

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i d'el Medi Natural



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

**TRABAJO FIN DE GRADO- GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS
ALIMENTOS**

**Encapsulación de Carvacrol en nanofibras de PCL y su
aplicación en materiales para envasado activo de
alimentos**

Curso 2017-2018

Alumna: María Gómez García

Tutora: Amparo Chiralt Boix

Cotutora experimental: Alina Tampau

Valencia, Junio de 2018

Encapsulación de Carvacrol en nanofibras de PCL y su aplicación en materiales para envasado activo de alimentos

Carvacrol encapsulation in PCL nanofibres and its application in active food packaging materials

Encapsulació de carvacrol en fibres de PCL i aplicació en materials per l'envasat actiu d'aliments

Alumna: María Gómez García

Tutor/a: Amparo Chiralt Boix

Cotutor/a experimental: Alina Tampau

RESUMEN

Se han estudiado las **propiedades funcionales** de films multicapa activos **biodegradables** de almidón, con incorporación de **Carvacrol (CA)** encapsulado en fibras de Policaprolactona (PCL) obtenidas mediante **Electrospinning (ES)**. Los films de **almidón** se obtuvieron mediante mezclado en fundido y moldeo por compresión y sobre estos films se electro-depositó una disolución de **PCL** con o sin CA durante diferentes tiempos. Los films con nanofibras se cubrieron con otra capa de almidón para obtener los films multicapa por termocompresión. Así, se obtuvieron 5 formulaciones, dos de ellas con solo PCL entre las capas almidón (con 60 y 90 minutos de electrodeposición), SP₁S y SP₂S respectivamente y dos formulaciones incorporando CA para los mismos tiempos, SP(CA₁)S y SP(CA₂)S, respectivamente. También se obtuvo un film control con doble capa de almidón (SS). Los films multicapa acondicionados a 53% de humedad relativa se estudiaron en cuanto a sus propiedades ópticas, barrera al oxígeno y al vapor de agua y propiedades mecánicas.

Las fibras obtenidas por ES se analizaron en cuanto a su cinética de liberación del compuesto activo en diferentes simulantes alimentarios con distinta **polaridad**. Las fibras mostraron una velocidad de liberación del CA mayor, con liberación casi total, en los simulantes menos polares, D1 (etanol 50%) y D2 (Isooctano) (que emulan alimentos grasos), debido a la mayor afinidad del compuesto con estos líquidos apolares. Los films con electrodeposición de PCL, con o sin CA, mostraron valores menores de permeabilidad al vapor de agua, debido a la naturaleza hidrofóbica de la capa de fibras y su efecto barrera en la multicapa. No obstante, no mostraron reducción en permeabilidad al oxígeno, que ya fue baja en los films con solo almidón. Con respecto a las propiedades

ópticas, las multicapas presentan valores de brillo relativamente bajos (aspecto mate), una claridad (L) media y tonalidad (h) ligeramente amarilla. En cuanto a las propiedades mecánicas, la presencia de la capa electrodepositada dio lugar a una disminución de la rigidez y resistencia a la rotura de las multicapas. La extensibilidad se vio afectada con la presencia de las capas con CA, reflejando la migración del activo a la capa de almidón, lo que debilitó la matriz.

Palabras clave: Propiedades funcionales, biodegradable, Carvacrol, Policaprolactona, almidón, Electrospinning, activo, alimento, polaridad.

ABSTRACT

The present work studies the functional properties of active biodegradable starch films with encapsulation of Carvacrol (CA) by the Electrospinning (ES) technique. For this, starch films were obtained by melt mixing to obtain the pellet and compression molding using a hydraulic press to obtain the films. On these films, a solution of the biodegradable polymer Polycaprolactone (PCL) with and without Carvacrol was electro-deposited by means of ES and with different times of electro-deposition to obtain the different formulations with which to work in the subsequent tests. Thus, 5 formulations were obtained, two of them with only PCL and starch, at ES duration of 60 and 90 minutes, SP₁S and SP₂S respectively and two formulations incorporating Carvacrol for the same times, SP (CA₁) S and SP (CA₂) S, respectively. A control film was also obtained for the tests based on only starch (SS). Once the films were obtained incorporating of the active components, they were thermo-sealed in a hydraulic press in order to obtain the multilayer material.

The fibers generated by ES were analyzed in terms of their kinetics of release of the active compound in different food simulants with different polarities. The fibers showed a higher rate of release in the less polar simulants, D1 (ethanol 50%) and D2 (Isooctane) (related to fatty foods) and, on the other hand, in these simulants an almost complete release of the CA was noted, due mainly to the affinity of monoterpene with these nonpolar substances.

The starch films carrying electrospun fibers were studied in terms of their optical properties, oxygen barrier, water vapor barrier property, moisture content and mechanical properties. With the addition of the electro-deposited layer of PCL and CA, a reduction of water vapor permeability values against the starch-only film was observed, due to the hydrophobic nature of these two compounds in the films. Regarding oxygen permeability, the presence of PCL did not significantly modify this property that was already exhibited by the thermoplastic starch. With regard to the optical properties, the multilayers have brightness values less than 40 which can be considered matt, have an average lightness (L) and a slightly yellow hue (h). Regarding the mechanical properties, the presence of the PCL layer generated a decrease in the rigidity and breaking strength of the multilayers. The extensibility was affected with the presence of the layers containing the CA,

observing less elasticity, perhaps due to the migration of the active, with weakening effect, in the starch layer.

Key words: Functional properties, biodegradable, Carvacrol, Polycaprolactone, starch, Electrospinning, active, foodstuff, polarity.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	5
3. MATERIALES Y METODOS	5
3.1 Materiales	5
3.2 Fibras electrodepositadas de PCL	5
3.2.1 Obtención por la técnica de electrospinning.....	5
3.2.2 Caracterización del material electrodepositado	6
3.3 Estudio de la cinética de liberación en simulantes alimentarios	6
3.4 Obtención de films activos de almidón	7
3.5 Caracterización de los films	8
3.5.1 Humedad y grosor	8
3.5.2 Barrera al vapor de agua	9
3.5.3 Barrera al oxígeno	9
3.5.4 Propiedades ópticas	9
3.5.5 Propiedades mecánicas.....	10
3.6 Análisis estadístico	11
4.RESULTADOS	11
4.1 Caracterización de las fibras electrospunadas	11
4.2 Cinética de liberación	12
4.3 Propiedades de los films de almidón con nanofibras de PCL y CA	14
5. CONCLUSIONES	15
6. BIBLIOGRAFIA	16

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equipo <i>Electrospinning</i>	6
Figura 2a. Mezclador de rodillos marca Labtech Engineering, Tailandia.....	8
Figura 2b. Prensa de platos caliente marca Labtech Engineering, Tailandia.....	8
Figura 3. Micrografías FESEM del material electrodepositado.....	11
Figura 4. Ratio M_t/M_0 (masa de activo liberado por el material electrodepositado a cada tiempo, con respecto a la masa inicial en las fibras) en función del tiempo, en los diferentes simulantes alimentarios: datos experimentales (puntos) y el modelo de Peleg ajustado (línea continua).....	12
Figura 5. Ratio M_t/M_∞ (masa de activo liberado por el material electrodepositado a cada tiempo, con respecto al valor máximo liberado cuando se alcanza el equilibrio) en función del tiempo, en los diferente simulantes alimentarios: datos experimentales (puntos) y el modelo de Fick ajustado (línea continua).....	12

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros del modelo de Peleg (M_{∞} : masa de activo liberado cuando se alcanza el equilibrio; $1/k_1$: la velocidad de liberación del CA) y el coeficiente D de difusión obtenido del ajuste del modelo de Fick para los cuatro simulantes alimentarios analizados. La ratio M_{∞}/M_0 presenta la cantidad de activo liberado cuando se alcanza el equilibrio, con respecto al contenido inicial de CA en la fibra, evaluado por extracción con etanol. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los simulantes. SSE: suma de cuadrados residuales.....13

Tabla 2. Propiedades de barrera (permeabilidad al vapor del agua: WVP y permeabilidad al oxígeno: OP) y mecánicas (módulo elástico: ME, tensión de fractura: TS y extensibilidad: $\% \epsilon$) de las multicapas de almidón con el material electrodepositado. Las diferentes letras (superíndices) en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las multicapas.....14

Tabla 3. Propiedades ópticas de las multicapas (transmitancia interna: T_i ; brillo (60°); luminosidad: L^* ; croma: C_{ab} ; tono: h_{ab}). Las diferentes letras (superíndices) en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las multicapas.....15

1. Introducción

En la actualidad, más de un 40% del plástico que se obtiene del petróleo se destina a la fabricación de envases y embalajes para uso alimentario. Desde hace varios años, este material se ha convertido en uno de los más utilizados por las industrias debido a sus características que lo hacen muy apto para el transporte y otros usos como la fabricación de maquinaria y/o piezas de construcción, aislantes o incluso en el ámbito sanitario (fabricación de jeringuillas, cápsulas, bolsas de suero etc.), entre otros muchos usos. Entre las buenas cualidades de los plásticos sintéticos puede destacarse su ligereza, versatilidad de formas y presentaciones, bajo coste, inercia química (compatibilidad con alimentos), compatibilidad con microondas, facilidad de impresión y larga vida útil. Con todo esto, no es difícil esperar que, de las 592.353 toneladas de residuos recogidos de forma separada en España durante el año 2015, se clasificara como plástico en las instalaciones de clasificación de envases ligeros más de un 38%, por delante del papel/cartón y del vidrio. (Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente MAPAMA, junto con INE, Instituto Nacional de estadística). En este último aspecto, el uso de envases plásticos tiene un fuerte impacto medioambiental ya que la parte de estos materiales que no se consigue reciclar o reutilizar, termina en espacios naturales como mares, océanos o bosques, contribuyendo a la contaminación medioambiental, afectando a animales y hábitats donde estos se desarrollan. La principal problemática de este material es su difícil reutilización y/o reciclado lo que conlleva a la generación de residuos de difícil eliminación.

Por este motivo, se está estudiando como alternativa a los materiales de envasado derivados del petróleo, el uso de polímeros biodegradables provenientes de fuentes renovables que favorezcan además un desarrollo sostenible. Estos son los llamados bioplásticos. Estos están formados por polímeros derivados de recursos renovables (biopolímeros) como por ejemplo el almidón o la celulosa, extraídos de biomasa; el ácido poliláctico (PLA), producido por síntesis clásica de monómeros obtenidos de biomasa; o el PHBV, un polihidroxialcanoato producido por microorganismos vivos. Con el uso de estos materiales se podría conseguir reducir el impacto medioambiental de los envases clásicos, al ser biodegradables, y promover el uso de materiales de fuentes renovables, reduciendo emisiones y aumentando la calidad de vida del planeta.

Al mismo tiempo con el cuidado por el bienestar medioambiental, hay también una constante preocupación del consumidor para alimentos por una parte inocuos y seguros, y, por otra parte, saludables y lo más naturales posible. Como consecuencia de esto, existe un creciente interés en desarrollar productos que sean beneficiosos para la salud y que aporten un bienestar físico, a poder ser, sin aditivos de dudosa inocuidad, ni ingredientes que no sigan los estándares de "natural". Por otra parte, en contra de esto, existen ciertos factores que pueden afectar la calidad de un alimento, dependiente sobre todo de la naturaleza de éste y las condiciones a las que sea sometido durante su procesado. Los agentes que provocan la alteración a lo largo del tiempo son

principalmente agentes físicos, generalmente atmosféricos, tales como la humedad, actividad del agua y la temperatura; agentes químicos, como el oxígeno del aire y la luz, que provocan fenómenos de oxidación, o la acidez (Elika, Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria) y fenómenos biológicos que son los causados por acción de microorganismos.

Como solución o alternativa a este problema, existe una tendencia actual de usar compuestos naturales conocidos por su actividad antimicrobiana y/o antioxidante para mejorar la vida útil de los alimentos. En concreto, la incorporación de estos compuestos en materiales de envasado para su liberación controlada, permitiría alargar la vida útil de los productos envasados. En este contexto se encuentran ciertos componentes de aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas como es el orégano, el tomillo o el clavo. A pesar de su efectividad antimicrobiana y/o antioxidante, una de las desventajas que presentan estos compuestos es su alta volatilidad por lo que surge la necesidad de encapsularlos en diferentes matrices, con el fin de disminuir las posibles pérdidas durante la obtención de material de envasado que los contiene.

Las tecnologías de encapsulación permiten proteger determinados compuestos (microorganismos, vitaminas, minerales, compuestos terapéuticos, antimicrobianos, antioxidantes, etc.) de forma que se pueda controlar la liberación en el tiempo o bajo situaciones determinadas. Se han desarrollado diferentes procesos de encapsulación de estas sustancias mediante diferentes técnicas, entre las que cabe destacar la técnica de electrospinning (ES), una eficiente tecnología de fabricación de estructuras a escala nanométrica, que permite la creación de materiales para la aplicación en diferentes campos.

Las notables aplicaciones del ES incluyen industrias como la ingeniería de tejidos, biosensores, filtración, liberación de sustancias y/o inmovilización de enzimas (Bhardwaj and Kundu, 2010). Entre las notables ventajas de esta técnica se puede destacar que trabaja a temperatura ambiente (evitando pérdidas de compuestos termolábiles), permite el uso de una gran variedad de soluciones poliméricas, tanto naturales como sintéticas y, además, ofrece una más alta superficie de contacto que las técnicas convencionales debido a la generación de micro- y nano-estructuras. La variación en las condiciones del proceso permite conseguir los resultados deseados en lo que se refiere a propiedades de las fibras y a su funcionalidad (Bhardwaj and Kundu, 2010).

En la ingeniería de tejidos, por ejemplo, se ha utilizado el *electrospinning* para un gran número de polímeros tales como ácido poliláctico, fibra de seda, colágeno, celulosa, entre otros. Aunque se presenta como una técnica muy interesante, la técnica todavía está siendo objeto de investigación con el fin de solucionar algunos problemas tales como el rendimiento en la fabricación de la fibra, que limita su aplicación, o la falta de uniformidad en su distribución en el colector.

Los componentes básicos de un equipo de ES son, en primer lugar, una jeringuilla, conectada a una bomba, donde se coloca la solución polimérica que posteriormente es *electroestirada*, una fuente de alto voltaje y un colector. La solución es impulsada desde la jeringuilla a través de la aguja y se seca atravesando una zona donde actúa el campo eléctrico, para depositarse seca sobre la placa metálica del colector enfrentado a la aguja. La aplicación del campo eléctrico produce el estiramiento de la solución, que inicialmente emerge de la aguja como una gota. Con el aumento del voltaje aplicado, la gota va cambiando su geometría desde curva hacia cónica, generando el llamado “cono Taylor”. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, se supera la fuerza de tensión superficial del líquido y desde el pico del cono Taylor se estira el chorro fino que se acelera con el campo eléctrico hacia el colector conectado al polo de entierro. Debido a la carga inducida por el campo eléctrico en las cadenas poliméricas, se van generando formaciones fibrilares o esféricas, en función de la naturaleza del polímero.

Con esta técnica se puede obtener un material polimérico que, a su vez, puede tener un efecto encapsulante de compuestos activos cuando estos se introducen también en la disolución de partida. Estos materiales encapsulantes portadores de compuestos activos pueden depositarse en forma de fibras o partículas sobre los materiales usados en el envasado, para posteriormente aplicarlos en el envasado de alimentos. Entre los compuestos activos que se pueden encapsular, están los aceites esenciales de diferentes plantas aromáticas, y sus componentes activos como el *Carvacrol*, compuesto mayoritario del aceite esencial de orégano. Este compuesto natural destaca por su demostrada capacidad antioxidante y antimicrobiana (Guarda *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014; Tomaino *et al.*, 2005) lo que permite su uso en el ámbito del envasado activo con la finalidad de alargar la vida útil de los alimentos protegiéndolo de fenómenos de deterioro tales como acción de ciertos microorganismos o la oxidación provocada por el oxígeno.

El Carvacrol (CA) es un monoterpenoide fenólico con demostrada efectividad contra microorganismos como *Escherichia Coli* y *Listeria* (Requena *et al.*, 2016), propensos a la proliferación en productos alimentarios. La efectividad del Carvacrol contra microorganismos alimentarios se atribuye a la naturaleza fenólica de este compuesto y su carácter lipofílico (Burt, 2004; Ramos *et al.*, 2011). Con esta estructura molecular, el *Carvacrol es capaz de actuar en la membrana exterior de las bacterias Gram-negativa, liberando el LPS (Lipopolisacaridos), aumentando la permeabilidad del ATP en la membrana citoplasmática y consecuentemente cambiar la permeabilidad pasiva en la célula* (Guarda *et al.*, 2011). De esta forma se podría conseguir alterar el ciclo vital de la bacteria, y con ello su crecimiento y/o proliferación, alterando sus funciones y así evitando que lleve a cabo mecanismos de degradación. (Guarda *et al.*, 2011)

Con todo esto, surge la necesidad de estudiar la liberación del compuesto activo Carvacrol en varios simulantes alimentarios para poder conocer su efectividad frente a microorganismos en alimentos dependiendo de su naturaleza, con el objetivo de predecir en qué productos funcionarían mejor las matrices que lo encapsulan. Estos ensayos son

útiles también para conocer cómo influye la afinidad del compuesto antimicrobiano con los materiales poliméricos encapsulantes en su liberación en diferentes tipos de alimentos (Requena *et al.*, 2017)

Para obtener materiales de envase biodegradables activos es necesario combinar diferentes tipos de polímeros con propiedades complementarias que permitan optimizar en conjunto las propiedades barrera y mecánicas del film. En este sentido, la estrategia de obtención de films multicapa combinando polímeros hidrofílicos, como el almidón, e hidrofóbicos como los poliésteres biodegradables, como el PLA, ha resultado muy efectiva (Muller *et al.*, 2017a y b). La capa de almidón aporta una alta barrera al oxígeno mientras que el poliéster aporta mayor barrera al vapor de agua y resistencia mecánica. El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en las plantas, por lo que tiene la ventaja de ser obtenido de fuentes fácilmente renovables, además y es producido en abundancia a bajo coste (Lourdin *et al.* 1995). No obstante, los plásticos basados en almidón presentan algunos aspectos negativos tales como limitada estabilidad causada por la absorción de agua, lo que conduce a un valor alto de permeabilidad al vapor de agua, envejecimiento inducido por su retrogradación y relativamente pobres propiedades mecánicas. Para superar estas limitaciones, se han propuesto mezclas con otros biopolímeros (Placket, 2011) o la obtención de films multicapa (Muller *et al.*, 2017a, Ortega *et al.*, 2015; Tampau *et al.* 2018). Ortega *et al.*, 2015 obtuvieron films bicapa de almidón- poli- ϵ -caprolactona (PCL) con propiedades barrera al vapor de agua mejoradas, debido al carácter hidrófobo de la capa de PCL de alta flexibilidad, y con alto poder barrera al oxígeno asociado con la capa de almidón. La PCL es un poliéster alifático obtenido por síntesis química a partir de compuestos de origen petroquímico, que tiene propiedades termoplásticas y es biodegradable, biocompatible y semicristalino, con muy bajo punto de fusión (58-60 °C), baja viscosidad y fácilmente procesable (Ortega *et al.*, 2015). La PCL es además electro-estirable mediante la técnica de electrospinning y puede actuar como encapsulador de compuestos activos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es evaluar el proceso de obtención de films multicapa de almidón con una capa electrodepositada de PCL, portadora o no de carvacrol, para mejorar las propiedades barrera de los films, a la vez que se incorpora el compuesto activo, obteniendo materiales antimicrobianos.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos propuestos para alcanzar el objetivo general son:

- Obtención de las matrices de fibras electrospunadas de PCL encapsulando el compuesto activo CA;
- Análisis de la cinética de liberación del CA desde la fibra de PCL en diferentes simulantes alimentarios, emulando cuatro tipos de alimentos más frecuentes;
- Obtención de los films multicapa de almidón de maíz termoprocesado con una capa central de PCL que encapsula el CA, aplicada mediante *electrospinning*;
- Evaluación de los films multicapa en cuanto a sus propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno, propiedades mecánicas y ópticas.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

El Carvacrol (CA) y poly-(ϵ -caprolactona) (PCL) fueron suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). El almidón de maíz (con 21% contenido en amilosa) se compró a Roquette (Roquette Laisa España, Benifaió (Valencia), España). El ácido acético glacial (AAG), el etanol absoluto de grado UV, el glicerol, el Nitrato de Magnesio ($Mg(NO_3)_2$), el Pentóxido de difósforo (P_2O_5) y el Isooctano fueron obtenidos de Panreac (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès (Barcelona), España).

3.2 Fibras electrodepositadas de PCL

3.2.1 Obtención por la técnica de electrospinning

Para la obtención de las diferentes formulaciones, se prepararon disoluciones de PCL al 15 % (p/p) en AAG, una con CA al 15%(p/p) con respecto al polímero (P(CA)), y otra sin el activo (P) para su comparación. Las disoluciones se mantuvieron 24 h en agitación a temperatura ambiente hasta la disolución completa del polímero.

Para la obtención de las fibras de PCL encapsulando CA se usó la técnica de *electrospinning*, empleando el equipo Fluidnatek (Bioinicia, Valencia, España) (Figura 1). Las condiciones de operación utilizados fueron: caudal de 1200 μ L/h, voltaje de 12,0 kV y una distancia aguja-colector de 20 cm. Para coleccionar sin dañar las fibras para su análisis, se usó papel de aluminio recortado en círculos con diámetro de 13 cm y posicionado sobre el colector.

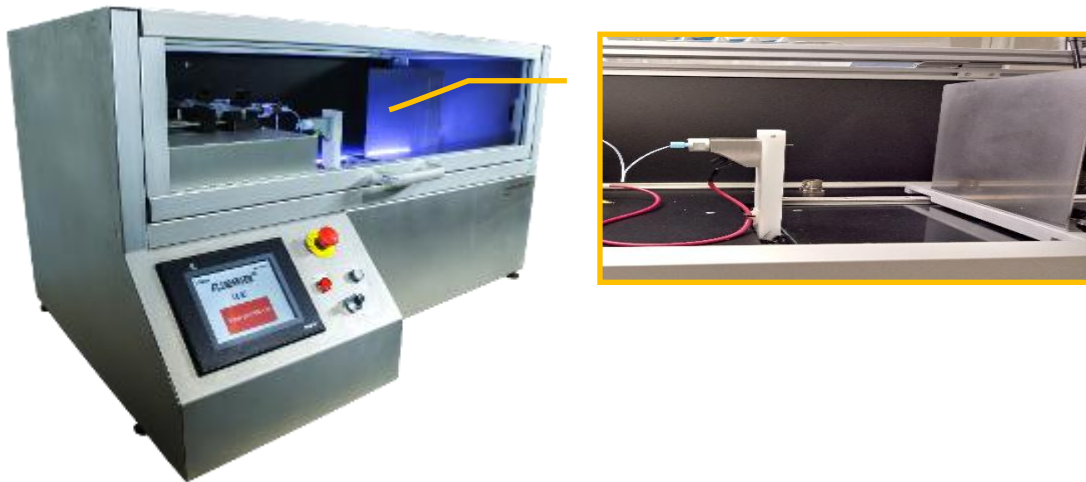


Figura 1. Equipo *Electrospinning*.

3.2.2 Caracterización del material electrodepositado

Las estructuras obtenidas por electrospinning se observaron con un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) modelo ULTRA 55 (Zeiss, Oxford Instruments). Para eso, las muestras se montaron con cinta carbónica sobre soportes metálicos, y después se recubrieron con una capa de platino. Se observaron usando un voltaje de 1kV. El tamaño de las fibras se obtuvo del análisis de imagen de las micrografías con el programa ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

El material también fue analizado en cuanto a su contenido en activo, mediante extracción con etanol absoluto durante 24 horas con agitación, y lectura espectrofotométrica a 275 nm, tal como describen Tampau *et al.* (2017).

3.3 Estudio de la cinética de liberación en simulantes alimentarios

La cinética de liberación del CA se analizó en cuatro simulantes alimentarios de diferentes polaridades (conforme a la Regulación 10/2011/EC): etanol al 10 % v/v (simulante A), ácido acético al 3% (p/v) (simulante B), etanol al 50% v/v (simulante D1) e isooctano (simulante D2). Los simulantes A y B corresponden a alimentos acuosos con pH neutro y con pH < 4,5, respectivamente. D1 imita las emulsiones aceite-en-agua y los alimentos con alto contenido en alcohol (> 20%), mientras D2 representa los alimentos con perfil altamente lipofílico. Muestras de film de 50 ± 2 mg se pusieron en contacto con 100 mL de simulante, a temperatura ambiente 25 ± 3 °C y en agitación continua durante todo el tiempo del ensayo. Se tomaron alícuotas de cada muestra a diferentes tiempos de contacto (desde 1 minuto) y se determinó la absorbancia a 275 nm con la ayuda de un espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific Evolution 200). La cuantificación del CA liberado se hizo usando rectas de calibrado determinadas previamente para cada simulante. El ensayo se realizó en triplicado, usando como blancos el extracto de las fibras libres de CA en los cuatro simulantes.

Los datos obtenidos se ajustaron a dos modelos matemáticos para obtener los parámetros característicos del proceso de liberación. En primer lugar, se ajustaron los datos al modelo de Peleg (Peleg, 1988). Este modelo empírico (ecuación 1) permite conocer la velocidad de liberación del activo ($1/k_1$, g CA/h) en cada simulante alimentario, así como la masa de CA liberada cuando se ha llegado al equilibrio (M_∞ g CA/100 g film) (ecuación 2), del ajuste a los datos experimentales: masa liberada (m_t) en función del tiempo (t).

$$m_t = \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (\text{ec. 1})$$

$$M_\infty = \frac{1}{k_2} \quad (\text{ec. 2})$$

En segundo lugar, los datos se ajustaron con el modelo de Fick, para lo cual los films se consideraron como láminas infinitas con el semiespesor de la capa como dimensión característica, en la que los componentes activos difunden solo en la dirección axial. Se utilizó la ecuación de difusión (ecuación 3) para tiempos largos (Crank, 1975) con $n=10$, para determinar los valores del coeficiente de difusión (D) del CA en los diferentes disolventes. Para ello se usó la herramienta Solver (Microsoft Excel) para optimizar los valores del coeficiente D, minimizando la suma de cuadrados residuales (SSE).

$$M_t = M_\infty \left(\frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-\pi^2 D (2n+1)^2 t}{L^2}\right) \right] \right) \quad (\text{ec. 3})$$

Donde:

t: Tiempo del proceso de liberación (s).

M_t : Masa del componente activo liberada en un tiempo t.

M_∞ : Masa del componente activo liberada al equilibrio.

L: Mitad del espesor de la capa (m).

3.4 Obtención de films activos de almidón

Los films de almidón se obtuvieron mediante mezclado en fundido y moldeo por compresión. Para ello se preparó una mezcla de almidón:glicerol:agua en proporción 1:0,3:0,5 que se termoprocesó en un mezclador de rodillos (Labtech Engineering, Tailandia) (Figura 2a) a 160 °C y 5 rpm durante 30 minutos, para permitir la gelatinización y la obtención del almidón termoplástico. Una vez obtenido el pellet de almidón, se condicionó a 53% humedad relativa (HR) y 25 °C durante una semana. Posteriormente se termopresó en prensa hidráulica (Labtech Engineering, Tailandia) (Figura 2b) siguiendo el protocolo descrito por Ortega Toro *et al.*, (2015): 5 minutos precalentamiento a 160 °C, prensado por 2 min a 50 bares/160 °C seguido de 6 min de prensado a 120 bares/160 °C y 3 minutos de enfriamiento hasta 50 °C.



Figura 2. **a:** Mezclador de rodillos marca Labtech Engineering, Tailandia; **b:** prensa de platos caliente marca Labtech Engineering, Tailandia.

Sobre las películas de almidón termoformado se electrodepositaron las fibras de PCL con o sin CA mediante electrospinning durante 60 o 90 minutos, respectivamente. Estos tiempos de deposición fueron calculados en un estudio previo de encapsulación del activo en esta matriz (Tampau *et al.*, 2018), para alcanzar una concentración de CA en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ apta para ejercer su efecto antimicrobiano contra cepas de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Los films con la capa depositada se sellaron en la prensa con otro film simple de almidón, creando una multicapa. Los parámetros de sellado fueron los mismos descritos por Ortega Toro *et al.*, (2015): prensado durante 4 minutos a 120 bares/80 °C, seguido de enfriamiento hasta 50 °C. De esta manera se obtuvieron 5 formulaciones: bicapa de almidón (SS) y dos bicapas de almidón con fibras de PCL electrodepositadas por 60 o 90 minutos (SP₁S, SP₂S, respectivamente) y dos bicapas con el compuesto activo CA encapsulado en las fibras de PCL (SP(CA₁)S y SP(CA₂)S) con aplicación de 60 y 90 minutos, respectivamente. Las multicapas se acondicionaron una semana a 53% HR y 25 °C antes de proceder con su caracterización.

3.5 Caracterización de los films

3.5.1 Humedad y grosor

El grosor de las muestras se evaluó con ayuda de un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) en 5 puntos en cada multicapa. Cada formulación se midió por triplicado. El contenido en humedad de los films previamente acondicionados a 53% de humedad relativa, se determinó gravimétricamente. Se colocaron muestras de entre 0,4 y 0,6 g en cápsulas de vidrio, previamente taradas. Las capsulas se mantuvieron en estufa a 60 °C/24 h y después, en un desecador con P₂O₅ a temperatura ambiente, hasta peso constante. De la pérdida de peso se determinó el contenido en agua inicial. Este análisis se llevó a cabo por triplicado para cada formulación.

3.5.2 Barrera al vapor de agua

La propiedad barrera al vapor de agua de las multicapas condicionadas a 53% HR se determinó, tal como describen Perdonés *et al.* (2016), aplicando un método gravimétrico ASTM E96-95 modificado (Gennadios *et al.*, 1994). En concreto, un círculo de film se colocó sobre una copa Payne con 5 mL de agua destilada (para asegurar una HR de 100%) y se fijó con tapa circular. Cada copa así preparada se colocó, con un ventilador, en un desecador con $Mg(NO_3)_2$ sobresaturado (53% HR) a 25 °C, en una estufa modelo HotCold UL (JP Selecta S.A., Barcelona). La diferencia de humedades relativas entre las dos caras de la muestra actúa como la fuerza impulsora para el transporte de agua a través del film. Las copas se pesaron inicialmente y durante 24 h, cada 1,5 h. El ensayo se realizó por triplicado para cada formulación. De los datos de pérdida de peso una vez alcanzado el estado estacionario, se obtuvo la tasa de transmisión del vapor de agua WVTR (ecuación 4) y de esta la permeabilidad al vapor de agua WVP (ecuación 5).

$$WVTR = \frac{J}{A} \quad (\text{ec. 4})$$

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{P_{w1} - P_{w2}} \quad (\text{ec. 5})$$

donde:

WVTR - la tasa de transmisión del vapor de agua ($g \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$);

J - la pendiente de la gráfica de pérdida de peso representada frente al tiempo ($g \cdot h^{-1}$);

A - el área del film (m^2);

P_{w1} - la presión parcial de vapor de agua por debajo del film (Pa);

P_{w2} - la presión parcial de vapor de agua por encima del film (Pa);

L - el grosor de la muestra del film (m).

3.5.3 Barrera al oxígeno

La barrera al oxígeno de los films se determinó a 25 °C y 53% HR con OX-TRAN Model 2/21 ML (Mocon Lippke, Neuwied, Alemania), exponiendo al flujo de O_2/N_2 un área de film de 50 cm^2 . Cada formulación se midió por triplicado.

3.5.4 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas se determinaron aplicando la teoría de Kubelka Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Hutchings, 1999). Para ello, se midieron los espectros de reflexión de los films sobre un fondo blanco (R) y otro negro (R_0), igual

que se registró el espectro de reflectancia del mismo fondo blanco (R_g), utilizando un espectrocolorímetro modelo CM-3600d (Minolta CO,Tokyo) con esfera integradora. Se calcularon los espectros de reflectancia de una lámina de multicapa de grosor infinito (R_∞) con la ayuda de las ecuaciones 6-8. A partir de eso, se obtuvo la transmitancia interna (Ti) a 460 nm (ecuación 9) y las coordenadas de color L^* , C_{ab}^* y h_{ab}^* (ecuaciones 10-14), utilizando como referencia el observador 10º/iluminante D65.

$$a = \frac{1}{2} \left[R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 \times R_g} \right] \quad (\text{ec. 6})$$

$$b = (a^2 - 1)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{ec. 7})$$

$$R_\infty = a - b \quad (\text{ec. 8})$$

$$T_i = \sqrt{(a + R_0)^2 - b^2} \quad (\text{ec. 9})$$

$$a^* = 500 \times \left(\left(\frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right) \quad (\text{ec. 10})$$

$$b^* = 200 \times \left(\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right) \quad (\text{ec. 11})$$

$$L^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16 \quad (\text{ec. 12})$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{ec. 13})$$

$$h_{ab}^* = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{ec. 14})$$

donde X_n , Y_n y Z_n son las coordenadas triestimulo del observador 10º/iluminante D65.

El brillo de los films se determinó según el método ASTM D523 (1999) con brillómetro Multi-gloss (268, Konica Minolta), con un ángulo de incidencia de 60º. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.5 Propiedades mecánicas

Para determinar las propiedades mecánicas de las multicapas, se utilizó una máquina de ensayos mecánicos, modelo TA.XTplus (Stable MicroSystems, Haslemere, Inglaterra) siguiendo el método estándar ASTM D882 (ASTM, 2001). Las muestras previamente equilibradas a 53% HR se recortaron para obtener rectángulos con área de ensayo de 5 cm x 2,5 cm y se sometieron a extensión a una velocidad de 50 mm/min, hasta rotura. De cada formulación se hicieron 8 repeticiones. En cada caso se obtuvieron las curvas esfuerzo de tensión deformación de Henky y de los parámetros módulo elástico (ME), tensión de fractura (TS) y extensibilidad: %ε.

3.6 Análisis estadístico

El análisis y comparación de los datos se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Corp., Rockville, MD, EE. UU). Para el ajuste de los modelos se utilizó el programa Microsoft Excel 2013®.

4. Resultados

4.1 Caracterización de las fibras electrospunadas

En la Figura 3 se presentan las estructuras obtenidas durante el proceso de electrospinning. Estas presentan un aspecto mayoritariamente fibroso, con formaciones fusiformes, más abundantes en la formulación con el activo. El diámetro de las fibras estuvo en el rango 200 ± 40 nm para las portadoras de activo y 500 ± 350 nm para las fibras de solo PCL. De esta manera, se confirmó que la presencia del CA generó fibras más finas, tal como fue reportado por Tampau *et al.* (2017). Esta diferencia en estructura se puede atribuir a que la presencia de CA y su interacción con las cadenas poliméricas (Bahrami & Gholipour Kanani, 2011) afectó a la formación de las fibras durante la electrodeposición.

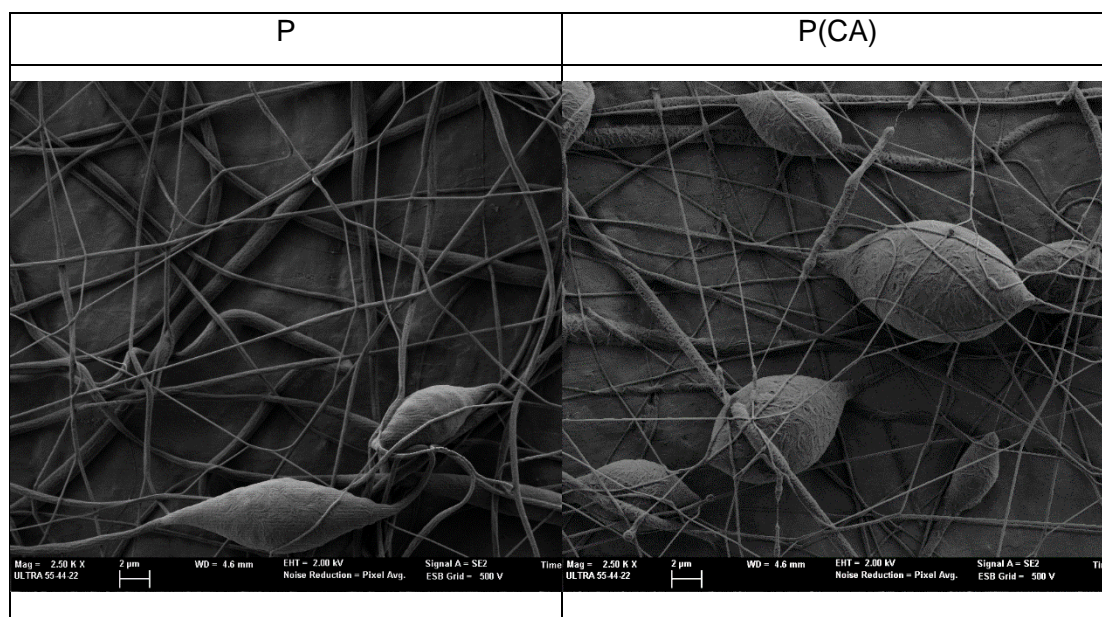


Figura 3. Micrografías FESEM del material electrodepositado.

El material electrodepositado durante 90 minutos, que luego se empleó en el ensayo de liberación, se analizó en su contenido en CA por extracción con etanol y lectura espectrofotométrica a 275 nm. Se obtuvo una cantidad de CA de $11,1\pm 0,1$ g CA/100g fibra, lo que corresponde a una retención del $83\pm 1\%$ del activo, coherente con los valores obtenidos por Tampau *et al.* (2017).

4.2 Cinética de liberación

Las fibras electrodepositadas por el tiempo máximo de 90 minutos se analizaron en cuanto a su cinética de liberación de CA, para evaluar la cantidad del activo liberable en diferentes sistemas alimentarios, considerando los simulantes líquidos mencionados en el apartado 3.3. La cantidad de CA se midió después de varios tiempos de contacto con los simulantes. Los datos obtenidos, con sus respectivos promedios y desviaciones, se presentan en las Figura 4 (Masa de CA liberado a cada tiempo en relación a la masa total en la fibra) y Figura 5 (Masa de CA liberado en relación a la cantidad máxima liberable en el equilibrio).

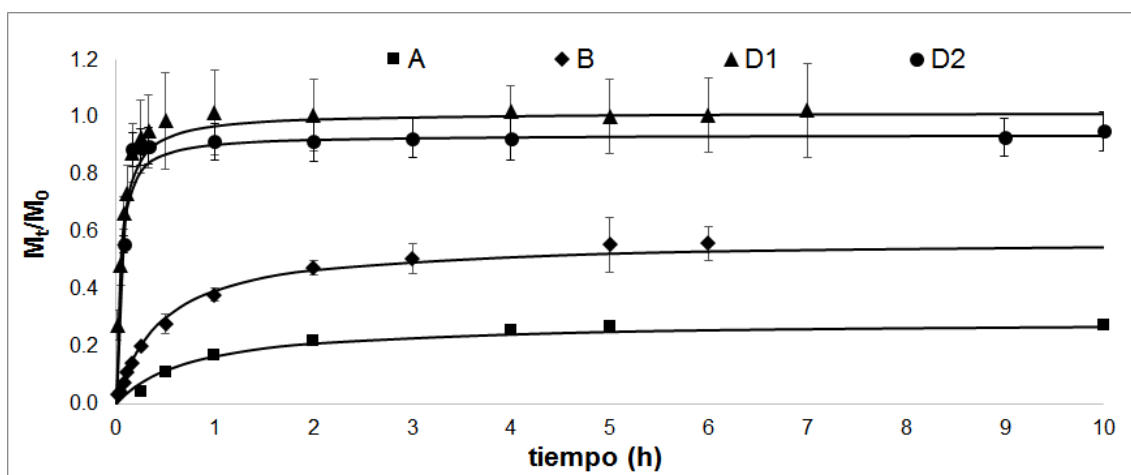


Figura 4. Ratio M_t/M_0 (masa de activo liberado por el material electrodepositado a cada tiempo, con respecto a la masa inicial en las fibras) en función del tiempo, en los diferentes simulantes alimentarios: datos experimentales (puntos) y el modelo de **Peleg** ajustado (línea continua).

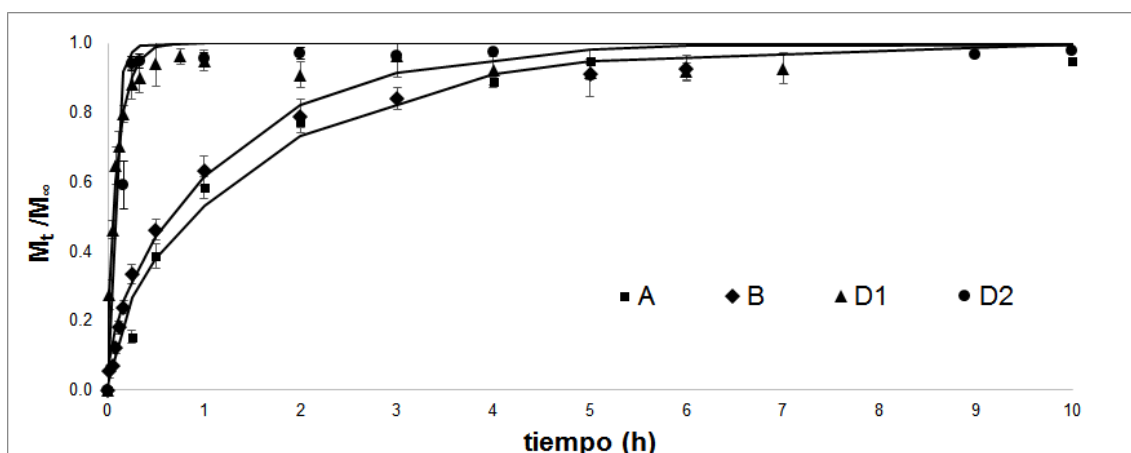


Figura 5. Ratio M_t/M_∞ (masa de activo liberado por el material electrodepositado a cada tiempo, con respecto al valor máximo liberado cuando se alcanza el equilibrio) en función del tiempo, en los diferente simulantes alimentarios: datos experimentales (puntos) y el modelo de **Fick** ajustado (línea continua).

Tabla 1. Parámetros del modelo de Peleg (M_∞ : masa de activo liberado cuando se alcanza el equilibrio; $1/k_1$: la velocidad de liberación del CA) y el coeficiente D de difusión obtenido del ajuste del modelo de Fick para los cuatro simulantes alimentarios analizados. La ratio M_∞/M_0 presenta la cantidad de activo liberado cuando se alcanza el equilibrio, con respecto al contenido inicial de CA en la fibra, evaluado por extracción con etanol. Las diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los simulantes. SSE: suma de cuadrados residuales

Simulante	Modelo matemático ajustado					
	Peleg				Fick	
	$1/k_1$ ($\mu\text{g CA/g film}$)	$M_\infty=1/k_2$ ($\text{g CA}/100 \text{ g film}$)	M_∞/M_0 (%)	R^2	$D \times 10^{13}$ (m^2/s)	SSE
A	$34,1 \pm 0,4^a$	$7,8 \pm 0,3^b$	75 ± 3^b	0,9993	$3,9 \pm 0,3^a$	0,03
B	38 ± 2^a	$6,1 \pm 0,6^a$	57 ± 5^a	0,9998	$5,3 \pm 1^a$	0,12
D1	700 ± 150^b	11 ± 1^c	100 ± 10^c	0,9981	46 ± 7^b	0,04
D2	800 ± 100^b	$11,5 \pm 0,8^c$	96 ± 7^c	0,9998	109 ± 14^c	0,05

En la Tabla 1 se presentan los valores del parámetro M_∞ correspondiente a 100g de material electrospunado, valores obtenidos mediante el ajuste lineal del modelo de Peleg a los datos experimentales. También se dan los valores del parámetro $1/k_1$, relacionado con la velocidad de liberación del activo desde las fibras. La bondad del ajuste ($R^2 > 0.998$) se observa también en la Figura 4, donde se puede ver la curva ajustada a los datos reales. Se observó que la polaridad de los simulantes alimentarios influyó tanto el valor de la asíntota (M_∞) como de la pendiente del tramo inicial de la gráfica (velocidad de liberación). La liberación más rápida se registró para los simulantes D1 (50% etanol) y en el D2 (isooctano), en los cuales se obtuvo también un mayor porcentaje de liberación del activo (prácticamente el 100%). Este comportamiento es coherente con lo previamente reportado por Tehrany (2007), que reporta la influencia de la polaridad del solvente y su respectiva afinidad química con la matriz polimérica y el activo encapsulado. Tanto la PCL como el CA tienen una mayor afinidad con los simulantes apolares, lo que supone una mayor difusión del solvente en el seno de la matriz polimérica, con su consecuente relación y liberación del activo (también afín al medio solvente).

También se estimó la difusión aparente (D) del activo, considerando que el proceso se desarrolla a través de una lámina homogénea, de grosor equivalente al de la capa electrodepositada ($0,16 \pm 0,08$ mm). Sin embargo, la estructura revelada por FESEM (Figura 3) presenta huecos (poros) entre las fibras, que afectarán al acceso del simulante al interior de la matriz por capilaridad. En la Figura 5 se presentan las curvas correspondientes al ajuste del modelo de Fick por un método no lineal ($SSE < 0,12$). Los valores del coeficiente de difusión D (Tabla 1) más altos se obtuvieron para el sistema totalmente apolar (simulante D₂) y los más bajos para el simulante A, en coherencia con lo obtenido desde el ajuste del modelo de Peleg. Este comportamiento también fue

reportado por Ramos *et al.*, 2014 con el estudio de la liberación de CA desde capas de polipropileno. Dado ese comportamiento del material electrodepositado en los diferentes simulantes, se puede esperar una liberación de CA completa y rápida en los sistemas alimentarios con marcado carácter apolar, mientras que a medida que aumente el carácter polar, esa liberación se produzca a menor velocidad y solo parcialmente.

4.3 Propiedades de los films de almidón con nanofibras de PCL y CA

Se evaluó la mejora aportada por la capa electrodepositada de PCL (durante 60 o 90 min) en las propiedades funcionales de los films multicapa de almidón termoprocesado, que podría actuar como material de envasado activo para alimentos. Las Tablas 2 y 3 presentan las diferentes propiedades estudiadas, donde se puede apreciar la influencia de la capa de PCL con o sin el activo. En general, la electrodeposición de PCL por diferentes tiempos no generó diferencias significativas en cuanto al grosor de las multicapas, que presentaron un aumento promedio de 70-120 μm frente a la bicapa con solo almidón (SS). Eso indica que, durante la termocompresión, las capas de nanofibras funden y se compactan de tal manera que su grosor inicial no afectó al grosor de las multicapas finales. El contenido de humedad de las multicapas no se vio afectado por la presencia de las fibras de polímero hidrofóbico, siendo de $7,3\pm 0,2$ g/100 g film seco.

Tabla 2. Propiedades de barrera (permeabilidad al vapor del agua: WVP y permeabilidad al oxígeno: OP) y mecánicas (módulo elástico: ME, tensión de fractura: TS y extensibilidad: $\%\epsilon$) de las multicapas de almidón con el material electrodepositado. Las diferentes letras (superíndices) en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las multicapas.

	Multicapas				
	SS	SP ₁ S	SP(CA ₁)S	SP ₂ S	SP(CA ₂)S
WVP[g·mm/(kPa·h·m ²)]	21±6 ^b	9±1 ^a	7±1 ^a	5±2 ^a	6±2 ^a
OP x 10 ¹⁴ [cm ³ / Pa·s·m]	2,2±0,6 ^a	3,5±0,8 ^a	2,6±0,12 ^a	5±2 ^a	4±2 ^a
ME [MPa]	206±21 ^b	149±23 ^a	126±34 ^a	192±32 ^b	126±23 ^a
TS [MPa]	9,7±0,7 ^d	7±2 ^{bc}	6,2±0,9 ^{ab}	8±1 ^c	5,8±0,8 ^a
$\%\epsilon$	39±4 ^b	34±15 ^{ab}	34±10 ^{ab}	36±5 ^{ab}	29±6 ^a
Grosor [mm]	0,38±0,07 ^a	0,45±0,01 ^b	0,45±0,01 ^b	0,44±0,03 ^b	0,5±0,02 ^b

En cuanto a las propiedades barrera, la WVP fue mejorada en presencia de las fibras de PCL, con una reducción de 65 y 80 % para las fibras aplicadas durante 60 y 90 minutos, respectivamente. Esto demuestra la efectividad de la capa central hidrofóbica de nanofibras para limitar el transporte de las moléculas de agua, resultado similar al observado por Ortega-Toro *et al.*, 2015. No se observó un cambio drástico en cuanto a la permeabilidad al oxígeno, ya que las capas exteriores de almidón del material analizado exhiben una muy buena barrera (bajos valores de OP) a este gas.

Con respecto a las propiedades mecánicas, la presencia de la capa electrodepositada generó una disminución del módulo elástico (ME) y la resistencia a la fractura (TS) del material, con respecto a la multicapa de SS. Esto se puede atribuir a la discontinuidad

interfacial introducida por la capa de poliéster, dado que este no presenta una gran afinidad química con el polisacárido, reduciendo así las fuerzas de cohesión en la zona de contacto de las capas. La extensibilidad (%ε) del material no cambió con la capa electrodepositada, salvo en el caso de la multicapa que contenía las nanofibras de PCL con CA con 90 minutos de aplicación. En este caso se observó una disminución de la resistencia a la fractura y en la extensibilidad. Este efecto (que también fue notado en menor intensidad para la multicapa con CA electrodepositado 60 minutos) se puede explicar por la migración parcial del CA en la capa de almidón, debilitando la matriz del polisacárido, lo que promueve la rotura.

Tabla 3. Propiedades ópticas de las multicapas (transmitancia interna: T_i ; brillo (60°); luminosidad: L^* ; croma: C_{ab} ; tono: h_{ab}). Las diferentes letras (superíndices) en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las multicapas.

	Multicapas				
	SS	SP ₁ S	SP(CA ₁)S	SP ₂ S	SP(CA ₂)S
T_i [460 nm]	0,73±0,01 ^c	0,72±0,01 ^{bc}	0,69±0,01 ^{ab}	0,69±0,04 ^{ab}	0,69±0,02 ^a
Brillo [60°]	15±2 ^b	17±4 ^d	9±2 ^a	18±5 ^b	10±3 ^a
L^*	65,7±0,6 ^b	64,8±0,9 ^{ab}	64,6±0,8 ^{ab}	66±2 ^b	64,2±0,4 ^a
C_{ab}	21,3±0,3 ^{ab}	21,2±0,3 ^{ab}	21,0±0,6 ^{ab}	21±1 ^a	21,7±0,3 ^b
h_{ab}	79,8±0,4 ^c	79,4±0,4 ^{bc}	78,9±0,6 ^{ab}	79,5±0,5 ^c	78,7±0,2 ^a

Con respecto a las propiedades ópticas (Tabla 3), la presencia de la capa de PCL afectó la transmitancia interna (T_i), porque aporta más opacidad, tal como observó Ortega-Toro *et al.*, 2015. En cuanto al tono, las multicapas presentaron un ligero tono amarillo (h_{ab}) independientemente del grosor de la capa electrodepositada.

5. Conclusiones

Las capas de PCL con CA generadas por ES presentaron una mayor y más rápida liberación del activo en los simulantes de alimentos ricos en fase grasa (simulantes D1 y D2), donde se registró una liberación prácticamente completa del CA. Sin embargo, en simulantes que emulan alimentos más polares (A y B), la migración ocurrió a una velocidad más lenta, liberándose menor cantidad (57-75%).

Las nanofibras electrodepositadas entre capas de almidón termoprocesado presentaron una notablemente menor permeabilidad al vapor del agua, pero no modificaron sustancialmente el resto de propiedades funcionales de material de envasado.

Este estudio demuestra que la encapsulación de CA en fibras de PCL obtenidas por *electrospinning* y su deposición en films de almidón para obtener multicapas biodegradables puede ser una alternativa interesante para mejorar las propiedades de este material polimérico de bajo coste, aportando actividad antimicrobiana y antioxidante a los films multicapa y mejorando la capacidad de barrera al vapor de agua que tanto limita su uso como material de envasado para alimentos.

6. Bibliografía

ASTM. (1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. standard designations: E96-95. In ASTM, annual book of ASTM (pp. 406-413). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

ASTM. (1999). Standard test method for specular gloss. In Designation (D523). Annual book 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. Standard Designations: D882. In Annual book of ASTM standards (pp 162-170). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

BAHRAMI, S. H., & GHOLIPUR KANANI, A. (2011). Effect of changing solvents on poly(ϵ -Caprolactone) nanofibrous webs morphology. *Journal of Nanomaterials*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/724153>

BHARDWAJ, N., & KUNDU, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>

BURT, S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (3) 223– 253 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

CRANK, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*, (2nd ed.) London: Oxford University Press, (Chapter 4).

ELIKA, Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria, visto el 16 de Mayo de 2018. *Alteracion de los alimentos* (pdf). <https://alimentos.elika.eus/wp-content/uploads/sites/2/2017/10/7.Alteraci%C3%B3n-de-los-alimentos.pdf>

GENNADIOS, A., WELLER, C. L., & GOODING, C. H. (1994). Measurement errors in wáter vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21(4), 395e409. ISSN 0260-8774 [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90062-0).

GUARDA, A., F RUBILAR, J., MILTZ, J & GALOTTO, M (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology* 146 (2011) 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.011>

HUTCHINGS, J. B. (1999). *Food and Colour Appearance*, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.

LOURDIN, D., VALLE, G & COLONNA, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers* 27 (1995) 261-270.
[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00071-2](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00071-2)

MAPAMA (2011). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Visto el 16 de Mayo de 2018. Memoria anual de generación y gestión de residuos. Residuos de competencia municipal. 2015. (pdf)
http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/memoriaanualdegeneracionygestionderesiduosresiduosdecompetenciamunicipal2015_tcm30-438175.pdf

MULLER, J., GONZALEZ, C & CHIRALT, A. (2017a). Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *European Polymer Journal* 95 (2017) 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.019>

MULLER, J., CASADO, A., GONZALEZ, C & CHIRALT, A (2017b). Antimicrobial properties and release of cinnamaldehyde in bilayer films based on polylactic acid (PLA) and starch. *European Polymer Journal* 96 (2017) 316–325.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.009>.

ORTEGA-TORO, R., MOREY, I., TALENS, P., & CHIRALT, A. (2015). Active bilayer films of thermoplastic starch and polycaprolactone obtained by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 127, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.080>

PELEG, M. (1988). An Empirical Model for the Description Moisture Sorption Curves. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216–1217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13565.x>

PERDONES, A., CHIRALT, A., VARGAS, M., (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids* 57 (2016) 271e279. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.006>

PLACKETT, D. (2011). *BIOPOLYMERS- New materials for sustainable films and coatings*. Editorial John Wiley & Sons, Incorporated. United States. 354 pp.

RAMOS, M., JIMENEZ, A., PELTZER, M & GARRIGÓS, M. (2011). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 513–519
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.031>

RAMOS, M., BELTRÁN, A., PELTZER, M., VALENTE, A. J. M., & GARRIGÓS, M. del C. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 470–477.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.019>

- REQUENA, R., JIMENEZ, A., VARGAS, M & CHIRALT, A. (2016). Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] active bilayer films obtained by compression moulding and applying essential oils at the interface. *Polym Int* 2016; 65: 883–891
<https://doi.org/10.1002/pi.5091>
- REQUENA, R., VARGAS, M., & CHIRALT, A. (2017). Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. *European Polymer Journal*, 92(May), 185–193.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.05.008>
- TAMPAU, A., GONZALEZ-MARTINEZ, C., & CHIRALT, A. (2017). Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning. *Journal of Food Engineering*, 214, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.005>
- TAMPAU, A., GONZALEZ-MARTINEZ, C., & CHIRALT, A. (2018). Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ϵ -caprolactone) nanofibres. Application in starch multilayer films. *Food Hydrocolloids* 79 (2018) 158-169.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.021>
- TEHRANY, E. A., & DESOBRY, S. (2007). Partition coefficient of migrants in food simulants/polymers systems. *Food Chemistry*, 101(4), 1714–1718.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.058>
- TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, V., VENUTI, V., SULFARO, V., & DE PASQUALE, A.(2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549e554.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>