



# RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS A BASE DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSA Y ACEITE ESENCIAL DE ÁRBOL DE TE

**MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**Alumno:**

Marta María Bagán Tomás

**Directoras académicas:**

Chelo González Martínez

Maite Cháfer Nácher

Amparo Chiralt Boix

**Directora experimental:**

Laura Sánchez González

**Centro:** Instituto Universitario de  
Ingeniería de Alimentos para el  
desarrollo

Valencia, Septiembre 2009

# RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS A BASE DE HIDROXIPROPILMETILCELULOSA Y ACEITE ESENCIAL DE ÁRBOL DE TÉ

Marta María Bagán Tomás, Laura Sánchez González<sup>1</sup>, Chelo González Martínez<sup>1</sup>, Maite Cháfer<sup>1</sup>, Amparo Chiralt Boix<sup>1</sup>

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo general obtener nuevos recubrimientos comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y aceite esencial de árbol de té (AT), incorporado por sus propiedades antimicrobianas. Se diseñaron formulaciones formadoras de recubrimientos (FFR) utilizando HPMC como matriz soporte y diferentes concentraciones de AT y se determinó el pH, densidad, potencial- $\zeta$ , propiedades reológicas y tamaño de partícula de las FFR. Además se obtuvieron los recubrimientos aislados, que fueron caracterizados en cuanto a permeabilidad al vapor de agua (PVA), isotermas de sorción, propiedades mecánicas y ópticas y microestructura. También se realizó un estudio microbiológico "in vitro" para evaluar la capacidad antimicrobiana de dicho film frente a *L.monocytogenes*.

Los resultados mostraron que el aumento en el contenido de AT promovió cambios en el tamaño. Con respecto a las propiedades del film, el mayor contenido de AT disminuyó la PVA y la capacidad de absorción de agua. En general, la adición de AT en la matriz de HPMC condujo a una disminución significativa en el brillo y transparencia, aunque no se observaron diferencias significativas en el módulo de elasticidad de los films. Las propiedades de los films estaban relacionadas con su microestructura, que fue observada por SEM. El estudio mostró que el AT posee actividad antibacteriana contra *L.monocytogenes*.

**PALABRAS CLAVE:** film, propiedades fisicoquímicas, mecánicas, ópticas, *Listeria monocytogenes*, isotermas, microestructura, brillo, *Melaleuca alternifolia*.

## RESUM

Aquest treball té com objectiu general obtenir nous recobriments comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) i oli essencial d'arbre de te (AT), incorporat per les seues propietats antimicrobianes. Es van dissenyar formulacions formadores de recobriment (FFR) utilitzant HPMC com a matriu suport i diferents concentracions de AT.

---

<sup>1</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

Es va determinar el pH, densitat, potencial- $\zeta$ , propietats reològiques i tamany de partícula de les FFR i es van obtenir els recobriments aïllats, que van ser caracteritzats quant a permeabilitat al vapor d'aigua (PVA), isoterms de sorció, propietats mecàniques i òptiques i microestructura. També es va realitzar un estudi microbiològic "in Vitre" per evaluar la capacitat antimicrobiana del film front a *L.monocytogenes*.

El resultat mostraren que l'augment del contingut de AT va promoure canvis al tamany de les partícules de FFD. Amb respecte a les propietats del film, quant més quantitat de AT, menys va ser la PVA y la capacitat de sorció. En general, l'adició de AT a la matriu de HPMC va causar una disminució significativa a la brillantor i transparència, encara que no hagueren diferències significatives al mòdul d'elasticitat dels films. Les propietats dels films tenien relació amb la seua microestructura, que va ser observada per SEM. L'estudi mostra que el AT té activitat antimicrobiana front a *L.monocytogenes*.

PARAULES CLAU: film, propietats fisicoquímiques, mecàniques, òptiques, *Listeria monocytogenes*, isoterms, microestructura, brillantor, *Melaleuca alternifolia*.

## ABSTRACT

The aim of this work is to develop new edible coatings based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) and tea tree Essentials oil (TTO), which was incorporated due to its antimicrobial properties. Film-forming dispersions (FFD) were prepared by mixing HPMC (support matrix) and different contents of AT. FFD were analysed in terms of Ph, density,  $\zeta$ -potential, particle size and rheological behaviour. Water vapour permeability (WVP), sorption isotherms, mechanical and optical properties, and microstructure of the dry coatings were also analysed. We also performed a microbiological study in vitro to assess the antimicrobial capacity of that film against *L. monocytogenes*.

Results showed that the increase in TTO content promoted changes in the size of the FFD particles. With regards to the film properties, the higher the TTO content, the lower the WVP and the moisture sorption capacity. In general, the addition of TTO into the HPMC matrix leads to a significant decrease in gloss and transparency, although no significant differences were seen in the modulus of the composite films. The properties of the films were related with their microstructure, which was observed by SEM. The study showed that the AT has antibacterial activity against *L. monocytogenes*.

KEY WORDS: coating, physicochemical, mechanical, optical properties, *Listeria monocytogenes*, isotherms, microstructure, gloss, *Melaleuca alternifolia*.

## INTRODUCCIÓN

Los cambios en los hábitos alimentarios están ejerciendo un efecto determinante sobre las áreas de innovación tecnológica y especialmente en la producción de alimentos, para que estos conserven al máximo las características de un producto fresco. En este sentido, deben aplicarse técnicas de conservación, que combinadas o no, puedan mantener o mejorar las características originales del producto, alargando su vida útil sin que se pierdan las características sensoriales y nutricionales, asegurando además su estabilidad microbiológica. Es aquí donde el uso de recubrimientos comestibles (RC) constituye una interesante alternativa.

Los recubrimientos comestibles se definen como productos comestibles que forman una fina capa sobre el alimento (Guilbert, 1986; Gennadios y Weller, 1990). Constituyen una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua que retrasa el deterioro del alimento (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997), mejoran las propiedades mecánicas (Mellenthin et al., 1982), ayudan a mantener la integridad estructural del producto que envuelven, a retener compuestos volátiles (Nisperos-Carriedo y Shaw, 1990). También pueden actuar como vehículo de aditivos alimentarios (antimicrobianos, microorganismos de control biológico, antioxidantes, aromatizantes, colorantes, etc.) (Kester y Fennema, 1986).

Los compuestos utilizados en la formulación de recubrimientos comestibles deben estar autorizados por la legislación vigente. En la Unión Europea estos materiales se regulan por la directiva 95/2/CE de 20 de Febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los edulcorantes.

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), es un derivado de la celulosa que resulta interesante para su incorporación en recubrimientos comestibles, porque es inodoro, insípido y biodegradable (Krochta y Mulder-Johnston, 1997). Los polisacáridos se caracterizan por formar redes moleculares cohesionadas por una alta interacción entre sus moléculas (puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals, London, Debye, de cristalización o de valencia primaria) (Sothornvit y Krochta, 2005). Esta cohesión molecular les confiere buenas propiedades mecánicas, pudiendo ejercer de matriz estructural del recubrimiento (Guilbert, 1986). Además su coste de aplicación es bajo. El HPMC presenta excelentes propiedades (Nisperos-Carriedo, 1994; Villalobos et al., 2006) y es muy eficiente barrera a gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) (Kester y Fennema, 1986; Park et al., 1993; Nisperos-Carriedo, 1994). Sin embargo, los films de HPMC son altamente permeables al vapor de agua, lo que es una importante desventaja para su aplicación en alimentos (Krochta y Mulder-Johnston, 1997), ya que de esta forma el producto es susceptible de captar o ceder humedad.

También se pueden formular films compuestos, en los que se combinan las ventajas de los componentes hidrocoloides y lipídicos, éstos últimos como barrera al vapor de agua y los primeros como barrera selectiva al oxígeno y al dióxido de carbono, además de proveer una matriz de soporte estructural (Kester y Fennema, 1986; Baldwin et al., 1997).

Resulta interesante caracterizar tanto las formulaciones como los recubrimientos secos. Las formulaciones presentan características fisicoquímicas como densidad, ph, potencial- $\zeta$ , tamaño de partícula y reología que va a condicionar las posibles interacciones y propiedades en el film seco. Por otro lado, también es importante conocer diferentes las propiedades fisicoquímicas de los films que se estudian: las propiedades mecánicas, las cuales permiten conocer la aptitud de los mismos para su posterior aplicación en alimentos, y predecir su resistencia mecánica durante la manipulación por parte del consumidor. Otras características interesantes de los films necesarias para esclarecer y comprender los mecanismos que regulan sus propiedades mecánicas y permeabilidad son las isoterms de sorción de agua y su microestructura. La apariencia o aspecto es otro de los factores de calidad decisivo para la aceptación de un producto por parte del consumidor. Por ello, el color y el brillo también son objeto de análisis en numerosos trabajos de recubrimientos y films comestibles (Trezza y Krochta, 2000).

Por otro lado, la incorporación de agentes antimicrobianos en los recubrimientos constituye una técnica innovadora en el mantenimiento de la seguridad, la inocuidad y vida útil de alimentos y en especial, de los mínimamente procesados. El crecimiento de microorganismos en la superficie de productos es una de las principales causas de su deterioro, pudiendo ser evitado mediante el uso de agentes antimicrobianos

El uso de coberturas comestibles como transporte de agentes antimicrobianos para el recubrimiento de productos es reciente. Entre los compuestos más utilizados se encuentran los ácidos orgánicos y sus sales, sulfitos, nitritos, bacteriocina, enzimas, entre otros (Suppakul et al., 2003). Una de las tendencias más recientes consiste en la incorporación de compuestos de origen natural, tales como el própolis (Kim et al., 2001) o extractos de plantas tales como canela, vainillina, y más recientemente los aceites esenciales (Suppakul et al., 2003; Shelef, 1983; Deans y Ritchie, 1987; Aureli et al., 1992; Lis-Balchin y Deans, 1996; Smith- Palmer et al., 1998). Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas que dan aroma característico a algunas flores, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Son intensamente aromáticos, no grasos, volátiles y livianos. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales.). Su actividad antimicrobiana es debida a la presencia de diferentes terpenos ( Panuwat et al 2003).

Kim y col. (2004) evaluaron la eficacia del aceite esencial de árbol de té (AT) como posible agente antimicrobiano y antioxidante. Estudios recientes enfatizan el amplio espectro del AT, el cual es efectivo contra hongos, levadura, virus y bacterias (Carson y Riley, 1993). Los mecanismos de acción del AT no están claramente identificados pero parece que están relacionados con la naturaleza hidrofóbica de los terpenos (Bakkali et al., 2008; Burt, 2003)

Una de las bacterias que más interés ha suscitado a lo largo de los años ha sido *Listeria monocytogenes* debido a la gran importancia que presenta como uno de los principales patógenos asociados a los alimentos.

Sus efectos sobre la salud humana son perjudiciales, ya que puede provocar abortos, meningoencefalitis y meningitis especialmente en neonatos, ancianos e inmunodeprimidos. (Farber y Peterkin, 1991).

Son numerosos los aceites esenciales que han demostrado poseer actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, al igual que algunos extractos de plantas. Smith-Palmer et al. (2001) demostraron que tal actividad se ve afectada por las condiciones experimentales, el medio, el alimento o la temperatura de incubación. En estudios "in vitro" se ha demostrado la eficacia de diferentes aceites esenciales sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* en niveles comprendidos entre 0.2 y 10  $\mu\text{l ml}^{-1}$ . Sin embargo, otros estudios señalan que los organismos Gram negativos son ligeramente menos susceptibles que las bacterias Gram positivas a la actividad antimicrobiana que manifiestan los aceites esenciales (Burt, 2003).

El presente trabajo analiza el efecto que tiene la incorporación del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, también conocido como aceite esencial de árbol de té (AT) en las características de films obtenidos a base de hidroxipropilmetilcelulosa. Para ello, se han caracterizado las propiedades físico-químicas de la emulsión (propiedades reológicas, tamaño de partícula, pH, densidad y  $\zeta$ -potencial) y de los recubrimientos secos (espesor, propiedades barrera al vapor de agua, isoterma de sorción, propiedades mecánicas y ópticas y microestructura). También se realizó un estudio microbiológico "in vitro" para evaluar la capacidad antimicrobiana de dicho film frente a *L. monocytogenes*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. DISEÑO Y PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES FORMADORAS DE RECUBRIMIENTO**

Para la obtención de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFR) se utilizó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, E-464, Methocel Food grade, Dow Chemical Company, Midland, EEUU) y aceite esencial de árbol de té (AT, Herbes del moli, Alicante, España).

La metodología de preparación de las FFR fue estandarizada del siguiente modo. El HPMC (1% p/p) fue dispersado en agua destilada, se calentó a una temperatura de 80°C y una vez alcanzada dicha temperatura se dejó de aplicar calor y se agitó durante 2 horas. Después, se añadió AT a las disoluciones (T = 25°C): 0,5. % p/p, 1% p/p y 2 % p/p, Las FFR fueron homogeneizadas con un Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos y desgasificadas con una bomba de vacío (Diaphragm vacuum puma, Wertheim, Alemania) a temperatura ambiente.

#### **1.1. Propiedades físicoquímicas de las formulaciones**

##### **1.1.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA**

El tamaño de partícula de las formulaciones se determinó usando un difractómetro láser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

Las muestras fueron dispersadas en agua destilada a 2000 rpm hasta que se obtuvo un nivel de obscuración en el intervalo 5 - 10%. Para aplicar la teoría Mie, se consideró un índice de refracción de 1,46 y una absorción de 0 para las partículas dispersas.

Se determinó el tamaño de partícula, por cuadruplicado, en tres muestras de cada una de las FFR. El tamaño medio de las partículas fue expresado en términos de los parámetros  $d_{43}$  y  $d_{32}$ , (Ec. 1 y Ec. 2).

$$d_{32} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (1)$$

$$d_{43} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^4}{\sum n_i \cdot d_i^3} \quad (2)$$

### 1.1.2. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA

El comportamiento reológico de las FFR se analizó, por cuadruplicado, a 25°C, usando un reómetro rotatorio (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania). Se midió el esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función del gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ) desde 0 a 512 s<sup>-1</sup> de la siguiente manera: 5 minutos hasta alcanzar el gradiente de velocidad máximo y 5 minutos hasta descender a 0. Las curvas de flujo obtenidas se ajustaron a La Ley de la potencia (Ec.3) para determinar el índice de comportamiento al flujo (n) y el índice de consistencia (K) de las formulaciones. La viscosidad aparente fue calculada a 100 s<sup>-1</sup> y 400 s<sup>-1</sup>.

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (3)$$

### 1.1.3. pH Y DENSIDAD

El pH de las formulaciones fue medido con un pH-metro GLP 21+ (Crison, Barcelona, España) a 25°C. Se determinó por triplicado, en cada una de las FFR.

La densidad de las formulaciones fue medida con un densímetro digital DA-110M, (Mettler Toledo, Barcelona, Spain. Se determinó por duplicado en cada una de las FFR.

### 1.1.4. POTENCIAL - $\zeta$

El método seguido para realizar las medidas del potencial- $\zeta$  fue diluir las FFD en gotas hasta alcanzar una concentración de 0,02% de AT usando agua desionizada. El potencial- $\zeta$  se determinó a 25°C con un Zetasizer nano-z ((Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se utilizó el modelo matemático de Smoluchowsky para convertir las medidas de movilidad electroforética en valores de potencial- $\zeta$ . Se determinó por cuadruplicado para cada una de las FFR.

## 2. OBTENCIÓN DE LOS FILMS SECOS

Las distintas FFR fueron vertidas en placas niveladas de politetrafluoretileno (PTFE) de 15 cm de diámetro, y se secaron a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa de 60% durante 48 horas. El espesor de los films se controló ajustando una misma densidad de sólidos superficiales a 56 g/m<sup>2</sup>.

### 2.1. Propiedades fisicoquímicas de los films secos

#### 2.1.1. DETERMINACIÓN DEL ESPESOR DE LOS FILMS

El espesor de los films fue medido utilizando un micrómetro digital (Palmer -Comecta, España). Se midió el espesor en 3 puntos (uno en el centro y 2 en el perímetro) en las muestras utilizadas para los ensayos de permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas.

#### 2.1.2. ISOTERMAS DE SORCIÓN

Los films una vez secados en desecadores con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se recortaron con un tamaño de  $\phi = 3$  cm, se introdujeron en el interior de las placas petri. Las muestras de cada una de las formulaciones fueron colocadas, por triplicado, en desecadores que contenían sales saturadas: LiCl, CH<sub>3</sub>COOK, Mg(Cl)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaBr, KI, NaCl, KCl, las cuales se mantuvieron a 20°C en un incubador Hot-Cold M4000668 (P-Selecta, Barcelona, España), para mantener unas humedades relativas constantes (Greenspan, 1977)

Los films fueron pesados periódicamente ( $\pm 0,00001$  g) hasta que alcanzaron peso constante, y se asume que se ha alcanzado el equilibrio (Spiess y Wolf, 1983). Finalmente, la humedad de equilibrio de las muestras ( $W_e$ ) se determinó utilizando una estufa de vacío (0.8bar) a 70°C durante 24 horas. Se obtuvieron las curvas humedad de equilibrio (b.s) vs. actividad de agua.

#### 2.1.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

Las muestras utilizadas para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) fueron almacenadas en desecadores a 54.4% HR y 20°C durante al menos 15 días, antes de realizar las determinaciones.

La PVA fue medida según el método de la ASTM E-96-95 (ASTM, 1995), las muestras fueron montadas entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 35 mm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica).

En el interior de la copa de permeabilidad se depositó agua destilada para conseguir una humedad relativa del 100% ( $P_{w0}$ ) en una cara del film, mientras que se empleó una disolución saturada de nitrato magnesio (HR: 54.4%) para controlar la humedad relativa en la otra cara del film ( $P_{w2}$ ).



Las determinaciones se realizaron a 20°C. Un ventilador, situado en la parte superior de la copa, se utilizó para eliminar el vapor de agua que atraviesa el film.

Las medidas de la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) se realizaron a 20°C y el peso de las copas fue determinado a intervalos 1,5 horas durante un periodo de al menos 10 horas. La pendiente de la curva peso vs. tiempo (J) fue determinada para calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua, VTVA, (Ec. 4). Para cada tipo de film, las medidas de PVA (Ec.5) se realizaron en al menos tres muestras para cada una de las formulaciones.

$$VTVA = \frac{J}{t \cdot A} \quad (4)$$

$$PVA = \frac{VTVA}{P_{w1} - P_{w2}} \cdot L \quad (5)$$

Donde: VTVA, velocidad de transmisión de vapor de agua,  $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ; J, pendiente de la curva de pérdida de peso en el tramo lineal,  $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$ ; A, área efectiva para la transmisión de vapor de agua,  $\text{m}^2$ ;  $P_{w1}$ , presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara orientada hacia el interior de la celda, Pa;  $P_{w2}$ , presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara orientada hacia el exterior de la celda, Pa; L, espesor del film, m

El método ASTM establece que la resistencia al transporte de agua, a través del espacio de aire entre la superficie del agua y el film es despreciable ( $P_{w0} = P_{w1}$ ). Sin embargo, para films hidrofílicos, esto no se cumple y puede inducir a importantes errores en la permeabilidad calculada. Así para considerar el efecto de la capa estanca de aire en las medidas de PVA, los valores de  $P_{w1}$  fueron calculados aplicando las ecuaciones 6 y 7 (Gennadios et al., 1994).

$$P_{w1} = P_t - (P_t - P_{w0}) \cdot e^{-\frac{N_w h_i}{cD}} \quad (6)$$

$$N_w = (6,43 \cdot 10^{-11}) \cdot VTVA \quad (7)$$

$$c = \frac{P_t}{R \cdot T} \quad (8)$$

$$D = 0,26 \left( \frac{T}{298} \right)^{1,8} \quad (9)$$

Donde:  $P_t$ , presión total del sistema, Pa;  $P_{w0}$ , presión de vapor saturado del agua a la temperatura de trabajo, Pa;  $N_w$ , flujo de agua en el film,  $\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $h_i$ , distancia entre el agua desionizada y el film, m; C, concentración molar total de aire y vapor de agua,  $\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ ; D, difusividad del vapor de agua en el aire,  $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ; T, Temperatura de trabajo, K; R, Constante universal de los gases,  $\text{Pa}\cdot\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$

#### 2.1.4. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las muestras utilizadas para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) fueron almacenadas en desecadores a 54,4% HR y 20°C durante al menos 15 días, antes de realizar las determinaciones. Los ensayos mecánicos se realizaron mediante un analizador de textura Texture Analyser TA-XT-plus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido), con una célula de carga de 50 N y pinzas de tensión (ATG).

Las muestras (25,4 x 100 mm) fueron colocadas dejando una separación entre las pinzas de 50 mm y el ensayo se realizó a una velocidad de 50 mm/min (ASTM, 2001). El esfuerzo de fractura ( $\sigma_F$ ), el porcentaje de deformación en el momento de la rotura (% E) así como el módulo de elasticidad (ME) de los films fueron evaluados en al menos 8 muestras de cada una de las formulaciones. El esfuerzo de fractura fue calculado dividiendo la fuerza máxima necesaria para la ruptura del film por la sección transversal del film. E fue calculado dividiendo la deformación del film en el momento de la rotura por la longitud inicial (50 mm). El módulo de elasticidad se corresponde con la pendiente de la curva esfuerzo de tracción frente a deformación en el tramo lineal inicial.

Las curvas Fuerza vs. distancia obtenidas en los ensayos mecánicos fueron transformadas en curvas esfuerzo vs. deformación de Hencky (Peleg, 1979), utilizando las ecuaciones 10 y 11.

$$\sigma = \frac{F \cdot (L_0 + L(t))}{A_0 \cdot L_0} \quad (10)$$

$$\varepsilon_H = Ln \frac{L_0 + L(t)}{L_0} \quad (11)$$

Donde:  $\sigma$ , esfuerzo, Pa; F, fuerza, N; L (t), longitud del film a tiempo t, m;  $L_0$ , longitud inicial del film, m;  $A_0$ , área transversal inicial del film, m<sup>2</sup>;  $\varepsilon_H$ , deformación de Hencky.

#### III.2.1.5. TRANSPARENCIA Y COLOR

Los films fueron equilibrados a 54,4% de HR antes de las determinaciones de transparencia que se realizaron a través del espectro de reflexión de las muestras obtenido con un espectro colorímetro CM-3600d (Minolta Co, Tokio, Japón), con un área de medida de 10 mm.

Las mediciones se efectuaron por triplicado en 5 muestras de cada tipo de film, sobre un fondo blanco y negro. La transparencia fue determinada aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) a los espectros de reflexión de las muestras. La luz que pasa a través de la muestra se ve afectada por el coeficiente de absorción (K) y el coeficiente de dispersión (S) (Ec. 12). En esta ecuación,  $R_\infty$  es la reflectancia de la muestra con un espesor infinito, determinada a través de las ecuaciones 13 y 14 en función de la reflectancia de la muestra (R), medida sobre un fondo negro de reflectancia conocida ( $R_g$ ) y  $R_0$  es la reflectancia de la muestra sobre un negro ideal.

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} \quad (12)$$

$$R_{\infty} = a - (a^2 - 1)^{1/2} \quad (13)$$

$$a = \frac{1}{2} \left( R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 \cdot R_g} \right) \quad (14)$$

Valores bajos de K/S, se asocian con estructuras cerradas y materiales opacos, mientras que valores altos se relacionan con estructuras abiertas y materiales transparentes.

#### 2.1.6. BRILLO

El brillo de las muestras fue determinado en al menos 5 muestras de cada tipo de film usando un brillómetro plano (Multi-Gloss 268, Minolta, Alemania) a ángulos de incidencia de 60° perpendicularmente a la superficie del films, de acuerdo con el estándar D523 de la ASTM (ASTM, 1999). Antes de las determinaciones, los films fueron acondicionados en desecadores a 20°C y 54,4% HR durante al menos dos semanas. Para llevar a cabo las determinaciones, los films fueron colocados sobre un estándar mate. Los resultados fueron expresados en unidades de brillo, relativas a una superficie estándar negra altamente pulida con un valor de brillo cercano a 100.

#### 2.1.7 MICROESTRUCTURA

Los films se almacenaron en desecadores con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> durante al menos 15 días. El análisis de la microestructura de la superficie y secciones transversales los films se realizó utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) con un microscopio JEOL JSM-5410 (Japón). Se obtuvieron muestras de 5 x 1mm que se colocaron sobre portaobjetos de cobre. Las muestras fueron metalizadas con oro y observadas a 10 KV. La microestructura se observó en una muestra de cada tipo de film.

### 3. EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DE LOS FILMS A BASE DE HPMC Y AT

#### 3.1. Preparación de la cepa

El cultivo de *Listeria monocytogenes* (CECT 2294) fue obtenido a partir de liófilos suministrados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, Valencia).

La cepa conservada a  $-25^{\circ}\text{C}$  en TSB (Tryptic Soy Broth, Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, España) complementado con 30% de glicerol (Panreac, Barcelona, España), fue regenerada sembrando una asa en 10ml de medio de cultivo (TSB). Tras un periodo de incubación de 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ , se transfirió 10  $\mu\text{l}$  de este primer cultivo a 10ml de TSB e incubándolo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. Una dilución de este cultivo será utilizada para el posterior ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana de los films.

### **3.2. Actividad antimicrobiana de los films**

La metodología utilizada es una adaptación del artículo de Kristo et al (2008). TSA con 3% NaCl (Panreac, Barcelona, España) (TSANaCl) fue utilizado como sistema modelo simulando un alimento sólido. Se vertieron alícuotas de TSANaCl (20g) en placas Petri. Una vez solidificado el medio de cultivo, se inocularon las placas en superficie con una dilución del cultivo de trabajo de *Listeria monocytogenes* ( $10^2\text{UFC}/\text{cm}^2$ ). Posteriormente se depositaron los diferentes films en la superficie inoculada. Una placa de TSANaCl inoculada fue utilizada como control del ensayo. Las placas cerradas con parafilm para evitar problemas de deshidratación fueron almacenadas durante 12 días a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Se realizó un seguimiento del crecimiento de la cepa periódicamente durante el tiempo de almacenamiento (concretamente en los días 0,3,5,7,12). El agar fue retirado de las placas Petri en condiciones de esterilidad e introducido en bolsas de Stomacher. En cada bolsa, se añadieron 100mL de agua peptonada (tryptone phosphate water, Scharlau Chemie, S.A., Barcelona, España). Tras agitar las bolsas durante 1 minuto en un Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience), cada muestra fue diluida con agua peptonada y sembrada en profundidad con TSA. Tras un periodo de incubación de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , las colonias fueron contadas. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

## **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) mediante el software Statgraphics plus® versión 5.1, utilizando el nivel de significación del 95%.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento.**

#### **3.1.1. DENSIDAD, pH, $\zeta$ -POTENCIAL Y TAMAÑO DE PARTÍCULA**

Los valores de densidad, pH y potencial- $\zeta$  para las distintas FFR se muestran en la Tabla 1.

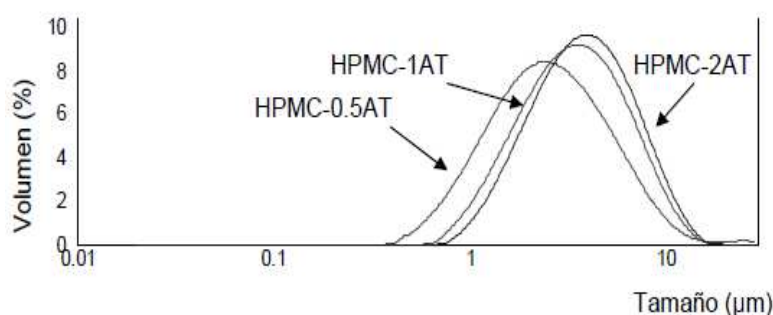
**TABLA 1.** Valores de densidad, pH y potencial-  $\zeta$ . Valores medios y desviación estándar

FFD	$\rho$ (Kg/m <sup>3</sup> )	pH	potencial $\zeta$ (mV)
HPMC	1002.47(0.35) <sup>a</sup>	7.87( 0.06) <sup>a</sup>	-
HPMC-0,5AT	1002.46(0.31) <sup>a</sup>	6.98(0.03) <sup>b</sup>	-2.76(0.09) <sup>b</sup>
HPMC-1AT	1002.32(0.22) <sup>a</sup>	5.74(0.02) <sup>c</sup>	-2.7(0.4) <sup>b</sup>
HPMC-2AT	1000.75(0.06) <sup>b</sup>	4.70(0.01) <sup>d</sup>	-2.72(0.08) <sup>b</sup>

a,b,c,d Superíndices diferentes indican diferencias significativas. ( $p < 0,05$ )

La incorporación de AT supuso una disminución significativa del pH de las FFD. El descenso del pH puede estar relacionada con la disociación de ciertos componentes del AT como ácidos naturales presentes en disolución acuosa (Sánchez et al., 2009). Con respecto a la densidad, se observa un ligero descenso, significativo cuando se incorporó la mayor concentración de AT (HPMC-2AT) debido a la menor densidad del AT. Por otro lado, las partículas/gotas de todas las formulaciones muestran valores de potencial bastante bajos (del orden de -2.7 mV) con cargas negativas, tal y como se observa en la Tabla 1. Teniendo en cuenta que el potencial de una solución acuosa de AT es de -30 mV (sin hidrocoloide), el descenso en la carga superficial de las gotas de aceite puede explicarse por la presencia de interacciones y por el apantallamiento de las cargas producido por el HPMC al recubrir las gotas de AT, lo que se traduce en una disminución de la carga neta superficial de las partículas. Vargas (2008) encontró comportamientos similares en dispersiones a base de quitosano (partícula cargada) y metilcelulosa.

La figura 1 muestra una distribución típica de tamaño de partícula para cada una de las FFR analizadas. Se pueden observar distribuciones monomodales y polidispersas.



**FIGURA 1.** Distribución típica del tamaño de partícula de las FFR a base de HPMC y AT.

En la Tabla 2 se presentan los valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  de las formulaciones estudiadas. La media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ( $D_{3,2}$ ) representa el tamaño medio basado en la superficie específica por unidad de volumen, y permite caracterizar las partículas pequeñas y de forma esférica. La media de tamaño de la distribución de partículas en volumen ( $D_{4,3}$ ) representa el tamaño medio basado en la unidad de peso de las partículas, y representa las partículas de mayor tamaño y formas irregulares, tales como los agregados.

Estos valores se muestran en la Tabla 2 junto con el número de partículas por m<sup>3</sup> de FFR (N) y el área superficial (A<sub>N</sub>). Para evaluar la influencia en función de la proporción de aceite esencial de árbol de te adicionado al film sobre el tamaño promedio de la partícula en las emulsiones se efectuó un análisis de varianza factorial considerando los factores D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> conjuntamente. Con el fin de discernir entre las medias se utilizó el test de Fisher (LSD) con un nivel de significación del 95%.

**TABLA 2.** Valores de tamaño medio de la partícula D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub>, área superficial y número de partículas. Valores medios y (desviación estándar)

FFD	D <sub>4,3</sub> (μm)	D <sub>3,2</sub> (μm)	A <sub>N</sub> x 10 <sup>-3</sup> (m <sup>2</sup> )	N x 10 <sup>-14</sup> (partículas/m <sup>3</sup> )
HPMC-0,5AT	3.30(0.06) <sup>a</sup>	2.00(1.64) <sup>a</sup>	16.75(0.31) <sup>a</sup>	2.97(0.16) <sup>a</sup>
HPMC-1AT	4.13(0.16) <sup>b</sup>	2.80(0.01) <sup>b</sup>	23.91(0.10) <sup>b</sup>	3.04(0.25) <sup>a</sup>
HPMC-2AT	4.7(0.34) <sup>b</sup>	3.29(0.15) <sup>c</sup>	40.75(1.87) <sup>c</sup>	4.23(0.93) <sup>b</sup>

a,b,c. Superíndices diferentes indican diferencias significativas. (p < 0,05)

Como se puede observar en la Tabla 2, el aumento de concentración de AT, incrementó el tamaño medio de las partículas significativamente (p < 0,05), lo que se refleja en las mayores valores de D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub>. Por tanto, el incremento en el contenido de AT dio lugar a una emulsión con partículas mayores, como consecuencia del aumento de la fracción volumétrica de la fase dispersa. Resultados similares se han encontrado en formulaciones con quitosano y ácido oleico (Vargas et al., 2009).

### 3.1.2 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

Los datos reológicos se ajustaron al modelo de Ostwald de Waale y los parámetros del modelo se muestran en la Tabla 3, junto con la viscosidad aparente calculada a 100 s<sup>-1</sup> y 400 s<sup>-1</sup>.

**TABLA 3.** Parámetros del modelo de Ostwald de Waale obtenidos para las diferentes formulaciones. Valores medios y (desviación estándar).

FFD	0 < γ < 512 s <sup>-1</sup>			
	n	K (Pa s) <sup>n</sup>	η <sub>ap</sub> (100 s <sup>-1</sup> ) (Pa s)	η <sub>ap</sub> (400 s <sup>-1</sup> ) (Pa s)
HPMC	1.16(0.007) <sup>a</sup>	0.002(8.95E-05) <sup>a</sup>	0.004(5.83E-05) <sup>a</sup>	0.006(2.29E-05) <sup>a</sup>
HPMC-0,5AT	1.023(0.03) <sup>b</sup>	0.004(6.04E-05) <sup>a</sup>	0.006(6.04E-05) <sup>a</sup>	0.005(8.47E-04) <sup>b</sup>
HPMC-1AT	0,978(0.07) <sup>b</sup>	0.005(0.002) <sup>a</sup>	0.004(1.86E-04) <sup>a</sup>	0.004(2.46E-04) <sup>b</sup>
HPMC-2AT	1.006(0.009) <sup>b</sup>	0.004(8.38E-05) <sup>a</sup>	0.004(3.39E-04) <sup>a</sup>	0.004(1.52E-04) <sup>b</sup>

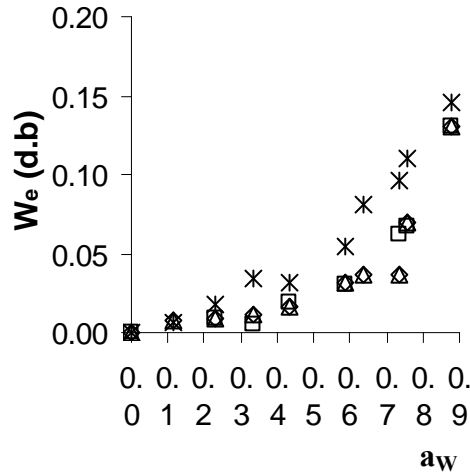
a,b,. Superíndices diferentes indican diferencias significativas. (p < 0,05)

Todas las FFD mostraron un comportamiento reológico newtoniano independiente del tiempo. La adición de AT no supuso cambios notables en el comportamiento reológico de las formulaciones para el rango de concentraciones estudiados.

## 3.2. Características de los films

### 3.2.1 ISOTERMAS

Las isotermas de sorción de HPMC y HPMC-AT a 20°C se muestran en la Figura 2.

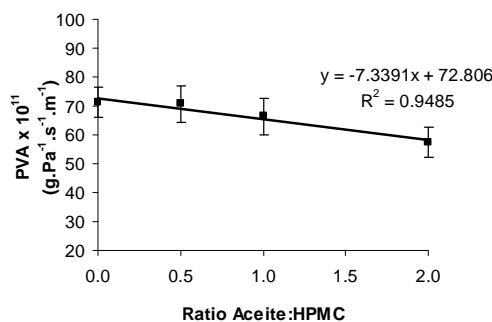


**FIGURA 2.** Isotermas de sorción de films de HPMC y a base de HPMC y AT. Datos experimentales ( x HPMC, □ HPMC-0.5AT, Δ HPMC-1AT, ◇ HPMC-2AT).

Tal y como se observa, la isoterma de sorción de los films de HPMC muestra una forma sigmoidal, típica de una isoterma tipo II, con un aumento progresivo en la humedad de equilibrio hasta el final, sin cambios bruscos en la pendiente de la isoterma típicos de hidrocoloides más hidrofílicos, como el quitosano por ejemplo. Este comportamiento ha sido observado también por otros autores en films a base de HPMC (Villalobos et al., 2006). La incorporación de AT supuso un descenso en la capacidad de sorción de los films como consecuencia del aumento del carácter hidrófobo de los films.

### 3.2.2 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) a 20°C para una humedad relativa de 54,4% se muestran en la Figura 3.



**FIGURA 3.** Valores de permeabilidad al vapor de agua de Films a base de HPMC y AT para una HR de 54,4% a 20°C Valores medios e intervalos LSD al 95,5.

La PVA de los films de HPMC descendió con la incorporación de AT, de manera que cuanto mayor es la concentración de AT en el film, menores son los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos, aunque las diferencias solo fueron significativas entre formulaciones extremas. El hecho de que se obtuviera mayor PVA para el HPMC se debe a la polaridad del film, ya que éste integró agua en su estructura estableciendo puentes de hidrogeno con las moléculas de polímero, reemplazando las uniones entre las moléculas del propio polímero. De esta manera, el polímero perdió cohesión y aumentó la permeabilidad tanto al agua como a los gases (McHugh y Krochta, 1994a). Estos valores de permeabilidad al vapor de agua se ajustan a los obtenidos por otros autores en films basados en HPMC (Sebti et al., 2002; Villalobos et al., 2006).

### 3.2.3 PROPIEDADES MECÁNICAS

La influencia de la incorporación de AT al film en las propiedades mecánicas se puede observar en la Tabla 4.

**TABLA 4.** Módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TF) y porcentaje de elongación de los films a base de HPMC y HPMC-AT a 20° y HR de 54,4%. Valores medios y desviación estándar.

FFD	ME(MPa)	TF(MPa)	E(%)
HPMC	643.82(74.88) <sup>a</sup>	56.94(7.73) <sup>a</sup>	0.08(0.0069) <sup>a</sup>
HPMC-0,5AT	696.00(104.90) <sup>a</sup>	42.58(6.55) <sup>ab</sup>	0.060(0.028) <sup>a</sup>
HPMC-1AT	542.27(160.52) <sup>a</sup>	36.42(22.96) <sup>b</sup>	0.05(0.02) <sup>a</sup>
HPMC-2AT	365.75(124.84) <sup>a</sup>	30.28(10.93) <sup>b</sup>	0.04(0.01) <sup>a</sup>

a,b Superíndices diferentes indican diferencias significativas. (p< 0,05)

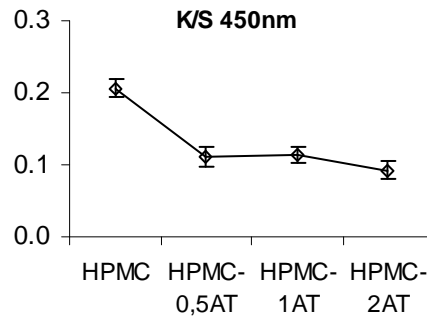
La incorporación de AT en las formulaciones supuso un descenso del módulo de elasticidad y del porcentaje de elongación, aunque no significativos por la alta variabilidad obtenida en las mediciones. La tensión de fractura de las muestras presentó el mismo comportamiento, siendo significativo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores para films base de HPMC y aceites esenciales (Sánchez et al., 2009) y se explica por el efecto de discontinuidad estructural provocado por la incorporación de aceite.

### 3.2.4 PROPIEDADES ÓPTICAS

A continuación se muestran los valores de K/S para una longitud de 450 nm) teniendo en cuenta el espectro de reflexión de las muestras. En la Figura 4 se puede observar como la translucidez de las muestras disminuye con la incorporación de AT, debido a que una disminución de K/S se relaciona con un descenso de la transparencia (Hutchings, 1999). Los valores de K/S a dicha longitud de onda se vieron significativamente afectados con la incorporación de AT (p<0,05). Así, los films con AT fueron más opacos que los que únicamente presentaban HPMC. Y a medida que se aumentó la concentración de AT más opacos resultaron.

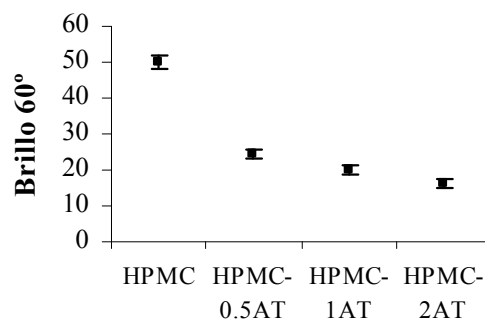


Este fenómeno se relaciona con la dispersión de la luz provocado por las gotas de lípidos (con un índice de refracción diferente) distribuidos en todo el film; cuanto mayor es la concentración de aceite, mayor es la intensidad de la dispersión de la luz. Esto está también afectado por el tamaño de la gota (Sánchez et al., 2009)



**FIGURA 4.**Valores de K/S a 450 nm

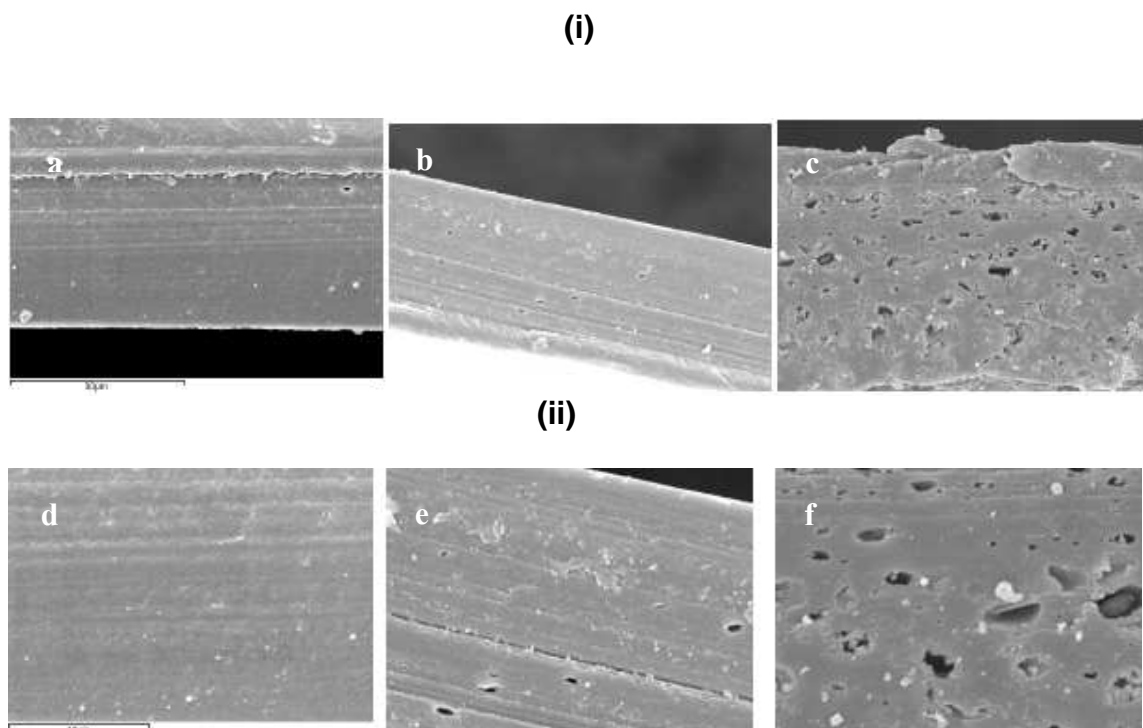
Los valores de brillo de los films medidos a un ángulo de incidencia de 60° y acondicionados a una humedad relativa del 54,4% se muestran en la Figura 5. Todas las formulaciones presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). La incorporación de AT en los films de HPMC supuso un descenso del brillo, tanto más significativo cuanto mayor fue el contenido en AT. Similares resultados fueron obtenidos por diversos autores (Trezza y Krochta, 2000; Villalobos et al., 2005) en films en cuya composición presentan lípidos. El brillo está relacionado con la morfología superficial alcanzada durante el secado del film. En este sentido, la disminución del brillo con el aumento en el contenido de AT puede ser explicada por un incremento en la rugosidad superficial del film. Dicha rugosidad aparece como consecuencia de la migración de gotas o agregados arriba del film introduciendo irregularidades en la superficie. El incremento en la concentración de gotas da lugar a numerosas irregularidades que contribuyen a reducir el brillo (Sánchez et al., 2009).



**FIGURA 5.**Brillo de los Films a base de HPMC y HPMC-AT medido a 60°. Valores medios e intervalos LSD al 95%.

### 3.2.5 MICROESTRUCTURA

Se caracterizó la microestructura de secciones transversales de los films mediante SEM a 2000 y 5000 aumentos (Figura 6). Las micrografías revelan una estructura compacta con un gran empaquetamiento de las cadenas de HPMC cuando no se incorpora AT en la formulación (a y d). Por el contrario, cuando se incorporó AT (b,c,e,f), la estructura es más abierta probablemente debido a las gotas de aceite (o de huecos originados durante la fractura del film) que interrumpen la matriz continua del polímero, lo que impide el empaquetamiento de las cadenas de HPMC en la matriz. Estas observaciones apoyan los resultados de las propiedades mecánicas, donde altas concentraciones de aceite dieron lugar a un debilitamiento mecánico del film por la presencia de partículas lipídicas de gran tamaño embebidas en la matriz. Además, se observa que a medida que aumenta la cantidad de AT en la FFR aumenta el número de partículas lipídicas embebidas en la matriz. Las partículas lipídicas se distribuyen de manera homogénea por toda la matriz, no detectándose ni separación de fases ni migraciones de las partículas dispersas por efecto de la diferencia de densidades.



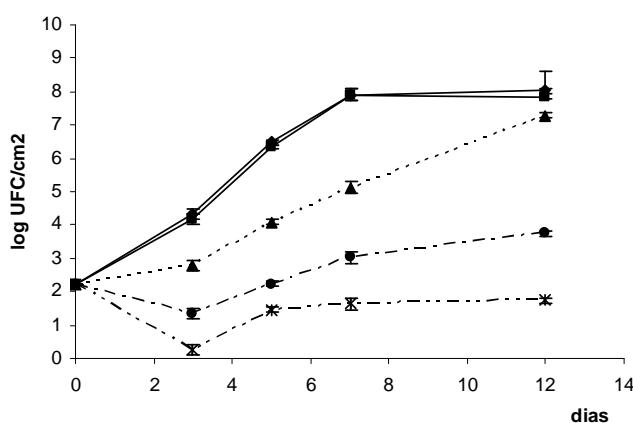
**FIGURA 6.** Micrografías SEM de corte transversal (i) X 2000 y (ii) X 5000). (a,d)HPMC, (b,e)HPMC-0,5AT, (c,f)HPMC-2AT.

### 3.2.6 MICROBIOLOGIA

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos “in vitro” para la cepa *L. monocytogenes* expresado en logUFC/cm<sup>2</sup> en los días 0,3,5,7 y 12. El HPMC siguió la misma tendencia que el control, aumentando el log UFC/cm<sup>2</sup> con el tiempo. Por el contrario, se observó un efecto en la reducción del número de colonias a media que se iba incorporando AT.

La incorporación de AT redujo sustancialmente los niveles de *L.monocytogenes* en el medio que contenía TSA y NaCl durante los 3 primeros días del ensayo, lo que se corresponde con un incremento en la efectividad antimicrobiana del film. A partir de este día se produjo un aumento en los niveles de *L. monocytogenes* de forma asintótica. Estos resultados pueden explicarse bien por una pérdida de los compuestos antimicrobianos volátiles del AT o bien, por la difusión del AT desde la superficie del film al interior de agar, reduciéndose así la concentración efectiva de antimicrobiano en la superficie, donde el crecimiento microbiano es predominante. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Oussalah et al., 2005; Kristo et al., 2008).

Al final del periodo de almacenamiento ensayado (12 días), se consiguió una reducción logarítmica en las UFC de 5 y 7 unidades en los films con un 1 y un 2% de AT, respectivamente.



**FIGURA 7.** UFC de *Listeria monocytogenes* en films a base de HPMC y HPMC-AT (◇ Control, ■HPMC, ▲HPMC-0,5AT, ● HPMC-1AT, ⊗HPMC-2AT ). (Valores medios y desviación estándar)

## CONCLUSIONES

El aceite esencial de árbol de te aparece como un ingrediente interesante para el de diseño de nuevos films a base de hidroxipropilmetilcelulosa con actividad antimicrobiana.

La incorporación de AT, en las proporciones 1:0,5; 1:1 y 1:2 en la matriz de HPMC redujo la permeabilidad al vapor de agua y disminuyó el brillo y la transparencia de la película. Asimismo, la resistencia a la rotura se vio disminuida por la incorporación de AT debido a la presencia de discontinuidades en film.

La contaminación microbiológica de los alimentos sigue siendo un problema de salud pública enorme, y el uso de los recursos naturales se esta potenciando en los últimos años. Este estudio mostró que el AT posee actividad antibacteriana contra *L.monocytogenes*. En la formulación HPMC-2AT el crecimiento bacteriano quedo inhibido completamente durante los primeros tres días de almacenamiento.

## REFERENCIAS

- ASTM 1995. Standard test methods for water vapor transmission of materials. standard designation. E96-95. En: Annual Book of ASTM. Philadelphia, P. A. pp. 406-413.
- ASTM 2001. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. En: Annual Book of ASTM, Philadelphia, PA, 162-170.
- Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S., 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55 (5), 344–348.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, I. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Baldwin, E.A.; Nisperos, M.O.; Hagenmaier, R.D.; Baker, R.A. 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.*, 51(6):6-63.
- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36 (3), 162– 167.
- Carson, C. F., & Riley, T. V. 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, review. *Letters in Applied Microbiology*, 16, 49–55.
- Deans, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165– 180.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*: A foodborne pathogen. *Microbiology Review*, 55, 476–511.
- Gennadios, A.; Weller, C.L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technol.*, 44(10):63-69.
- Gennadios, A., Mc Hugh, T.H., Weller, C.L. y Krochta, J.M. 1994. Edible coatings and films based on proteins in edible coatings and films to improve food quality. In: J. M. Krochta, E. A. Baldwin y M.O. Nisperos-Carriedo, editors. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 201-277.
- Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. En Food packaging and preservation: Theory and Practice. Ed. M. Mathlouthi, Elsevier Applied Science Publishers, New York, U.S.A., pp. 371-394.
- Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry*, 81A(No 1).
- Hutchings, J.B. 1999. Food and Colour Appearance, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication
- Kester, J. J.; Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technol.*, 40(12):47-59.
- Kim, H. J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2849–2854.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K., Biliaderis, C.2008. Thermal, mechanical and water vapour barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386
- Krochta, J.M.; De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: changes and opportunities. *Food Technol.*, 51:61-72.
- Lis-Balchin, M., Hart, S., Deans, S.G., Eaglesham, E., 1996. Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 4 (2), 69– 86.
- McHugh, T.H; Krochta, J.M. 1994a. Permeability properties of edible films. En Edible Coatings and films to improve Food Quality. Eds. J.M. Krochta; E.A. Baldwin; M.O. Nisperos-Carriedo, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, U.S.A., pp. 139-187.
- Mellenthin, W.M.; Chen, P.M.; Borgic, D.M. 1982. In-line application of porous wax coating materials to reduce friction discoloration of 'Bartlett' and 'd'Anjou' pears. *HortSci.*, 17:215-217.
- Mihaliak, C.A., Gershenzo, J.Croteau, R., 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implications for theories of plant chemical defense. *Oecologia* 87, 373-376.
- Nisperos-Carriedo, M.O.; Shaw, P.E. 1990. Comparison of volatile flavour components in fresh and processed orange juices. *J. Agr. Chem.*, 38:1048-1052.

- Nisperos-Carriedo, M. O. 1994. Edible coatings and films based on polysaccharides. En Protein-based films and coatings. Eds. J.M. Krochta; E.A. Baldwin; M.O. Nisperos-Carriedo. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, U.S.A., pp. 305-335.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 414–420
- Panuwat, S., Joseph, M., Kees, S., Stephen, W. 2003. Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3197-3207
- Park, H.J.; Weller, C.L.; Vergano, P.J.; Testin, R.F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J. Food. Sci.*, 58(6):1361-1364, 1370.
- Peleg, M. 1979. Characterization of stress relaxation curve of solid foods. *Journal of Food Science*:44, 277-281
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Cháfer, M. 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
- Sebti, I., Ham-Pichavant, F., & Coma, V. 2002. Edible bioactive fatty acid-cellulosic derivative composites used in food-packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4290–4294.
- Shelef, L.A., 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6, 29– 44.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology* 26, 118–122.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18, 463– 470.
- Sothornvit, R.; Krochta, J.M. 2005. Plasticizers in edible films and coatings. En Innovations in Food Packaging. Ed. J.H. Han, Elsevier Publishers, New York, U.S.A., pp.403-433.
- Spiess, W.E.L., Wolf, W.R., 1983. The results of the COST 90 Project on water activity. En: Physical Properties of Foods. Jowitt, R., Escher, F., Hallstrom, B., Meffert, H.F.Th., Spiess, W.E.L, Vos, G. (Eds), London, NY: Applied Science Publishers, 65-91.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger S 2003 Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.* 68: 408-420.
- Trezza, T.A., Krochta, J.M 2000. The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. *Journal of Food Science*: 65(4), 658-662.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. 2009. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23, 536–547.
- Vargas-Colás, M. 2008. Recubrimientos comestibles a base de quitosano: caracterización y aplicación. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., & Chiralt, A. 2005. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53–61.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. 2006. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose Films. *Food Hydrocolloids*:20(4), 502-509.
- Ward, G. Y Nussinovitch, A. 1996. Gloss properties and surface morphology relationships of fruits. *J. Food Sci.* 61(5): 973-977.
- Yang, L., & Paulson, A. T. 2000. Effect of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33(7), 571–578