

ABSTRACT

In the field of food packaging there is great interest in the development of biodegradable active materials, which extend the shelf-life of the food products and reduce synthetic plastic waste.

In the present Doctoral Thesis, different strategies have been used to incorporate non-volatile (polyphenols from thyme extract) and a volatile active compound (eugenol) into biodegradable films prepared with starch (S) of different sources or chitosan (CH) or with mixtures of CH:S. The functional properties and release kinetics of casted films prepared with pea starch or CH or CH:S blends were evaluated as affected by the incorporation of polyphenols from an aqueous thyme extract (TE) and tannic acid (TA), a polyphenol which was used as a cross-linking agent. Moreover, the functional properties and release kinetics of corn starch films, obtained by casting or by thermo-compression moulding, were evaluated as a function of the addition of eugenol (E) in free form or pre-encapsulated with different wall materials. In order to encapsulate E, whey protein isolate (WP) or soy lecithin (LE), as wall material, and maltodextrin (MD), as drying coadjuvant, were selected. Microencapsulate powders were obtained by spray-drying. The effect of the addition of oleic acid (OA), as eugenol carrier, and CH, as a potential capsule stabilizer, was also analysed. The different formulations were characterized before and after drying, in terms of encapsulation efficiency, thermal stability, release kinetics and antioxidant capacity and antimicrobial activity.

Results showed that TE provided pea starch and chitosan films with antioxidant activity. Polyphenols (TE and TA) interacted with CH chains and acted as cross-linkers, thus improving the tensile behaviour of films and reducing the release rate and the amount of polyphenol released from the films in water and ethanol aqueous solutions. The opposite effect was observed when TE was incorporated into the pure S matrix. All the films became darker, more reddish and less transparent when TE was incorporated, and this effect was more marked in pure S matrices, which suggests that the TE compounds were poorly encapsulated. Thus, S:TE films showed the fastest delivery rate and the highest delivery ratio of TE.

A good encapsulation efficiency (EE) of E was observed in the CH-free powders (87-98%). However, the use of CH provoked a marked EE decrease in both WP and LE powders (22% and 46%, respectively). The formulations exhibited similar E release behaviour in food simulants of different polarity, where practically the total E content was delivered at a similar rate. All the samples exhibited differing degrees of antioxidant and antimicrobial activities, according to the E content of the powder. The antibacterial effect of CH-free powders against *E. coli* was also coherent with their eugenol content, in line with the burst release of E to the culture medium, which exceeded the Minimum Inhibitory Concentration of the bacteria with 15 mg powder/mL for OA-free powder. An

additional positive effect of OA was detected in terms of the antilisterial action of this powder, which led to a similar antibacterial action in powders with and without OA (with different E load).

The process of thermo-compression moulding of the films led to important E losses (80-65%), which were minimised when using OA in the microcapsules (EOA-WP or EOA-LE). In the films containing non-encapsulated E, the retention of E was promoted due to the formation of E-starch complexes. The presence of microencapsulated eugenol increased the presence of discontinuities in the polymeric matrix, thus yielding films that were mechanically less resistant and stretchable, except for E-LE-S films, which became more resistant to break. The barrier properties were improved when adding microencapsulates to the films, except for OA-based microcapsules, due to the presence of large discontinuities and voids filled with OA. Eugenol release from the films was affected by microcapsule, their composition and the food simulant. Thus, the process of encapsulation promoted a faster E release rate and a greater amount of E released at the equilibrium, especially when using the most water soluble microcapsules (E-WP-S) and acetic acid as food simulant, in coherence with the hydrolysis of the starch matrix in the acidic environment.

In starch film obtained by casting, the addition of microencapsulated eugenol powder in starch film-forming dispersions modified film microstructure, yielding less resistant and less elastic films with reduced moisture content, transparency and oxygen permeability as compared to casted films formulated with non-encapsulated eugenol. The addition of eugenol microencapsulated with OA promoted the preservation of the antioxidant activity of the films, especially in less polar food simulants. To validate the functional activity of these films, a practical application of the active films to preserve sunflower oil was carried out. S-EOA-LE films were effective in preventing sunflower oil oxidation during 53 days of storage at 30°C, maintaining low and almost constant values of peroxide index, conjugated dienes and trienes.

RESUMEN

Actualmente existe un gran interés en desarrollar materiales de envases activos biodegradables para poder alargar así la vida útil de los alimentos y reducir los residuos procedentes de plásticos sintéticos.

En la presente Tesis Doctoral, se han usado diferentes estrategias para incorporar compuestos activos no volátiles (polifenoles procedentes del extracto acuoso de tomillo) y volátiles (eugenol) en películas biodegradables a base de almidón procedente de diferentes fuentes, quitosano y mezclas quitosano-almidón. Para ello, se evaluó como se vieron afectadas las propiedades funcionales de las películas y las cinéticas de liberación del compuesto activo debido a la incorporación de los polifenoles del tomillo (TE) y del ácido tánico (TA), polifenol utilizado como agente de entrecruzamiento. Además, las propiedades funcionales y cinéticas de liberación de películas de almidón obtenidos por casting o por termoconformado también fueron evaluados en función de la adición de eugenol in forma libre (E) o previamente pre-encapsulado con diferentes materiales (proteína de suero de leche (WP) o lecitinas (LE) junto con maltodextrinas como agente coadyuvante). Los productos microencapsulados en polvo fueron obtenidos por atomización. El efecto de la incorporación de ácido oleico (OA) en los encapsulados, como soporte para el eugenol, y quitosano (CH), como estabilizador potencial de las capsulas también fue estudiado. Las diferentes formulaciones fueron caracterizadas antes y después del secado en términos de eficiencia de encapsulación, estabilidad térmica, cinéticas de liberación y capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Los resultados mostraron que el extracto de tomillo (TE) confirió a las películas de almidón de guisante y quitosano actividad de antioxidante. Los polifenoles (TE y TA) interaccionaron con las cadenas de CH y actuaron como agentes de entrecruzamiento, mejorando el comportamiento mecánico de las películas y reduciendo la velocidad de liberación y la cantidad de polifenol liberado de las películas en agua y en di soluciones acuosas de etanol. El efecto opuesto fue observado cuando el TE fue incorporado en la matriz de S pura. Todas las películas fueron más oscuras, más rojizas y menos transparentes cuando el TE fue incorporado, y este efecto fue más marcado en las matrices de S puro, lo que sugiere que los compuestos de TE fueron escasamente encapsulados. Así, las películas S:TE mostraron la liberación más rápida y la mayor proporción de TE liberado.

ue observó Una buena eficacia de encapsulación (EE) en los polvos sin CH (el 87-98 %). Sin embargo, el empleo de CH provocó una marcada disminución de la EE tanto en los polvos formulados con WP como en polvos de LE (22 % y 46 %, respectivamente). Las formulaciones mostraron un comportamiento similar en cuanto a la liberación de E en simulantes alimentarios de diferente polaridad, donde prácticamente el contenido de E total fue liberado a una velocidad similar. Todas las muestras presentaron diferente

grado de actividad antioxidante y antimicrobiana, según el contenido de E del polvo. El efecto antibacteriano de polvos sin CH contra *E. coli* fue también coherente con su contenido de eugenol, al igual que la brusca liberación de E al medio de cultivo, que excedió la Concentración Mínima Inhibitoria de esta bacteria con 15 mg polvo/mL para el polvo sin OA. Un efecto adicional positivo de OA se detectó con respecto a la actividad antilisteria de este polvo, que dio lugar a una actividad antibacteriana similar en polvos con y sin OA (con diferente carga de E).

El proceso de moldeo por termocompresión de las películas provocó importantes pérdidas de E (80-65%), que se minimizaron cuando se utilizó OA en las microcápsulas (EOA-WP o EOA-LE). En las películas con E no encapsulado, se promovió la retención de E debido a la formación de complejos almidón-E. La presencia de eugenol microencapsulado aumentó la presencia de discontinuidades en la matriz polimérica, produciendo películas que eran mecánicamente menos resistentes y elásticas, a excepción de las películas E-LE-S, que se volvieron más resistentes a la rotura. Las propiedades barrera se mejoraron al agregar microencapsulados a las películas, a excepción de las microcápsulas con OA, debido a la presencia de grandes discontinuidades y vacíos llenos de OA. La liberación de eugenol de las películas se vio afectada por la microcápsula, su composición y el simulante alimentario. Así, el proceso de encapsulación promovió una liberación de E más rápida y una mayor cantidad de E liberado en el equilibrio, especialmente para las microcápsulas más solubles en agua (E-WP-S) y en ácido acético, en coherencia con la hidrólisis de la matriz de almidón en medio ácido.

En la película de almidón obtenida por *casting*, la adición de polvo de eugenol microencapsulado en las dispersiones formadoras de película modificó la microestructura de las películas, que fueron menos resistentes y menos elásticas con un contenido reducido de humedad, y una menor transparencia y permeabilidad al oxígeno en comparación con las películas formuladas con eugenol no encapsulado. La adición de eugenol microencapsulado con OA promovió la actividad antioxidante de las películas, especialmente en los simulantes alimenticios menos polares. Para validar la actividad funcional de estas películas, se llevó a cabo una aplicación práctica de las películas activas para la conservación de aceite de girasol. Las películas S-EOA-LE fueron efectivas para prevenir la oxidación del aceite de girasol durante 53 días de almacenamiento a 30 °C, manteniendo valores bajos y casi constantes de índice de peróxidos, dienos conjugados y trienos.

RESUM

Actualment existeix un gran interès a desenvolupar materials d'envasos actius biodegradables per a poder allargar així la vida útil dels aliments i reduir els residus procedents de plàstics sintètics.

En la present Tesi Doctoral, s'han usat diferents estratègies per a incorporar compostos actius no volàtils (polifenols procedents de l'extracte aquós de timó) i volàtils (eugenol) en pel·lícules biodegradables de midó procedent de diferents fonts, quitosano i mescles quitosano-midó. Per a açò, es va avaluar com es van veure afectades les propietats funcionals de les pel·lícules i les cinètiques d'alliberament del compost actiu a causa de la incorporació dels polifenols del timó (TE) i de l'àcid tànic (TA), polifenol utilitzat com a agent d'entrecreuament. A més, les propietats funcionals i cinètiques d'alliberament de pel·lícules de midó obtinguts per càsting o per termoconformació també van ser avaluats en funció de l'addició d'eugenol in forma lliure (I) o prèviament pre-encapsulat amb diferents materials (proteïna de sèrum de llet (WP) o lecitines (LE juntament amb maltodextrines com a agent coadjuvant). Els productes microencapsulats en pols van ser obtinguts per atomització. L'efecte de la incorporació d'àcid oleic (OA) en els encapsulats, com a suport per a l'eugenol, i quitosano (CH), com a estabilitzador potencial de les càpsules també va ser estudiat. Les diferents formulacions van ser caracteritzades abans i després de l'assecat en termes d'eficiència d'encapsulació, estabilitat tèrmica, cinètiques d'alliberament i capacitat antioxidant i antimicrobiana.

Els resultats van mostrar que l'extracte de timó va conferir a les pel·lícules de midó de pèsol i quitosano activitat d'antioxidant. Els polifenols (TE i TA) van interaccionar amb les cadenes de CH i van actuar com a agents d'entrecreuament, millorant el comportament mecànic de les pel·lícules i reduint la velocitat d'alliberament i la quantitat de polifenol alliberat de les pel·lícules en aigua i dissolucions aquoses d'etanol. L'efecte oposat va ser observat quan TE va ser incorporat en la matriu de S pura. Totes les pel·lícules van ser més fosques, més vermelloses i menys transparents quan TE va ser incorporat, i aquest efecte va ser més marcat en les matrius de S pur, la qual cosa suggereix que els compostos de TE van anar escassament encapsulats. Així, les pel·lícules S:TE van mostrar l'alliberament més ràpid i la major proporció de TE alliberat.

Es va observar una bona eficàcia d'encapsulació (EE) en les pols sense CH (el 87-98 %). No obstant açò, l'ocupació de CH va provocar una marcada disminució de la EE tant en les pols formulades amb WP com en pols de LE (22 % i 46 %, respectivament). Les formulacions van mostrar un comportament similar quant a l'alliberament d'eugenol en simulants alimentaris de diferent polaritat, on pràcticament el contingut d'eugenol total va ser alliberat a una velocitat similar. Totes les mostres van presentar diferent grau d'activitat antioxidant i antimicrobiana, segons el contingut de E de la pols. L'efecte antibacterià de les pols sense CH contra *E. coli* va ser també coherent amb el seu

contingut d'eugenol, igual que el brusc alliberament d'eugenol al medi de cultiu, que va excedir la Concentració Mínima Inhibitòria d'aquest bacteri amb 15 mg pols/ml per a la pols sense OA. Un efecte addicional positiu de OA es va detectar pel que fa a l'activitat antilisteria d'aquesta pols, que va donar lloc a una activitat antibacteriana similar en pólvores amb i sense OA (amb diferent càrrega d'eugenol).

El procés de modelat per termocompressió de les pel·lícules va provocar importants pèrdues d'eugenol (80-65%), que es van minimitzar quan es va utilitzar OA en les microcàpsules (EOA-WP o EOA-LE). En les pel·lícules amb E no encapsulat, es va promoure la retenció d'eugenol a causa de la formació de complexos midó-E. La presència d'eugenol microencapsulat va augmentar la presència de discontinuïtats en la matriu polimèrica, produint pel·lícules que eren mecànicament menys resistents i elàstiques, a excepció de les pel·lícules E-LE-S, que es van tornar més resistents al trencament. Les propietats barrera es van millorar en agregar microencapsulats a les pel·lícules, a excepció de les microcàpsules amb OA, a causa de la presència de grans discontinuïtats i buits plens de OA. L'alliberament de eugenol de les pel·lícules es va veure afectada per la microcàpsula, la seua composició i el simulant alimentari. Així, el procés d'encapsulació va promoure un alliberament d'eugenol més ràpid i una major quantitat d'eugenol alliberat en l'equilibri, especialment per a les microcàpsules més solubles en aigua (E-WP-S) i en àcid acètic, en coherència amb la hidròlisi de la matriu de midó al medi àcid.

En la pel·lícula de midó obtinguda per *casting*, l'addició de pols de eugenol microencapsulat en les dispersions formadores de pel·lícula va modificar la microestructura de les pel·lícules, que van ser menys resistents i menys elàstiques amb un contingut reduït d'humitat, i una menor transparència i permeabilitat a l'oxigen en comparació de les pel·lícules formulades amb eugenol no encapsulat. L'addició de eugenol microencapsulat amb OA va promoure l'activitat antioxidant de les pel·lícules, especialment en els simulants alimentosos menys polars. Per a validar l'activitat funcional d'aquestes pel·lícules, es va dur a terme una aplicació pràctica de les pel·lícules actives per a la conservació d'oli de girasol. Les pel·lícules S-EOA-LE van ser efectives per a prevenir l'oxidació de l'oli de girasol durant 53 dies d'emmagatzematge a 30 °C, mantenint valors baixos i quasi constants d'índex de peròxids, dienos conjugats i trienols.