

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del  
Medi Natural



Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANTIBACTERIANAS DE PELÍCULAS DE POLIÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO CINÁMICO

Curso 2020-2021

**Alumno:** Jaroslaw Szmaj Aguilar

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora:** Lorena Atarés Huerta

**Cotutor experimental:** Ramón Ordóñez Lagos

Valencia, Julio 2021



## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANTIBACTERIANAS DE PELÍCULAS DE POLIÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO CINÁMICO

**Alumno:** Jaroslaw Szmaj Aguilar

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora:** Lorena Atarés Huerta

**Cotutor experimental:** Ramón Ordóñez Lagos

Valencia, Julio de 2020

### Resumen

El uso masivo de plásticos ha generado un grave problema medioambiental, al que contribuyen en gran medida los envases de origen alimentario por la necesidad de envasar los alimentos para su conservación. Por tanto, es necesario desarrollar envases para alimentos que sean biodegradables o compostables. Los materiales biodegradables elaborados a partir de fuentes renovables, como el PLA, pueden ser una buena alternativa a los plásticos derivados del petróleo. Además, la elaboración de envases activos con propiedades antioxidantes o antimicrobianas pueden alargar la vida útil de los alimentos. En este trabajo se han elaborado películas de PLA con diferentes concentraciones de ácido cinámico, con capacidad antioxidante y antimicrobiana, con vistas al desarrollo de materiales activos de envasado alimentario. Se ha evaluado el efecto de la proporción de este ácido en las propiedades físicas y antimicrobianas de los films. Los films se prepararon mediante la técnica de casting usando acetato de etilo como disolvente. Se observó una mejora en la propiedad barrera al oxígeno en todas las formulaciones con ácido cinámico, mientras que las propiedades mecánicas mostraron una disminución en su valor independientemente de la concentración de compuesto activo. La propiedad barrera al agua no se vio afectada de manera significativa. A pesar del elevado grado de retención del activo en las películas, estas no inhibieron significativamente el crecimiento de *Listeria innocua*, probablemente debido a la limitada migración del compuesto activo al medio de cultivo. Se propone continuar la línea de investigación explorando otras estrategias de incorporación del compuesto activo para potenciar su liberación desde la matriz de PLA.

**PALABRAS CLAVE:** BIODEGRADABLE, ENVASADO ACTIVO, ÁCIDO POLILACTIVO, ÁCIDO CINAMICO

### Resum

L'ús massiu de plàstics ha generat un greu problema mediambiental, al qual contribueixen en gran manera els envasos d'origen alimentari per la necessitat d'envasar els aliments per a la seua conservació. Per tant, és necessari desenvolupar envasos per a aliments que siguin biodegradables o compostables. Els materials biodegradables elaborats a partir de fonts renovables, com el PLA, poden ser una bona alternativa als plàstics derivats del petroli. A més l'elaboració d'envasos actius amb propietats antioxidants o antimicrobianes poden allargar la vida útil dels aliments. En aquest treball s'han elaborat pel·lícules de PLA amb diferents

concentracions d'àcid cinàmic, amb capacitat antioxidant i antimicrobiana, amb vista al desenvolupament de materials actius d'envasament alimentari. S'ha avaluat l'efecte de la proporció d'aquest àcid en les propietats físiques i antimicrobianes dels films. Els films es van preparar mitjançant la tècnica de càsting usant acetat d'etil com a dissolvent. Es va observar una millora en la propietat de barrera a l'oxigen en totes les formulacions amb àcid cinàmic, mentre que les propietats mecàniques van mostrar una disminució en el seu valor, independentment de la concentració de compost actiu. La propietat de barrera al vapor d'aigua no es va veure afectada de manera significativa. Malgrat l'elevat grau de retenció de l'actiu en les pel·lícules, aquestes no van inhibir significativament el creixement de *Listeria innocua*, probablement a causa de la limitada migració del compost actiu al medi de cultiu. Es proposa continuar la línia d'investigació explorant altres estratègies d'incorporació del compost actiu per a potenciar el seu alliberament des-de la matriu de PLA.

PARAULES CLAU: BIODEGRADABLE, ENVASAT ACTIU, ÀCID POLILÀCTIC, ÀCID CINÀMIC

#### Abstract

The massive use of plastics has created a serious environmental problem, to which food packaging is a major contributor because of the need to package food for preservation. Therefore, there is a need to develop food packaging that is biodegradable or compostable. Biodegradable materials made from renewable sources, such as PLA, can be a good alternative to petroleum-based plastics. In addition, the development of active packaging with antioxidant or antimicrobial properties can extend the shelf life of food. In this work, PLA films with different concentrations of cinnamic acid, with antioxidant and antimicrobial capacity, have been studied for the development of active food packaging materials. The effect of the proportion of this acid on the physical and antimicrobial properties of the films has been evaluated. The films were prepared by casting using ethyl acetate as solvent. An improvement in the oxygen barrier property was observed in all formulations with cinnamic acid, while the values of mechanical properties showed a decrease regardless of the concentration of the active compound. The water barrier capacity was not significantly affected. Despite the high degree of retention of the active compound in the films, the films did not significantly inhibit the growth of *Listeria innocua*, probably due to the limited migration of the active compound into the culture medium. It is proposed to continue the line of research by exploring other strategies of incorporation of the active compound to enhance its release from the PLA matrix.

KEYWORDS: BIODEGRADABLE, ACTIVE PACKAGING, POLYLACTIC ACID, CINNAMIC ACID

## ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3.MATERIALES Y METODOS.....	5
3.1 Materiales .....	5
3.2 Preparación de las películas .....	5
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS .....	5
3.3.1. GROSOR.....	5
3.3.2. PROPIEDADES MECÁNICAS .....	6
3.3.3. PROPIEDADES DE BARRERA .....	6
3.3.3.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP).....	6
3.3.3.2 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO.....	6
3.3.4. PROPIEDADES ÓPTICAS .....	7
3.3.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS.....	7
3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	9
4.1 PROPIEDADES MECÁNICAS .....	9
4.2 PROPIEDADES BARRERA AL AGUA Y AL OXÍGENO .....	11
4.3 PROPIEDADES OPTICAS .....	12
4.4 RETENCIÓN DEL ACTIVO EN EL FILM.....	13
4.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIONAS .....	14
5. CONCLUSIÓN .....	15
6.BIBLIOGRAFIA.....	16

## 1.INTRODUCCIÓN

En la década de 1920 Hermann Staudinger acuñó el término de macromolécula, y sus reacciones de polimerización, que serían los pilares fundamentales de la industria del plástico. A partir de 1940 se comienzan a aplicar sus investigaciones y se globaliza la industria de producción de polímeros (Mülhaupt, 2004). En las siguientes años se obtendría la primera fibra sintética, el nylon (Virgil,Qi 2020). En la actualidad, la producción mundial de plásticos ha alcanzado 370 millones de toneladas, y China es el principal productor, con un 31% de la producción. De los 57.9 millones de toneladas que se produjeron en la Unión Europea, sólo 9,4 millones de toneladas fueron reutilizadas (PLASTICEUROPE,2019).

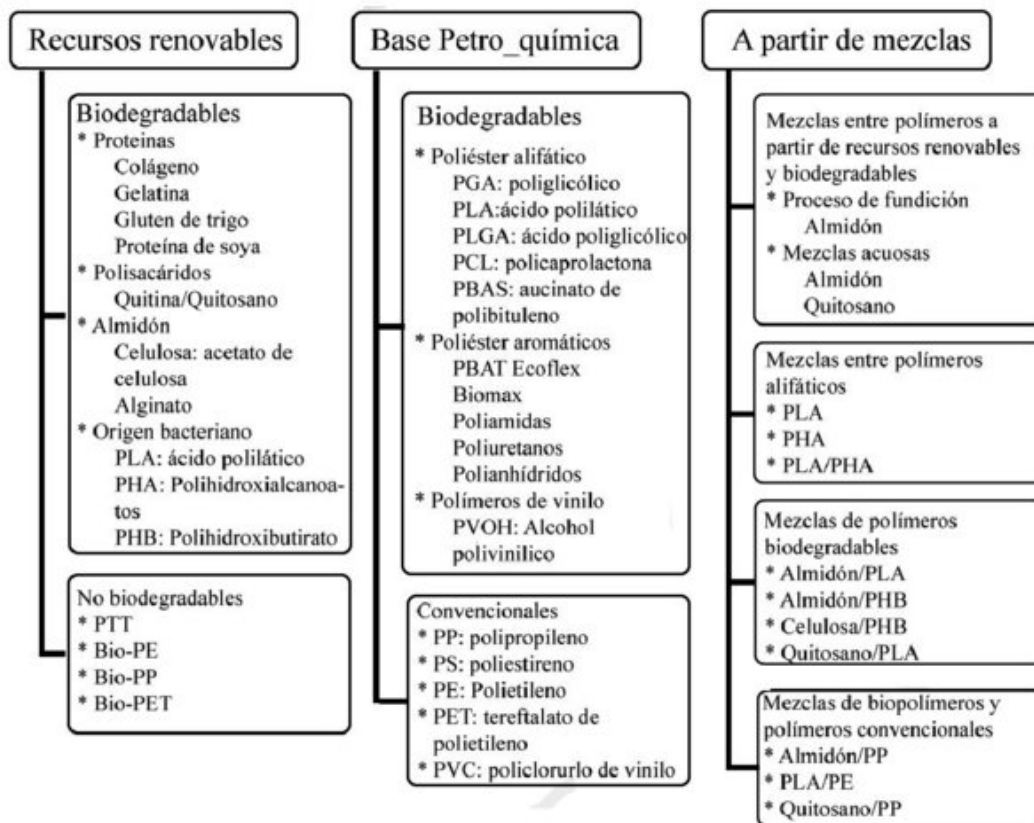
En la actualidad, aproximadamente la mitad de los desechos plásticos provienen del envasado, de los cuales la mayoría corresponden a la industria alimentaria, el mayor responsable de esta problemática medioambiental. Por este motivo, la cuarta asamblea de las Naciones Unidas consiguió un acuerdo global para alentar a los estados miembros en la búsqueda de alternativas ambientalmente inocuas para el ecosistema, teniendo en cuenta todas las fases del ciclo de vida del producto y sus posibles consecuencias para el medio ambiente (PNUMA, 2019).

Los bioplásticos se han presentado como una opción factible para sustituir a los materiales plásticos derivados del petróleo. Se definen como bioplásticos los polímeros que proceden de fuentes renovables, o son biodegradables, o ambas cosas. Algunos polímeros derivados del petróleo, como la policaprolactona (PCL), son biodegradables y otros derivados de fuentes renovables como las poliolefinas, no lo son. Una de las mayores ventajas de los materiales biodegradables es su capacidad para degradarse, por la acción enzimática de los microorganismos presentes en el medio, generando productos como agua, dióxido de carbono o metano y biomasa (Ren J ,2011)., integrándose en el ciclo de la materia orgánica. Muchos materiales poliméricos derivados de fuentes renovables tales como los residuos agrícolas, suelen ser biodegradables o compostables bajo ciertas condiciones ambientales (Popa et al., 2020).

Los bioplásticos son clasificados según su método de producción o su fuente primaria:

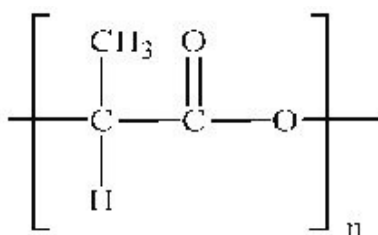
- Polímeros directamente extraídos de la biomasa, como polisacáridos o proteínas
- Polímeros producidos por síntesis química clásica a partir de monómeros procedentes de una fuente renovable, como el ácido poliláctico (PLA), o del petróleo.
- Polímeros producidos por microorganismos, genéticamente modificados o no, como los polihidroxialcanoatos

Actualmente, la aplicación a gran escala de los bioplásticos es su coste económico. Por ejemplo, el PHB tiene mejores propiedades barrera que el polipropileno (Markl et al ,2018), por lo que sería una alternativa interesante para el envasado de alimentos, pero su aplicación está limitada por su baja plasticidad y la dificultad de procesado. La necesidad de adaptación de sus propiedades y el coste de producción limitan la popularidad de los bioplásticos en la industria del plástico, muy madura y con los costes muy reducidos (Shen et al,2020). En la **figura 1** se pueden observar los principales polímeros usados por la industria, clasificados en función de su biodegradabilidad y su método de producción.



**Figura 1:** Clasificación de los distintos polímeros según su método de producción, biodegradabilidad y mezclas (Rodriguez S. et al., 2016)

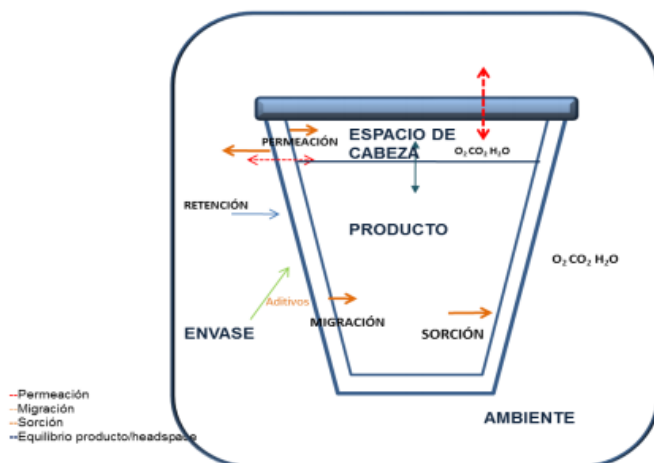
El ácido poliláctico es un poliéster constituido por monómeros de ácido láctico (**figura 2**), con propiedades similares al tereftalato de polietileno (PET). Su monómero se puede obtener fácilmente de los residuos de la industria azucarera (O. Martin, L. Aveârous, 2001; Tawakkal et al., 2014). Tiene aplicación en la producción de hilos de sutura, cápsulas de liberación lenta, implantes clínicos y envasado de alimentos (Serna et al., 2011). El PLA está reconocido como seguro para uso alimentario por la FDA. En estudios de migración a productos alimentarios se ha confirmado que las concentraciones de ácido láctico que migran del alimento son mucho más bajas que las habitualmente utilizadas en ingredientes alimentarios (Conn et al., 1995)



**Figura 2:** Estructura del PLA (Popa et al. 2014)

Durante los últimos años, se están utilizando las interacciones entre el alimento y el envase como una ventaja para el desarrollo de materiales de envasado con una funcionalidad añadida (Chen y Brody, 2013). Un envase activo es un material de envasado que interactúa con el alimento y el entorno de manera beneficiosa para la calidad, la salubridad, la vida útil e incluso las propiedades sensoriales del alimento (Jamshidian et al., 2010). Este concepto no es nuevo, ya que poblaciones indígenas de zonas cálidas recubrían los alimentos de hojas a modo de proteger el alimento, a modo de envase, el cual aportaba enzimas, compuestos antimicrobianos o aromas que otorgaban cualidades organolépticas o que eran capaces de extender la vida útil del alimento (López-de-Dicastillo et al., 2010).

Los envases activos operan a través de fenómenos de transferencia de materia (migración, sorción y permeabilidad), como puede observarse en la **figura 3**. Estos fenómenos pueden desencadenar cambios químicos, nutricionales o sensoriales positivos, afectando, por tanto, a la calidad del alimento (Dury-Brum et al., 2007). Los compuestos incorporados al envase con el fin de promover la transferencia al alimento reciben el nombre de compuestos activos. La liberación del compuesto activo depende de diversos factores como la composición del polímero, la cristalinidad, la relación superficie/volumen y el entorno donde este es liberado (Auras et al., 2004).



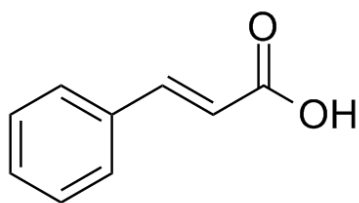
**Figura 3:** Procesos de transferencia de masa en un sistema alimento-envase-entorno (Sánchez, 2016)

En el caso concreto de envases de PLA, se ha comprobado la liberación de compuestos antioxidantes desde el envase al alimento. En concreto, se ha estudiado la migración de  $\alpha$ -tocoferol y resveratrol desde el PLA a simulantes alimentarios (Graciano-Verdugo, 2010). En un estudio realizado en leche deshidratada, se observó la liberación continua de antioxidantes naturales, lo que redujo las reacciones de peroxidación lipídica y extendió la vida útil del producto (Soto-Valdez et al., 2011).

Los envases activos pueden tener un efecto positivo sobre la calidad microbiológica del producto, prolongando así su vida útil (Sun Lee et al., 2008). El desarrollo de envases con estas

características requiere la selección del compuesto activo, el material de envase, el diseño del proceso de elaboración y el método de incorporación del activo, así como la comprobación del efecto en el sistema alimentario (Muller et al. 2017).

El ácido cinámico (**figura 4**), o ácido 3-fenil-2-propenoico, es un ácido monocarboxílico con demostrada capacidad antimicrobiana (Soriano, 2020). Es un componente característico de las plantas del género *Cinnamomum*. De forma natural se puede obtener del aceite de canela o de la manteca de Karité (árbol autóctono africano). También se puede sintetizar a partir de cinamaldehído y cloruro de benzal o anhídrido acético y benzaldehído (reacción de Perkin) o benzaldehído y el ácido malónico (Narasimhan et al., 2004). Es uno de los principales intermediarios en la síntesis de multitud de compuestos orgánicos como flavonoides, catequinas, fenilpropanoides y cumarinas (Narasimhan et al., 2004). Es sólido a temperatura ambiente, de color blanco y con baja solubilidad en agua. Estudios anteriores han demostrado que tiene una capacidad antimicrobiana significativa, ya que tanto él como la mayoría de sus derivados con capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae* (Malheiro et al., 2019). El ácido cinámico es un compuesto antioxidante que se ha demostrado beneficioso para la salud (Natella et al. 1999) y por tanto su presencia en la matriz del alimento no entrañaría problemas sanitarios.



**Figura 4:** Estructura molecular del ácido cinámico

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar el efecto de la adición de ácido cinámico en diferentes proporciones sobre las propiedades de films de PLA, obtenidos por extensión y secado (*casting*), usando acetato de etilo como solvente. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de los films de PLA con distintas concentraciones de compuesto activo mediante *casting*, usando acetato de etilo como solvente
- Caracterización de las propiedades de barrera, mecánicas, ópticas y antimicrobianas de los films
- Análisis del efecto de la incorporación de AC, en función de la proporción incorporada, en las películas de PLA.



### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Materiales

El ácido poliláctico (PLA) amorfo, polímero base para obtener los films, fue suministrado por Natureworks (Minnesota, U.S.A) (4060D, densidad 1.24 g/cm<sup>3</sup>), y el ácido cinámico (AC) por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El solvente utilizado, acetato de etilo, se adquirió en Indurkern S.A (Barcelona, España). Para el acondicionamiento de los films a 53 % HR se utilizaron soluciones sobresaturadas de nitrato de magnesio (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), y para su desecado se usó pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), ambos suministrado por Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España).

Para los ensayos de actividad antimicrobiana, se utilizaron cepas liofilizadas de *Listeria innocua* (CECT 910) que se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universitat de València, España). Scharlab (Barcelona, España) suministró el agua de peptona tamponada. En las pruebas *in vitro* se utilizó medio de cultivo agar tríplico de soja y para la realización de los recuentos en placa de *L. innocua* se utilizó medio de agar Base Palcam que contenía el suplemento selectivo de Palcam para *Listeria*, todo ello suministrado por Scharlab (Barcelona, España).

#### 3.2 Preparación de las películas

Las películas de PLA y AC se obtuvieron por extensión y secado (*casting*). Se disolvieron pellets de PLA en acetato de etilo con agitación magnética durante 3 h. El AC se incorporó en diferentes proporciones másicas para obtener diferentes formulaciones, tal como se indica en la **tabla 1**. Una vez obtenidas las soluciones, se vertieron en placas de teflón de 15 cm de diámetro y se dejó evaporar el solvente durante 24h.

**Tabla 1:** Fracciones másicas del PLA y el ácido cinámico en las distintas formulaciones.

Formulación	PLA	AC
PLA	1	0
2C	0,98	0,02
3C	0,97	0,03
4C	0,96	0,04
5C	0,95	0,05
7C	0,93	0,07
10C	0,90	0,10

Se obtuvieron 10 films de cada formulación, y se almacenaron en desecadores a 53%HR y 25Cº hasta la realización de los ensayos.

#### 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS

##### 3.3.1. GROSOR

Se utilizó un micrómetro digital (Palmer digital) con una precisión de 0,001mm para medir el grosor de los films en 8 posiciones aleatorias.

### 3.3.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Para llevar a cabo la determinación de las propiedades mecánicas de los films se siguió el método estándar ASTM D882-09 (American Society for Testing Materials, 2009). Las muestras (10 por formulación), acondicionadas a 25 °C y 53 % HR, se cortaron en rectángulos (2,5 x 10 cm) y se fijaron en las pinzas del texturómetro (Universal Testing Machine, TA.XTplus model, Stable Micro Systems, Haslemore, Inglaterra) para realizar el ensayo de tracción hasta rotura. La separación inicial de las pinzas fue de 50 mm y se sometieron a una velocidad de deformación de 20 mm/s. A partir de los datos de fuerza-deformación se obtuvieron las curvas de tensión vs. deformación de Hencky, para calcular la tensión de fractura (TS), el módulo de Young (EM) y el porcentaje de deformación en el punto de rotura (% E).

### 3.3.3. PROPIEDADES DE BARRERA

#### 3.3.3.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

Para la determinación de la WVP de los films, se empleó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-E96 (2005) y la corrección de Gennadios et al. (1994), empleando copas de permeabilidad de 3,5 cm de diámetro (Payne, Elcometer SPRL, Hermelle/SD Argeneau, Bélgica). Se cortaron círculos de las películas (3 por formulación) de 6,5 cm de diámetro y se ajustaron en la copa. Las copas, con agua destilada en el interior, se colocaron en un desecador con una solución acuosa sobresaturada de  $Mg(NO_3)_2$  para mantener una humedad relativa (HR) en la cámara de 53%, a una temperatura de 25 °C. Por tanto, el gradiente de HR fue de 53-100 %. Se utilizó un ventilador en el interior del desecador para homogeneizar la atmósfera y evitar la formación de capa límite en la superficie del film.

Se tomaron medidas de la masa de la copa durante 25 h, cada 1,5 h con una balanza analítica, hasta alcanzar el estado estacionario. A partir de la pendiente de pérdida de masa respecto al tiempo, se calculó la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) con la **Ecuación 1**, y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) con la **Ecuación 2**:

$$WVTR = J/A \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

J: pendiente de la gráfica de pérdida de masa frente al tiempo (g/h)

A: área de la película ( $m^2$ )

$$WVP = (WVTR \times L) / (P_{w1} - P_{w2}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$P_{w1}$ : presión parcial de vapor de agua por debajo de la película (Pa)

$P_{w2}$ : presión parcial de vapor de agua por encima de la película (Pa)

L: grosor de la muestra de la película (m)

#### 3.3.3.2 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

La permeabilidad al oxígeno de las películas acondicionadas a 53 % HR, se determinó según el método estándar ASTM F1927-07 con el equipo OX-TRAN (modelo 1/50, Mocon, Mineapolis, USA). El área de exposición de cada muestra fue de 50 cm<sup>2</sup>. El equipo realizó mediciones de la tasa de transmisión de oxígeno (TR) en intervalos de 10 minutos hasta alcanzar el equilibrio. La TR se transformó en permeabilidad con la **Ecuación 3** considerando el espesor de las películas y presión de oxígeno del equipo.

$$OP=TR \times T/(PO_2) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

OP: Permeabilidad al oxígeno (cm<sup>3</sup>.mm/m<sup>2</sup>.atm.dia)

PO<sub>2</sub>: Presión del oxígeno (atm)

L: Espesor de la película (mm)

TR: Tasa de transmisión de oxígeno (cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>.s)

### 3.3.4. PROPIEDADES ÓPTICAS

Se obtuvieron los espectros de reflexión de las películas sobre fondo blanco (R) y negro (R<sub>0</sub>), así como el espectro de reflexión del fondo blanco (R<sub>g</sub>), empleando un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co., Tokyo, Japan, 380-780nm) con una ventana de 10 mm de diámetro. Con estos datos, se determinó la reflectancia infinita (R<sub>∞</sub>), independiente del grosor de la película, y la transmitancia interna (T<sub>i</sub>) de las muestras con las **(Ecuaciones 4-7)**, aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) para la dispersión múltiple de la luz (Pastor et al., 2010). A partir de la Reflectancia infinita se determinaron las coordenadas de color CIE-L\*a\*b\*, el croma (C<sub>ab</sub>\*, **ecuación 8**) como el tono (h<sub>ab</sub>\*, **ecuación 9**) de las muestras.

$$a=R+(R_0-R+R_gR_0 \cdot R_g) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$b=\sqrt{a^2-1} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$R_\infty=a-b \quad \text{Ecuación 6}$$

$$T_i=\sqrt{(a+R_0)^2-b^2} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$Cab^*=\sqrt{(a^*)^2+(b^*)^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$h_{ab}^*=\arctan[a^*b^*] \quad \text{Ecuación 9}$$

### 3.3.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS

La actividad antibacteriana de todas las formulaciones con AC se evaluó utilizando la metodología descrita en estudios anteriores (Requena et al, 2019). Se utilizaron cepas liofilizadas de *Listeria innocua* y (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 10<sup>6</sup> UFC/ml. Para los ensayos *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* (10<sup>4</sup> UFC/ml) y se cubrieron con las diferentes películas del mismo diámetro. Se utilizaron placas sin recubrir como control. Las placas se incubaron durante 6 días a 10 °C. Para los recuentos (por duplicado), las muestras se homogeneizaron en agua de peptona tamponada, durante 2 min, en un Stomacher Lablender (Masticator, IUL Instruments; Barcelona, España) y se hicieron las diluciones correspondientes. Se utilizó agar Base Palcam, con suplemento selectivo para *Listeria* como medio de cultivo y las muestras se incubaron a 37°C durante 48 horas. Los recuentos se expresaron como log UFC/g de medio de cultivo.

### 3.3.6 CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO EN EL FILM

Se cuantificó la masa de AC retenido en las los films mediante extracción con metanol y determinación espectrofotométrica. La ley de Lambert-Beer (**Ecuación 10**), establece que en disoluciones con una concentración baja de soluto se da una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la muestra.

$$A = \epsilon \times c \times l \quad \text{Ecuación 10}$$

donde:

A: Absorbancia

$\epsilon$ : coeficiente de extinción molar característico de cada compuesto y longitud de onda (L/mol cm)

c: concentración de la sustancia en análisis (mol/L)

l: grosor de la muestra (cm)

Se determinó el espectro de absorción del ácido cinámico y se seleccionó la longitud de onda del máximo de absorbancia (270 nm). Como blanco se utilizó la formulación de PLA. Con ello, se obtuvo la recta patrón a partir de disoluciones de concentración conocida del compuesto en metanol y la medida de su absorbancia a 270 nm, utilizando un espectrofotómetro UV/VIS (Thermo Scientific Evolution 201, EEUU).

Para cada muestra seca, se tomaron (por triplicado) aproximadamente 100 mg y se introdujeron en un vial con 10 ml de metanol, manteniendo agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se filtraron y se midió la absorbancia para determinar la concentración de activo presente con la recta de calibrado. El resultado se expresó en gramos de activo cuantificado por cada 100 gramos de activo inicialmente incorporado en la formulación (**ecuación 11**).

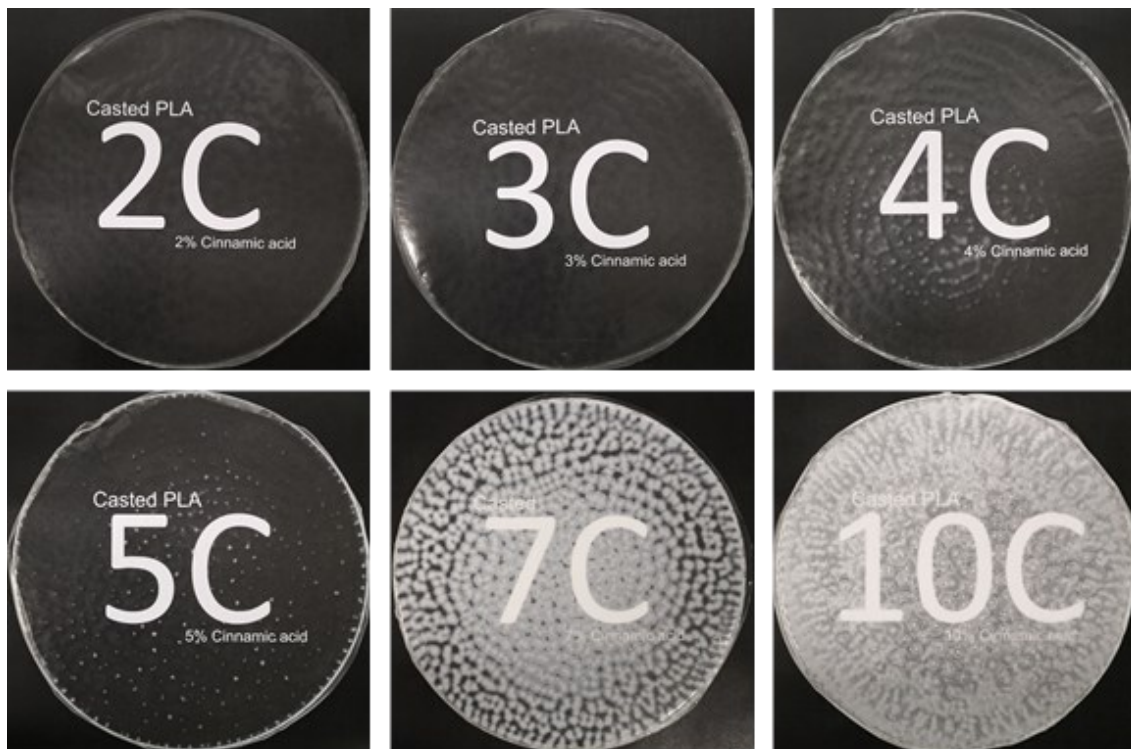
$$\% \text{ Recuperación compuesto activo} = \frac{\text{mactivo liberado}}{\text{mmuestra} \times X_{\text{activo}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

### 3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII (Manugistics Cop., Rockville, EEUU), para cada propiedad, con el fin de observar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) debidas a la presencia y proporción de AC.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

La **figura 5** muestra el aspecto visual de los films obtenidos con las diferentes proporciones de ácido cinámico (2-10%). A partir del 4 %, se observó la formación de cristales de ácido cinámico que proporcionaron un aspecto heterogéneo a los films. Esto indicó la falta de compatibilidad del compuesto en la matriz polimérica, lo que limitaba su uso como material de envase. En base a este resultado, sólo se caracterizaron en sus propiedades funcionales, los films con 2 y 3 % de ácido cinámico que presentaron una estructura homogénea sin formación aparente de zonas de cristalización. No obstante, todos los films fueron analizados en su capacidad antibacteriana.

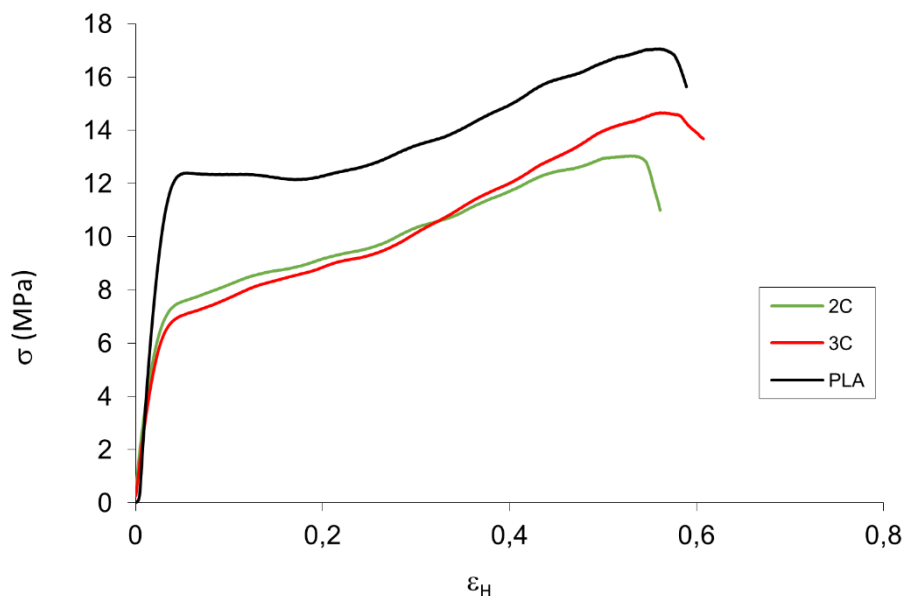


**Figura 5.** Aspecto visual de los films de PLA obtenidos con diferentes proporciones de ácido cinámico incorporado.

##### 4.1 PROPIEDADES MECÁNICAS

En la **figura 6** se muestran las curvas típicas de tensión frente a deformación de Henky para las formulaciones analizadas, y la **tabla 2** muestra los resultados de los parámetros mecánicos (módulo elástico, tensión de ruptura y porcentaje de elongación) obtenidos. Puede observarse que, en todos los casos, se da un intervalo de deformación elástica (recta inicial) cuya pendiente corresponde al módulo de elasticidad, y un intervalo de deformación plástica antes de la fractura del film. La incorporación de AC a ambas concentraciones provocó un descenso de la fuerza del film. La comparación del comportamiento mecánico de los films con los obtenidos por mezclado en fundido y moldeo por compresión con idéntica composición (Dasilva, 2020) permite afirmar que la técnica de casting da lugar a films mucho más extensibles (del orden de 60 %) que el

termoprocésado (3-4 %), cuyos films no presentaron apenas deformación plástica. No obstante, los valores de esfuerzo en los films por casting fueron mucho menores que en los termoprocésados. Esto podría explicarse por la retención de una cierta cantidad del solvente (acetato de etilo) en la matriz polimérica, que podría plastificar la matriz, haciéndola más extensible. La retención de acetato de etilo en la matriz de PLA ha sido observada también por otros autores (Tampau et al. 2020).



**Figura 6:** Curvas típicas de tensión ( $\sigma$ ) -deformación de Henky ( $\epsilon_H$ ) de las formulaciones sin ácido cinámico (PLA), con 2% de ácido cinámico (2C) y con 3% de ácido cinámico (3C).

**Tabla 2:** Valores promedio y desviación estándar del espesor, módulo elástico, tensión de ruptura y porcentaje de elongación en el punto de rotura para las formulaciones estudiadas.

Formulación	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Módulo elástico (MPa)	Tensión en rotura (MPa)	Elongación (%)
PLA	247±13 <sup>a</sup>	466±104 <sup>c</sup>	21±7 <sup>b</sup>	67±25 <sup>a</sup>
2C	246±22 <sup>a</sup>	296±53 <sup>b</sup>	13±3 <sup>a</sup>	52±12 <sup>a</sup>
3C	251±11 <sup>a</sup>	208±62 <sup>a</sup>	15±2 <sup>a</sup>	65±9 <sup>a</sup>

Superíndices diferentes <sup>(abcde)</sup> en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

La incorporación de ácido cinámico no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el espesor de las películas ( $p > 0,05$ ). Los valores de las propiedades mecánicas de los films de la formulación PLA (sin AC) fueron similares a los obtenidos en estudios previos para el mismo polímero y films obtenidos por casting (Muller, 2017; Sanyang, 2016). Al incorporar el compuesto activo se produjo un marcado descenso de la pendiente de la curva tensión-deformación (módulo elástico), coherente con una reducción de la rigidez del material, que fue más acusada a mayor concentración de ácido. También se observó un descenso

estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la tensión de fractura, mientras que el porcentaje de elongación no se vio afectado. Estos resultados indican una pérdida importante de la cohesión de la matriz al incorporar el ácido cinámico, lo cual, dada la relativamente baja proporción del compuesto activo, podría deberse a una de-polimerización parcial del PLA, por efecto de hidrólisis provocado por el ácido. Un efecto similar fue observado en films de PLA con ácido cinámico obtenidos por termoprocesado (Dasilva, 2020).

Estudios previos (Choi et al., 2018) reportaron efectos de entrecruzamiento entre proteínas y los ácidos tánico y cafeico, asociado a una restricción en la movilidad molecular y un incremento de la rigidez de la matriz. En otros estudios se describe un efecto plastificante de algunos ácidos fenólicos principalmente en films de polisacáridos, debido a la formación de puentes de hidrogeno con los grupos hidroxilo de los ácidos y las cadenas poliméricas. Esto supone el reemplazamiento de las interacciones polímero-polímero dentro de la matriz, lo que facilita el desplazamiento de cadenas por el aumento del espacio libre intercadena (Azeredo, 2016). Sin embargo, en los films de PLA, la adición de ácido cinámico produjo un descenso de la rigidez y la tensión de fractura, sin un efecto sobre la extensibilidad, lo que, tal como se ha comentado, podría explicarse por la despolimerización parcial del PLA debido a la presencia de ácido y la gran sensibilidad a la hidrólisis de los poliésteres como el PLA.

#### 4.2 PROPIEDADES BARRERA AL AGUA Y AL OXÍGENO

La **tabla 3** muestra los valores de la permeabilidad el vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP) para las tres formulaciones estudiadas. Los valores obtenidos en la formulación PLA son cercanos a los obtenidos por Muller et al. (2017) para films del mismo tipo de PLA obtenidos por casting y también para films del mismo polímero obtenidos por termoprocesado (Dasilva, 2002). La incorporación de ácido cinámico no produjo una mejora estadísticamente significativa en las propiedades barrera al vapor de agua de las películas, aunque esto si que fue observado para el mismo tipo de films obtenido por termoprocesado (Dasilva, 2020).

**Tabla 3:** Valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP) de las películas de PLA con (2C y 3C) y sin (PLA) ácido cinámico al 2 y 3 %. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar

Formulación	WVP ( $g \cdot mm / KPa \cdot h \cdot m^2$ )	OP $\times 10^{14}$ ( $cm^3 \cdot mm / m^2 \cdot atm \cdot día$ )
PLA	0.27 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>	246 $\pm$ 15 <sup>b</sup>
2C	0.38 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	184.90 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>
3C	0.18 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	162 $\pm$ 3 <sup>a</sup>

Subíndices diferentes (*abcde*) en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

La capacidad de limitar la transferencia de gases en un sistema alimentario es uno de los puntos críticos para su conservación (Mathew y Abraham, 2008). La incorporación de AC supuso una mejora en las propiedades barrera al oxígeno de las películas, en coherencia con la proporción de ácido incorporada. Esta reducción de la permeabilidad al oxígeno puede estar relacionada con la capacidad antioxidante del ácido cinámico y el consiguiente bloqueo al paso del oxígeno a través del film (Tawakkal et al. 2014), tal como se ha descrito en estudios anteriores (Fabra et

al., 2011). Esta mejora en la permeabilidad al oxígeno fue también observada en films similares obtenido por termoprocesado, sobre todo con 2 % de AC.

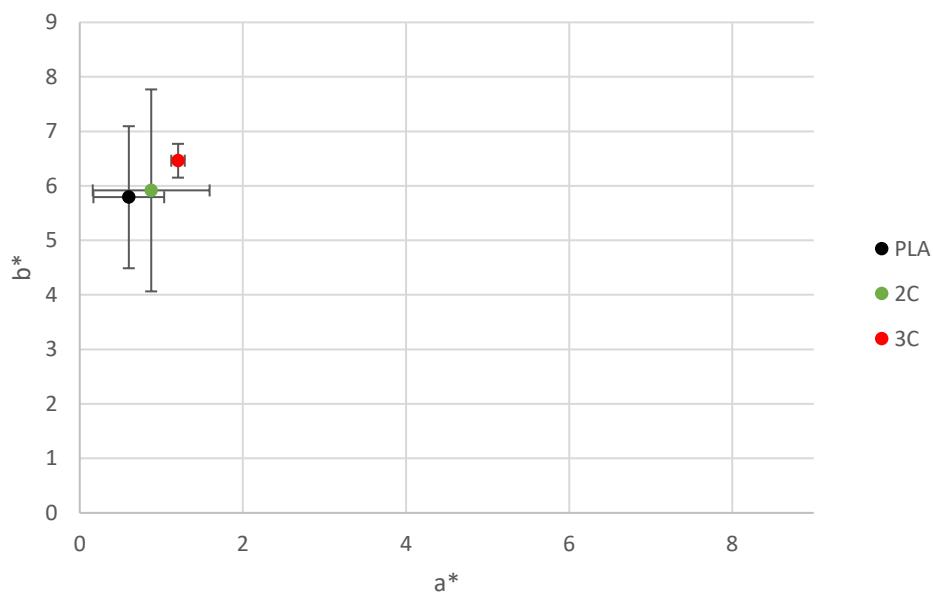
#### 4.3 PROPIEDADES OPTICAS

En la **tabla 4** se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de las coordenadas de color de las películas, y en la **figura 7** sus posiciones en el plano cromático. Para la formulación PLA se obtuvieron valores ligeramente distintos a los reportados por Wang et al (2016), probablemente debido al uso de diferentes disolventes. Choudhury, et al (2014) estudiaron el efecto del solvente sobre los films de PLA y observaron variaciones en las propiedades ópticas en función el solvente empleado. En lo referente al efecto de la incorporación de AC sobre el color de las películas, solamente se observó un ligero aumento de la luminosidad, en coherencia con lo observado por Muller et al., (2017) con la incorporación de cinamaldehído a films de PLA. La incorporación del activo provocó una ligera tendencia hacia mayores valores de croma o saturación del color, sin cambios significativos en el tono.

**Tabla 4:** Valores promedio y desviaciones estándar de la Claridad ( $L^*$ ), coordenadas en el plano cromático ( $a^*$  y  $b^*$ ), croma ( $C_{ab}^*$ ) y tono ( $h_{ab}^*$ ) de todas las formulaciones.

Formulación	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$h_{ab}^*$	$C_{ab}^*$
PLA	$80.6 \pm 3.0^a$	$0.72 \pm 0,43^a$	$5.91 \pm 1,30^a$	$83.6 \pm 2.8^a$	$5.97 \pm 1.3^a$
2C	$84.7 \pm 2.8^b$	$0.87 \pm 0,72^a$	$6.27 \pm 1,85^a$	$84.3 \pm 9.0^a$	$6.4 \pm 1.9^a$
3C	$83.5 \pm 0.3^b$	$1.2 \pm 0,08^a$	$6.47 \pm 0.31^a$	$79.4 \pm 1.0^a$	$6.58 \pm 0.3^a$

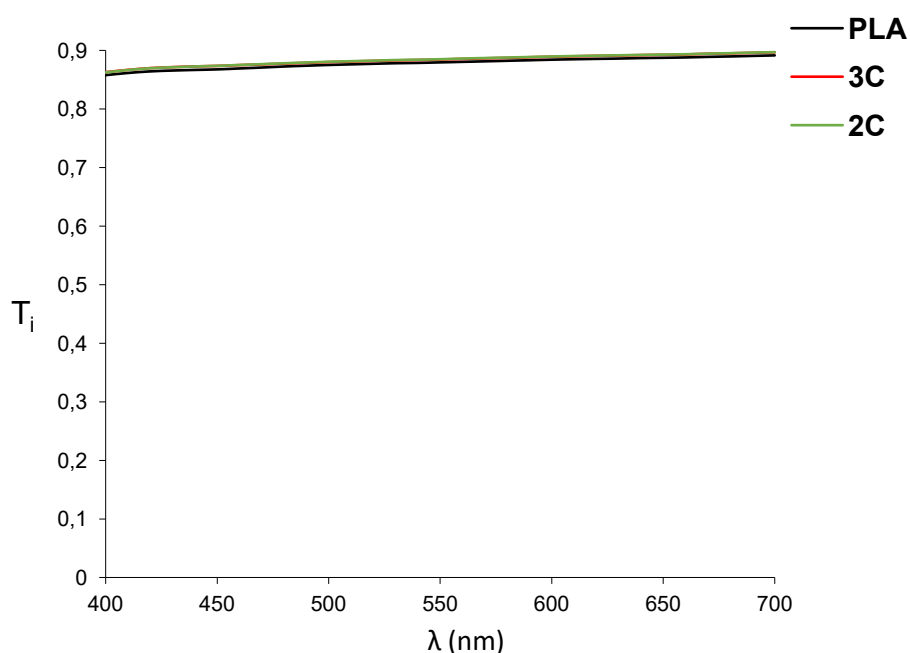
Subíndices diferentes (*abcde*) en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7:** Ubicación de las formulaciones en el plano cromático  $a^*b^*$



En la **figura 8** se muestran los valores de transmitancia interna ( $T_i$ ) para el entorno de luz visible (400-700 nm) de las formulaciones estudiadas. Los valores obtenidos, en todo el espectro fueron similares a los reportados por Muller et al. (2017). La adición del ácido fenólico en las proporciones ensayadas no produjo modificaciones en el espectro de transmitancia interna, por lo que se puede concluir que la adición del compuesto no afecta a la transparencia de las películas. En conclusión, la incorporación de AC al 2 o 3 % no provocó cambios significativos en las propiedades ópticas de los films de PLA.



**Figura 8:** Espectros de transmitancia interna ( $T_i$ ) entre 400 y 700 nm para las diferentes formulaciones.

#### 4.4 RETENCIÓN DEL ACTIVO EN EL FILM

En la **tabla 5** se muestran los valores del porcentaje de retención de AC en las formulaciones 2C y 3C, en términos de porcentaje de AC extraído del film, respecto al inicialmente incorporado. Para ambas formulaciones, la retención porcentual promedio de AC en el film fue superior al 97 %, lo que parece indicar una buena conservación del activo en la matriz de PLA. Por tanto, con las cantidades presentes, sería esperable un efecto antimicrobiano del activo si se produce su liberación efectiva en el sustrato alimentario. No obstante, esta liberación está afectada por la capacidad del compuesto para difundir hasta la superficie del film en contacto con el sustrato alimentario. Esta difusión depende, a su vez, de las interacciones del film con dicho sustrato y la posible relajación de la matriz por difusión del agua del alimento. Sin embargo, dada la naturaleza hidrofóbica del PLA, la relajación de la matriz en contacto con un medio acuoso, no es muy factible.

Jamshidian et al (2012) ha hecho un estudio de revisión sobre la producción, aplicaciones, la obtención de nanocomposites, and la liberación de compuestos activos incorporados en films

de PLA en simulantes alimentarios, observando problemas de liberación que podría mitigarse con técnicas de nanotecnología. Srisa y Harnkarnsujarit (2020) estudiaron la migración del trans-cinamaldehído, concluyendo que la temperatura es clave y que la migración está favorecida en una bicapa de PLA con adipato-co-tereftalato de butileno (PBAT). Estudios realizados con films de PLA-carvacol (Roberto Scaffaro et al., 2020) concluyeron que la migración de este es similar a la esperada en este tipo de films y que los procesos de migración del compuesto activo se detendrían a las 300 h aproximadamente.

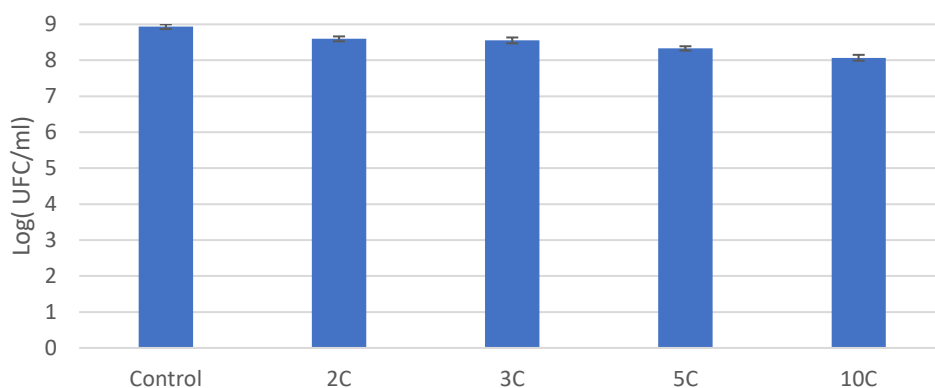
**Tabla 5:** Valores promedio y desviaciones estándar del porcentaje de recuperación del compuesto activo en las formulaciones estudiadas

Formulación	%
2C	97.5±2.8 <sup>a</sup>
3C	98.0±3.1 <sup>a</sup>

Subíndices diferentes (abcde) en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ )

#### 4.5 PROPIEDADES ANTIMICROBIONAS

Los resultados de los recuentos microbianos se muestran en la **figura 9**, y en la **tabla 5** pueden observarse los valores de reducción logarítmica de cada formulación en referencia al control (placas sin recubrir). En todos los casos hubo un crecimiento de las bacterias de más de 4 log UFC respecto al inóculo inicial ( $10^4$  UFC/ml), el cual fue ligeramente inhibido a medida que aumentó la concentración de AC en el film. No obstante, en las formulaciones de film ensayadas se obtuvieron reducciones logarítmicas del crecimiento inferiores a 1 log, lo que indica que el compuesto activo no se liberó adecuadamente de la matriz. La concentración mínima inhibitoria del AC para *Listeria innocua* es de 0.65 mg/mL (Ordoñez et al. 2020) y con la cantidad incorporada en los films podría alcanzarse en el medio de cultivo si se diera de forma efectiva su liberación. Esto implica, que el compuesto queda atrapado dentro de la matriz de PLA y no puede actuar con antimicrobiano de manera efectiva. Si que se observa la tendencia a una mayor inhibición cuando aumenta la concentración de AC en el film, lo que es coherente con una mayor liberación del compuesto de la zona más superficial del film en contacto con el medio de cultivo. Esto sugiera que la incorporación del compuesto en la superficie del film (por pulverización o electrodeposición) podría resultar más efectiva para la obtención de films activos de PLA con ácido cinámico.



**Figura 9:** Recuento microbiano de *L. innocua* en las placas sin recubrir (control) y recubiertas con films de PLA con diferentes proporciones de ácido cinámico, después de 6 días de incubación a 10 °C

**Tabla 5:** Valores del recuento microbiano de *Listeria innocua* y de su inhibición para las muestras estudiadas

Formulación	Log(UFC/g)	Inhibición
Control	8.94±0.07 <sup>d</sup>	-
2C	8.59±0.07 <sup>c</sup>	0.34±0.07 <sup>a</sup>
3C	8.55±0.08 <sup>c</sup>	0.38±0.08 <sup>a</sup>
5C	8.33±0.06 <sup>b</sup>	0.60±0.06 <sup>b</sup>
10C	8.07±0.08 <sup>a</sup>	0.87±0.08 <sup>c</sup>

Subíndices diferentes (*abcde*) en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ )

## 5. CONCLUSIÓN

Los films de PLA con diferentes proporciones de ácido cinámico pudieron obtenerse vía *casting* usando acetato de etilo como solvente. No obstante, se observó cristalización del activo a partir de 3%, lo que supone la no viabilidad de las películas con proporciones de activo superiores. La incorporación del ácido en los films hasta 3% los hizo menos firmes y menos resistentes a la fractura, sin modificaciones su extensibilidad. No se observó una mejora de las propiedades barrera al agua, pero sí de la barrera al oxígeno, probablemente debido a la capacidad antioxidante del ácido cinámico. A pesar de que la retención del ácido en los films fue superior al 97%, no se observó actividad antimicrobiana en los ensayos *in vitro* frente a *Listeria innocua*. Esta falta de actividad puede deberse a limitaciones en la transferencia del activo desde la matriz de la película. Como propuesta para futuras investigaciones, se propone la incorporación superficial del compuesto por diferentes técnicas tales como la pulverización o la electrodeposición (*electrospinning*) con el fin de potenciar la liberación del compuesto activo. Del mismo modo, el diseño de materiales multicapa en combinación con otros polímeros biodegradables podría optimizar las propiedades de barrera del envase.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ATCHARAWAN SRISA, NATHDANAI HARNKARNSUJARIT(2020), Antifungal films from trans-cinnamaldehyde incorporated poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) for bread packaging, Food Chemistry, Volume 333, 127537

AURAS, R., HARTE, B. Y SELKE, S. (2004). Effect of water on the oxygen barrier

BYUN, Y., WHITESIDE, S., THOMAS, R., DHARMAN, M., HUGHES, J. AND KIM, Y.T. (2012), The effect of solvent mixture on the properties of solvent cast polylactic acid (PLA) film. J. Appl. Polym. Sci., 124: 3577-3582.

CHEN, J. Y BRODY. A. L. (2013). Use of active packaging structures to control the microbial quality of a ready-to-eat meat product. Food Control. 30(1):306-310.

CHOUDHURY M, MOHANTY S, NAYAK S (2014) Effect of Different Solvents in Solvent Casting of Porous Pla Scaffolds – In Biomedical and Tissue Engineering Applications. J Tissue Sci Eng 6: 142.

CLARA SÁNCHEZ GARCÍA (2016) “Desarrollo y caracterización de polímeros activos de ácido poliláctico (pla) para su posible uso en envases alimentarios” Centro De Investigación En Química Aplicada.

CONN, R. E., KOLSTAD, J. J., BORZELLECA, J. F., DIXLER, D. S., FILER, L. J., LADU, B. N. Y PARIZA, M. W. (1995). Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food contact polymer. Food chemistry and toxicology. 33 (4):273-283.

DURY-BRUN, C., CHALIER, P., DESOBRY, S. Y VOILLEY, A. (2007). Multiple mass transfers of small volatile molecules through flexible food packaging. Food reviews international. 23(3):199-255.

FABRA, M.J., HAMBLETON, A., TALENS, P., DEBEAUFORT, F., CHIRALT, A. (2011). Effect of ferulic acid and  $\alpha$ -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. Food Hydrocolloids. Vol. 25, p. 1441-1447.

FAUSTA NATELLA, MIRELLA NARDINI, MAURIZIO DI FELICE, AND CRISTINA SCACCINI Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure–Activity Relation Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999 47 (4), 1453-1459

HENRIETTE M.C. AZEREDO, KEITH W. WALDRON (2016), Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review, Trends in Food Science & Technology, Volume 52, Pages 109-122

HUTCHINGS, J. B. (1999). Instrumental specification. In Food colour and appearance (pp.199–237).

JAMSHIDIAN, M., TEHRANY, E. A., IMRAN, M., JACQUOT, M. Y DESOBRY, S. (2010). Polylactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. Comprehensive reviews in food science and food safety. 9(5):552-571.

KYUNG-MAN CHOI, MYEON-CHEON CHOI, DONG-HUN HAN, TAE-SUNG PARK, CHANG-SIK HA (2013) Plasticization of poly(lactic acid) (PLA) through chemical grafting of poly(ethylene glycol) (PEG) via in situ reactive blending, European Polymer Journal, Volume 49, Issue 8, Pages 2356-2364

- LONG-FENG WANG, JONG-WHAN RHIM, SEOK-IN HONG (2016), Preparation of poly(lactide)/poly(buylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 68, Pages 454-461
- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C., ALONSO, J. M., CATALÁ, R., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUNOZ, P. (2010). Improving the Antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(20):10958-10964.
- M.L. SANYANG, S.M. SAPUAN, M. JAWAID, M.R. ISHAK, J. SAHARI (2016), Development and characterization of sugar palm starch and poly(lactic acid) bilayer films, *Carbohydrate Polymers*, Volume 146, , Pages 36-45,
- MALHEIRO, J. F., MAILLARD, J. Y., BORGES, F., & SIMÕES, M. (2019). Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141, 71-78.
- MAOCAI SHEN, BIAO SONG, GUANGMING ZENG, YAXIN ZHANG, WEI HUANG, XIAOFENG WEN, WANGWANG TANG, Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?, *Environmental Pollution*, Volume 263, Part A, 2020,114469,
- MARKL, E., GRÜNBICHLER, H., & LACKNER, M. (2018). PHB-bio based and biodegradable replacement for PP: a review. *Nov. Tech. Nutr. Food Sci*, 2, 206-209.
- MATHEW, S. & ABRAHAM, T.E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826–835.
- MÜLHAUPT, R. (2004), Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 43: 1054-1063.
- MULLER, JUSTINE (2017). *Films Activos Para El Envasado de Alimentos a Base de Ácido Poliláctico (PLA) y Almidón*. Universitat Politècnica de València
- NARASIMHAN, B., BELSARE, D., PHARANDE, D., MOURYA, V., & DHAKE, A. (2004). Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(10), 827-834.
- O MARTIN, L AVÉROUS (2001), Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems, *Polymer*, Volume 42, Issue 14, 2001, Pages 6209-6219, ,
- ORDOÑEZ, R.; ATARÉS, L.; CHIRALT A. (2021). Physicochemical and antimicrobial properties of cassava starch films with ferulic or cinnamic acid. *LWT*. 144:111242.
- PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A. & GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 82, No. 4, p. 1174-1183.
- PLASTICS EUROPE, Productores de Materias Plásticas, visto el 26 de junio de 2021. <https://www.plasticseurope.org/es>
- PNUMA (2019.), Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. “Combatir La Contaminación de Los Productos de Plástico Desechables.” *Cuarta Asamblea de Las Naciones Unidas Sobre El Medio Ambiente*, 1–24.

Polymer Science. 92:1790–1803

POPA, ELISABETA & RÂPĂ, MARIA & POPA, OVIDIU. (2014). BIOPOLYMERS BASED ON RENEWABLE RESOURCES - A REVIEW. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XVIII,

properties of polyethylene Terephthalate and Poly (lactide) films, Journal of Applied

REN, J. (ED.). (2011). Biodegradable poly (lactic acid): synthesis, modification, processing and applications. Springer Science & Business Media.

REQUENA, R., VARGAS, M., & CHIRALT, A. (2019). Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 101, 183–190.

ROBERTO SCAFFARO, ANDREA MAIO, EMMANUEL F. GULINO, GIORGIO D.M. MICALE (2020), PLA-based functionally graded laminates for tunable controlled release of carvacrol obtained by combining electrospinning with solvent casting, *Reactive and Functional Polymers*, Volume 148, 104490

SERNA C. L, RODRÍGUEZ DE S. A, ALBÁN A. F . (2011) Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. Universidad del Valle.

SORIANO ALMIÑANA, A. (2020). Ácidos fenólicos como agentes antibacterianos en el desarrollo de materiales activos para el envasado de alimentos. Universitat Politècnica de València

SOTO-VALDEZ, H., AURAS, R. Y PERALTA, E. (2011). Fabrication of poly (lactic acid) films with resveratrol and the diffusion of resveratrol into ethanol. *Journal of applied polymer science*. 121(2):970-978

SRISA, A. HARNKARNSUJARIT, N. (2020) Antifungal films from trans-cinnamaldehyde incorporated poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) for bread packaging. *Food Chemistry*. 333, 15, 127537

SUN LEE, D., YAM, K. T. Y PIERGIOVANNI, L. (2008). *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press. Boca Raton, EE.UU. 650 p.

TAMPAU, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A. (2020) Poly(lactic acid) based materials encapsulating carvacrol obtained by solvent casting and electrospinning. *Journal of Food Science*

TAWAKKAL, I.S.M.A., CRAN, M.J., MILTZ, J. AND BIGGER, S.W. (2014), A Review of Poly(Lactic Acid)-Based Materials for Antimicrobial Packaging. *Journal of Food Science*, 79: R1477-R1490.

VIRGIL PERCEC, QI XIAO (2020) From organic chemistry to chemical biology via macromolecules with Hermann Staudinger, *Giant*, Volume 4, , 100036