



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ÁCIDOS FENÓLICOS COMO AGENTES
ANTIBACTERIANOS EN EL DESARROLLO DE
MATERIALES ACTIVOS PARA EL ENVASADO
DE ALIMENTOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Andrés Soriano Almiñana

TUTOR/A ACADEMICO: M^a Amparo Chiralt Boix

COTUTOR/A: Lorena María Atarés Huerta

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Ramón Ordóñez Lagos

Curso Académico: 2019/2020

VALENCIA, 6 DE JULIO DE 2020

ÁCIDOS FENÓLICOS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS EN EL DESARROLLO DE MATERIALES ACTIVOS PARA EL ENVASADO DE ALIMENTOS.

Andrés Soriano Almiñana, Ramón Ordoñez Lagos, M^a Amparo Chiralt Boix, Lorena Atarés Huerta.

RESUMEN

El desarrollo de nuevos materiales activos para el envasado de alimentos es una necesidad de la industria alimentaria para mejorar la conservación de los alimentos, alargando su vida útil, y manteniendo la calidad y seguridad alimentaria. A su vez, la utilización de polímeros biodegradables o compostables para este propósito es necesaria para minimizar el impacto medioambiental de los envases plásticos convencionales. En el presente estudio se analiza la factibilidad de la utilización de ácidos fenólicos como compuestos antimicrobianos en el desarrollo de materiales biodegradables o compostables activos para el envasado de alimentos. La velocidad de liberación y cantidad liberada de estos compuestos a la matriz alimentaria definen en gran medida el potencial antimicrobiano del material, dependiendo del balance de interacciones moleculares establecido entre el polímero, el activo y el sustrato alimentario. Los ácidos fenólicos, como el ferúlico y cinámico poseen actividad antibacteriana, pero su efecto cuando se incorporan a la matriz polimérica está controlado por la velocidad y cantidad de liberación, lo cual depende fuertemente del tipo de polímero y su interacción con el sustrato alimentario.

PALABRAS CLAVE: biopolímero, ácidos fenólicos, envases activos, interacciones envase-alimento, antibacterianos.

ÀCIDS FENÒLICS COM AGENTS ANTIBACTERIANS EN EL DESENVOLUPAMENT DE MATERIALS ACTIUS PER L'ENVASAT D'ALIMENTS.

RESUM

El desenvolupament de nous materials actius per a l'envasament d'aliments és una necessitat de la indústria alimentària per millorar la conservació dels aliments, allargant la vida útil, i mantenint la qualitat i seguretat alimentària. Al seu torn, la utilització de polímers biodegradables o compostables per a aquest propòsit és necessària per minimitzar l'impacte mediambiental dels envasos plàstics convencionals. En el present estudi s'analitza la factibilitat de la utilització d'àcids fenòlics com compostos antimicrobians per al desenvolupament de materials biodegradables o compostables actius per a l'envasament d'aliments. La velocitat d'alliberament i quantitat alliberada d'aquests compostos a la matriu alimentaria, defineixen en gran mesura el potencial antimicrobià del material, depenent del balanç d'interaccions moleculars entre el polímer, l'actiu i el substrat alimentari. Els àcids fenòlics, com el ferúlic i cinàmic posseeixen activitat antibacteriana, però el seu efecte quan s'incorporen a la matriu polimèrica està controlat per la velocitat i quantitat d'alliberament, la qual cosa depèn fortament del tipus de polímer i la interacció amb el substrat alimentari.

PARAULES CLAU: biopolímer, àcids fenòlics, envasos actius, interaccions envàs-aliment, antibacterians.

PHENOLIC ACIDS AS ANTIBACTERIAL AGENTS IN DEVELOPING ACTIVE MATERIALS FOR FOOD PACKAGING.

ABSTRACT

The development of new active materials for food packaging is a necessity of the food industry to improve food preservation, extend shelf life, and maintain food quality and safety. Likewise, the use of biodegradable or compostable polymers for this purpose is necessary to minimize the environmental impact of conventional plastic packaging. This study analyses the feasibility of using phenolic acids as antimicrobial compounds for the development of biodegradable or compostable active materials for food packaging. The rate of release and amount released of these compounds into the food matrix largely defines the antimicrobial potential of the material, depending on the balance of molecular interactions established between the polymer, the active and the food substrate. Phenolic acids, such as ferulic and cinnamic acids, possess antibacterial activity, but their effect when incorporated into the polymeric matrix is controlled by the rate and amount of release, which is strongly dependent on the type of polymer and its interaction with the food substrate.

KEY WORDS: byopolimer, phenolic acids, active packaging, food-packaging interactions, antibacterials.

1. Introducción.

Debido a la gran demanda de los consumidores de alimentos más naturales, menos procesados, el envasado ha evolucionado para asegurar la calidad y la seguridad del alimento durante el almacenamiento, fundamentalmente mediante el uso de materiales plásticos. Entre las tecnologías de envasado, el envase activo pretende, además de constituir una barrera física entre el producto y su entorno, desempeñar funciones adicionales, a través de las interacciones entre el envase o su atmósfera interna y el alimento, en beneficio de la mejora de su calidad y seguridad (Dobrucka R., 2014). El desarrollo de este tipo de envases implica la selección del compuesto activo, los materiales del envase, el diseño del proceso y el método de incorporación de los activos, y la comprobación de la efectividad en el sistema alimentario (Muller et al., 2017). Dependiendo del tipo de deterioro o daño que se pretenda evitar (oxidación, pardeamiento, degradación de grasas o proteínas, contaminación microbiológica, cambios en la textura, etc.) se seleccionan los materiales y agentes activos más convenientes para alcanzar el objetivo. La incorporación de compuestos activos al material del envase permite controlar su velocidad y cantidad de liberación. Por ejemplo, con agentes antimicrobianos, pueden conseguirse concentraciones adecuadas de compuestos activos en la superficie del producto, donde la contaminación es frecuente, durante un periodo de tiempo más largo (López et al., 2007).

En particular, los envases antimicrobianos constituyen un tipo de envase activo en el cual el producto, el envase y el ambiente interactúan entre sí para reducir o retardar el crecimiento microbiano con el fin de prolongar la vida útil del producto, manteniendo la calidad y seguridad alimentaria (Sun Lee et al., 2008). Existe gran variedad de agentes antimicrobianos, los cuales tienen diferente actividad y afectan a diferentes microorganismos, que pueden clasificarse en cuanto a sus mecanismos de acción. Algunos agentes antimicrobianos inhiben el metabolismo esencial mientras que otros alteran la estructura de las paredes celulares provocando su alteración y la muerte celular (Ahvenainen, 2003). Los antimicrobianos pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo: inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular, daño en la integridad de las membranas o interferencia en los procesos metabólicos esenciales. Consecuentemente, algunos agentes antimicrobianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitoria más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como microbiostáticos (Mussel, 1983). Algunas de las sustancias que pueden ser usadas en envases antimicrobianos son ácidos, anhídridos, alcoholes, aminas, compuestos de amonio, antibióticos, péptidos antimicrobianos, enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas o antioxidantes fenólicos (Suppakul et al., 2003). En la **tabla 1** se muestran algunos ejemplos de agentes antimicrobianos utilizados en la conservación de alimentos y los efectos observados por algunos autores.

Por otro lado, en las últimas décadas, la preocupación por el grave problema medioambiental causado por la acumulación de plásticos y el agotamiento de las reservas fósiles ha llevado a un incremento en la investigación sobre polímeros y materiales biodegradables obtenidos de fuentes renovables. Los polímeros biodegradables pueden descomponerse en el medio ambiente integrándose en el ciclo de la materia orgánica y contribuyendo a la producción de biomasa, que puede, a su vez, ser utilizada como fuente de materiales. El desarrollo de

envases activos a partir de materiales biodegradables de fuentes renovables en un reto actual para la conservación de alimentos de forma más sostenible.

TABLA 1. Agentes y efectos antimicrobianos.

Antimicrobiano	Efecto	Referencia
Ácido sórbico	Inhibición del crecimiento de hongos	Guilbert et al., 1986
Carvacrol y eugenol	Inhibición de la actividad microbiana de <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria Inocua</i>	Requena et al., 2019
Timol	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i>	Sarkar et al., 2017
Nisina	Reducción de la actividad microbiana de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Jung et al., 1992
Quitosano	Acción bactericida, fungicida e inactivación de enzimas microbianas	Geraldine et al., 2008
Vainillina	Inhibición de la tasa de crecimiento de colonias de especies de <i>Aspergillus</i>	Neyrade, 2011
Cinamaldehido	Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> y <i>L. innocua</i>	Muller et al., 2017
Hexanal	Inhibición del crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, psicrófilas, mohos y levaduras	Neyrade, 2011
Peróxidos de hidrógeno	Reducción de la población de <i>Salmonella spp.</i> Inoculada en melones enteros	Neyrade, 2011
Metil Jasmonato y etanol	Disminución del deterioro fúngico y aumento de la capacidad antioxidante	Ayala et al., 2005
Ácido cinámico	Inhibición del crecimiento microbiano	Malheiro et al., 2018
Ácidos clorogénicos	Inhibición del crecimiento microbiano de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i>	Chaves et al., 2018

Se han llevado a cabo un gran número de estudios sobre films para uso alimentario donde se analizan las propiedades de barrera al vapor de agua y gases, propiedades mecánicas y ópticas, en aras a determinar su funcionalidad como materiales de envasado (Valencia et al., 2011). Las propiedades funcionales de los films, dependen del tipo de polímero utilizado, de las condiciones de formación del film, del tipo de plastificante, de la naturaleza del disolvente, de la velocidad de evaporación del disolvente, y de su espesor, entre otras (Guilbert, 1986). Por ejemplo, Acosta et al. (2015) estudiaron las propiedades físicas y la estabilidad de películas, basadas en almidón y gelatina, observando que la adición de ésteres de ácidos grasos afectaba notablemente a las propiedades de los films, mejorando sus propiedades mecánicas, haciéndolas más flexibles y elásticas, y aumentando la capacidad de barrera frente a la humedad. Hager et al. (2012) también estudiaron las propiedades de barrera de films de gluten con ácidos gálico y tánico, observando cambios en las propiedades mecánicas y barrera de los

films. En estos estudios se utilizan polímeros obtenidos de biomasa como polisacáridos (almidón, quitosano o derivados de celulosa) y proteínas (de soja, lácteas o del gluten) o también poliésteres biodegradables obtenidos por síntesis (PLA o PCL) o mediante procesos biotecnológicos (PHA, PHVB), evaluando su capacidad para la conservación de los alimentos. Se ha estudiado el efecto de la incorporación de agentes de relleno (composites), plastificantes o compuestos activos (antioxidantes y antimicrobianos) en aras a mejorar la funcionalidad de los materiales. Pueden obtenerse films y recubrimientos con diferentes características de dureza, flexibilidad, transparencia, con buena capacidad de barrera a los gases y al vapor de agua, pudiendo modularse sus propiedades mediante la mezcla de diferentes compuestos (Vargas et al., 2008). Con el propósito de obtener matrices con características y funciones específicas, se adicionan componentes como emulsificantes, antioxidantes, conservantes, nutrientes, vitaminas, inhibidores del crecimiento de microorganismos, colorantes, saborizantes, fortificadores de alimentos, especias, etc. (Pranoto et al., 2005). En los films activos, la incorporación a las matrices poliméricas de compuestos con una actividad específica (como antioxidante o antimicrobiana) permite, a través de su liberación controlada, una mejor conservación de los alimentos, alargando su vida útil (Sánchez-González et al., 2011; Pastor et al., y 2013).

El objetivo de este estudio consiste en analizar la factibilidad de la utilización de ácidos fenólicos como compuestos antimicrobianos para el desarrollo de materiales biodegradables o compostables activos para el envasado de alimentos, en función de su actividad antimicrobiana y de las interacciones potenciales polímero-activo-sustrato alimentario.

2. Actividad antimicrobiana de los ácidos fenólicos.

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en productos de origen vegetal. Constituyen una de las familias más importantes de metabolitos secundarios en las plantas y, en su mayoría, son derivados de la fenilalanina y, en menor cantidad, de la tirosina, con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas (Shahidi y Nazk, 1995). Los tres grupos más importantes de compuestos fenólicos son: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles. Químicamente, los fenoles son sustancias con un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a sus derivados funcionales (Porrás y Malo, 2009). Los ácidos fenólicos son ácidos orgánicos con un anillo aromático y al menos un sustituyente hidroxilo (Badui Dergal 2006).

Para los ácidos fenólicos se ha descrito una actividad antimicrobiana más efectiva en las especies gram positivas (Cueva et al., 2010). En la actividad antibacteriana, influye el tipo y la posición de los sustituyentes del anillo bencénico y la longitud de la cadena lateral de los ácidos fenólicos (Gill & Holley, 2006). Se ha demostrado que los ácidos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de las bacterias debido a las propiedades oxidativas, así como por alterar la hidrofobicidad y la carga superficial de las células, causando finalmente la fisura y deposición citoplasmática (Maddox et al., 2010).

El ácido cinámico es un ácido monocarboxílico, conjugado del cinamato, que se encuentra en *Cinnamomu cassia*. Es sólido a temperatura ambiente y ligeramente soluble en agua. Este ácido y sus derivados son capaces de ejercer un importante control del crecimiento bacteriano.

Malheiro et al. (2018) observaron que casi todos sus derivados inhibieron el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *Enterococcus*.

El ácido ferúlico es otro ácido fenólico que se encuentra en la pared celular vegetal. Se trata de un ácido hidroxicinámico, formado por un anillo aromático con un grupo metoxilo en orto al hidroxilo y un grupo carboxílico en posición para con el hidroxilo. Se ha demostrado en estudios anteriores que posee propiedades antibacterianas efectivas, con un riesgo mínimo para desarrollar resistencias (Takahashi et al., 2013). Estudios realizados por Takahashi et al. (2015) demostraron actividad antibacteriana del ácido ferúlico contra diferentes microorganismos como *L. monocytogenes*.

Existen estudios previos acerca de la actividad antimicrobiana de otros ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico, con capacidad de dañar la membrana celular, frente a la bacteria *E. coli* (Matejczyk et al., 2018). El ácido cumárico, ferúlico y sirínico presentaron actividad antimicrobiana frente a la *L. monocytogenes* (Miyague et al., 2015). Malheiro et al. (2018), también demostraron que el ácido cinámico y el cinamaldehído y sus derivados inhiben significativamente el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *S. aureus* o *E. hirae*. En las **tablas 2 y 3** se resumen diferentes estudios sobre la actividad antimicrobiana de ácidos fenólicos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, con especificación de los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para diferentes bacterias.

Sanchez-Maldonado et al. (2011), estudiaron la relación entre la estructura de los ácidos fenólicos y su actividad antibacteriana en bacterias ácido-lácticas, *E. coli* y *B. subtilis*. La acción antibacteriana fue distinta para los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos. La actividad de los hidroxibenzoicos disminuyó cuando aumentó el número de hidroxilos en el anillo benzoico, es decir cuando aumentó su carácter lipofílico. Para los hidroxicinámicos, el número de hidroxilos en el anillo tuvo un efecto mucho menor, lo cual se atribuyó al marcado poder antibacteriano del doble enlace conjugado de la cadena lateral. La relación entre la estructura molecular del ácido fenólico y el poder antimicrobacteriano permite seleccionar al compuesto más adecuado para un microorganismo crítico en un alimento concreto.

Malheiro et al. (2018), observaron que el ácido cinámico, el cinamaldehído y sus derivados controlaron significativamente el crecimiento microbiano de *S. aureus* o *E. hirae*. Miyague et al. (2015), observaron un efecto sinérgico de ácidos fenólicos y aceites esenciales en el control del crecimiento de *Listeria monocytogenes*, a pH 5 y 6, por lo que recomiendan su uso combinado en productos cárnicos o lácteos fermentados, sensibles a *Listeria*, para reducir el impacto sensorial del uso simple de aceites esenciales.

Se han incorporado ácidos fenólicos en films de biopolímeros en aras a obtener materiales activos (antimicrobianos/antioxidantes) para el envasado. Siang et al. (2015), estudiaron el efecto antimicrobiano *in vitro* de films de zeína y quitosano con compuestos fenólicos como el ácido ferúlico. Se observó inhibición del crecimiento de las bacterias *S. aureus* (bacteria gram positiva causante de intoxicaciones alimentarias) y *E. coli* (bacteria gram negativa, utilizada como indicador de la salubridad de los alimentos) al añadir el ácido ferúlico en las matrices poliméricas. Choi et al. (2018), incorporaron ácidos fenólicos, como el ácido tánico y el ácido cafeico, a films biodegradables obtenidos con gelatina, polvo de cúrcuma y glicerol, obteniendo films más resistentes, con mayor capacidad de barrera frente al vapor de agua, y con capacidad

para prolongar de la vida útil de productos cárnicos. Los films presentaron una buena actividad antioxidante, previniendo la oxidación lipídica de carne fresca. También se ha estudiado la incorporación de ácido gálico y ferúlico a films de zeína, observándose un buen potencial para el desarrollo de materiales bioactivos flexibles con poder antioxidante y antimicrobiano (Arcan et al., (2011). Siang et al. (2015), estudiaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de films de zeína y quitosano con ácido ferúlico y ácido gálico, observando, además, una mejorara en la función barrera frente al vapor de agua y en las propiedades mecánicas. Los films mostraron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

TABLA 2. Actividad antibacteriana de ácidos fenólicos hidroxicinámicos, con especificación de su estructura molecular y la concentración mínima inhibitoria (MIC) encontrada para diferentes bacterias.

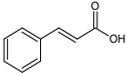
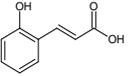
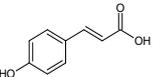
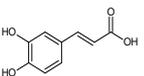
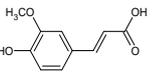
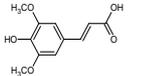
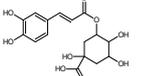
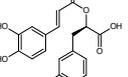
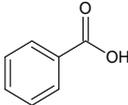
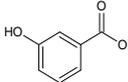
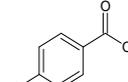
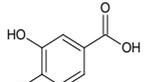
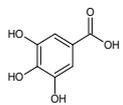
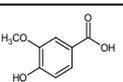
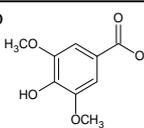
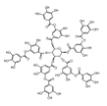
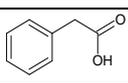
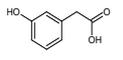
Compuesto activo	Estructura	-OH	-OCH3	pKa	pH	Microorganismo objetivo	MIC (mg/g)	Referencia
Hidroxicinámicos								
Cinámico		0	0	4,44	-	<i>Escherichia coli</i>	0,11	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Escherichia coli</i> NCTC	0,14	Malheiro et al. 2018
				-	6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,48	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,79	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	0,86	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,07	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,14	Malheiro et al. 2018
				-	-	<i>Enterococcus hirae</i>	0,17	Malheiro et al. 2018
o-Coumárico		1	0	-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,82	Miyague et al. 2015
p-Coumárico		1	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,12	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	5/6	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,82	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,21	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	1,04	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,25	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Cafeico		2	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,23	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,25	Matejczyk et al. 2018
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,52	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	0,63	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,30	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Ferúlico		1	1	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,16	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	6	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,97	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,68	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	0,89	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,38	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Sinapico		1	2	-	5/6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,12	Miyague et al. 2015
Clorogénico		-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	1,00	Cetin-Karaca & Newman 2015
Rosmarínico		-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,25	Matejczyk et al. 2018

TABLA 3. Actividad antibacteriana de ácidos hidroxibenzoicos y otros, con especificación de su estructura molecular y la concentración mínima inhibitoria (MIC) encontrada para diferentes bacterias.

Compuesto activo	Estructura	-OH	-OCH3	pKa	pH	Microorganismo objetivo	MIC (mg/g)	Referencia
Hidroxibenzoicos								
Benzoico		0	0	4,19	-	<i>Escherichia coli</i>	0,07	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Escherichia coli</i>	1,00	Cueva et al. 2010
				-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,56	Deog-Hwan & Douglas 1994
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,45	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	0,97	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,04	Sanchez-Maldonado et al. 2011
m-hydroxybenzoico		1	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	1	Cueva et al. 2010
p-hydroxybenzoico		1	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,12	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	5/6	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,6906	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Cueva et al. 2010
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,57	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	1,12	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,13	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Protocatecuico		2	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,31	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,24	Che-Yi Chao et al. 2008
				-	6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,54	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,36	Che-Yi Chao et al. 2008
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,57	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	1,12	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,13	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,24	Che-Yi Chao et al. 2008
Gálico		3	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,49	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,7	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,74	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	4,56	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,64	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Vanílico		1	1	-	-	<i>Escherichia coli</i>	1	Cueva et al. 2010
				-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,8407	Miyague et al. 2015
Siringico		1	2	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,39	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	5/6	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,99085	Miyague et al. 2015
				-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,75	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Lactobacillus hammesii</i>	1,15	Sanchez-Maldonado et al. 2011
				-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	0,26	Sanchez-Maldonado et al. 2011
Otros ácidos								
Tánico		-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,025	Roger et al. 2018
				-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,025	Roger et al. 2018
Fenilacético		0	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	0,5	Cueva et al., 2010
3-hidroxifenilacético		1	0	-	-	<i>Escherichia coli</i>	1	Cueva et al., 2010

3. Factores que afectan al poder antimicrobiano de los materiales activos.

En el diseño de films y envases con propiedades antimicrobianas, es esencial seleccionar los agentes antimicrobianos, en función del microorganismo diana que se quiere controlar, y los polímeros adecuados en función de sus propiedades funcionales y los requerimientos de envasado del producto. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la incorporación de un antimicrobiano al material puede alterar sus propiedades mecánicas y de barrera, por lo que es importante analizar los posibles cambios y, en qué medida, estos afectan a su efectividad como material de envase. Ciertos antimicrobianos actúan como plastificantes, mejorando las propiedades de tracción de los films (Marcos et al., 2010). Sin embargo, también se ha observado una disminución de la fuerza de película al aumentar la concentración de antimicrobianos (Pranoto et al., 2005). Las interacciones del compuesto activo con el polímero del envase a través de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, determinan su influencia en las propiedades físicas asociadas a su funcionalidad (Picard et al., 2008).

En relación con la liberación del activo de la matriz polimérica y su migración al alimento para ejercer la acción antimicrobiana es importante tener en cuenta diferentes factores que afectarán a la efectividad. La **figura 1** refleja la influencia de diferentes factores que influyen en la efectividad antimicrobiana del material. La composición de la matriz polimérica y del alimento determinan los fenómenos de migración entre ambas fases, estando, a su vez, afectados por las interacciones moleculares en las mismas. Además, la composición de la matriz alimentaria también afectará al crecimiento microbiano tanto por el poder nutriente específico de los componentes del alimento, como por posibles efectos secuestrantes sobre el activo debido a interacciones específicas con algunos componentes del alimento (Requena et al., 2019). Se ha observado que las interacciones específicas de los compuestos activos en las diferentes matrices alimentarias pueden limitar su efectividad antimicrobiana, como sucede con algunos aceites esenciales. Algunos autores han demostrado que un alto contenido en grasa en la matriz alimentaria puede inhibir la actividad de los aceites esenciales, lo que se puede atribuir a la acción protectora de estos compuestos alimentarios para la bacteria (Gutierrez et al., 2008). Debido a su naturaleza lipófila, algunos autores sugieren, que los aceites esenciales se disuelven en la fase lipídica, y quedan con menor disponibilidad para interactuar con la bacteria presente en la fase acuosa (Veldhuizen et al., 2007). Además, los agentes antimicrobianos de los aceites esenciales pueden reaccionar con radicales libres de la grasa, produciendo compuestos menos efectivos que los compuestos fenólicos originales. Por otro lado, la diferente actividad del agua y características del sustrato alimentario pueden alterar la actividad antimicrobiana, afectando a la MIC del microorganismo para un determinado antimicrobiano (Shelef et al., 1984). Por tanto, la matriz alimentaria condiciona la efectividad de un determinado compuesto activo.

La eficacia de las películas con compuestos antimicrobianos no sólo depende de la naturaleza de los compuestos activos, sino también de la capacidad de la película para liberar una concentración adecuada del activo al alimento en un tiempo de contacto determinado y en el equilibrio. Esto, a su vez, depende de las interacciones del activo con la matriz polimérica y de su difusión en el sistema alimentario. La concentración del compuesto activo liberada al alimento durante el tiempo de almacenamiento es, por lo tanto, un factor esencial para garantizar la eficacia antimicrobiana y la seguridad alimentaria (Requena et al., 2017). Los

compuestos antimicrobianos se difunden al alimento, como consecuencia del gradiente de concentración establecido en el contacto, a una determinada velocidad (coeficientes de difusión), hasta alcanzar la situación de equilibrio. En el equilibrio, se alcanza una determinada de concentración del activo en cada medio (polímero y alimento), cuyo cociente se denomina coeficiente de partición (Requena et al., 2017) y la liberación se detiene. En algunos casos, el antimicrobiano se libera total y rápidamente al alimento y su efecto cesa cuando se consume el activo.

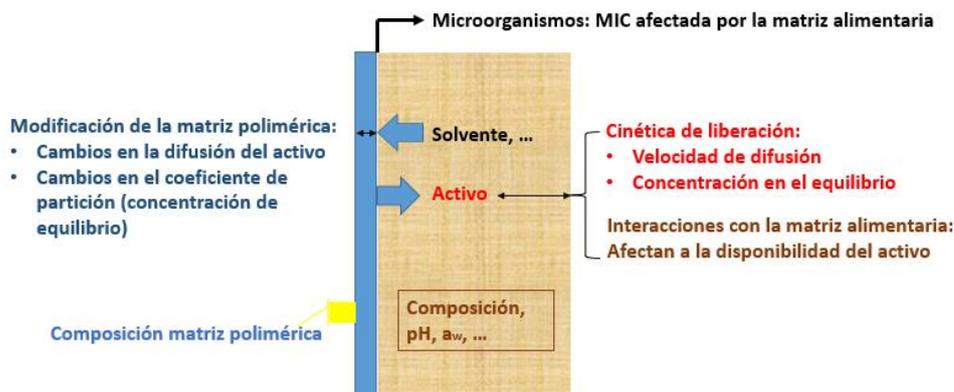


FIGURA 1. Factores que influyen en la efectividad antimicrobiana del material activo: composición de la matriz polimérica y del alimento, fenómenos de migración e interacciones moleculares en ambas fases.

La capacidad de liberación del activo, que afecta a su disponibilidad para ejercer su función, depende de las interacciones entre el activo, polímero y sustrato alimentario. Por tanto, la migración del activo depende de la composición de la estructura polimérica y del sustrato alimentario, ya que el polímero libera el activo en función de su afinidad química con ambas fases. Las interacciones de los componentes de la matriz alimentaria que pueden migrar a la matriz polimérica pueden afectar también a la liberación del activo (velocidad y concentración de equilibrio) a través de tres mecanismos: difusión de componentes del alimento (agua, grasa,) en la matriz polimérica, relajación de la estructura macromolecular como consecuencia de esta difusión (plastificación) y la difusión del compuesto activo a través de la matriz polimérica relajada, hasta alcanzar el equilibrio termodinámico entre el film y la matriz (Requena et al., 2017). La plastificación de la matriz polimérica aumenta la movilidad molecular y por tanto la velocidad de todos los procesos difusionales. La difusión del compuesto activo en la matriz plastificada puede aumentar en varios órdenes de magnitud respecto a la de una matriz vítrea. Por consiguiente, la facilidad de plastificación de la matriz polimérica, por la acción de componentes migrados desde el alimento (por ejemplo, difusión de moléculas de agua en una matriz polar como los films almidón), puede acelerar en gran medida la velocidad de difusión del activo al alimento.

Durante el contacto con el alimento, se alcanza el equilibrio para una concentración dada de activo en el film y en el producto. Esta cantidad migrada a la superficie del producto deberá ser suficiente, y en tiempo adecuado, para controlar el crecimiento microbiano. Es decir, deberá alcanzarse la MIC del compuesto para un determinado microorganismo diana antes de que su proliferación aumente y se haga más resistente a la acción antimicrobiana. Por tanto, la velocidad de difusión y la cantidad total liberada en el equilibrio serán factores determinantes de la efectividad. La composición, el pH y la actividad del agua de los alimentos afecta al crecimiento microbiano y a la concentración mínima de compuesto activo para inhibir el crecimiento (MIC). El pH tiene también un efecto relevante la efectividad de compuestos activos ionizables en medio acuoso, como los ácidos fenólicos. El pH influye en la proporción de la forma disociada o protonada, con diferente actividad antimicrobiana. Miyague et al. (2015), demostraron que la actividad microbiana de los ácidos fenólicos es más alta a pH bajo, por debajo del pKa del ácido, cuando predomina la forma protonada.

Factores ambientales, como la temperatura, afectan al crecimiento microbiano y también a la velocidad de liberación de los compuestos activos. En particular, la temperatura puede acelerar la liberación de los antimicrobianos en los alimentos, lo que podría mejorar sus propiedades antimicrobianas salvo en compuestos termo-sensibles. No obstante, una mayor temperatura también promueve el crecimiento microbiano y por tanto el efecto puede ser contraproducente.

Los estudios cinéticos de liberación de compuestos activos desde la matriz polimérica en simulantes alimentarios, permiten predecir la actividad antimicrobiana en un determinado tipo de alimento en función de su polaridad. Con el fin de determinar las cinéticas de liberación de los compuestos activos, se pueden utilizar diferentes tipos de simulantes alimentarios (Comission Regulation EU, 2011). Requena et al. (2017), utilizaron en sus estudios sobre las cinéticas de liberación del carvacrol y eugenol de films de PHBV, soluciones acuosas de etanol 10 % (Simulante A) y ácido acético 3% (Simulante B) para simular alimentos acuosos con valores de pH superior e inferior a 4,5, respectivamente, solución acuosa de etanol 50% (Simulante D1) para simular matrices alimentarias menos polares, como emulsiones acuosas de aceite en agua, e isoctano (Simulante D2) para simular matrices alimentarias grasas. En estos estudios se analiza la cantidad de compuesto activo liberada desde el film al simulante en función del tiempo, hasta alcanzar valores constantes en la situación de equilibrio. Los datos de concentración reducida (masa de activo liberada a tiempo t respecto a la total en el film: M_t/M_0 o masa de activo liberada a tiempo t respecto a la liberada en el equilibrio: M_t/M_∞) vs. tiempo se modelizan para obtener las constantes cinéticas o coeficiente de difusión (D), así como el valor de la cantidad liberada en el equilibrio en relación a la cantidad total inicial en el film (M_∞/M_0). En este sentido, se han utilizado diferentes modelos matemáticos, como la cinética de primer orden (Tawakkal et al., 2013), los modelos de Peppas, Weibull (Matiacevich et al., 2016), o Fick (Tawakkal et al., 2013), para determinar la velocidad de liberación del compuesto de las películas, y la máxima liberación alcanzada en el equilibrio (Requena et al., 2017). Esta última permite estimar la concentración de activo en un alimento de polaridad similar al simulante utilizado en el análisis, para una determinada proporción másica entre el envase y el producto. La **tabla 4** resume algunos valores encontrados para el coeficiente de difusión (D) y el porcentaje de liberación en el equilibrio (M_∞/M_0) de diferentes activos incorporados en distintas matrices poliméricas, en contacto con simulantes de diferente polaridad.

TABLA 4. Coeficiente de difusión (D) y porcentaje de liberación en el equilibrio respecto a la total en el film (M_{∞}/M_0) obtenidos para diferentes compuestos activos incorporados en distintas matrices poliméricas, en contacto con simulantes alimentarios de diferente polaridad (A: etanol al 10% en agua, B: ácido acético al 3 % en agua, D1: etanol al 50 % en agua, D2: isoctano)

Matriz polimérica	Compuesto activo	Simulante A		Simulante B		Simulante D1		Simulante D2		Referencia
		$D \times 10^{13}$	M_{∞}/M_0							
		(m^2/s)	(%)							
PHBV	Carvacrol	3,2	22	2,8	23	7,2	96	0,15	65	Requena et al. 2017
PHBV	Eugenol	0,5	47	0,5	52	5,5	92	0,023	71	Requena et al. 2017
PLA-PHBV (75:25)	Carvacrol	30	19	2	25	280	76	6	86	Requena et al. 2018
PLA-PHBV/ Almidón*	Carvacrol	5	22	15	11	5	100	2	70	Requena et al. 2018
PLA	Cinamal- dehido	0,024	48	0,019	45	0,63	55	0,0031	5,5	Muller et al. 2017
PLA/almidón*	Cinamal- dehido	0,53	35	0,15	29	13,8	27	0,018	8	Muller et al. 2017
Almidón/PCL /Almidón*	Carvacrol	3,9	75	5,3	57	46	100	100	96	Tampau et al. 2018

*films multicapa

En los datos de la **tabla 4** se puede observar cómo los valores de la velocidad (coeficiente de difusión: D) y porcentaje de liberación del activo están muy afectados por la polaridad del Simulante y el tipo de matriz polimérica. Un mismo compuesto, como el carvacrol, se libera más rápidamente y en mayor proporción de una matriz de PHBV en simulantes de polaridad intermedia como el etanol al 50 %. Lo mismo le ocurre al eugenol desde la misma matriz, pero su liberación es más lenta que la del carvacrol, aunque se libera en mayor proporción. Este comportamiento está asociado a las diferentes interacciones moleculares del activo con la matriz polimérica y con los simulantes. Los coeficientes de difusión se ven muy afectados por la polaridad de los simulantes, como consecuencia de la difusión de estos en la matriz polimérica y el diferente nivel de plastificación producida en la misma. La estructura de los films también tiene un gran impacto en la cinética y equilibrio del proceso de liberación. Los films multicapa (laminados) con capas de diferentes polímeros se comportan de forma global, estando afectado el proceso por el comportamiento de cada capa polimérica y su respuesta particular frente al contacto con el simulante.

4. Un caso de estudio: comparación de la actividad antibacteriana de ácidos ferúlico y cinámico en función del soporte polimérico y la matriz alimentaria.

En esta sección se analiza de forma particular la efectividad antimicrobiana de los ácidos ferúlico y cinámico incorporados a matrices poliméricas de almidón de yuca (S) y PLA en films monocapa y en films bicapa de ambos polímeros, con los activos incorporados en la capa de almidón. Estos resultados corresponden a estudios previos (González, 2019; García, 2019) y se analizan aquí de forma conjunta, teniendo en cuenta los factores discutidos en el punto anterior, que reflejan la influencia de la matriz polimérica en la actividad antimicrobiana de los compuestos activos. Se describen, en primer lugar, los materiales utilizados, los métodos de preparación de los films y la metodología para la caracterización de la capacidad antimicrobiana en ensayos *in vitro*, y, finalmente, se discuten de forma conjunta los resultados obtenidos en estos ensayos en los estudios realizados. Se discuten también algunos datos de estudios previos (Requena et al., 2019 FC; González, 2019) que reflejan la influencia de la matriz alimentaria en la capacidad antimicrobiana de los films activos, comparando también con otros activos de origen natural como Carvacrol o Eugenol, componentes de los aceites esenciales de orégano y clavo.

4.1. Materiales y métodos del estudio analizado.

Preparación de los films.

Los films se obtuvieron con almidón de yuca producido por Asia CO., LDT (Kalasin, Tailandia) y distribuido por Quimidroga S.A. (Barcelona) y PLA amorfo, que fue suministrado por Natureworks (USA). La preparación de los films se realizó mediante el mezclado en fundido de los distintos componentes de los films y moldeo por compresión. Para ambos polímeros se incorporó un 2 o 3 % en peso de cada uno de los ácidos y se obtuvieron films control sin activo (S o PLA). En las películas de almidón se incorporó, además, glicerol como plastificante al 30 % en peso respecto al almidón. Para el mezclado en fundido de las distintas formulaciones se utilizó un mezclador interno (Haake PolyLab QC, Thermo Fisher Scientific, Alemania). Las películas se obtuvieron mediante moldeo por compresión con una prensa de platos calientes (Labtech engineering, Tailandia, modelo LP20). Para la obtención de los films bicapa, se prepararon las capas de almidón con los activos al 2 o 3 % y se termo-sellaron con las capas de PLA en la prensa de placas calientes a 100 bares min a 130°C durante 3 min.

Ensayos antimicrobianos.

La actividad antibacteriana, se evaluó mediante la metodología descrita por Requena et al., (2019). Se utilizaron las cepas liofilizadas de *Listeria innocua* y *Escherichia coli* (CECT 101) almacenadas a -18°C con un 30 % de glicerol. Se prepararon los cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial en caldo tríptico de soja (TSB), incubando a 37°C durante 24 horas y se diluyeron hasta 10⁶UFC/ml. Para las pruebas *in vitro*, se utilizó medio de cultivo de agar tríptico de soja (TSA) en placas Petri (55 mm de diámetro), que se inocularon con 100 µl de la suspensión de *L. innocua* o *E. coli* (10⁴ UFC/ml) y se cubrieron con las diferentes películas del mismo diámetro. Los films sin activos (S o PLA) se utilizaron como control. La incubación se realizó durante 6 días a 10 °C. Los recuentos se hicieron por duplicado. Para ello, cada muestra fue homogeneizada en agua de peptona tamponada, durante 2 min, en un Stomacher Lablender

(Masticator, IUL Instruments; Barcelona, España) y se diluyó adecuadamente. Para *E. coli* se utilizó agar Rojo Bilis de Violeta y para *L. innocua* se utilizó medio de agar Base Palcam, con suplemento selectivo para *Listeria*. La incubación fue a 37°C durante 48 horas. Los recuentos se expresaron como log UFC/g.

4.2. Discusión de los resultados.

La **tabla 5** muestra los valores de los recuentos obtenidos a los 6 de incubación para las placas cubiertas con los diferentes films de almidón (S) o PLA con diferentes proporciones (1, 2 o 3 %) de ácido ferúlico (F) o ácido cinámico (C). También se dan los recuentos obtenidos con los films bicapa de almidón-PLA con 2 o 3 % de F o C incorporado en la capa de almidón, con la capa de PLA en contacto con el medio de cultivo. Esto último intentó simular un contacto alimentario a través de la capa hidrofóbica para evitar la hidratación del film, y comprobar si el activo difundía de manera efectiva a través de la capa de PLA desde la de almidón. Pudo observarse la inhibición del crecimiento de ambas bacterias para los films activos de almidón en contacto con el medio de cultivo, pero, a las mismas concentraciones, los activos no fueron tan efectivos cuando estaban incorporados en la capa de PLA, ni cuando, estando incorporados en la capa de almidón, el contacto con el medio fue a través de la lámina de PLA.

En la **tabla 5** se dan también las reducciones logarítmicas en el crecimiento de ambas bacterias respecto al film control sin activos. Esta reducción se considera significativa a partir de 2 reducciones logarítmicas (Requena et al., 2019). Pudo observarse que, para el ácido ferúlico, solo se obtuvieron reducciones superiores a 2 Log para los films de almidón con 3 % de ferúlico en el caso de *E. coli* y con 2 y 3 % para el caso de *L. innocua*. El ácido cinámico mostró una mayor actividad antibacteriana frente a las dos bacterias, en coherencia con los menores valores de su MIC (Tabla 6). No obstante, su efectividad antibacteriana solo fue significativa para los films de almidón con 2 o 3 % del ácido. La inhibición fue mayor para el ácido cinámico que el ferúlico y, en ambos casos, fue mayor a mayor concentración del ácido. Así mismo, ambos activos fueron más efectivos contra *Listeria* que contra *E. coli*. La mayor efectividad de los ácidos fenólicos contra bacterias gram positivas, ha sido ya reportada por otros autores (Cueva et al., 2010). Sin embargo, la misma proporción del activo no fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento de las bacterias cuando estaba incorporada en films de PLA ni cuando se incorporó en la capa de almidón, pero con el contacto alimentario a través de la lámina de PLA.

La diferente efectividad de los activos en función a la matriz alimentaria radica en su falta de liberación al medio de cultivo. La matriz de PLA hidrofóbica no adsorbe humedad desde el medio de cultivo, manteniendo una estructura cerrada (no plastificada) donde la difusión de los ácidos está claramente inhibida. Sin embargo, la matriz de almidón altamente hidrofílica se plastifica con la adsorción de agua desde el medio de cultivo, favoreciéndose la difusión del activo a través del film en la matriz alimentaria, facilitándose la disponibilidad del activo en el medio de cultivo para ejercer la acción antibacteriana. En el film bicapa en contacto por la lámina de PLA, los activos no difunden al medio, como se deduce de la falta de inhibición observada. Este se explica por la falta de la plastificación del PLA en contacto con el medio de cultivo y su efecto barrera para la plastificación de la capa de almidón en el film bicapa.

Los resultados ponen de manifiesto los efectos mencionados en el punto anterior en relación con la influencia de las interacciones del film con la matriz alimentaria que conllevan

una mayor o menor plastificación de esta con la repercusión consiguiente en el coeficiente de difusión del activo que controla su liberación, en este caso, al medio de cultivo. Por otro lado, la afinidad relativa del activo con la matriz polimérica y el sustrato alimentario determina el reparto del componente entre ambos en el equilibrio. La naturaleza hidrofóbica de los activos les hace más afines a la matriz de PLA que a la de almidón, lo que permite suponer, que al margen de la plastificación que afectaría a la velocidad de difusión, el coeficiente de partición ($M_{\infty}/(M_0-M_{\infty})$) sería mayor para el caso del contacto almidón-medio de cultivo (ambos con naturaleza hidrofílica) que para el contacto PLA-medio de cultivo.

TABLA 5. Crecimiento bacteriano (UFC) a los 6 días de incubación e inhibición del crecimiento (reducción logarítmica) respecto al film control sin activo ($\text{Log UFC}_{\text{control}} - \text{Log UFC}_{\text{muestra}}$) para los films con ácido ferúlico, en ensayos in vitro con TSA (datos tomados de González, 2019 (1) y García, 2019 (2)).

Formulación	<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria innocua</i>	
	Log UFC (6 días)	Reducción logarítmica	Log UFC (6 días)	Reducción logarítmica
S ⁽¹⁾	8.6±0.3	0.3±0.6	8.7±0.4	0.2±0.4
S 1F ⁽¹⁾	8.4±0.2	0.5±0.2	8.10±0.09	0.8±0.1
S 2F ⁽¹⁾	8.2±0.2	0.7±0.2	6.6±0.2	2.3±0.2
S 3F ⁽¹⁾	5.1±0.2	3.8±0.2	4.7±0.2	4.2±0.2
S 1C ⁽¹⁾	8.1±0.2	0.8±0.2	7.22±0.14	1.7±0.1
S 2C ⁽¹⁾	6.9±0.2	2.0±0.2	2.4±0.2	6.4±0.2
S 3C ⁽¹⁾	3.7±0.8	5.2±0.8	1.8±0.2	7.1±0.2
PLA ⁽²⁾	6.78±0.19	1.0±0.2	8.08±0.06	0.08±0.06
PLA 1F ⁽²⁾	7.05±0.39	0.7±0.4	8.12±0.07	0.03±0.07
PLA 2F ⁽²⁾	6.96±0.09	0.8±0.1	7.96±0.13	0.20±0.13
PLA 1C ⁽²⁾	7.4±0.4	0.4±0.4	8.13±0.03	0.03±0.03
PLA 2C ⁽²⁾	7.4±0.4	0.4±0.4	8.07±0.05	0.09±0.05
S 2F-PLA	9.14±0.08	0.4±0.1	-	-
S 3F-PLA	8.82±0.08	0.7±0.1	-	-
S 2C-PLA	9.2±0.4	0.3±0.3	-	-
S 3C-PLA	8.5±0.2	1.1±0.2	-	-

TABLA 6. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de ácidos fenólicos y compuestos puros de aceites esenciales para *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

Activo	MIC (mg/g)		Referencia
	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	
Ácido ferúlico	0.80	0.70	García, 2019.
Ácido cinámico	0.70	0.65	García, 2019.
Carvacrol	0.70	0.75	Requena et al. 2019
Eugenol	1.35	1.05	Requena et al. 2019

La influencia de la matriz alimentaria en la efectividad de los films con antimicrobianos puede apreciarse en la **tabla 7** donde se da la inhibición del crecimiento bacteriano (reducción logarítmica) a los 6 días de incubación de los films de almidón con ácidos ferúlico y cinámico al 2 y 3 %, así como de films de PHBV con carvacrol o eugenol al 13 %. Los dos ácidos fenólicos redujeron en más de 2 log el crecimiento de ambas bacterias en filetes de pechuga de pollo, ratificándose las tendencias observados en el ensayo *in vitro* con medio de cultivo, aunque sin un efecto significativo de la concentración de ambos ácidos para caso de *E. coli* y con menor efecto anti-*Listeria* del ácido cinámico que en el medio de cultivo. La menor efectividad del ácido cinámico contra *Listeria* en la carne de pechuga que en el medio de cultivo, refleja o bien el efecto protector de la matriz para el microorganismo o el efecto secuestrante de la matriz (por interacciones específicas) frente al activo. Ambos efectos limitarían su disponibilidad para ejercer la acción antibacteriana. Este efecto no fue apreciable para el ácido ferúlico que presentó una capacidad inhibitoria similar en el medio de cultivo y la matriz de carne.

Por otra parte, los films de PHBV con carvacrol (con valores de la MIC similares a las del ácido cinámico, **tabla 6**) no presentaron actividad inhibitoria significativa frente a ninguna de las dos bacterias en pechuga de pollo. Sin embargo, el eugenol con valores mayores de la MIC, sí que provocó una reducción logarítmica superior a 2 en el crecimiento de *E. coli* en carne de pollo. Estos resultados reflejan la importancia de las interacciones polímero-activo-matriz alimentaria en la definición de la actividad antimicrobiana del film. En particular para el carvacrol, se han descrito interacciones específicas con la proteína de la carne que limitan su disponibilidad para ejercer la acción antimicrobiana. Adicionalmente, la liberación de carvacrol de la matriz de PHBV está limitada al 20 % (**Tabla 4**) del contenido incorporado en el film en alimentos polares, como la carne, lo cual también supone restricciones para ejercer su acción antimicrobiana.

TABLA 7. Reducción logarítmica del crecimiento bacteriano en diferentes matrices alimentarias con films activos (UFC) a los 6 días de incubación e inhibición del crecimiento (reducción logarítmica) respecto al film control sin activo (Log UCF control -Log UCF muestra) para los films con ácido cinámico. (Datos tomados de González, 2019 (1) y Requena et al., 2019 (2))

Film activo	Pechuga de pollo		Melón cortado	
	Inhibición logarítmica	Inhibición logarítmica	Inhibición logarítmica	Inhibición logarítmica
	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. Innocua</i>
S 2F ⁽¹⁾	3.1±0.2	2.2±0,2	0.84±0.11	0.7±0.6
S 3F ⁽¹⁾	3.2±0.2	3.47±0.10	1.24±0.13	2.1±0.8
S 2C ⁽¹⁾	3.96±0.09	2.88±0.02	1.90±0.13	3.3±0.5
S 3C ⁽¹⁾	4.05±0.08	4.26±0.14	2.11±0.65	4.9±0.2
PHBV CA ⁽²⁾	1.7±0.2	0.8±0.2	0.4±0.2	0.9±0.7
PHBV EU ⁽²⁾	2.2±0.6	0.4±0.1	1.0±0.3	0.6±0.1

En la matriz alimentaria de melón de cortado, con una composición muy diferente a la carne, la reducción logarítmica del crecimiento de ambas bacterias fue menor que en la carne pollo, para un determinado film activo. En el caso de *E. coli*, solo fueron efectivos los films de

almidón con ácido cinámico, pero menos que en la carne. El melón, muy rico en azúcares representa un sustrato con alta disponibilidad de nutrientes para las bacterias lo que puede reforzar su resistencia al antimicrobiano, haciéndolo menos efectivo. Prueba de ello, son las intoxicaciones asociadas al consumo de melón y sandía cortados (CDC, 2020). No obstante, el efecto antilisteria del ácido cinámico, desde los films de almidón, se mantuvo al mismo nivel que en la carne, aunque inferior al observado en el medio de cultivo. Esto constituye un resultado interesante dado el impacto tan negativo de la contaminación con *Listeria* en la salud del consumidor, sumado a la resistencia al frío de la bacteria.

5. Conclusión.

El desarrollo de materiales biodegradables o compostables con actividad antimicrobiana es un reto actual para la industria alimentaria. En base a los estudios realizados, los desarrollos para este tipo de materiales deben tener en cuenta, además de la adecuación del material polimérico a los requerimientos de envasado del producto, las posibles interacciones del mismo con los compuestos activos que pueden modificar su funcionalidad. Por otro lado, la velocidad de liberación y cantidad liberada de estos compuestos a la matriz alimentaria, para ejercer su acción antimicrobiana, define en gran medida el poder antimicrobiano del material. Esta liberación depende del balance de interacciones moleculares establecido entre el polímero, el activo y el sustrato alimentario. Los ácidos fenólicos, como el ferúlico y cinámico poseen actividad antibacteriana, pero su efecto cuando se incorporan a la matriz polimérica está controlado por la velocidad y cantidad de su liberación, la cual depende fuertemente del tipo de polímero y su interacción con el sustrato alimentario. Por consiguiente, los materiales desarrollados deben ser probados específicamente para un alimento determinado con el microorganismo diana.

6. Referencias.

- ACOSTA, S., JIMÉNEZ, A., CHÁFER, M., GÓNZALEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A. (2015). Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. *Food Hydrocolloids*. 49: 135-343.
- AHVENAINEN, R. (2003). Active and intelligent packaging: An introduction. In: Ahvenainen, R., Ed., *Novel Food Packaging Techniques*. CRC Press, Boca Raton, 5-21.
- ARCAN, I., YEMENICIOGLU, A. (2011). Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International*. 44:550-556.
- AYALA-ZAVALA J.F., (2005). Los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas, uno de los más estudiados es el aceite de ajo, aplicación en productos vegetales.
- BADUI, D. S. (2006). *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson.
- CDC, Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. (2020).
- CETIN-KARACA, H., NEWMAN, M. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia Coli*. *Food Biosciencie*. 11: 8-16.
- CHAO, C. Y YIN, M. (2008). Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(2):201-206
- CHAVES, C., ESQUIVEL, P. (2018). Chlorogenic acids present in coffee: antioxidant and antimicrobial capacity. *Agronomía Mesoamericana*. 30: 299-311.

- CHOI, I., LEE, S., CHANG, Y., LACROIX, M., HAN, J. (2018). Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin. *LWT- Food Science and Technology*. 93:427-433.
- Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- CUEVA, C., MORENO-ARRIBAS, V., MARTÍN-ALVÁREZ, P., BILLS, G., VICENTE, F., BASILIO, A., LÓPEZ, C., REQUENA, T., RODRÍGUEZ, J., BARTOLOMÉ, B. (2010). Antimicrobial Activity of Phenolic Acids Against Commensal, Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Res Microbiol*. 161:372-82.
- DEOG-HWAN, O., DOUGLAS, M. (1994). Enhanced Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Glycerol Monolaurate with Organic Acids. Louisiana Agricultural Experiment Station Manuscript No.92-21-6422.
- DOBRUCKA, R. (2014). Rozporządzenia unijne dla opakowań aktywnych i inteligentnych. *Opakowanie* 2:50–53
- DONG-SUN JUNG, FLOYD W. BODYFELT, MARK A. DAESCHEL. (1992). Influence of Fat Emulsifiers on the Efficacy of Nisin in Inhibiting *Listeria monocytogenes* in Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*, 75: 387-393.
- GERALDINE, R., FERREIRA S., BOTREL D., GONÇALVES, L (2008). Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers.*, 72, p.403-409.
- GILL, A. O. & HOLLEY, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 170–174.
- GUILBERT, S. (1986). Technology and application of edible protective films. Mathlouthi, M. (ed.). *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice*. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA, pp. 371-394.
- GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124 (1): 91-97.
- HAGER, A., KATLEEN, J.R, ARENDT, K. (2012). Influence of Gallic Acid and Tannic Acid on the mechanical and barrier Properties of Wheat Gluten films. *J. Agric. Food Chem*. 6157-6163.
- LÓPEZ-CABALLERO, M. E., MARTÍNEZ-ALVAREZ, O., GÓMEZ-GUILLÉN, M. D. C. Y MONTERO, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1029-1038.
- MADDOX, C., LAUR, L., TIAN, L. (2010). Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*. 60: 53-58.
- MALHEIRO, J F, J MAILLARD, F BORGES, AND M SIMÕES. (2018). "Evaluation of Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid Derivatives in Microbial Growth Control." *International Biodeterioration and Biodegradation* 141:71–78.
- MARCOS, B., AYMERICH, T., MONFORT, J.M., GARRIGA, M. (2010). Physical performance of biodegradable films intended for antimicrobial food packaging. *J. Food Sci*. 75: 502-507.
- MATEJCZYK, M., ŚWISŁOCKA, R., GOLONKO, A., LEWANDOSKI, W., HAWRYLIK, E. (2018). Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salt as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences* 63: 14-21.
- MATIACEVICH, S. (2016). Edible antimicrobial films based on microencapsulated lemongrass oil. *J. Food Sci. Technol*. 53:832-839.

- MIYAGUE, L., MACEDO, R., MECA, G., HOLLEY, A., LUCIANO, F. (2015). Combination of phenolic acids and essential oils against *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Science and Technology. 64: 333-336.
- MULLER, J., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., & CHIRALT, A. (2017). Poly (lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. European Polymer Journal, 95, 56-70.
- MUSSEL, D. (1983). Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, España.
- NEREYDA, R. (2011). Uso de agentes naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai 1: 153-170.
- PABLO JUAN GARCÍA MARTÍNEZ. 2019. Efecto antimicrobiano de ácidos fenólicos en combinación con carvacrol para su aplicación en films bioactivos biodegradables. Trabajo Final de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- PASTOR C., SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L., CHIRALT A. CHÁFER M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. Journal of Food Hydrocolloids 272,280.
- PICARD, E., GÉRARD, J.F., ESPUCHE, E. (2008). Water transport properties of Polyamide 6 based nanocomposites prepared by melt blending: on the importance of the clay dispersion state on the water transport properties at high water activity. J. Membr. Sci. 313: 284-295.
- PORRAS-LOIZA, A.P. Y LÓPEZ-MALO, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 3-1:121-134.
- PRANOTO, Y., SALOKHE, V.M., RAKSHIT, S.K., (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible films incorporated with garlic oil. Food Res. Int. 38:267-272.
- 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: 185-193.
- REQUENA, R., VARGAS, M., CHIRALT, A. (2018). Obtaining bilayer starch polyester-blend films with carvacrol. Food Hydrocolloids. 83:118-133.
- REQUENA, RAQUEL, MARÍA VARGAS, AND AMPARO CHIRALT. (2019). "Eugenol and Carvacrol Migration from PHBV Films and Antibacterial Action in Different Food Matrices." Food Chemistry 277: 38-45.
- ROGER, J., MAGRO, M., SPAGNOLO, S., BONAIUTO, E., BARATELLA, D., FASOLATO, L., VIANELLO, F. (2018). Antimicrobial and magnetically removable tannic acid nanocarrier: A processing aid for *Listeria monocytogenes* treatment for food industry applications. Food Chemistry. 267:430-436.
- ROSA ELENA GÓNZALEZ GUEVARA. (2019). Eefecto antibacteriano de films con ácidos fenólicos: aplicación en matrices alimentarias. Trabajo Final de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.,CHIRALT, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., Y CHÁFER, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. Journal of Food Engineering, 105, 246-253.
- SANCHEZ-MALDONADO, A., SCHIEBER, A., GANZLE,M. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology 1364-5072.
- SARKAR, P., BHUNIA, A. K., & YAO, Y. (2017). Impact of starch-based emulsions on the antibacterial efficacies of nisin and thymol in cantaloupe juice. Food chemistry, 217, 155-162.

- SHAHIDI, F. Y NACZK, M. (1995). *Food Phenolics Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic Publishing Co. EE.UU. 106 p.
- SHELEF, L. A., JYOTHI, E. K., & BULGARELLI, M. A. (1984). Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science*, 49(3), 737–740.
- SIANG-YING, C., BE-JEN, W., YIH-MING, W. (2015) Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT- Food Science and Technology*. 63:115-121.
- SUN LEE, D., YAM, K. T. Y PIERGIOVANNI, L. (2008). *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press. Boca Raton, EE.UU. 650 p.
- SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNEVELD, M., BIGGER, S.W.(2003). Antimicrobial properties of Basil and its Possible Application in Food Packaging. *J. Agric. Food Chem.* 51, 11, 3197-3207.
- TAKAHASHI, H., KASHIMURA, M., KOISO, H., KUDA, T., KIMURA, B. (2013). “Use of Ferulic Acid as a Novel Candidate of Growth Inhibiting Agent against *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Food.” *Food Control* 33 (1): 244–48.
- TAKAHASHI, H., TAKAHASHI, T., MIYA, S., YOKOYAMA, H., KUDA, T., KIMURA, B. (2015). “Growth Inhibition Effects of Ferulic Acid and Glycine/Sodium Acetate On *Listeria Monocytogenes* in Coleslaw and Egg Salad.” *Food Control* 57: 105–9.
- TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C., CHIRALT, A. (2018). Release kinetics and antimicrobial properties of carvacrol encapsulated in electrospun poly-(ϵ -caprolactone) nonofibres. Application in starch multilayer films. *Food Hydrocolloids*. 79: 158-169.
- TAWAKKAL, I., CRAN, M., BIGGER, S. (2013). Release of thymol from poly(lactic acid)-based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. *LWT-Food Sci. Technol.* 66: 629-637.
- VALENCIA-CHAMORRO, S. A., PALOU, L., DEL RIO, M. A., PEREZ-GAGO, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011, 51 (9), 872–900.
- VARGAS M., PASTOR C., CHIRALT A., MCCLEMENTS D.J., Y GONZÁLEZ-MARTÍNEZ C. (2008). Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Review in food Science and Nutrition* 48, 496- 511.
- VELDHUIZEN, E. J., CREUTZBERG, T. O., BURT, S. A., & HAAGSMAN, H. P. (2007). Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2127–2132.