). En la industria alimentaria se utiliza una elevada cantidad de este tipo de materiales, con la finalidad de conservar y proteger a los alimentos de daño físico, oxidaciones y alteraciones microbiológicas. Sin embargo, la acumulación de este tipo de materiales no biodegradables conlleva un serio problema medioambiental, junto con un elevado coste en su reciclado. Por ello, en los últimos años, se están desarrollando nuevos materiales basados en polímeros biodegradables destinados a esta finalidad (Tharanathan, 2003). Entre estos biopolímeros destaca el almidón, el cual presenta grandes ventajas, como su bajo coste, biodegradabilidad, fácil acceso y gran disponibilidad en el mercado (Moreno et al., 2014; Wilhelm et al., 2003; Barnett, 2011). El almidón termoplástico (TPS), obtenido tras su termoprocésado en presencia de plastificantes como el glicerol, presenta propiedades termoplásticas muy similares a la de los plásticos sintéticos, lo cual posibilita la obtención de films por medio de procesado en seco (extrusión, moldeo-compresión etc.). Además, los films de almidón presentan una baja permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos (Ortega-Toro et al., 2014). Debido a sus características y compatibilidad con los

alimentos, su uso en la industria alimentaria para la obtención de material de envase resulta muy adecuado.

No obstante, los films de almidón presentan ciertos inconvenientes: baja resistencia mecánica, alta higroscopicidad y permeabilidad al vapor de agua y fenómenos de retrogradación durante el almacenamiento, que alteran sensiblemente sus propiedades, especialmente las mecánicas. Una de las posibles estrategias para mejorar las propiedades del almidón se basa en su combinación con otros materiales. Diferentes autores han estudiado la combinación del almidón con gelatina, observando cómo diferentes proporciones de ambos polímeros permiten modular la resistencia y extensibilidad de los films (Al-Hassan and Norziah, 2012; Fakhoury et al., 2012, 2013). Acosta et al. (2015) observaron que la combinación de almidón:gelatina en una proporción 1:1 dio lugar a films con un comportamiento mecánico óptimo, con alta resistencia y extensibilidad.

Por otro lado, los films de almidón pueden actuar como vehículo de sustancias activas para prevenir el desarrollo y crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos, alargando así su vida útil, mejorando su seguridad y manteniendo su calidad, sin necesidad de adicionar aditivos conservantes al propio alimento. Estas sustancias activas contribuyen, además, a la conservación del propio envase. Entre estos agentes antimicrobianos destacan los aceites esenciales, compuestos fenólicos, bacteriocinas y enzimas (Bayarri et al., 2014, Corradini et al., 2013). La lisozima es una de las enzimas antimicrobianas más estudiadas en cuanto a su incorporación en materiales de envase biodegradables. Posee una elevada estabilidad en un amplio intervalo de temperatura y pH, además, su elevado punto isoeléctrico ($pI \approx 11$) aporta a la proteína una carga electrostática neta positiva en un rango de pH que engloba casi todos los alimentos (Bayarri et al., 2014). Su poder antimicrobiano reside en su actividad muramidasa. Concretamente, actúa catalizando la hidrólisis de los enlaces β 1-4 entre el ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina del peptidoglicano presente en la pared celular de las bacterias Gram positivas. En las bacterias Gram negativas el peptidoglicano se encuentra debajo de la membrana celular, y no es accesible para este enzima (Ibrahim et al., 1996, Fabra et al., 2012, Bayarri et al., 2014). Esta actividad antimicrobiana puede estar afectada por diferentes factores como: pH, fuerza iónica del medio, temperatura o accesibilidad de la lisozima a la pared celular bacteriana (Smolelis & Hartsell, 1952). La lisozima de clara de huevo está considerada como GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la Food and Drug Administration (FDA), y catalogada como aditivo alimentario con el código E-1105.

Otro compuesto, de utilización más reciente en la elaboración de películas bioactivas, es el etil lauroil arginato (N- α -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride, LAE). Se trata de un surfactante catiónico derivado de la condensación del ácido láurico, L-arginina y etanol. Este compuesto destaca por ser un potente agente antimicrobiano para una elevada diversidad de microorganismos, como bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y levaduras. Actúa mediante la interacción con las membranas celulares de los microorganismos, causando la

desnaturalización de las proteínas de membrana, lo cual provoca un aumento en su permeabilidad, inhibiendo el crecimiento de las células o provocando su muerte (Rodríguez et al., 2004). Dicho compuesto puede metabolizarse rápidamente en el organismo, dando lugar a compuestos naturales presentes en la dieta. Por ello, está considerado como GRAS por la FDA, y ha sido aceptado como aditivo alimentario con el código E243 (Hawkins et al., 2009, Higuera et al., 2013). Recientemente, ha sido incorporado a diferentes matrices de envases alimentarios como politereftalato de etileno y polipropileno, incluyendo matrices biodegradables como etilen-vinil-alcohol (Muriel-Galet et al., 2015) y quitosano (Higuera et al., 2013). El LAE es predominantemente hidrofílico, lo que significa que tiende a concentrarse en la fase acuosa, donde se produce mayoritariamente la acción bacteriana. Además muestra una elevada estabilidad química en un rango de pH entre 3 y 7, comprendiendo así a la gran mayoría de alimentos. Gracias a estas cualidades puede ser utilizado en menor concentración que otros conservantes alimentarios equivalentes, lo que lo hace interesante para su incorporación como agente activo en películas biodegradables (Higuera et al., 2013).

En el presente trabajo se estudia el efecto de la incorporación de lisozima (LZ) o etil lauroil arginato (LAE) en films obtenidos a base de almidón de maíz (CS), gelatina bovina (BG) y glicerol (G) como agente plastificante, sobre sus propiedades físicas, estructurales y comportamiento térmico. Se estudia también la actividad antimicrobiana de los films frente *Listeria innocua*. Además, los films serán obtenidos por medio de procesado húmedo (*casting*) y seco (moldeo-compresión), con objetivo de observar cómo afecta la metodología de obtención sobre las propiedades mencionadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la obtención de los films se utilizó: Almidón de maíz (CS) (Roquette Laisa España, S.A.); Gelatina bovina de tipo A (BG) (Sancho de Borja, S.L., Zaragoza); Lisozima liofilizada (LZ) (Fluka Analytical, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania); Etil lauroil arginato (LAE) al 10% en etanol (Vedeqsa, Grupo Lamirsa, Terrassa, España) y glicerol (GL) como agente plastificante (Panreac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona).

Para el acondicionamiento de los films obtenidos se utilizó nitrato de magnesio o pentóxido de fósforo, ambos de Panreac Química S.A (Castellar del Vallés, Barcelona).

Para la caracterización de la actividad enzimática de la lisozima se utilizó tampón fosfato 1M (pH=6,24) preparado con fosfato potásico monobásico e hidróxido potásico (Panreac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona) y liofilizado de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Alemania).

Los medios de cultivo utilizados para los ensayos microbiológicos fueron Tryptic Soy Broth (TSB), Palcam Agar Base, Agar Bacteriological y Buffered

Peptone Water (Scharlab, Barcelona) y NaCl (Panreac, Barcelona). La cepa de *Listeria innocua* (CECT 910) fue proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, Valencia).

2.2 Obtención de los films

Se prepararon tres formulaciones de films a base almidón de maíz (CS) y gelatina bovina (BG), en proporción másica 1:1, utilizando glicerol (GL) como plastificante. Se consideraron los films control (CF) sin compuestos adicionales y films bioactivos con lisozima (LZ) o etil lauril alginato (LAE) con 0,1g de compuesto activo/g de polímeros. Cada formulación se obtuvo por extensión y secado (*casting*) y por mezclado en fundido y termoprensado. El glicerol se añadió al 25 % (respecto al total de sólidos) en los films obtenidos por *casting*, y al 30 % en los termoformados. De esta forma se obtuvieron 6 diferentes tipos de films: films control (CCF y PCF), films con LZ (CLZ y PLZ) y films con LAE (CLAE y PLAE), obtenidos por *casting* y termoformado respectivamente.

2.2.1 OBTENCIÓN DE FILMS POR CASTING

Para la preparación de los films por *casting*, se prepararon las dispersiones de los polímeros por separado para su posterior mezclado en la proporción adecuada. La dispersión de CS al 2% (p/p) en agua destilada, con agitación magnética durante 5 minutos, se mantuvo en un baño termostático a 100 °C durante 30 minutos, con el fin de gelatinizar el almidón de forma homogénea. Posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente. La dispersión de BG al 2% (p/p) se preparó con agitación magnética durante 30 minutos a 40°C. Se preparó la disolución acuosa de LZ al 10% (p/p), con agitación durante 20 minutos a 800 rpm. Las dispersiones de CS y BG se mezclaron en la proporción adecuada para obtener los films control y se les añadió la cantidad necesaria de la dispersión de LZ o LAE (10 % en etanol) para la obtención de los films bioactivos, además del GL. Las dispersiones correspondientes se vertieron en placas de teflón de 150 mm de diámetro, en una cantidad equivalente a 1.5 g de sólidos por placa y se dejaron secar durante 48 horas en condiciones de humedad relativa y temperatura controladas (45 ± 2 %HR y 25°C). Los films secos se despegaron de las placas y se acondicionaron durante una semana a 53%HR (utilizando disoluciones sobresaturadas de nitrato de magnesio) y 25°C, previamente a su caracterización.

2.2.2 OBTENCIÓN DE LOS FILMS POR TERMOPRENSADO

Para la obtención de las películas por prensado, se mezclaron en seco los componentes del film (CS, BG y, en su caso, LZ) en las proporciones definidas. A la mezcla seca se le añadió una cantidad de glicerol en agua (en su caso LAE al 10 % en etanol) en una proporción másica polímeros:GL:Agua de 1:0.3:1.1. Cada mezcla se homogenizó y termoprocesó en un molino de rodillos calientes (Modelo LRM-M-100,

Labtech Engineering, Thailand) a 160°C y 8 rpm durante 10 minutos. Los pellets obtenidos se acondicionaron durante una semana a 25°C y 53 %HR utilizando disoluciones sobresaturadas de nitrato de magnesio. Los films se obtuvieron en una prensa de platos calientes (Modelo LP20, Labtech Engineering, Thailand) con 5 min de precalentamiento a 160°C y posterior prensado a 30 bar durante 2 minutos, más 130 bar durante 6 minutos a 160°C, seguido de una etapa de enfriamiento hasta 60°C durante 3 minutos. En todos los casos se utilizaron muestras de 4 g. Las películas se acondicionaron del mismo modo que las obtenidas por *casting*.

2.3 Caracterización microestructural y física de los films

2.3.1. MICROESTRUCTURA

Se obtuvieron imágenes superficiales y transversales de los films mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) con un microscopio ZEISS®, modelo ULTRA 55 (Alemania). Para ello, las muestras se acondicionaron en desecadores con P₂O₅ durante 48 h, se criofracturaron en N₂ líquido para la observación de la sección trasversal, se montaron sobre portas de cobre y se recubrieron con platino. También se observó la superficie de los films.

2.3.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra), siguiendo el método estándar ASTM D882. Para cada formulación, se cortaron doce rectángulos (de 25 mm por 100 mm) y se acondicionaron al 53% de HR y 25 °C. Se determinó el espesor de cada rectángulo en cuatro puntos utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) antes de proceder con el ensayo. Las muestras se colocaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). Los parámetros de separación inicial de las pinzas y velocidad de elongación fueron de 50 mm y 50 mm·min⁻¹ respectivamente. Se obtuvieron curvas de fuerza frente a distancia, que fueron convertidas a curvas de tensión (σ) frente a deformación de Henky (ϵ_H).

A partir de las curvas de σ frente ϵ_H se obtuvieron los parámetros módulo de elasticidad o módulo de Young (EM, en MPa), tensión de fractura (TS, en MPa) y porcentaje de deformación en el punto de fractura (%E).

2.3.3. PROPIEDADES ÓPTICAS, TRANSLUCIDEZ, COLOR Y BRILLO

Para la medida de la translucidez y el color se utilizó un espectrocolorímetro Minolta modelo CM-3600d (Minolta CO., Tokio) mediante el cual se obtuvieron los espectros de reflexión de los films sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R₀) entre 400 y 700nm, así como el espectro del fondo blanco utilizado en las medidas anteriores (R_g). A partir de estos

espectros, se calcularon los de transmitancia interna (T_i), (indicador de la transparencia de las muestras) y R_∞ (reflectancia de una película de grosor infinito con espesor suficiente para que el efecto del fondo fuera nulo), utilizando la teoría de Kubelka - Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999). Se analizaron seis muestras por formulación, y en el caso de las películas obtenidas por *casting* se realizó la medida sobre la superficie de la película en contacto con el aire durante el secado.

Con los espectros de R_∞ , se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIEL*a*b*, utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante D₆₅. Con estas coordenadas se calcularon los valores de tono (h_{ab}^*), croma (C_{ab}^*) e índice de blancura (IB), según Atarés et al. (2010).

El brillo se midió con un brillómetro Multi.Gloss 268 (Minolta, Alemania) a un ángulo de incidencia de 60°. Para ello, las películas se colocaron sobre una superficie negra mate, de acuerdo con la norma ASTM D523 (ASTM, 1999). Se realizaron medidas en seis muestras por formulación, tomándose tres medidas en diferentes puntos y, en el caso de las películas obtenidas por *casting*, sobre la superficie que había estado en contacto con el aire durante el secado.

2.3.4. HUMEDAD

La determinación de la humedad de las películas se realizó mediante un método gravimétrico en dos etapas: secado en estufa de convección a 60°C durante 24h y almacenamiento en desecador con P₂O₅ durante 2 semanas hasta masa constante. Se realizaron seis repeticiones por formulación, y el resultado se expresó en g agua / g film seco.

2.3.5. PROPIEDADES BARRERA: PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP) Y AL OXÍGENO (OP).

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films, se siguió una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 según McHugh et al., (1993), aplicando un gradiente de HR de 53-100%. Se cortaron seis muestras circulares de 3,5 cm de diámetro por formulación. Las muestras se acoplaron sobre copas de aluminio (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se depositaron 5 ml de agua destilada. En el caso de películas obtenidas por *casting*, la cara del film en contacto con el aire durante el secado se colocó hacia el exterior de la copa. El sistema se aseguró con un anillo de goma y dos mordazas. Dichas copas se depositaron sobre un soporte con un ventilador, y este conjunto en desecadores de vidrio con disolución saturada de nitrato de magnesio para mantener una humedad relativa del 53%. Los desecadores se almacenaron a 25°C en estufa, y se monitorizó la pérdida de peso con una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante 24h. Finalmente, se midió el espesor de las películas en seis puntos con un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona).

La permeabilidad al oxígeno de las películas se midió según el método estándar ASTM D3985-05 (2005). Se utilizó un equipo de medida de la

transmisión de oxígeno (OX-TRAN, Oxtran System, Mocon, Mineapolis, USA). Las medidas se realizaron a una HR de 53%, utilizando muestras de 50 cm² de superficie expuesta. Se realizaron dos réplicas por formulación. Se midió el espesor de cada muestra en seis puntos.

2.3.6. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

Para el análisis termogravimétrico se utilizó un analizador térmico Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e (Schwarzenbach, Suiza), para estudiar la termoestabilidad de las películas. Se pesaron 3 mg de muestra acondicionada en nitrato de magnesio y se introdujeron en un crisol de alúmina en el equipo. Se calentaron a una velocidad de 10°C/min, desde temperatura ambiente hasta 600°C con flujo de nitrógeno (50 mL/min). Se realizaron dos réplicas por cada una de las seis formulaciones de films.

2.3.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LISOZIMA

La actividad enzimática de la lisozima se determinó con un método espectrofotométrico descrito por Shugar (1952), basado en la medida de la reducción de absorbancia consecuencia de la lisis de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698; Sigma, Steinheim, Germany) durante 5 minutos a 450 nm y 25 °C. Se preparó una suspensión de células al 0.01% (p/v) en tampón de fosfato de potasio 66.6 mM, pH 6.24, concentración ajustada con fin de proporcionar una absorbancia inicial comprendida ente 0.6-0.7 a 450 nm y 25 °C. Por otro lado, se preparó la disolución de lisozima en el mismo tampón, a una concentración de 200-400 U/mL. 2.5 mL de suspensión de *M. lysodeikticus* se introdujeron en una cubeta de 1 cm de paso del haz de luz junto con 100 µL de la solución enzimática, realizando un seguimiento de la absorbancia a 25 °C durante 5 minutos mediante un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, UK). Como blanco se utilizaron 2.5 mL de suspensión bacteriana junto con 100 µL de buffer.

La pendiente de la zona lineal inicial de la curva de absorbancia vs. tiempo (min), fue utilizada para cuantificar la actividad enzimática, la cual fue expresada como unidades de enzima por mg de lisozima (U/mg) (Corradini et al., 2013, Fabra et al., 2012). Una unidad corresponde con una reducción de absorbancia de 0.001 en un tiempo de un minuto. Cada análisis fue realizado por triplicado.

2.4. Caracterización del poder antimicrobiano de las películas

La actividad antimicrobiana de las películas con LZ y LAE fue analizada frente la bacteria Gram positiva *Listeria innocua* (CECT 910). La cepa utilizada, congelada en TSB con un 30% de glicerol como crioprotector, fue regenerada mediante su inoculación con un asa de siembra en 10 mL de TSB. Tras 24h de incubación a 37°C, se inocularon 10 µL de este cultivo madre a 10 mL de TSB, que se incubó 24 h bajo las mismas condiciones, para así obtener el cultivo de trabajo con células en fase exponencial de crecimiento.

Se vertieron 10 mL de medio TSA con un 3% de NaCl en placas Petri de 3,5 cm de diámetro. Una vez solidificadas, se inocularon en superficie con una población de 10^2 UFC/cm², cultivo obtenido a partir de la dilución del cultivo de trabajo. Cada placa de TSA-NaCl fue cubierta con una muestra de película de la misma área. El ensayo se realizó por duplicado para cada formulación, utilizando como controles placas inoculadas sin ser cubiertas por película (control de inóculo, CI), así como placas inoculadas cubiertas con películas control, sin agente antimicrobiano (CCF y PCF). Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, realizando recuentos a tiempo inicial, a las 5 h de incubación, y, finalmente, transcurridas las 24 h de incubación. En cada tiempo, las muestras fueron asépticamente retiradas de las placas e introducidas en bolsas Stomacher junto con 90 mL de agua de peptona, para su agitación en Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience) durante 90 segundos. Se realizaron siembras en profundidad, utilizando Palcam agar, medio específico para *L. innocua*. Las placas sembradas fueron incubadas a 37 °C durante 48 h, previamente a realizar el recuento.

2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza (ANOVA), utilizando Statgraphics Centurion XVI para Windows (Manugistics Corp., Rockville, Md.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización microestructural y física de los films

3.1.1. MICROESTRUCTURA

En las Figuras 1 a 3 se muestran las imágenes obtenidas mediante FESEM, de la sección transversal y superficie de los diferentes films. En la Figura 1 puede observarse la diferente microestructura del corte transversal de los films control, mezcla de almidón y gelatina, obtenidos por *casting* y por mezclado en fundido. En el primero se observa una estratificación de los dos polímeros ocurrida durante la etapa de secado debido a su falta de miscibilidad y separación de fases. En la parte superior predomina la fase rica en gelatina (con menor densidad) y en la inferior la fase rica en almidón. Esto puede apreciarse también en las imágenes superficiales (Figura 3) donde los dominios de gelatina aparecen en la superficie en formas globulares, tal como ha sido previamente observado por Acosta et al., (2015) para films de composición similar obtenidos por el mismo procedimiento. En los films termoformados se aprecia también la separación de fases de los polímeros pero sin la estratificación ocurrida durante el secado de la dispersión formadora de film. A mayor ampliación (Figura 2) puede observarse la falta de adhesión completa de las fases en las zonas de contacto. A nivel superficial, estos films muestran una orientación fibrosa atribuible a la agregación de las cadenas de gelatina a través de sus zonas

helicoidales, en una estructura tridimensional similar a la del colágeno (Acosta et al., 2015).

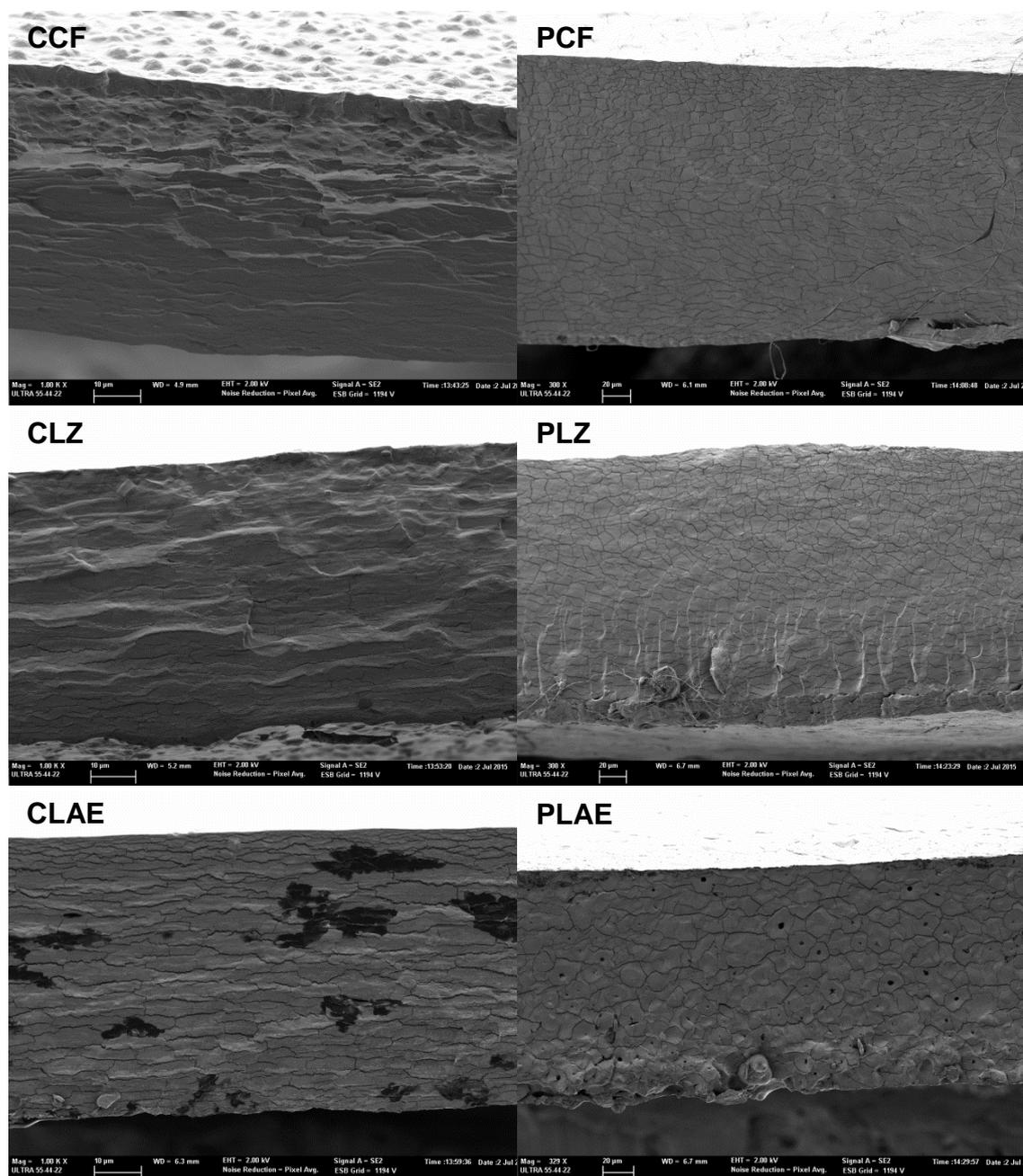


FIGURA 1. Imágenes FESEM de la sección transversal de los diferentes films control y con lisozima o LAE obtenidos por *casting* (izquierda) y por termocompresión (derecha) a 300 y 1000 aumentos respectivamente.

La incorporación de LZ a los films mezcla parece potenciar las interacciones almidón-gelatina, favoreciendo el mezclado, tanto en los films obtenidos por casting como por termocompresión. En las microfotografías a mayor ampliación siguen observándose los diferentes dominios (ricos en

almidón y gelatina respectivamente) pero se aprecia una mayor adhesión interfacial. A nivel superficial, ambos films con LZ presentan también estructuras globulares, pero en menor proporción. El film termoformado exhibe también cierto aspecto fibrilar a nivel superficial, pero menos marcado que el respectivo film control.

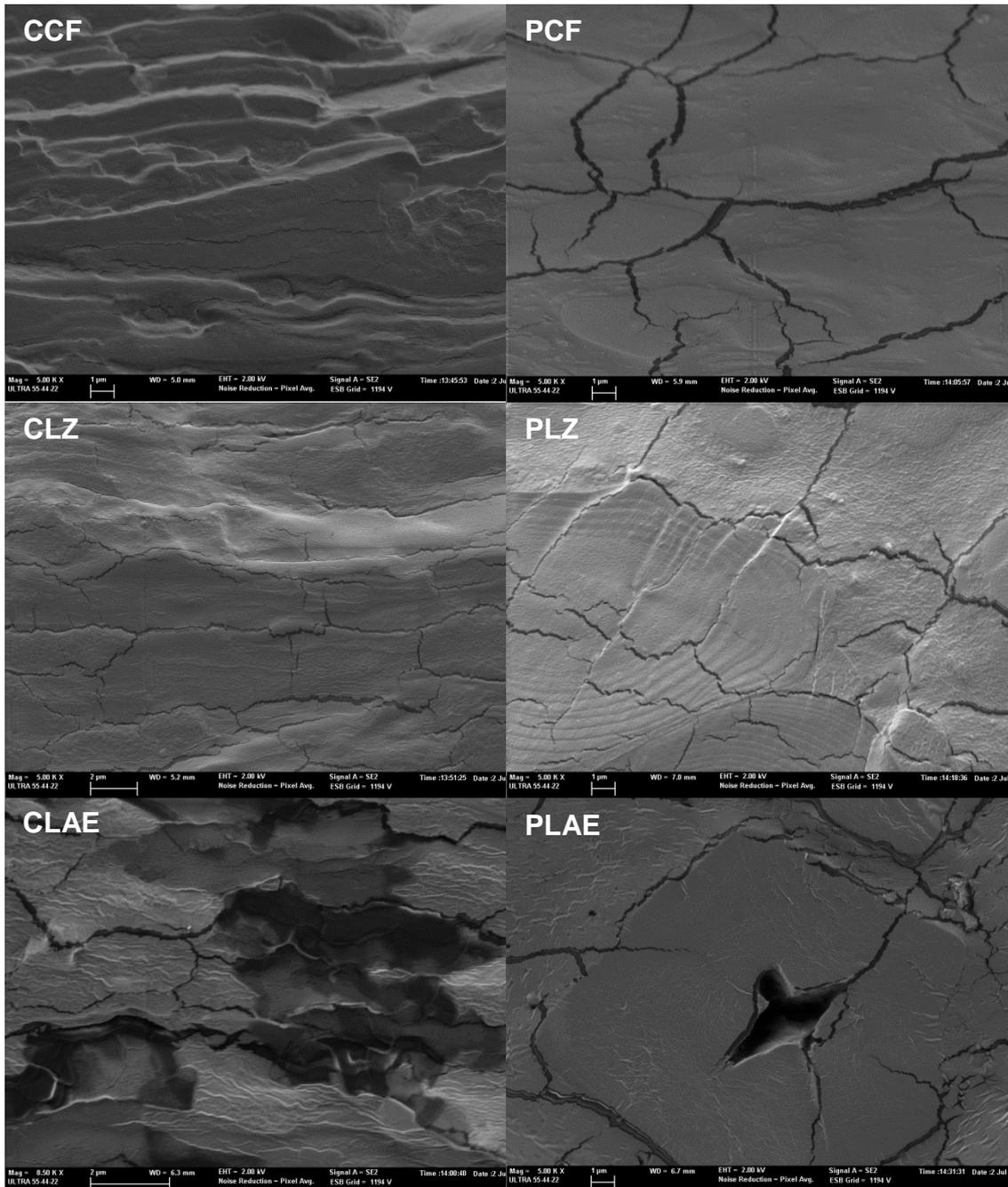


FIGURA 2. Imágenes FESEM a mayor ampliación (5000 aumentos) de la sección transversal de los diferentes films control y con lisozima o LAE obtenidos por *casting* (izquierda) y por termocompresión (derecha).

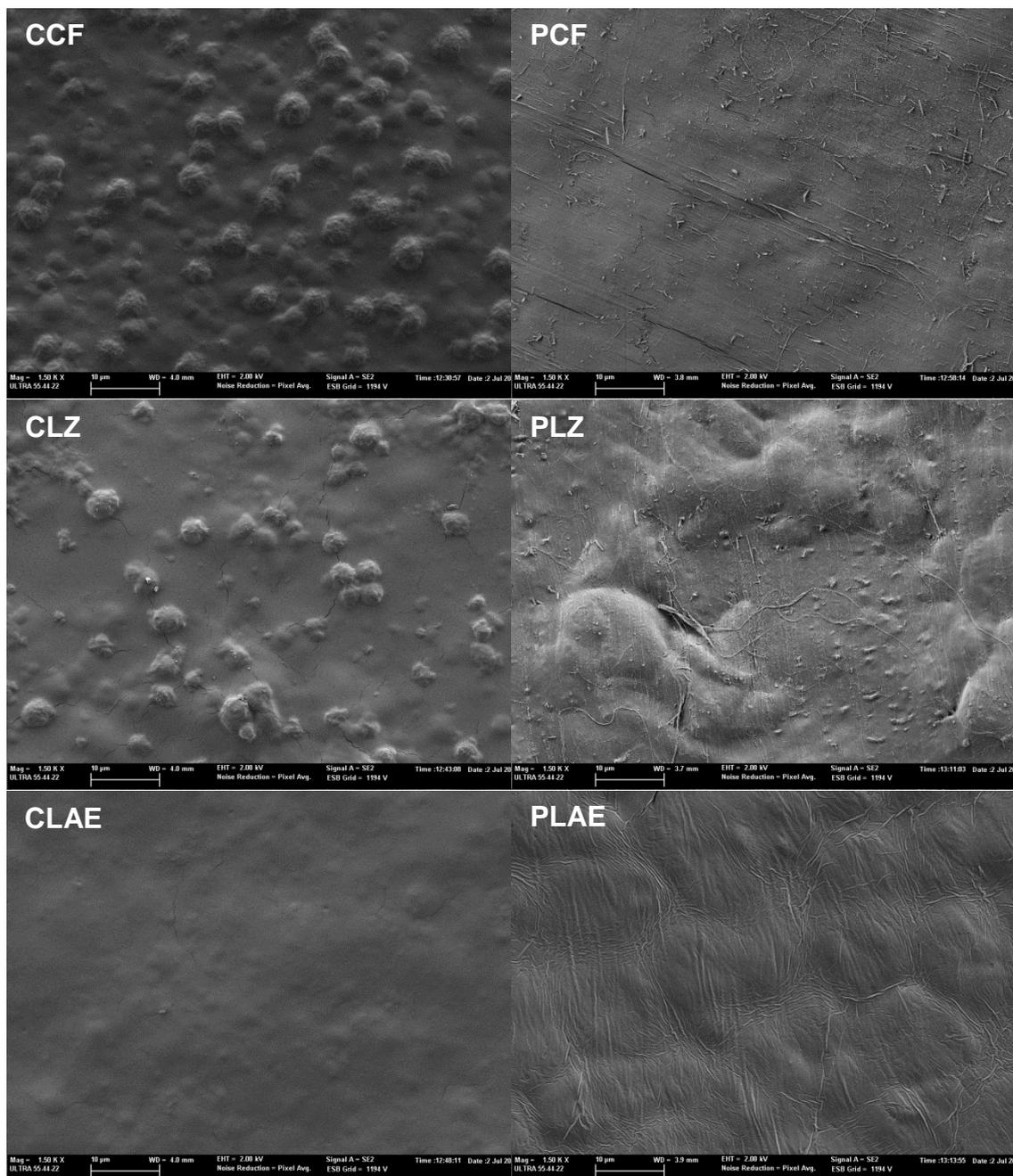


FIGURA 3. Imágenes FESEM de la superficie de los diferentes films control y con lisozima o LAE obtenidos por *casting* (izquierda) y por termocompresión (derecha) tomadas a 1500 aumentos.

En los films con LAE, se observa un menor tamaño de los dominios de almidón y gelatina, lo que indica que este compuesto con carácter tensoactivo favorece el mezclado de componentes. En los termoformados aparecen huecos atribuibles a la incorporación de aire a la mezcla fundida durante la etapa de homogenización en los rodillos, probablemente

favorecido también por el fuerte efecto tensoactivo del LAE. A nivel superficial, los films con LAE muestran la mayor homogeneidad, en coherencia con un efecto compatibilizador del compuesto frente a los dos polímeros.

3.1.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos para el espesor, módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y porcentaje de extensibilidad (%E) de los diferentes films. El espesor de los films obtenidos por *casting* fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los obtenidos por termocompresión, consecuencia de la baja capacidad de flujo del material fundido en la etapa de compresión.

TABLA 1. Resultados de espesor (mm), parámetros mecánicos (EM (MPa), TS (MPa) y %E) de los films equilibrados al 53% de HR a 25°C.

Formulación	Espesor (mm)	EM (MPa)	TS (MPa)	%E
CCF	0.065 ± 0.006 ^a	1021 ± 194 ^d	33 ± 6 ^e	14 ± 5 ^a
PCF	0.180 ± 0.014 ^b	110 ± 42 ^b	15 ± 2 ^b	94 ± 19 ^c
CLZ	0.065 ± 0.004 ^a	161 ± 15 ^c	18 ± 2 ^c	32 ± 9 ^b
PLZ	0.227 ± 0.012 ^c	119 ± 34 ^b	16.4 ± 0.2 ^{bc}	100 ± 28 ^c
CLAE	0.061 ± 0.003 ^a	512 ± 95 ^c	24 ± 7 ^d	35 ± 2 ^b
PLAE	0.176 ± 0.013 ^b	21.6 ± 1.8 ^a	3.4 ± 0.3 ^a	29 ± 3 ^b

Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

Los valores de los parámetros mecánicos de la formulación control obtenida por *casting* (CCF) fueron del mismo orden que los obtenidos por Acosta et al., (2015) para films de composición similar. En general, los films obtenidos por prensado fueron más maleables que los obtenidos por *casting*, y significativamente menos rígidos, menos resistentes a la fractura y más extensibles ($p < 0.05$). Esto puede justificarse por las diferencias microestructurales comentadas. En los films por *casting*, la fase rica en almidón está parcialmente separada por densidad de la fase rica en gelatina y las cadenas de ambos polímeros pueden interaccionar de forma independiente formando dos redes interpenetradas con fuerte atracción entre las cadenas afines, extendiéndose estos efectos a toda la matriz. Por el contrario, en los films termoformados, los dominios ricos en cada uno de los polímeros están entremezclados, son de menor tamaño y con una gran superficie de contacto entre ellos donde las fuerzas de adhesión son débiles.

La adición de LZ no implicó diferencias significativas en los parámetros mecánicos en los films obtenidos por termoprensado, mientras que por *casting*, supuso un descenso significativo de la rigidez y la resistencia a la fractura y un aumento significativo de la elongación de los films ($p < 0.05$). Esto puede atribuirse a la acción interfacial de la LZ en solución acuosa permitiendo la mayor interacción entre cadenas diferentes, al favorecerse el desplegamiento de las mismas en medio acuoso. La acción interfacial de la

LZ en los films termoformados se aprecia en la mayor adhesión de los diferentes dominios de ambos polímeros (Figura 2), aunque esto no tuvo un reflejo significativo en el comportamiento mecánico de estos films.

La adición de LAE supuso un descenso muy significativo ($p < 0.05$) en la rigidez y resistencia a la fractura de los films, y cambios en su extensibilidad respecto al correspondiente film control: aumentó en los films obtenidos por *casting* y disminuyó notablemente en los termoformados. El mayor grado de dispersión de las fases de almidón y gelatina (menor tamaño de los dominios) y la baja adhesión interfacial justifican el descenso de los parámetros de carga. Por otro lado, el aumento en la extensibilidad de los films por *casting* puede asociarse al deslizamiento de los diferentes dominios durante el test de extensión, mientras que en el film control las fases entrecruzadas de almidón-gelatina ofrecen más resistencia, pero menos capacidad de deformación. Por contra, en el proceso de termoformado la acción interfacial del LAE parece menos efectiva, con formación de dominios mayores y presencia de huecos en la matriz, que contribuyen a su menor deformabilidad, en comparación con el correspondiente film control.

Otro factor a tener en cuenta en las diferencias de comportamiento mecánico de los films obtenidos por diferentes métodos es el grado de cristalinidad, tanto en la fase rica en almidón como en la rica en gelatina. Mientras en disolución la agregación de cadenas y la formación de zonas cristalinas durante el secado de los films puede ocurrir en gran extensión debido a la alta movilidad molecular, en el mezclado en fundido y termocompresión, esta organización molecular es menos probable, obteniéndose estructuras más amorfas, con menor rigidez (Jiménez et al., 2012).

3.1.3. PROPIEDADES ÓPTICAS, TRANSLUCIDEZ, COLOR Y BRILLO

En la Tabla 2 se presentan los valores obtenidos para los diferentes parámetros ópticos de los films: L^* , luminosidad; Cab^* , croma; hab^* , tono; IB, índice de blancura y brillo a 60° .

El procesado en seco supuso, para todas las formulaciones, un descenso significativo ($p < 0.05$) de la luminosidad y el tono, acompañado de un aumento del croma. En consecuencia, los films termoprensados presentaron un tono rojizo indicador de pardeamiento, a diferencia de los films obtenidos por *casting*, los cuales presentaron un color muy próximo al blanco, independientemente del valor del tono, debido al bajo valor de croma o intensidad de color. La adición de LZ en los films por *casting* no supuso cambios en los parámetros ópticos, mientras que en prensado, disminuyó significativamente la luminosidad y tono, y aumentó el croma ($p < 0.05$), dando lugar a films mucho más pardeados con respecto al correspondiente film control (PCF). La adición de LAE en *casting* supuso un descenso significativo tanto de la luminosidad como del croma, y un aumento del tono ($p < 0.05$). Cuando el LAE fue añadido en los films obtenidos mediante termocompresión, se produjo un descenso significativo ($p < 0.05$) del tono y el croma respecto al correspondiente film control. De hecho la formulación PLAE fue la menos pardeada de todas las muestras termoformadas. Los

valores de IB fueron coherentes con los parámetros colorimétricos ya comentados, siendo significativamente superior para los films obtenidos por casting ($p < 0.05$). La adición de LZ y LAE aumentó significativamente ($p < 0.05$) el brillo de los films obtenidos por ambos procedimientos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones debidas al procesado. Este aumento de brillo es atribuible al descenso en la rugosidad superficial de los films (menos formaciones globulares) tal como se observa en las imágenes superficiales de FESEM (Figura 3).

TABLA 2. Valores de los parámetros ópticos (luminosidad, croma, tono, índice de blancura, transmitancia interna y brillo a 60°) para las diferentes formulaciones.

Formulación	L*	C _{ab} *	h _{ab} *	IB	Brillo (60°)
CCF	80.6 ± 0.5 ^d	7.3 ± 0.2 ^b	98.0 ± 0.3 ^d	79.4 ± 0.4 ^e	12.1 ± 0.7 ^a
PCF	62.32 ± 1.05 ^b	30.4 ± 1.3 ^e	83.6 ± 0.7 ^b	51.6 ± 0.9 ^b	12 ± 4 ^a
CLZ	81.4 ± 0.3 ^e	7.4 ± 0.4 ^b	98.6 ± 0.8 ^d	80.0 ± 0.3 ^e	14.1 ± 0.9 ^b
PLZ	54.7 ± 0.2 ^a	33 ± 3 ^f	76.5 ± 2 ^a	43.9 ± 1.9 ^a	19 ± 4 ^c
CLAE	73.8 ± 0.6 ^c	4.36 ± 0.13 ^a	104.0 ± 0.9 ^e	73.4 ± 0.6 ^d	18.7 ± 1.3 ^c
PLAE	62.3 ± 0.7 ^b	26.1 ± 1.8 ^c	85.5 ± 0.4 ^c	54.3 ± 0.2 ^c	19 ± 4 ^c

Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

En la Figura 4 se muestran los espectros de transmitancia interna (T_i) de los films, como indicadores de la transparencia de los mismos.

Los films obtenidos por casting mostraron una mayor transmitancia interna a bajas longitudes de onda, resultando más transparentes que los obtenidos por prensado. La adición de ambos compuestos activos en procesado por casting no generó cambios en la transparencia, a diferencia de lo observado para los films termoprensados. La formulación con LZ (PLZ) mostró la mayor reducción de T_i a bajas longitudes de onda con respecto al film control (PCF), siendo la formulación menos transparente. Sin embargo, la adición de LAE en los films prensados (PLAE) generó un aumento de la transparencia con respecto al film control (PCF). Considerando el descenso selectivo de T_i respecto a la longitud de onda (mayor descenso a bajas λ) éste es atribuible principalmente a la formación de productos pardos en los films, que absorben luz entre 400 y 500 nm. La formación de estos productos puede ser el resultado de reacciones de Maillard (condensación de grupos amino de las proteínas con grupos carbonilo de azúcares reductores, provenientes de la hidrólisis parcial del almidón) o reacciones de caramelización de los azúcares presentes, ambas potenciadas por las altas

temperaturas del proceso. En ese sentido, es remarcable el diferente efecto de la LZ y el LAE, ambos con grupos amino, pero probablemente con diferente reactividad.

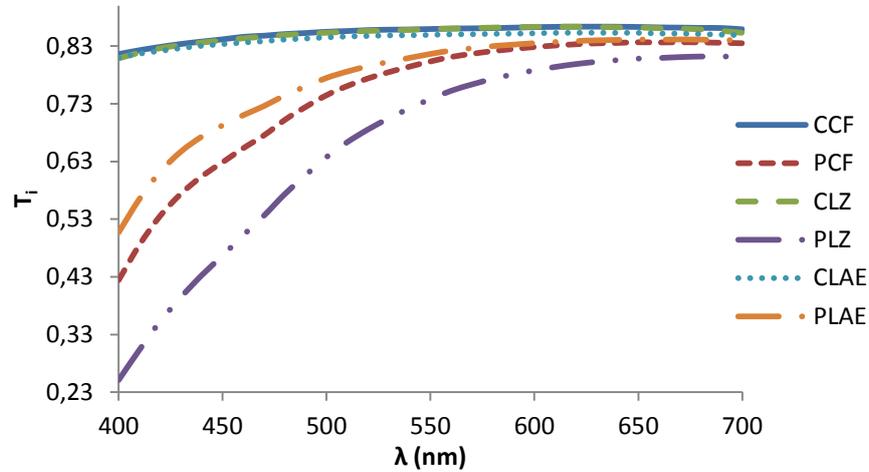


FIGURA 4. Espectros de transmitancia interna (T_i) entre 400 y 700 nm de longitud de onda para las diferentes formulaciones de films obtenidos por *casting* (C) y prensado (P).

3.1.4. PROPIEDADES BARRERA: PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP) Y AL OXÍGENO (OP) Y HUMEDAD.

En la Tabla 3 se muestran la humedad de equilibrio (X_w) de los films, (g agua/g film seco), así como los valores de las propiedades barrera: permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP). La humedad de equilibrio de los films termoprensados fue mayor, excepto en los films con LZ, que la de los obtenidos por casting en coherencia con las diferencias estructurales que llevan asociadas diferente proporción de puntos activos para la adsorción de agua en la matriz. Así mismo, la incorporación de LZ potenció la capacidad de adsorción de agua de los films obtenidos por casting.

TABLA 3. Valores permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP) y humedad de equilibrio (X_w , g agua/ g film seco) de los diferentes films.

Formulación	WVP (g/Pa·s·m)·10 ⁷	OP (cm ³ /m ² ·día)·10 ¹³	X_w (g agua/g film seco)
CCF	6.9 ± 0.2 ^b	1.26 ± 0.03 ^a	8.9 ± 0.9 ^{ab}
PCF	15.1 ± 1.3 ^d	2.512 ± 0.014 ^b	10.1 ± 0.3 ^c
CLZ	8.2 ± 0.5 ^c	1,19 ± 0.02 ^a	14.00 ± 0.12 ^d
PLZ	17.6 ± 0.9 ^e	1.99 ± 0.16 ^{ab}	8.9 ± 0.7 ^{ab}
CLAE	5.0 ± 0.6 ^a	2.08 ± 0.07 ^{ab}	8.4 ± 0.8 ^a
PLAE	8.1 ± 1.2 ^c	9.47 ± 1.18 ^c	9.3 ± 0.4 ^b

Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

Los valores de WVP y OP obtenidos para la formulación control elaborada por *casting* fueron del orden de los publicados para films de almidón y gelatina (Acosta et al., 2015). Los films termoprensados presentaron un poder barrera significativamente menor ($p < 0.05$) tanto al vapor de agua como al oxígeno en todas las formulaciones. La incorporación de LZ disminuyó la OP y aumentó la WVP en los films con ambos tipos de procesado. Por el contrario, el LAE aumentó significativamente la OP y disminuyó la WVP en ambos tipos de films. Estas diferencias pueden justificarse también por las diferencias estructurales entre los films, que dan lugar a distintas velocidades de transporte de las moléculas de agua u oxígeno en la matriz. La formación de estructuras multifásicas con débil adhesión interfacial en el procesado en seco, menos compactas que las obtenidas por *casting*, explica la mayor facilidad para el transporte de masa en las mismas. Esta tendencia en las propiedades barrera y mecánicas en función del método de procesado ha sido también observada por otros autores (Fakhoury et al., 2013).

3.1.5. ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO

La Tabla 4 muestra los valores de las temperaturas de degradación térmica de los films (inicio: T_0 y máxima velocidad: $T_{m\acute{a}x}$), así como de los compuestos activos puros. Los valores obtenidos permiten tener información acerca de la estabilidad térmica del material en función de la composición, así como de los posibles cambios ocurridos en el procesado térmico, en comparación con los films obtenidos por *casting*. La temperatura inicial de degradación de los compuestos activos puros fue 175°C para el LAE y 217°C para la lisozima, ambas superiores a la temperatura de procesado (160°), lo que ofrece cierta seguridad sobre su conservación durante el mismo.

TABLA 4. Temperatura de inicio de la degradación térmica (T_0) del material y temperatura de máxima velocidad de degradación ($T_{m\acute{a}x}$) para los diferentes films.

Formulación	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	T_0 (°C)
CCF	264.75 ± 0.11 ^e	119 ± 4 ^a
PCF	261.75 ± 0.11 ^d	162.2 ± 1.4 ^b
CLZ	260.09 ± 0.12 ^d	124.8 ± 0.7 ^a
PLZ	255.92 ± 0.12 ^c	161.3 ± 1.4 ^b
CLAE	249.9 ± 0.4 ^a	123.5 ± 1.7 ^a
PLAE	251.3 ± 1.3 ^a	121.6 ± 0.3 ^a
LAE	253.8 ± 1.1 ^b	175 ± 4 ^c
LZ	310.7 ± 1.6 ^f	217 ± 7 ^d

Diferentes letras (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

Todos los films obtenidos por termoprensado (excepto el que contenía LAE) presentaron valores de la T_0 del orden de 160°C mientras que en los

obtenidos por casting ésta fue del orden de 120°C. Esto indica que durante las etapas de termoprocesado a 160°C, se formaron compuestos de degradación a partir de 120°C, los cuales pueden ser responsables de la coloración de estos films, como se ha comentado previamente. En este sentido, es remarcable la baja temperatura de inicio de la degradación de los films termoprocesados con LAE (121°C) que también presentaron menos pardeamiento, y que podría indicar un efecto termoprotector de este compuesto en los films almidón-gelatina durante el mezclado en fundido y termocompresión. La temperatura de máxima velocidad de degradación de todos los films estuvo entre 250 y 260°C, disminuyendo ligeramente con la incorporación de compuestos activos y, salvo cuando contienen LAE, en los films termoformados.

3.2. Caracterización del poder antimicrobiano de los films

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la actividad antimicrobiana de los diferentes films. Como puede observarse, los films con LAE mostraron, en cualquiera de sus formas de procesado (PLAE y CLAE), un efecto bactericida total a todos los tiempos controlados. Sin embargo, ninguna de las formulaciones que contenían LZ mostraron un efecto antimicrobiano a ninguno de los tiempos ensayados, aunque la actividad enzimática determinada fue alta 21.803 ± 2.378 U/mg de sólido. Esto podría deberse a la inmovilización de la LZ en la matriz de almidón-gelatina, lo cual limita su difusión a la superficie del film, teniendo en cuenta su alto peso molecular (14.4 KDa), inhibiendo así su potencial capacidad antimicrobiana.

TABLA 5. Resultados de los recuentos obtenidos en el análisis de la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* (CECT 910) a 37°C a tiempo inicial (t=0h), 5 horas y 24 horas de incubación.

	0h	5h	24h
Formulación	Log (UFC/cm ²)	Log (UFC/cm ²)	Log (UFC/cm ²)
Ci**	2.08 ± 0.07 ^a	3.91 ± 0.05 ^b	7.35 ± 0.02 ^b
CCF	2.14 ± 0.04 ^b	4.19 ± 0.03 ^c	7.40 ± 0.05 ^b
PCF	2.25 ± 0.02 ^c	3.86 ± 0.08 ^b	7.35 ± 0.04 ^b
CLZ	2.13 ± 0.03 ^{ab}	4.18 ± 0.03 ^c	7.40 ± 0.03 ^b
PLZ	2.13 ± 0.02 ^{ab}	3.77 ± 0.06 ^a	7.24 ± 0.07 ^a
CLAE	CND*	CND*	CND*
PLAE	CND*	CND*	CND*

Diferentes letras (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas entre las distintas formulaciones, con un intervalo de confianza del 95%.

* Crecimiento No Detectado.

** Control de Inóculo

4. CONCLUSIONES

La incorporación de LZ y LAE a los films de almidón gelatina afectó a la microestructura de los films obtenidos por *casting* y por termoformado, mejorando la adhesión interfacial de las fases separadas de ambos polímeros (no compatibles). Los films termoformados fueron más extensibles y menos rígidos y resistentes que los obtenidos por *casting*. En general, la incorporación de los agentes activos comportó un descenso en los parámetros de carga de los films, aumentando su extensibilidad cuando se obtuvieron por *casting*. En los films con ambos tipos de procesado, la incorporación de LZ disminuyó la OP y aumentó la WVP mientras que el LAE aumentó significativamente la OP y disminuyó la WVP. Los films termoprocesados fueron más permeables para todas las formulaciones. Los films termoformados presentaron tonalidades pardas asociadas a la formación de compuestos de Maillard durante el calentamiento. Esto fue más notable en los films con LZ mientras que el LAE parece ejercer un efecto termoprotector. Los films con LAE mostraron un efecto bactericida total contra *Listeria innocua*, mientras que con LZ no se observó inhibición del crecimiento. La utilización del LAE como agente antimicrobiano se presenta como una alternativa interesante para la obtención de films biodegradables activos obtenidos tanto por *casting* como con procesado termoplástico, dada su fuerte poder antimicrobiano y elevada estabilidad térmica.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, S., Jiménez, A., Cháfer, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. (2015) Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 49, 135-143.
- Al-Hassan, A. A., Norziah, M. H. (2012) Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26, (1) 108-117.
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapour transmission of materials. In Standard designations: E96-95 annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (1999). Standard test methods for specular gloss. Designation (D523): Annualbook of ASTM standards (Vol. 06.01) Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Standard D882 annual book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. ASTM.
- ASTM. (2005). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plasticfilm and sheeting using a coulometric sensor. In Standard designation: D3985-05:annual book of American Society for Testing Materials. West Conshohocken, PA: ASTM.
- Atarés, L., Bonilla, J., Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100, 678-687.
- Barnett, I., (2011). Packaging Solutions Throughout the Supply Chain: Technology, Trends and Future Outlook. *Business Insight*, London.
- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., (2014), Properties of lysozyme/lo methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging, *Journal of Food Engineering*. 131, 18-25.

- Corradini, C., Alfieri, I., Cavazza, A., Lantano, C., Lorenzi, A., Zucchetto, N., Montenero, A., (2013) Antimicrobial films containing lysozyme for active packaging obtained by sol-gel technique. *Journal of Food Engineering*, 119, 580–587.
- Fabra M. J., Sánchez G.L., Chiralt A. (2012). Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. *Food Science and Technology*, 55, 22-26.
- Fakhoury, F. M., Martelli, S. M., Bertan, L. C., Yamashita, F., Innocentini Mei, L. H., Collares Queiroz, F.P. (2012). Edible films made from blends of manioc starch and gelatin e Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *Food Science and Technology*, 49, 149-154.
- Fakhoury, F. M., Costa, D., Yamashita, F., Martelli, S. M., Jesus, R. C., Alganer, K., Collares-Queiroz, F. P., Innocentini-Mei, L. H. (2013) Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95, 681– 689.
- Hawkins, D.R., Rocabayera, X., Ruckman, S., Segret, R., Shaw, D. (2009). Metabolism and pharmacokinetics of ethyl Na-lauroyl-L-arginate hydrochloride in human volunteers. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2711–2715.
- Higueras, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., Rollini, M. (2013) Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-Nα-dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 339–345.
- Hutchings, J.B., 1999. Food colour and appearance. Aspen Publishers, Maryland. Jensen, H., Hancock, R.E.W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91, 19-29.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T (1996). Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills Gram-negative and Gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3799–3806.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2012) Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M. (1993). Hydrophobic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899-903.
- Moreno, O., Pastor, C., Muller, J., Atarés, L., González, C., Chiralt, A. (2014) Physical and bioactive properties of corn starch – Buttermilk edible films. *Journal of Food Engineering*, 141, 27–36.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2015) Antimicrobial Effectiveness of Lauroyl Arginate Incorporated into Ethylene Vinyl Alcohol Copolymers to Extend the Shelf-Life of Chicken Stock and Surimi Sticks. *Food Bioprocess Technol*, 8, 208–217.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A. M., Talens, P. O., Chiralt, A. B. (2014) Films de almidón termoplástico. Influencia de la incorporación de Hidroxipropil-Metil-celulosa y ácido cítrico. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 134-141
- Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., Manresa, A. (2004) Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, Na-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 903–912.
- Shugar, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 302–309.
- Smolelis, A.N., Hartsell S.E. (1952) Factors affecting the lytic activity of lysozyme. *Journal of Bacteriology*. 63 (5), 665–674.
- Tharanathan R., (2003). Biodegradable films and composite coating: past, present and future. *Critical Review in Food Science and Technology*, 14, 71-78.
- Wilhelm, H.-M., Sierakowski, M.-R., Souza, G.P., Wypych, F. (2003) Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52, 101–110.