

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

**Encapsulación de Carvacrol en matrices de Poli(vinil) alcohol (PVA),
mediante *electrospinning***

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso 2017-2018

Autor:

Miriam Durá Romero

Tutor:

Amparo Chiralt

Co-tutor experimental:

Alina Tampau



Valencia, 14 de junio de 2018

RESUMEN

El Carvacrol (CA) presenta propiedades antioxidantes y antimicrobianas y tiene potencial para ser incorporado en matrices biopoliméricas para la obtención de materiales activos biodegradables. Para su incorporación, se requiere la obtención de una emulsión del compuesto en la disolución del polímero y la posterior eliminación del solvente, por el método de extensión en placa y secado (casting) obteniendo un film o mediante la técnica de electrospinning (ES), obteniendo una matriz de fibras o partículas de tamaño nano o micrométrico, que pueden depositarse sobre un film soporte. En este estudio se ha evaluado la encapsulación de CA en matrices de Poli(vinil) alcohol (PVA) mediante la técnica de ES, en comparación con el casting, utilizando o no Tween 85 (T85) como compuesto emulsionante. Se ha determinado la concentración óptima de polímero en la disolución acuosa, así como la relación CA:PVA, que permiten un adecuado electro-estirado de las fibras en el equipo de ES. Se identificó una concentración de PVA del 15% (p/p), con 15% de CA respecto al polímero, como concentraciones aptas para el buen funcionamiento del proceso. Así, se obtuvieron 3 formulaciones de fibras: un blanco con solo PVA, PVA con CA y PVA con CA y T85. Las emulsiones fueron electrodepositadas por ES, y también se sometieron, para comparación, a un proceso de casting en placa de teflón. Las emulsiones se caracterizaron en cuanto a su tamaño de partícula, tensión superficial, conductividad y potencial ζ . La adición del tensoactivo supuso el descenso esperado de la tensión superficial, mientras que no afectó notablemente a la conductividad. A pesar de que el potencial ζ determinado para las emulsiones fue muy bajo para su estabilización por carga, se mantuvieron estables por efecto viscoso, debido a la alta viscosidad presentada por las formulaciones y por interacciones específicas con las cadenas de PVA. Las emulsiones presentaron una distribución de tamaño de partículas en el rango sub-micro y micrométrico, siendo menores en presencia de T85.

El material seco obtenido por ES y casting se analizó en cuanto a su eficiencia encapsulante (EE), mediante extracción del activo con etanol absoluto, su microestructura por FESEM y su comportamiento termogravimétrico (TGA) entre 250 a 700 °C. La EE obtenida por los dos métodos demostró una buena retención del activo (70-83%), sin que la presencia del tensoactivo mejorara notablemente este parámetro. El análisis termogravimétrico reveló la existencia de una fracción del CA fuertemente retenido y otra termo-liberable, independientemente del método de encapsulación. La electrodeposición de las emulsiones conllevó una menor temperatura de degradación del polímero que el proceso de casting. En base a los resultados obtenidos, es posible obtener fibras de PVA con CA encapsulado con buena eficacia encapsulante que pueden utilizarse para el recubrimiento de materiales de envase, confiriéndoles capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Palabras clave: Encapsulación, poli(vinil) alcohol, Carvacrol, Electrospinning, casting, eficiencia encapsulante, termo-liberación.

ABSTRACT

Carvacrol (CA) has antioxidant and antimicrobial properties and it shows potential to be incorporated into biopolymeric matrices to obtain biodegradable active materials. For its incorporation, the preparation of an emulsion of the compound in the polymer solution and the subsequent elimination of the solvent are required and this is achieved by the extension-and-drying method (casting) or by the electrospinning (ES) technique, obtaining a matrix of fibres or particles of nano or micrometric size, which can be deposited on a supporting film. In the present study, the encapsulation of CA in Poly(vinyl) alcohol (PVA) was evaluated by means of the ES technique, in comparison with the casting, using or not Tween 85 (T85) as an emulsifier compound. The optimum polymer concentration in the aqueous solution has been determined, as well as the CA:PVA ratio, which allows a suitable electro-stretching of the fibres in the ES apparatus. A concentration of 15% of PVA (w/w) with 15% of CA with respect to the polymer were identified as appropriate concentrations for the proper development of the process. Thus, 3 formulations were obtained: a blank with only PVA, PVA with CA and PVA with CA and T85. The emulsions were electrodeposited by ES, and were also compared with a Teflon plate casting process. Emulsions were characterized in terms of their particle size, surface tension, conductivity and ζ potential. The addition of the surfactant caused the expected decrease in surface tension, while not significantly affected the conductivity. Although the ζ potential for the emulsions was very low for their charge stabilization, they remained stable by viscous effect due to the high viscosity shown by the formulations and specific interactions with the PVA chains. The emulsions presented a particle size distribution in the sub-micro and micrometric range, being lower in the presence of T85.

The dry material obtained by ES and casting was analysed in terms of its encapsulating efficiency (EE), by extraction of the active with absolute ethanol, its microstructure by FESEM and its thermogravimetric behaviour (TGA) between 250 to 700 °C. The EE obtained by both methods showed a good retention of the active (70-83%) but the presence of the surfactant didn't improve remarkably this parameter. The thermogravimetric analysis revealed the existence of one part of the CA strongly retained to the matrix and another thermo-releasable, independent of the encapsulation method. The electrodeposition of the emulsions entailed a lower polymer degradation temperature than the casting process. Based on the results, it is possible to obtain

PVA fibres with encapsulated CA with good encapsulating efficiency that could be used for the coating of packaging materials, conferring them antioxidant and antimicrobial capacity.

Keywords: Encapsulation, poly(vinyl) alcohol, Carvacrol, Electrospinning, casting, encapsulating efficiency, thermo-release.

AGRADECIMIENTOS

Tras un intenso periodo de aprendizaje, tanto en el campo científico como a nivel personal, me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado a desarrollar satisfactoriamente este proyecto.

A mi tutora, Amparo Chiralt, por hacer posible la realización de mi estudio incorporándome en su equipo de trabajo y ayudándome en todo lo que he necesitado.

A mi co-tutora, Alina Tampau, quien ha estado acompañándome en todo momento durante el desarrollo de mi proyecto, gracias por su paciencia y dedicación.

Por último, a mis padres, mi hermano y mi familia, por sus consejos, su comprensión y por apoyarme en todo lo que me he propuesto y durante toda mi trayectoria académica.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	OBJETIVOS.....	4
2.1.	Objetivo general.....	4
2.2.	Objetivos específicos.....	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3.1.	Materiales y reactivos.....	5
3.2.	Preparación de las dispersiones y obtención del material encapsulante.....	5
3.2.1.	Obtención del material encapsulante por <i>electrospinning</i>	7
3.2.2.	Obtención del material encapsulante por el método tradicional: <i>Casting</i>	8
3.3.	Caracterización de las emulsiones.....	8
3.3.1.	Potencial ζ y tamaño de partícula.....	8
3.3.2.	Conductividad y Tensión superficial (TS).....	9
3.4.	Caracterización del material encapsulante.....	9
3.4.1.	Cuantificación de la retención de Carvacrol.....	9
3.4.2.	FESEM.....	10
3.4.3.	Análisis termogravimétrico.....	11
3.4.4.	Análisis estadístico.....	11
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1.	Comportamiento de las diferentes disoluciones/emulsiones en el equipo de ES.....	11
4.2.	Caracterización de las emulsiones seleccionadas.....	12
4.2.1.	Potencial ζ y tamaño de partícula.....	12
4.2.2.	Conductividad y tensión superficial.....	14
4.3.	Caracterización del material encapsulado.....	15
4.3.1.	Retención del activo.....	15
4.3.2.	FESEM.....	16

4.3.3. TGA	17
4. CONCLUSIONES	20
5. BIBLIOGRAFÍA	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de producción de PVA (Thong et al., 2016)	2
Figura 2. Estructura del Carvacrol	3
Figura 3. Imagen demostrativa de los componentes que constituyen el equipo de <i>electrospinning</i>	4
Figura 4. Dispersiones en proceso de desaireado a temperatura ambiente durante 24h. A y B: emulsiones recién homogeneizadas con Ultraturrax. C y D: emulsiones tras desaireado durante 24h.....	7
Figura 5. Placas de teflón con el material encapsulante en proceso de secado durante 48h.....	8
Figura 6. Muestras en proceso de extracción sobre placa agitadora.	9
Figura 7. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM). Marca <i>Zeiss</i> , fabricante <i>Zeiss Oxford Instruments</i>	10
Figura 8. Esquema de la ionización del grupo acetato presente en la cadena de PVA (Wiśniewska <i>et al.</i> , 2016).	13
Figura 9. Distribución de tamaño de las partículas presente en las formulaciones en fase líquida.	14
Figura 10. Micrografías FESEM del material encapsulante.....	17
Figura 11. Termogramas TGA del material obtenido por <i>casting</i> y por ES y de los diferentes compuestos puros.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones ensayadas indicando la cantidad de polímero, Carvacrol y tensoactivo presente en cada formulación y su nomenclatura.	6
Tabla 2. Parámetros del proceso (Caudal de líquido, distancia inyector-colector y voltaje) aplicados a las diferentes disoluciones de PVA o emulsiones con CA. La “x” indica la presencia del componente, mientras que “-“ indica la ausencia del mismo.	12
Tabla 3. Potencial ζ (factor de dilución 1:100), conductividad y tensión superficial de las emulsiones. Las diferentes letras (superíndices) diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones.....	13
Tabla 4. Eficiencia encapsulante (EE%) y cantidad de CA retenido por gramo de polímero y de fibra de las películas obtenidas por <i>casting</i> y de las fibras electrodepositadas. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones.....	16
Tabla 5. Temperaturas de degradación o termo-liberación (T_o y T_p) de A) los componentes individuales de las emulsiones y B) de los materiales encapsulados obtenidos por ES y <i>casting</i> junto a la fracción termo-liberable detectada para el CA. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones.....	19

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe, cada vez más, una elevada demanda por parte del consumidor de alimentos seguros exentos de cualquier tipo de contaminación. Una de las opciones que aporta un incremento en la seguridad y calidad alimentaria es la utilización de envases que incorporan materiales con propiedades antimicrobianas como son los envases “inteligentes”, activos y selectivos con el medio y el producto en el que se utilizan (Sánchez-González, 2010; Shemesh *et al.*, 2015).

El sector del envase ha mostrado recientemente una fuerte inclinación por la utilización de materiales biodegradables, impulsando la creación de nuevos films y recubrimientos para la industria alimentaria (Sánchez-González, 2010). Sin embargo, por el momento, la mayoría de los envases destinados a preservar los alimentos son de plásticos sintéticos, confeccionados a partir de polímeros derivados del petróleo, que a pesar de presentar numerosas ventajas, como son su amplia disponibilidad, bajo coste, versatilidad o buen efecto barrera, tienen el inconveniente de no ser biodegradables y causar un efecto desfavorable en el medio ambiente (González y Alvarez-Igarzabal, 2013). Por el contrario, los envases activos biodegradables interactúan con el producto, favoreciendo la permeabilidad controlada de los gases y ejerciendo una acción de protección externa frente a patógenos, oxígeno, humedad, etc., además de prolongar su vida útil evitando las posibles pérdidas en sus propiedades organolépticas (Brody *et al.*, 2001).

El Poli(vinil) alcohol (PVA) es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en diferentes aplicaciones industriales, comerciales, medicinales y alimentarias, obtenido (Figura 1) a partir de un proceso de polimerización del Acetato de vinilo seguido de la hidrólisis de los grupos acetato (Thong *et al.*, 2016). Se trata de un polímero soluble en agua, totalmente biodegradable, inodoro y transparente que presenta buenas propiedades mecánicas, resistencia química y biocompatibilidad. La utilización del PVA como matriz polimérica podrá facilitar la posterior incorporación del compuesto activo (Yang *et al.*, 2015).

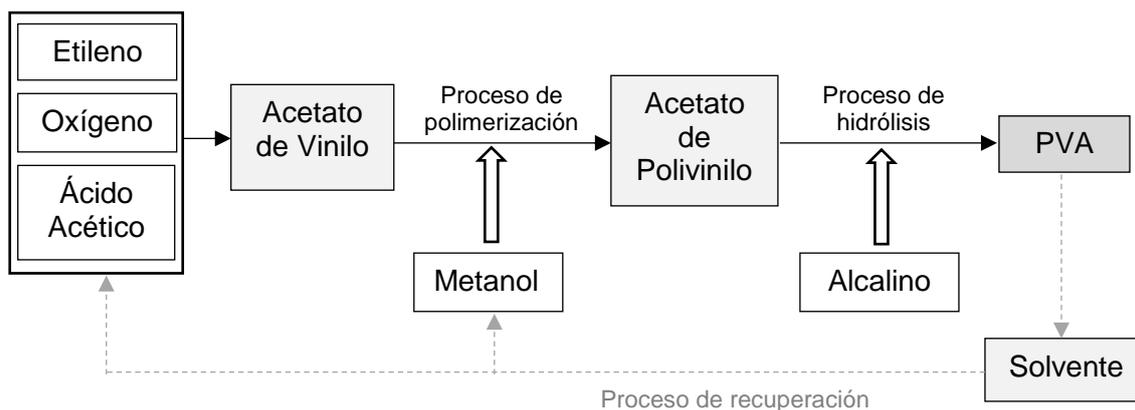


Figura 1. Esquema de producción de PVA (Thong et al., 2016)

Por otro lado, con la intención de reemplazar los aditivos químicos en las industrias alimentarias por compuestos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, se pueden utilizar principios activos procedentes de extractos vegetales, que incorporados a diferentes matrices poliméricas permitan la obtención de films antimicrobianos (Atarés y Chiralt, 2016).

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla compleja de sustancias volátiles y semivolátiles, en su mayoría terpenos, terpenoides y compuestos aromáticos de bajo peso molecular procedentes del metabolismo secundario de las plantas. Los terpenos están formados por varias unidades de carbono (C5), conocidas como isopreno. Los terpenoides son terpenos que contienen oxígeno en su composición. Los compuestos aromáticos son derivados de diversos fenilpropanos. Todos ellos se obtienen mediante destilación de diferentes partes de especies vegetales para la elaboración de los aceites esenciales. Sus principales aplicaciones recaen en campos como la perfumería y aromaterapia, fitosanitarios alternativos, en productos farmacéuticos o como aditivos alimentarios naturales. El empleo de los AE en la alimentación se ha visto favorecido además de por presentar propiedades antibacterianas, antivíricas, antiparasitarias y antimicóticas, por ser reconocidos por la *Administración de Alimentos y Medicamentos* (FDA) como compuestos seguros (GRAS) para su utilización en la industria alimentaria (Burt, 2004; Llorens-Molina, 2009; Atarés y Chiralt, 2016). Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas antimicrobianas que poseen, su elevado coste, intenso aroma o potencial toxicidad limita su uso en la conservación de alimentos.

El Carvacrol (CA) (Figura 2) es un fenol monoterpenoide presente en el aceite esencial del orégano que, actuando solo o junto con otros compuestos orgánicos, presenta un control efectivo sobre el crecimiento microbiano y bacteriano en alimentos. Es considerado por tanto, buen conservante en una amplia variedad de productos alimenticios (Suntres et al., 2015),

aunque su aplicación directa sobre los alimentos puede estar limitada por su fuerte sabor, alta volatilidad o reactividad con algunos de los componentes alimentarios que podrían provocar variaciones organolépticas en los mismos (López-Mata *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015; Atarés y Chiralt, 2016)

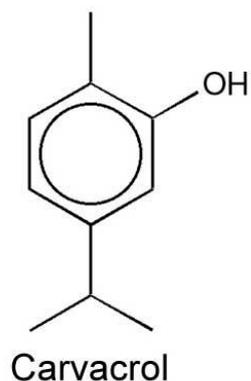


Figura 2. Estructura del Carvacrol

Frente a la problemática presentada por las limitaciones del CA, además de la baja solubilidad en agua o toxicidad a elevadas dosis, se plantea su encapsulación de los materiales bioactivos en películas que mantengan su efectividad, mejoren la estabilidad y faciliten la liberación controlada al alimento (Wen *et al.*, 2016)

Uno de los métodos de encapsulación más efectivo es la técnica de *electrospinning* (ES). En los últimos años, la técnica de ES ha sido utilizada en diversos campos relacionados con la medicina (tejidos y apósitos para heridas) (Hamori *et al.*, 2014; Sill and von Recum, 2008; Wade and Burdick, 2014) y materiales de electrodo (Wen *et al.*, 2016). No obstante, en el campo de los envases alimentarios se podría considerar una nueva tecnología. El equipo consta de un inyector (aguja conductora eléctrica), un colector y una fuente de alimentación responsable de generar el voltaje, como se puede observar en la Figura 3. La solución polimérica es introducida en el inyector donde, al aumentar la intensidad del campo eléctrico, la gota que se encuentra en el extremo de la aguja se alarga formando una estructura en forma de cono, conocida como cono de Taylor. Cuando las fuerzas eléctricas repulsivas generadas en el seno de la solución exceden las fuerzas de tensión superficial de la misma, ésta es expulsada desde la punta del cono de Taylor hasta el colector, sobre cual se deposita el material seco (Tampau *et al.*, 2017).

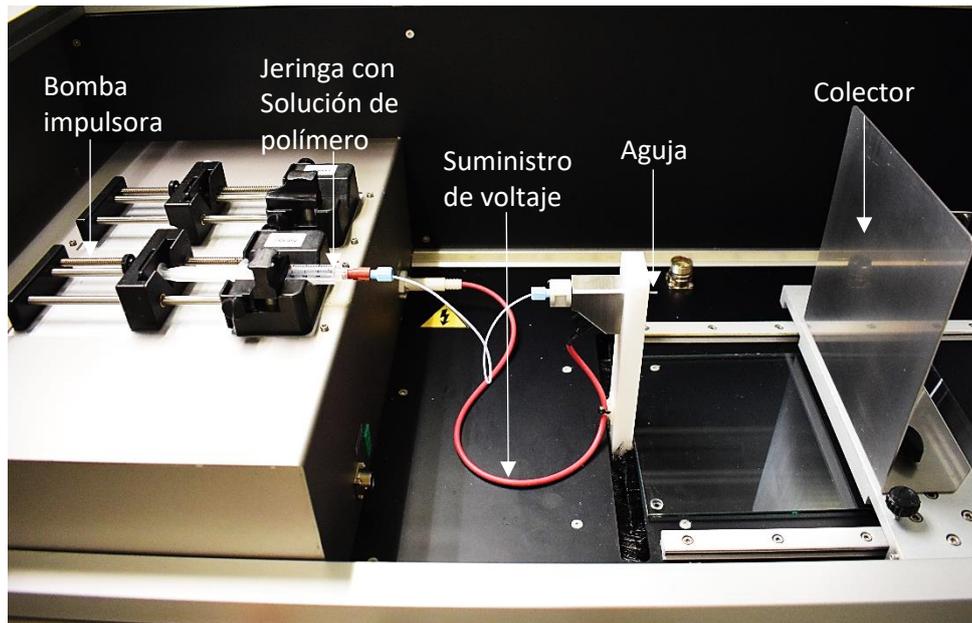


Figura 3. Imagen demostrativa de los componentes que constituyen el equipo de *electrospinning*.

De esta forma, la técnica permite obtener membranas de fibras mediante el electroestiramiento de la solución o emulsión bajo la influencia del campo eléctrico, que acelera el chorro de líquido emergente del inyector hacia el colector (Quinn *et al.*, 2018). Las fibras obtenidas poseen una gran área superficial en la que se favorece la liberación del agente activo hasta el punto diana. Además, para dicha técnica los polímeros biodegradables, respetuosos con el medio ambiente, son preferibles en comparación con los obtenidos a partir de petróleo, por lo que la elección del PVA se ajustaría a los requisitos de la técnica (Wen *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El trabajo desarrollado tiene como principal objetivo incorporar el compuesto activo Carvacrol (CA), en la matriz del polímero Poli(vinil) alcohol (PVA) para formar films con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, con la consiguiente cuantificación del activo retenido y comparación del método de encapsulación por *electrospinning* con el tradicional de extensión y secado (*casting*) de la disolución polimérica con el activo emulsionado.

2.2. Objetivos específicos

Con el fin de alcanzar el objetivo general marcado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Cribado inicial para determinar la máxima concentración de PVA que permite el electro-estirado efectivo de la misma, con y sin Carvacrol, empleando o no un tensoactivo para la compatibilización de los compuestos.
- Caracterización de las emulsiones obtenidas y del material electrospunado.
- Análisis de la eficiencia encapsulante de CA del material obtenido por ES y comparación con la obtenida en films por *casting*.
- Evaluación de la función del tensoactivo en la mejora de la retención del CA en los diferentes sistemas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos

Para la obtención del material encapsulante se utilizaron los siguientes materiales: el PVA (Mr: 13000-23000, grado de hidrólisis: 87-89 %) empleado como matriz polimérica, el Carvacrol (CA) (pureza ≥ 98) como aditivo activo procedente del aceite esencial de orégano y el tensoactivo Tween 85; todos ellos suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). El etanol absoluto (apto para UV/HPLC) utilizado para el proceso cuantificación del CA retenido y el Pentóxido de fósforo (P_2O_5) fueron adquiridos de Panreac (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès (Barcelona), España). El agua purificada (con una resistividad de 18.2 M Ω ·cm) fue obtenida con el equipo Milli-Q Advantage A10 de Millipore (Millipore S.A.S., Molsheim, Francia).

3.2. Preparación de las dispersiones y obtención del material encapsulante

Para la obtención de las dispersiones, inicialmente se realizó un cribado de 4 concentraciones distintas de polímero. A medida que aumenta la concentración de polímero, la dispersión posee más viscosidad, pero permite un mayor rendimiento de la operación (mayor cantidad de fibra depositada por unidad de tiempo), con efecto también sobre la capacidad de retención de CA. De esta forma, el objetivo fue encontrar la máxima concentración de polímero posible que permitiera el proceso de electro-estirado con el compuesto activo incorporado. Las formulaciones se diseñaron variando la concentración de polímero entre 5 y 20% (p/p). De esta manera, se obtuvieron las siguientes concentraciones de PVA: 5%, 12,5%, 15% y 20% (p/p). Para cada concentración de polímero se prepararon las emulsiones, con y sin tensoactivo y en todas

ellas se incorporó CA al 15% respecto al polímero, en base a estudios previos (Tampau *et al.*, 2017). Para el cálculo de la cantidad de T85 añadido, se tomó en consideración el diámetro promedio (d) de las gotas, previamente determinado, y se calculó su superficie específica ($Se=6/d$), m^2/m^3). En base a esta y considerando una concentración de exceso superficial del T85 de ($5 \text{ mg}/m^2$), se obtuvo una proporción T85:CA = 0,106 (%). Para asegurar que todas las gotas de CA se quedaban recubiertas por el tensoactivo, en las formulaciones se añadió el triple de este valor estimado (0,00318 g T85/g CA).

Se partió de una solución madre de PVA de 30 partes por cien (30 p.p.c), preparada con 30 g de polímero al que se adicionaron 100 ml de agua Milli-Q, que agitó con un agitador magnético durante 3h, bajo calentamiento (80°C), hasta su completa disolución. Posteriormente, se llevó a cabo la dilución correspondiente para la preparación de las dispersiones mostradas en la Tabla 1. Las formulaciones obtenidas fueron codificadas con la siguiente nomenclatura $P_iA_jT_k$, donde P_i representa al polímero a la concentración i , A_j el carvacrol a la concentración j con respecto al polímero, y T_k el tensoactivo, con $k=0$ si la formulación no lleva Tween 85 y $k=1$ si se encuentra presente).

Tabla 1. Formulaciones ensayadas indicando la cantidad de polímero, Carvacrol y tensoactivo presente en cada formulación y su nomenclatura.

Formulación	PVA (g)	CA (g)	Tween 85 (mg)
$P_5A_{15}T_1$	5	0,75	2,4
$P_5A_{15}T_0$	5	0,75	0
$P_{12,5}A_{15}T_1$	12,5	1,88	6,0
$P_{12,5}A_{15}T_0$	12,5	1,88	0
$P_{15}A_{15}T_1$	15	2,25	7,2
$P_{15}A_{15}T_0$	15	2,25	0
$P_{20}A_{15}T_1$	20	3,00	9,54
$P_{20}A_{15}T_0$	20	3,00	0

Una vez añadidos los componentes correspondientes a cada una de las dispersiones se homogeneizaron individualmente durante 3 minutos a 12000 rpm utilizando un homogeneizador Ultraturrax (Blue Line Model DI 25 basic, IKA, Staufen, Alemania). Todas las dispersiones se dejaron en reposo durante 24h a temperatura ambiente para su desaireado natural, como se observa en la Figura 4, y posteriormente se desgasificaron antes de su uso en

un desecador de vidrio conectado a una bomba a vacío (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania).

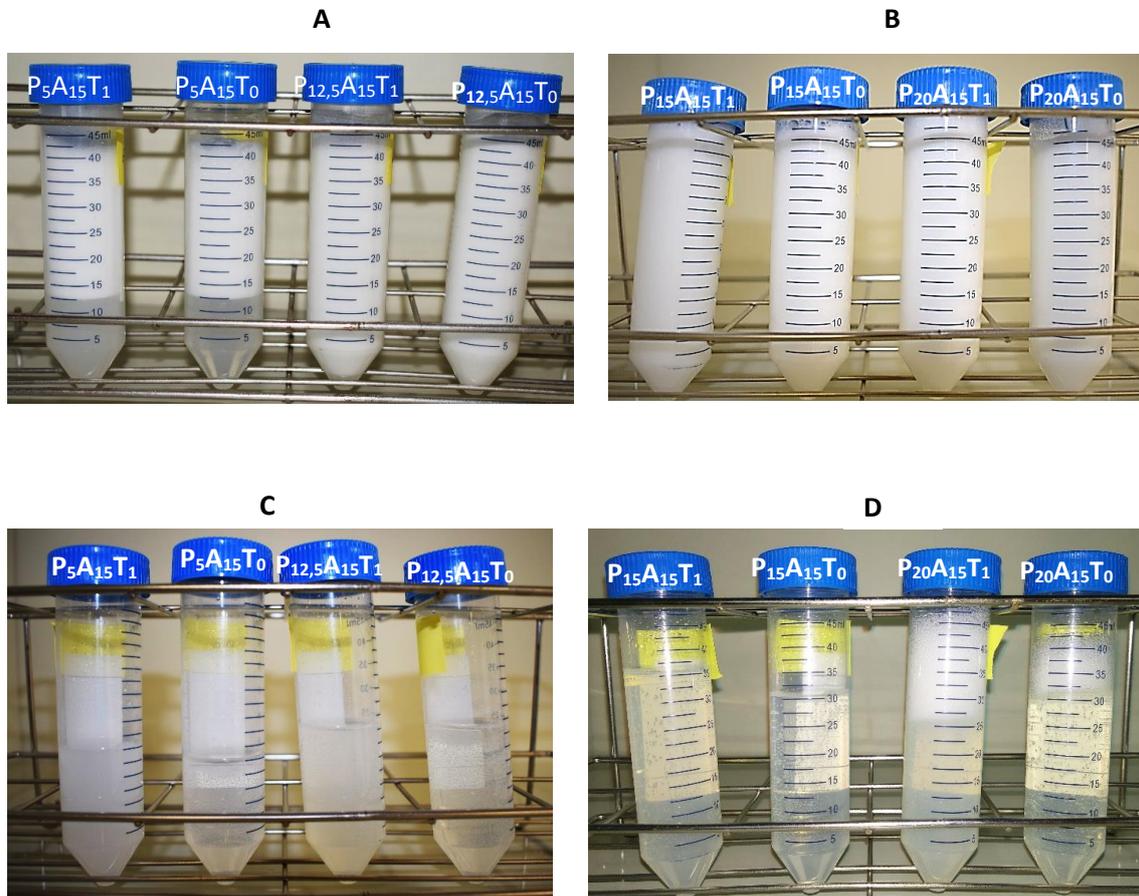


Figura 4. Dispersiones en proceso de desaireado a temperatura ambiente durante 24h. A y B: emulsiones recién homogeneizadas con Ultraturrax. C y D: emulsiones tras desaireado durante 24h.

3.2.1. Obtención del material encapsulante por *electrospinning*

Cada una de las dispersiones acuosas preparadas fueron electrospunadas bajo condiciones ambientales (25 °C y 45% HR) utilizando el equipo Fluidnatek de BioInicia S.L. (Valencia, España) (Figura 3). Durante el proceso, el flujo del líquido, el voltaje y la distancia inyector-colector fueron establecidos empíricamente. Cada muestra se introdujo en una jeringa Luer Lok (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU) de plástico de 5 ml conectada mediante un tubo de teflón a un inyector metálico provisto con una aguja de acero inoxidable de diámetro interior de 0,6 mm. El inyector se posicionó horizontalmente a una distancia de 15 cm hasta el plato colector, el cual

se recubrió con un folio de aluminio para recoger el polímero electroestirado. Con el fin de conseguir la estabilidad del cono de Taylor el voltaje fue ajustado para cada dispersión.

3.2.2. Obtención del material encapsulante por el método tradicional: *Casting*

Para la obtención de películas por el método tradicional de extensión y secado, comúnmente conocido como *casting*, se utilizaron las mismas dispersiones preparadas, vertiendo una cantidad de emulsión equivalente a 1,5 g PVA/placa. La cantidad necesaria de cada dispersión se vertió en placas de teflón de 150 mm de diámetro y se dejó secar durante 48 h a 25 °C y 45 % de humedad relativa (HR) (Figura 5). Las películas obtenidas se acondicionaron posteriormente a 0% HR en desecadores con Pentóxido de fosforo (P_2O_5) durante una semana.



Figura 5. Placas de teflón con el material encapsulante en proceso de secado durante 48h.

3.3. Caracterización de las emulsiones

3.3.1. Potencial ζ y tamaño de partícula

El potencial ζ de las emulsiones se determinó mediante el equipo Zetasizer Nano-Z (Nano series modelo Zen 2600, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El potencial ζ es una magnitud de medida de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas. Se puede utilizar como un indicador de la estabilización por carga de las emulsiones y se mide a través de la dispersión de la luz, en la emulsión sometida a un campo eléctrico. El software del equipo convierte la movilidad electroforética en potencial ζ , utilizando la ecuación de Smoluchowski. Las muestras fueron diluidas en agua destilada en proporciones 1:25, 1:50 y 1:100 (v/v) y medidas a 25 °C. La medida se realizó por triplicado para cada muestra y dilución.

Por otro lado, el tamaño de partícula se obtuvo con un difractómetro láser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) el cual midió la distribución de los

diferentes tamaños de partículas en las muestras. Una vez preparada la muestra y alcanzado un valor de obscuración de 3% se procedió a su medición, realizando 3 lecturas por formulación.

3.3.2. Conductividad y Tensión superficial (TS)

La conductividad eléctrica de las dispersiones se obtuvo utilizando el instrumento SevenEasy Conductivity de Mettler Toledo (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Se realizaron 10 medidas por cada muestra. La tensión superficial (TS) de los sistemas líquidos se analizó mediante el método de la gota colgante, utilizando el equipo OCA 20 (Dataphysics, Alemania), con el software SCA 20. Este método evalúa la TS analizando la forma de una gota de líquido que se deja formar (sin caer) en el campo visual de la cámara del equipo. Se hicieron 20 medidas por formulación.

3.4. Caracterización del material encapsulante

3.4.1. Cuantificación de la retención de Carvacrol

La cantidad de CA retenida en el material encapsulante obtenido tras su procesado fue determinada por extracción con etanol absoluto, seguida de cuantificación mediante espectrofotometría en ultravioleta, usando un espectrofotómetro Helios Zeta UVeVis (Helios Zeta UVeVis, Thermo Fisher Scientific, United Kingdom). En el caso del material encapsulante obtenido por ES, las muestras se electrodepositaron sobre papel de aluminio previamente pesado y se analizaron en conjunto con este soporte. Las muestras de material se introdujeron en viales de color ámbar junto con 15 mL de etanol absoluto y se mantuvieron en agitación a 300 rpm durante 24 horas (Figura 6).



Figura 6. Muestras en proceso de extracción sobre placa agitadora.

La cantidad de CA de las muestras se cuantificó a 275 nm, utilizando cubetas de cuarzo de 10 mm. Como blanco se utilizó el extracto de la matriz polimérica sin el activo CA. La absorbancia

detectada con el equipo fue convertida a $\mu\text{g CA/mL}$ de extracto, usando una recta de calibrado previamente preparada, con concentraciones de CA entre 4 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (Concentración=66,643xAbsorbancia; $R^2=0,999$). La eficiencia encapsulante se determinó como un porcentaje entre el CA extraído con etanol del material encapsulante y el contenido teórico en CA añadido cuando se prepararon las emulsiones. El ensayo se realizó por triplicado para cada formulación.

3.4.2. FESEM

La superficie y la sección transversal del material obtenido por los dos métodos fueron observadas utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) (Supra 25-Zeiss, Jena, Germany) (Figura 7). Esta técnica utiliza electrones para formar una imagen que refleja las características superficiales del material encapsulante, pudiendo proporcionar información de las estructuras que se generan durante los dos métodos de secado. Esta tecnología trabaja utilizando como fuente de electrones un cañón de emisión de campo que proporcionan haces de electrones de alta y baja energía más focalizados, permitiendo mejorar la resolución espacial, minimizando las cargas aplicadas sobre la muestra y creando así menos daños en esta. Las muestras, previamente mantenidas en atmósfera 0% HR, se colocaron sobre cinta carbónica adhesiva horizontalmente (para observar la superficie) o verticalmente (para evaluar la sección transversal, después de la criofractura previa por inmersión en N_2 líquido). Posteriormente fueron recubiertas con una capa de Platino con el fin de aumentar su conductividad eléctrica, usando un equipo de alto vacío (EM MED020, Leica Microsystems, Alemania). Finalmente, se observaron las muestras bajo un voltaje de 2 kV y se registraron las imágenes.



Figura 7. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM). Marca *Zeiss*, fabricante *Zeiss Oxford Instruments*.

3.4.3. Análisis termogravimétrico

Los datos del análisis termogravimétrico (TGA) se obtuvieron mediante un analizador térmico Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e (Schwarzenbach, Suiza) el cual ofrece información cuantitativa sobre la descomposición térmica de los materiales en un barrido de temperaturas dado. La técnica se basa en el cambio de peso que experimenta una muestra en función del calentamiento que se le aplica y del tiempo. Cada muestra, con un peso máximo de 10 mg, se introdujo en un crisol de alumina (capacidad 70 μ L) previamente tarado en el equipo. El crisol fue calentado gradualmente en una atmósfera de nitrógeno con flujo de 20 ml/min, a una velocidad de 10°C/min desde 25° hasta 700 °C. Las curvas termogravimétricas, que presentan las pérdidas de peso experimentadas por las muestras durante el calentamiento se normalizaron y se obtuvo su primera derivada para obtener los diferentes datos. Los picos observados en las curvas se integraron para obtener la pérdida relativa de peso correspondiente al componente que se está degradando o perdiendo en cada intervalo de temperatura. También se registraron la temperatura inicial de degradación (T_0) a la cual comienza cada etapa de degradación o pérdida de la muestra, y la temperatura de máxima velocidad de degradación (T_p), correspondiente al punto de inflexión de la curva termogravimétrica. Para cada formulación se hicieron 3 mediciones.

3.4.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza simple (ANOVA) empleando el programa Statgraphics Centurion XVI para Windows (Manugistics Corp., Rockville, Md). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comportamiento de las diferentes disoluciones/emulsiones en el equipo de ES

Las emulsiones con las 4 concentraciones de PVA establecidas se dejaron en reposo en tubos para observar su estabilidad con el tiempo (Figura 4). En ninguna de las formulaciones que incorporaban el activo se detectó separación de los componentes. Además, durante este tiempo de reposo, se observó que la espuma generada durante la homogeneización, desapareció después de unas 12 horas. Este comportamiento ayudó al proceso de desgasificación posterior que se aplicó antes de proceder a su uso en el equipo de ES. La Tabla 2 resume las disoluciones/emulsiones probadas, así como los valores de los parámetros de proceso aplicados en el equipo de *electrospinning* para cada formulación y el resultado global obtenido. Únicamente los sistemas con 12,5 y 15 % de PVA fueron electrospunables. De estas

formulaciones que mostraron el mejor comportamiento durante el proceso, se seleccionaron las de 15% (p/p) de polímero para seguir el estudio en base al mayor rendimiento (g material electrospunado por unidad de tiempo) del proceso, en coherencia con la mayor concentración del polímero para un flujo similar de líquido en el inyector.

Tabla 2. Parámetros del proceso (Caudal de líquido, distancia inyector-colector y voltaje) aplicados a las diferentes disoluciones de PVA o emulsiones con CA. La “x” indica la presencia del componente, mientras que “-” indica la ausencia del mismo.

			Rango de valores de los parámetros durante el <i>electrospinning</i>		
PVA (p/p%)	CA	T85	Caudal (μL/h)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)
5,0	x	x	Estas formulaciones no se electrodepositaron.		
5,0	x	-			
12,5	-	-	250	15	18,5-20
12,5	x	x	250-500	15	18-20
12,5	x	-	250-500	15	20-23
15,0	-	-	250-500	15	20-22
15,0	x	x	250-500	15	20-25
15,0	x	-	250-500	15	20-23
20,0	x	x	Estas formulaciones no se pudieron electrodepositar por presentar una alta tensión superficial y viscosidad excesiva, la cual impidió el electroestirado de la disolución. Esta observación fue similar al comportamiento notado por <i>Khajavi y Damerchely, 2007</i> .		
20,0	x	-			

4.2. Caracterización de las emulsiones seleccionadas

4.2.1. Potencial ζ y tamaño de partícula

La Tabla 3 presenta los valores del potencial ζ medido para las formulaciones diluidas en ratio 1:100. El PVA, siendo clasificado como un polímero no-iónico, normalmente no presenta carga. No obstante, debido al grado parcial de hidrolisis en su proceso de fabricación, el PVA utilizado contiene un 11-13% de grupos acetato. En disolución acuosa, los grupos acetato pueden sufrir ionización por el mecanismo descrito por (*Wiśniewska et al., 2016*), cargándose negativamente las cadenas de polímero (Figura 8).

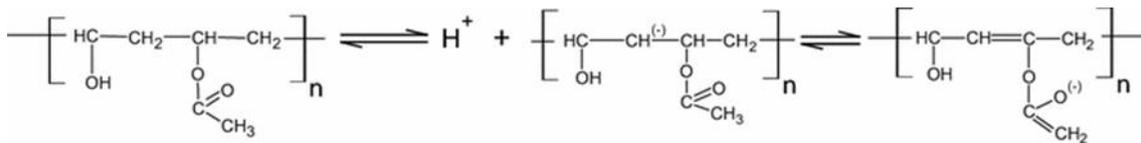


Figura 8. Esquema de la ionización del grupo acetato presente en la cadena de PVA (Wiśniewska *et al.*, 2016).

Se observa que la incorporación de CA reduce el potencial ζ del sistema, lo que refleja interacciones del fenol con la carga negativa del carboxilo (debido al carácter de ácido débil de los fenoles) que reduce carga global. No obstante, cuando el T85 está presente en el medio, esta interacción se debilita al actuar el T85 como emulsionante del fenol, obteniéndose en este caso un mayor valor del potencial ζ , sin diferencias significativas respecto el PVA puro. Aunque con CA los valores del potencial son muy bajos para dar lugar a la estabilización por carga de la emulsión, esta presentó estabilidad, sin separación de fases, lo cual puede atribuirse a las fuertes interacciones ácido-base del carvacrol-PVA. En cuanto al tamaño de partícula (Figura 9), la presencia del tensoactivo (formulación P₁₅A₁₅T₁) generó una distribución monomodal en el rango sub-micrométrico mientras que la formulación con solamente PVA y el activo CA (P₁₅A₁₅T₀) presentó una distribución multimodal, con tamaños de partículas de mayor tamaño, lo que sugiere la formación de agregados micrométricos de las cadenas poliméricas, que podrían estar asociados a las interacciones con el CA, ya que no se dan en presencia de T85, al actuar este compuesto como emulsionante de las gotas de CA, inhibiendo las interacciones con las cadenas poliméricas.

Tabla 3. Potencial ζ (factor de dilución 1:100), conductividad y tensión superficial de las emulsiones. Las diferentes letras (superíndices) diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones.

Formulación	Potencial ζ (mV)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)		Tensión superficial (mN/m)
		Formulaciones sin diluir	Formulaciones diluidas 1:100	
P ₁₅ A ₀ T ₀	-13±3 ^a	1450.0 ± 0.8 ^a	28.9±0.1 ^b	42.2 ± 0.7 ^b
P ₁₅ A ₁₅ T ₀	-7±2 ^b	1448 ± 1 ^a	21.5±0.4 ^a	31.5 ± 0.4 ^a
P ₁₅ A ₁₅ T ₁	-11.6±0.6 ^a	1449 ± 4 ^a	44.5±0.1 ^c	31.3 ± 0.3 ^a

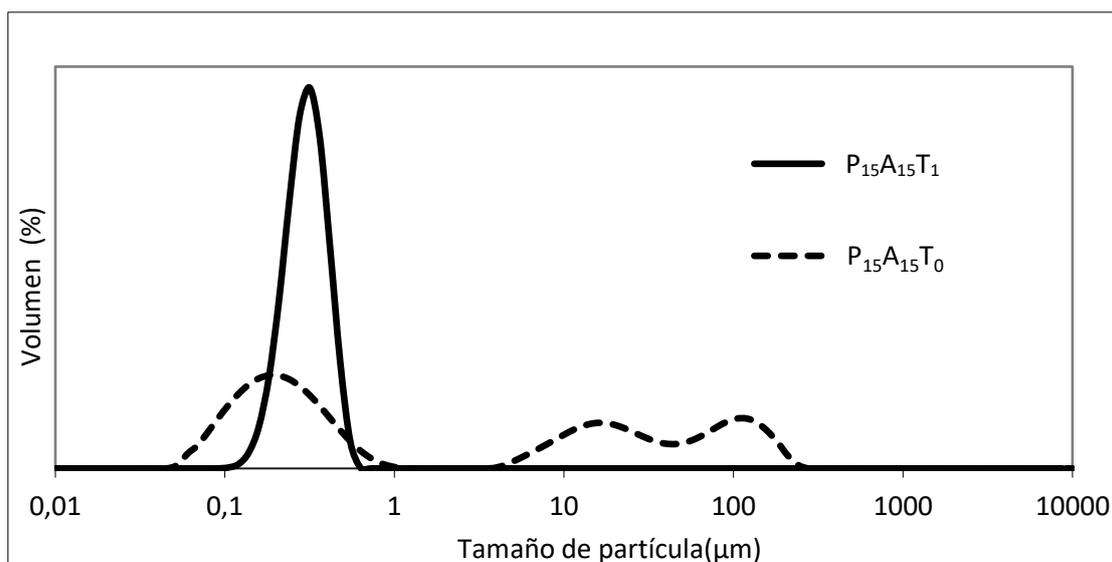


Figura 9. Distribución de tamaño de las partículas presente en las formulaciones en fase líquida.

4.2.2. Conductividad y tensión superficial

Los valores de la conductividad se pueden apreciar en Tabla 3. Las formulaciones analizadas sin dilución (de interés porque es la forma en cual se someten al proceso de electroestirado) no presentan diferencias notables entre ellas; comportamiento esperado ya que la movilidad de las partículas está restringida debido a la alta viscosidad. Sin embargo, el análisis de la conductividad en sistemas diluidos 1:100 revela comportamientos estadísticamente diferentes. La conductividad del sistema PVA con CA es la menor, seguida por la del PVA puro, con mayor carga superficial en ausencia de CA, y aumentando notablemente en presencia de T85. Esto refleja de nuevo las diferentes interacciones carvacrol-PVA en presencia del emulsionante, que conducen a partículas muchas más pequeñas, limitando la agregación de las cadenas, con mayor movilidad y por tanto con mayor conductividad eléctrica. De hecho, la conductividad de la disolución de PVA es mucho más alta que la del solvente (conductividad del agua Milli Q es alrededor de 0.056 $\mu\text{S}/\text{cm}$) y se reduce significativamente con la adición de CA debido a su efecto neutralizante de la carga del PVA y la formación potencial de agregados de cadenas como revela la distribución de tamaños de partícula.

En cuanto a la tensión superficial, la Tabla 3 refleja que los valores de este parámetro son inferiores a los del agua solvente ($72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), lo que demuestra el carácter tensoactivo del PVA, que aumenta en presencia de CA. La incorporación de T85 no modificó significativamente el valor de la tensión superficial respecto al sistema PVA-carvacrol. Normalmente, el electroestiramiento de una disolución ocurre cuando el voltaje aplicado induce en el líquido

fuerzas electrostáticas capaces de vencer a la tensión superficial del mismo. Por esto, es deseable que tensión superficial de la disolución sea lo más baja posible para reducir el voltaje empleado durante el proceso; un voltaje excesivo puede llegar a desestabilizar la electrodeposición. Todas las disoluciones utilizadas presentaron valores relativamente bajos de la tensión superficial, lo cual facilita el proceso de *electrospinning*.

4.3. Caracterización del material encapsulado

4.3.1. Retención del activo

La capacidad de retener el activo fue determinada y los resultados se dan en la Tabla 4. El secado por el método de *casting* genera una buena retención del CA (alrededor del 75%), debido al incremento gradual de la viscosidad del medio con la evaporación progresiva del solvente, lo cual contribuye a la retención del activo en la matriz. Por otro lado, las interacciones descritas entre el carvacrol-PVA ejercerán un efecto positivo en la retención del activo, limitando la evaporación del compuesto por arrastre de vapor durante el secado del film. Este efecto es muy dependiente de la estabilidad de la emulsión; los fenómenos de floculación de gotas y cremado que ocurren durante la etapa de evaporación del solvente, dan lugar a la evaporación por arrastre de vapor de este tipo de compuestos inmiscibles en agua, provocando grandes pérdidas de los mismos durante el secado del film (Perdones *et al.*, 2016). Gracias a las interacciones carvacrol-PVA que promueven la estabilidad de la emulsión, estas pérdidas fueron muy reducidas, dando lugar a una alta eficacia encapsulante. La utilización del tensoactivo no mejoró significativamente la cantidad de CA retenido por la matriz debido a que los requerimientos emulsionantes en la mezcla carvacrol-PVA no parecen limitantes para la estabilidad de la emulsión.

El material obtenido por ES destaca por una alta eficiencia encapsulante, algo superior a la de las películas. Durante el electroestirado, el chorro de líquido se abre en múltiples chorros que aumentan la superficie de contacto con el aire y permite la evaporación rápida del solvente. Como anteriormente ha sido reportado por otros autores (Tampau *et al.*, 2017), durante la electroaplicación en sistemas polares ocurre un efecto de arrastre de vapor del activo durante la evaporación del solvente polar (agua). Sin embargo, los valores de encapsulación alcanzados por las fibras obtenidas incorporando CA en PVA son elevados, incluso superiores a las películas obtenidas por *casting*, lo cual se explica por la fuerte interacción entre el CA y las cadenas del PVA, que permite obtener una muy buena retención del activo. La incorporación de T85, que limita estas interacciones, conlleva menos retención de CA en las fibras.

Tabla 4. Eficiencia encapsulante (EE%) y cantidad de CA retenido por gramo de polímero y de fibra de las películas obtenidas por *casting* y de las fibras electrodepositadas. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones.

Formulación		EE (%)	g CA/ g PVA	g CA/ g fibra o film
<i>Casting</i>	P ₁₅ A ₁₅ T ₀	75 ± 2 ^a	0.109±0.003 ^a	0.098±0.002 ^a
	P ₁₅ A ₁₅ T ₁	76 ± 3 ^{ab}	0.110±0.004 ^{ab}	0.099±0.003 ^{ab}
<i>Electrospinning</i>	P ₁₅ A ₁₅ T ₀	83 ± 9 ^b	0.12±0.02 ^b	0.11±0.01 ^b
	P ₁₅ A ₁₅ T ₁	77 ± 7 ^{ab}	0.11±0.01 ^{ab}	0.10±0.01 ^{ab}

4.3.2. FESEM

En cuanto al análisis visual de los materiales encapsulantes, se pueden observar en la Figura 10 las micrografías de FESEM obtenidas para ambos tipos de materiales. Se aprecia que la electrodeposición genera fibras con formaciones esféricas. Con el PVA puro, las esferas tienen menor tamaño y las fibras son más continuas que cuando el CA y el tensoactivo están presentes. El material generado por este método presenta una alta superficie específica, que favorecería la liberación del activo para ejercer su actividad antimicrobiana y antioxidante.

Las películas en su sección transversal exhiben en general una estructura homogénea tanto para el PVA puro como para los films con CA, sin apreciarse gotas del activo, lo que revela su buena integración en la matriz a través de las interacciones con las cadenas de PVA. No obstante, en la formulación con T85 las micrografías presentan pequeñas formaciones esféricas, principalmente cerca de la superficie del film, atribuibles a las micelas de T85 con CA que migran básicamente a la superficie del film durante la etapa de secado por la menor densidad de esta fase lipídica.

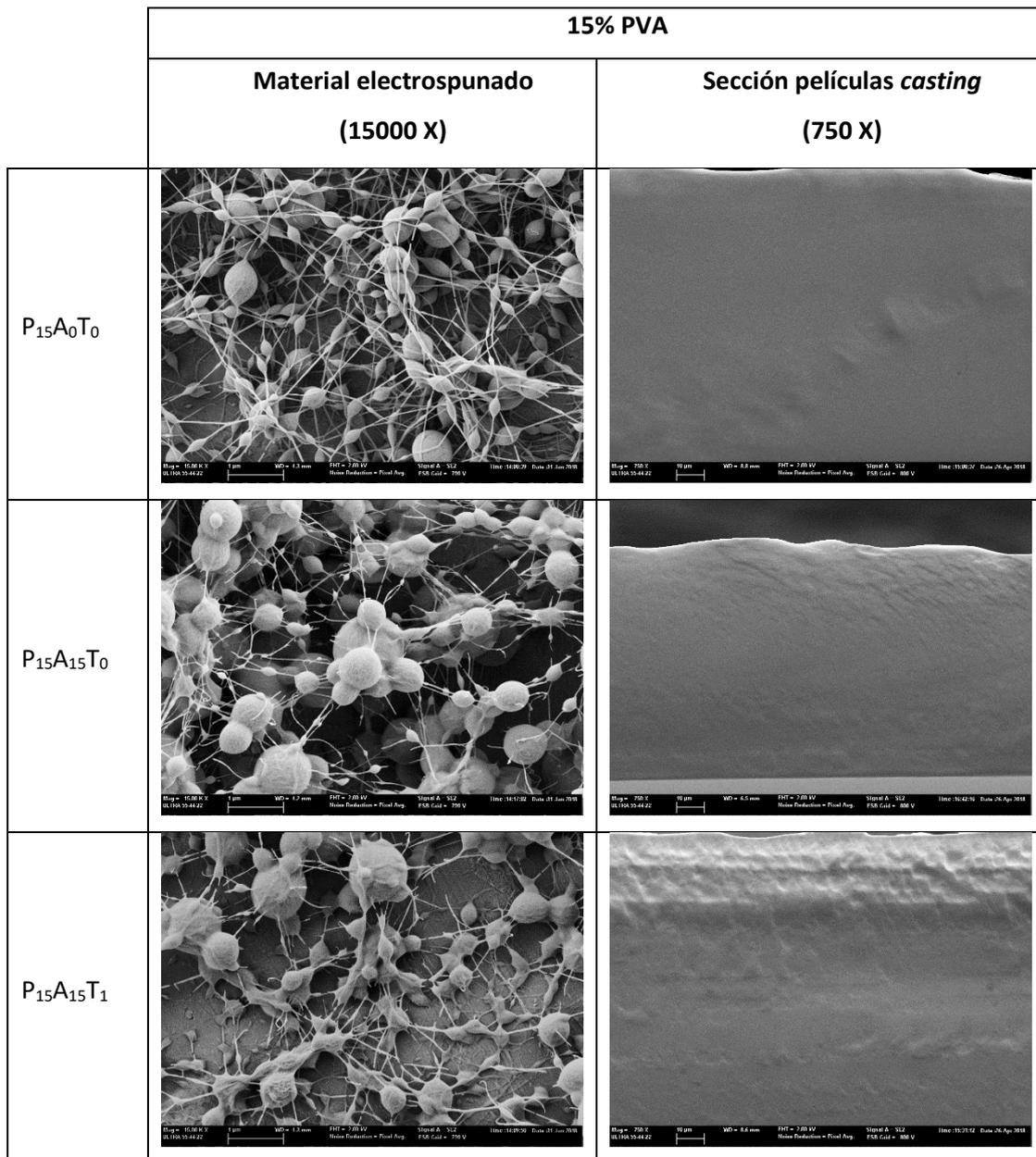


Figura 10. Micrografías FESEM del material encapsulante.

4.3.3. TGA

La figura 11 muestra los termogramas obtenidos para los diferentes materiales obtenidos por *electrospinning* y *casting*, así como para los diferentes compuestos puros para su comparación. Así mismo, en la Tabla 5 se presentan los parámetros obtenidos desde el análisis termogravimétrico (temperatura de inicio (T_0) y de velocidad máxima (T_p) del cambio de masa térmico). Se aprecian ligeras diferencias en el comportamiento térmico del PVA puro en polvo (material de partida), y el obtenido por *casting* o ES. Su temperatura de degradación es superior

en el material en polvo, siendo también más alta en el material obtenido por casting que en el por ES. Estas diferencias son atribuibles al diferente nivel de cristalización del polímero (a mayor cristalinidad, mayor temperatura) lo que indica un mayor grado de cristalización del PVA en los films que el en material electrospunado, lo cual se justifica por la mayor velocidad de evaporación del solvente que limita el proceso de cristalización, obteniéndose un material más amorfo y menos termoestable. Por otro lado, la presencia de CA da lugar a una primera etapa de pérdida de peso atribuible a la termo-liberación de este componente del material. Esta cantidad estuvo afectada por el tipo de proceso y la presencia o no de T85 en la mezcla. En general, la termo-liberación del CA en la primera etapa no fue total, obteniéndose porcentajes respecto al PVA inferiores al contenido analizado, lo que sugiere que una fracción del compuesto está fuertemente ligado a las cadenas de polímero. Mientras que el contenido en CA fue ligeramente superior en las fibras que en los films, su termo-liberación fue significativamente menor en las fibras sin T85, donde su obtuvo la mayor eficacia encapsulante (83%). Esto indica que en las fibras sin T85 el compuesto está más fuertemente ligado a la matriz, en coherencia con lo comentado previamente respecto a la inhibición del T85 de las interacciones carvacrol-PVA, al atrapar al compuesto en las micelas, limitando su enlace a las cadenas del polímero. En el material seco, la desestructuración de las asociaciones lipídicas (micelas) no permite una mayor retención del activo en la matriz. La fracción no ligada de CA se termo-libera de la matriz a temperaturas del orden a del compuesto puro, siendo las diferencias atribuibles a la inercia térmica de la muestra en relación a la cantidad de activo en cada caso. La cantidad de activo fuertemente retenido en matriz se libera con la degradación del polímero en la segunda etapa del termograma. Así, se observa que la matriz de fibras sin T85 presenta la menor temperatura de degradación en coherencia con la mayor capacidad de ligar al activo, el cual contribuirá además a limitar la cristalización del polímero por su efecto plastificante. Por tanto, la matriz que permite una mejor retención del activo, protegiéndolo frente a su termo-liberación es la formulación $P_{15}A_{15}T_0$ obtenida por ES. Sin embargo, se observa que la máxima velocidad de liberación del activo no ligado ocurre a temperaturas más bajas en las fibras, lo que se podría deberse a su estructura más abierta con mayor superficie específica.

En las estructuras obtenidas por casting, con un secado más lento, la temperatura de máxima velocidad de degradación del polímero fue mayor, sin diferencias significativas entre las diferentes muestras, lo que sugiere un mayor nivel de cristalización, similar en todos los casos, donde el CA estaría atrapado principalmente con las cadenas de la fracción amorfa.

Tabla 5. Temperaturas de degradación o termo-liberación (T_o y T_p) de A) los componentes individuales de las emulsiones y B) de los materiales encapsulados obtenidos por ES y *casting* junto a la fracción termo-liberable detectada para el CA. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones

A

Compuestos puros	T_o (°C)	T_p (°C)
Carvacrol	77±6 ^a	159±7 ^a
PVA	197±2 ^b	293±5 ^b
Tween 85	335±2 ^c	380±2 ^c

B

Formulación	1ª etapa		2ª etapa		Fracción termo-liberable de CA	
	T_o (°C)	T_p (°C)	T_o (°C)	T_p (°C)	Respecto a la matriz	Respecto al PVA
					(%)	(%)
ES P ₁₅ A ₀ T ₀	-	-	190±3 ^a	281±2 ^a	-	-
ES P ₁₅ A ₁₅ T ₀	44±3 ^{ab}	109±7 ^a	188±5 ^a	275±6 ^a	6±1 ^a	7±1 ^a
ES P ₁₅ A ₁₅ T ₁	43±5 ^a	121±8 ^b	192±2 ^{ab}	280±3 ^a	9±1 ^b	10±1 ^b
<i>casting</i> P ₁₅ A ₀ T ₀	-	-	192±1 ^a	288±4 ^b	-	-
<i>casting</i> P ₁₅ A ₁₅ T ₀	45±1 ^{ab}	135±3 ^c	197±1 ^b	290±2 ^b	8,3±0,9 ^b	9±1 ^b
<i>casting</i> P ₁₅ A ₁₅ T ₁	51±7 ^b	129±4 ^{bc}	193±4 ^{ab}	288±3 ^b	7,9±0,2 ^b	8.8±0.2 ^b

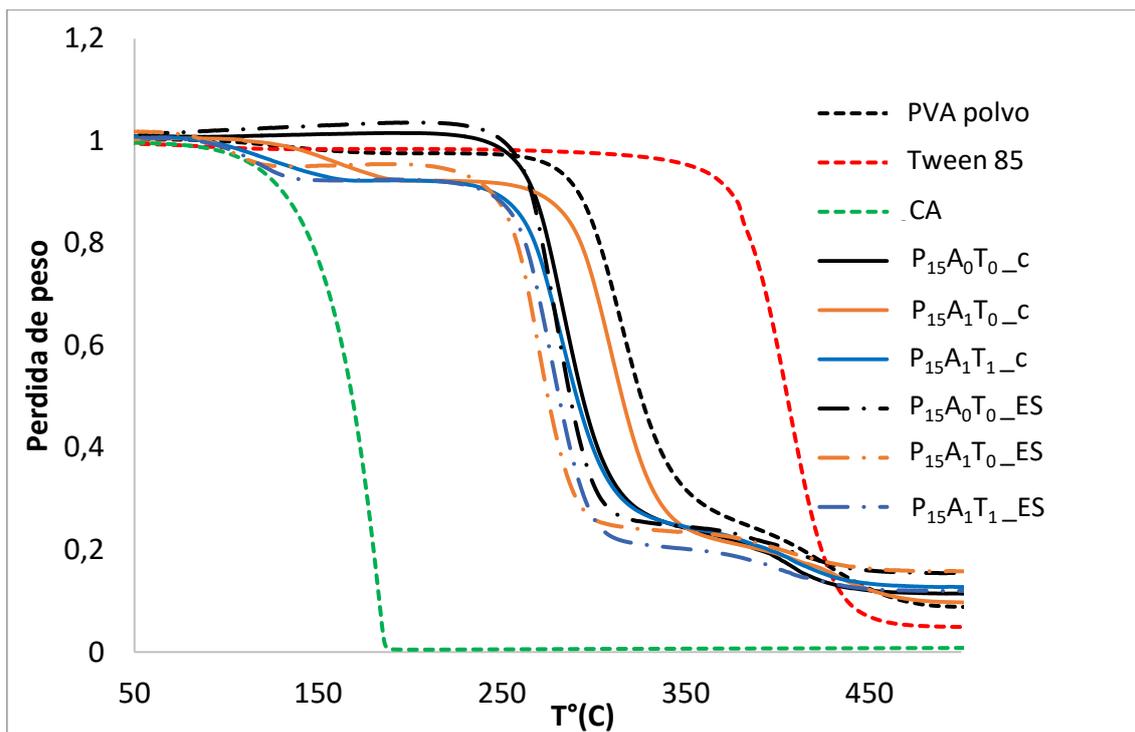


Figura 11. Termogramas TGA del material obtenido por *casting* y por ES y de los diferentes compuestos puros.

4. CONCLUSIONES

Las formulaciones a base de PVA (15% p/p) y CA incorporado (15% respecto al polímero), presentan un comportamiento adecuado para su electroestirado y la obtención de fibras de PVA con el compuesto encapsulado, con una eficacia encapsulante del 83 %. La cantidad retenida de CA presenta dos fracciones con diferente nivel de interacción en la matriz: un 5 % más fuertemente ligado y un 7 % más libre, según se deduce del análisis térmico. La adición del tensoactivo T85 no presentó ventajas para la encapsulación del compuesto en la matriz de fibras debido a que limitó las interacciones del CA con el polímero, aumentando la proporción de compuesto menos fuertemente ligado. En comparación, en el material obtenido por casting, las cadenas poliméricas tuvieron una estructura más cristalina con menor capacidad para enlazar al carvacrol que fue más termo-liberable, aunque la eficacia encapsulante fue alta (75-77%) y similar a la de las fibras electrospunadas con T85.

Este estudio demuestra que el proceso de ES puede ser una alternativa para la obtención de carvacrol encapsulado en matrices de PVA que pueden aplicarse superficialmente sobre materiales de envasado para la obtención de films multicapa activos. No obstante, se ha de estudiar la adhesión efectiva a otros materiales y la cinética de liberación del activo en diferentes sistemas alimentarios para asegurar la efectividad antimicrobiana y/o antioxidante de los mismos en sistemas reales.

5. BIBLIOGRAFÍA

ATARÉS, L. and CHIRALT, A. (2016) 'Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging', *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, 48, pp. 51–62. doi: 10.1016/J.TIFS.2015.12.001.

BURT, S. (2004) 'Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 94(3), pp. 223–253. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022.

GONZÁLEZ, A. and ALVAREZ IGARZABAL, C. I. (2013) 'Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging', *Food Hydrocolloids*. Elsevier, 33(2), pp. 289–296. doi: 10.1016/J.FOODHYD.2013.03.010.

LLORENS-MOLINA, J. A. (2009) 'Obtención de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (equipo Clavenger).'

LÓPEZ-MATA, M., RUIZ-CRUZ, S., SILVA-BELTRÁN, N., ORNELAS-PAZ, J., ZAMUDIO-FLORES, P. and BURRUEL-IBARRA, S. (2013) 'Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Carvacrol', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 18(12), pp. 13735–13753. doi: 10.3390/molecules181113735.

PERDONES, Á., CHIRALT, A. and VARGAS, M. (2016) 'Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil', *Food Hydrocolloids*, 57, pp. 271–279. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.02.006.

QUINN, J. A., YANG, Y., BUFFINGTON, A. N., ROMERO, F. N. and GREEN, M. D. (2018) 'Preparation and characterization of crosslinked electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes', *Polymer*. Elsevier, 134, pp. 275–281. doi: 10.1016/J.POLYMER.2017.11.023.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. (2010) *Caracterización y aplicación de recubrimientos antimicrobianos a base de polisacáridos y aceites esenciales. Doctoral Thesis*. Universitat Politècnica de València, Spain.

SHEMESH, R., KREPKER, M., GOLDMAN, D., DANIN-POLEG, Y., KASHI, Y., NITZAN, N., VAXMAN, A. and SEGAL, E. (2015) 'Antibacterial and antifungal LDPE films for active packaging', *Polymers for Advanced Technologies*, 26(1), pp. 110–116. doi: 10.1002/pat.3434.

SUNTRES, Z. E., COCCIMIGLIO, J. and ALIPOUR, M. (2015) 'The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, pp. 304–318. doi:

10.1080/10408398.2011.653458.

TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTINEZ, C. and CHIRALT, A. (2017) 'Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning', *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 214, pp. 245–256. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2017.07.005.

THONG, C. C., TEO, D. C. L. and NG, C. K. (2016) 'Application of polyvinyl alcohol (PVA) in cement-based composite materials: A review of its engineering properties and microstructure behavior', *Construction and Building Materials*. Elsevier, 107, pp. 172–180. doi: 10.1016/J.CONBUILDMAT.2015.12.188.

WEN, P., ZHU, D., WU, H., ZONG, M., JING, Y. and HAN, S. (2016) 'Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging', *Food Control*, 59, pp. 366–376. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.005.

WIŚNIEWSKA, M., BOGATYROV, V., OSTOLSKA, I., SZEWEZUK-KARPISZ, K., TERPILOWSKI, K. and NOSAL-WIERCINSKA, A. (2016) 'Impact of poly(vinyl alcohol) adsorption on the surface characteristics of mixed oxide $Mn_xO_y-SiO_2$ ', *Adsorption*, 22(4), pp. 417–423. doi: 10.1007/s10450-015-9696-2.

YANG DI, JIA LI, T. Y. and Y. X. (2017) 'The preparation and mechanical properties of novel PVA SiO_2 film'. doi: 10.1080/17458080.2014.980447.

YUAN, G., LV, H., YANG, B., CHEN, X. and SUN, H. (2015) 'Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract', *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(12), pp. 11034–11045. doi: 10.3390/molecules200611034.