



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos  
(FoodUPV)

Films de PHBV con ácido ferúlico o extracto activo de la  
paja de arroz para potenciar la conservación de carne de  
cerdo.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Rodríguez Insua, María Dolores

Tutor/a: Chiralt Boix, M<sup>a</sup> Amparo

Cotutor/a: Cháfer Nácher, María Teresa

Director/a Experimental: MOLL MONTANER, EVA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

**TÍTULO: Films de PHBV con ácido ferúlico o extracto activo de la paja de arroz para potenciar la conservación de carne de cerdo.**

AUTORES: M<sup>a</sup> Dolores Rodríguez Insua

RESUMEN: Con el objetivo de potenciar el desarrollo de materiales biodegradables activos para la conservación de alimentos, se han obtenido films de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) mediante mezclado en fundido y moldeo por compresión del polímero con 6 % de ácido ferúlico y un extracto activo de la paja de arroz obtenido por extracción en agua subcrítica a 180°C (E180), ambos con probada actividad antibacteriana. Con los films se obtuvieron bolsas termo-selladas con policaprolactona (PCL) que se utilizaron para el envasado de carne cerdo. Las muestras de carne envasada se almacenaron a 4°C durante 16 días y se controlaron en sus parámetros de calidad: pérdida de peso, cambio de pH y color, índice de oxidación (TBARS) y recuentos microbianos de viables totales, coliformes, bacterias ácido lácticas y coliformes totales. Se envasaron muestras control en bolsas de PHBV sin compuestos activos y en bolsas de polietileno para la comparación de resultados. Los controles se realizaron a diferentes tiempos de almacenamiento. Los resultados mostraron mejoras en la conservación de la calidad de la carne en las bolsas de PHBV con ácido ferúlico y E180. Los índices de oxidación de la carne, reflejados en los valores de TBARS y color de las muestras, fueron mucho menores en los films con ácido ferúlico y el extracto activo, así como los recuentos microbianos. El límite de aceptabilidad de los recuentos en viables totales no se alcanzó durante el periodo controlado en las muestras envasadas en PHBV con ácido ferúlico.

PALABRAS CLAVE: Envasado activo; PHBV; ácido ferúlico, extracto de paja de arroz; vida útil, carne de cerdo

**TÍTOL: Films de PHBV amb àcid ferulic o extracte actiu de la paja d'arròs per a potenciar la conservació de carn de porc.**

RESUM: Amb l'objectiu de potenciar el desenvolupament de materials biodegradables actius per a la conservació d'aliments, s'han obtingut films de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) mitjançant barrejat en fos i emotlament per compressió del polímer amb 6% d'àcid ferulic i un extracte actiu de la palla d'arròs obtingut per extracció en aigua subcrítica a 180°C (E180), tots dos amb provada activitat antibacteriana. Amb els films es van obtindre bosses termosegellades amb policaprolactona (PCL) que es van utilitzar per a l'envasament de carn porc. Les mostres de carn envasada es van emmagatzemar a 4°C durant 16 dies i es van controlar en els seus paràmetres de qualitat: pèrdua de pes, canvi de pH i color, índex d'oxidació (TBARS) i recomptes microbians de viables totals, coliformes, bacteris àcid làctics i coliformes totals. Es van envasar mostres control en bosses de PHBV sense compostos actius i en bosses de polietilè per a la comparació de resultats. Els

controls es van realitzar a diferents temps d'emmagatzematge. Els resultats van mostrar millores en la conservació de qualitat de la carn en les bosses de PHBV amb àcid ferulic i E180. Els índexs d'oxidació de la carn, reflectits en els valors de TBARS i color de les mostres, van ser molt menors en els films amb àcid ferulic i l'extracte actiu, així com els recomptes microbians. El límit d'acceptabilitat dels recomptes en viables totals no es va aconseguir durant el període controlat en les mostres envasades en PHBV amb àcid ferulic.

PARAULES CLAU: Envasament actiu; PHBV; àcid ferulic, extracte de palla d'arròs; vida útil, carn de porc

**TITLE: PHBV films with ferulic acid or active extract of rice straw to promote pork meat preservation**

ABSTRACT: In order to enhance the development of active biodegradable materials for food preservation, Poly(3-Hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) films have been obtained by melt blending and compression moulding of the polymer with 6 % ferulic acid and an active extract of rice straw obtained by subcritical water extraction at 180°C (E180), both with proven antibacterial activity. The films were used to obtain heat-sealed bags with polycaprolactone (PCL), which were used for the packaging of pork meat. The packaged meat samples were stored at 4°C for 16 days and their quality parameters were monitored: weight loss, pH and colour change, oxidation index (TBARS) and microbial counts of total viable, coliforms, lactic acid bacteria and total coliforms. Control samples were packaged in PHBV bags without active compounds and in polyethylene bags for comparison of results. The controls were carried out at different storage times. The results showed improvements in meat quality preservation in PHBV bags with ferulic acid and E180. The meat oxidation indices, reflected on the TBARS values and sample colour, were lower in samples packaged in films containing ferulic acid or active extract, as well as the microbial counts. The acceptability limit for total viable counts was not reached throughout the entire storage period in samples packaged in PHBV films with ferulic acid.

KEYWORDS: Active packaging; PHBV; ferulic acid, rice straw extract; shelf life, pork meat.

## 1 INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria, y en especial en lo que se refiere al envasado de alimentos, tiene entre los grandes retos a afrontar: aumentar la vida útil de los alimentos, encontrar sustancias naturales que permitan reducir el uso de aditivos sintéticos y reducir el impacto ambiental que generan los envases convencionales no biodegradables comúnmente utilizados, procedentes mayoritariamente de fuentes no renovables (*Baghi et al., 2022*). El uso de estos plásticos genera graves problemas ambientales, tanto por proceder de fuentes no renovables como por los elevadísimos tiempos necesarios para su descomposición, 450 años o más dependiendo de su composición. Esta es la principal razón de la búsqueda de nuevos materiales de envasado que acorten el tiempo de descomposición y reduzcan el impacto ambiental que generan (*Vázquez y Sánchez, 2023*).

Entre los materiales biodegradables se encuentra la familia de polihidroxicanoatos (PHA) que tiene un comportamiento similar a algunos de los plásticos procedentes fuentes de fósiles, pero provienen de recursos renovables, y sus propiedades dependen de su estructura química (*González et al., 2013*). Dentro de esta gran familia está el poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxicanoato) (PHBV), que es uno copolímero con unidades de canoato en la cadena del poli(3-hidroxitirato) (PHB). Las unidades de canoato reducen su cristalinidad y punto de fusión respecto al PHB, adecuando mejor sus propiedades a los requerimientos de los materiales de envase. La incorporación de sustancias activas al polímero puede mejorar sus propiedades, a la vez que le confieren propiedades activas (antibacterianas o antioxidantes) al material (*Salgado, 2023*), mejorando su funcionalidad para el envasado de alimentos. La mezcla con otros polímeros, como la policaprolactona (PCL), permite también mejorar las propiedades del PHBV. Este polímero biodegradable tiene un bajo punto de fusión (60°C) pero con muy buenas características mecánicas, sobre todo de extensibilidad. (*Muñoz, 2015*)

La adición de sustancias en los envases que aporten o mejoren su funcionalidad, como reducir la oxidación de grasas o controlar el crecimiento microbiano, ha dado lugar a envases activos que permiten alargar la vida útil del producto envasado (*Yildirim et al., 2018*). Entre estas sustancias, los compuestos fenólicos tienen un gran potencial debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (*Salgado, 2023; Ordoñez et al., 2022a*).

Los ácidos fenólicos son compuestos activos con efectos positivos en la formulación de materiales de envase. En algunos casos, mejoran la capacidad de barrera al vapor de agua y, en mayor medida al oxígeno, del polímero, y confieren propiedades antioxidantes y antimicrobianas al material (*Ordoñez et al., 2022a*), con bajo impacto sensorial sobre los alimentos envasados. Entre los ácidos fenólicos, se encuentra el ácido ferúlico, que puede ser obtenido de fuentes naturales o por síntesis química. Este compuesto tiene un alto poder

antioxidante y antimicrobiano (Dędek et al., 2019). Diferentes estudios probaron que la incorporación de este ácido en distintos materiales biodegradables, como el ácido poliláctico (PLA) o almidón, confiere mejoras en la flexibilidad de los films y efecto antioxidante y antimicrobiano, siempre y cuando se produzca la liberación adecuada del compuesto en el sustrato alimentario (Ordoñez et al., 2021; 2022b; 2022c; 2022d; 2023). Moll y Chiralt (2023) y Moll et al. (2023) desarrollaron films de PHBV con diferentes proporciones de ácidos fenólicos (ferúlico y p-cumárico) en los que se consiguió mejorar la capacidad de barrera al oxígeno y al vapor de agua (en menor proporción) de los films, así como reducir la cristalinidad del polímero, obteniendo una mayor extensibilidad, dependiendo de la microestructura de los films. Los films presentaron actividad frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, de forma dependiente del grado de liberación del compuesto activo, que estuvo muy afectado por la polaridad del medio de contacto, disminuyendo al aumentar la polaridad del mismo. Estudios previos con ácidos fenólicos (ferúlico, p-cumárico y protocatecuico), incorporados en mezclas de PLA: PHBV (75:25) mostraron buenos resultados en la conservación de carne de cerdo envasada, alargando su vida útil (Hernández et al., 2022).

Por otro lado, muchos extractos vegetales son ricos en compuestos fenólicos y podrían utilizarse como fuentes de compuestos activos para los materiales de envasado. Los residuos vegetales que se generan en campo o en el procesado de la industria de alimentos, con la consiguiente problemática ambiental, podrían valorizarse a través de la obtención de extractos activos, utilizables para este fin u otras aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica (Abril et al., 2009).

Uno de los residuos vegetales con bajo aprovechamiento y altos contenidos fenólicos es la paja de arroz. A nivel mundial se producen grandes cantidades de arroz (512.860, en miles toneladas) y, en concreto en España, 632,5 miles de toneladas por año. Un 18% de la producción española de arroz se localiza en la Comunitat Valenciana CV (Mercasa, 2023), por lo que, si se tiene en cuenta que por cada kg de arroz se generan 1,5 kg de paja, esto supondría 170.000 toneladas de paja de arroz anuales, solo en la CV. Estos restos de cosecha tienen además el agravante, en el caso de la CV, de que se concentran en el parque natural protegido de L'Albufera de Valencia, humedal de alto valor ambiental. Por tanto, su retirada o quema inmediata son necesarias para evitar su pudrición y los problemas de anoxia que afectarían a los arrozales y a las aguas del lago. De ahí, el gran interés en desarrollar procesos de aprovechamiento y revalorización de la paja.

En los procesos de revalorización, es fundamental la utilización de tecnologías “verdes”, con bajo consumo energético y disolventes no tóxicos que garanticen la seguridad y sostenibilidad del proceso y los productos (Chemat et al., 2012). En este sentido, se han realizado estudios previos de obtención de extractos activos de la paja de arroz mediante el uso de agua como solvente

limpio, y la aplicación de tecnologías que potencien la extracción, como el pretratamiento con ultrasonidos o la extracción en agua subcrítica a alta temperatura y presión, por debajo del punto crítico (*Freitas et al., 2020; 2022; 2023a; 2023b*). Estos extractos han mostrado alta capacidad antioxidante y antimicrobiana y se han incorporado en polímeros biodegradables para la obtención de envases biodegradables activos. Específicamente, se han incorporado en diferentes polímeros biodegradables, como PLA y almidón (monocapas y laminados), mejorando sus propiedades de barrera, y con efectos antioxidantes y antimicrobianos demostrados en el envasado de aceite de girasol y carne de cerdo (*Freitas et al., 2022; 2023a; 2023b; 2023c*).

El presente estudio tiene por objetivo analizar la capacidad conservante de la carne cerdo de envases de PHBV con dos tipos de componentes activos: ácido ferúlico y un extracto activo de la paja de arroz obtenido a 180°C mediante extracción con agua subcrítica, ambos con capacidad antioxidante y antimicrobiana demostradas. Para ello, se prepararon bolsas para el envasado la carne con los films de PHBV obtenidos por mezclado en fundido y moldeo por compresión. La carne envasada en los diferentes materiales se almacenó en refrigeración para el control de diferentes parámetros de calidad a diferentes tiempos de almacenamiento.

### **1.1 Objetivos desarrollo sostenible**

Este proyecto está relacionado con 2 objetivos del desarrollo sostenible (*Gamboa, 2015*).

ODS 9. Industria innovadora e infraestructura flexible: En este estudio se pretende buscar alternativas a los envases contaminantes de la industria alimentaria y sustituirlos por envases biodegradables.

ODS 12. Asegurar patrones de consumo y de productos sostenibles: Se pretende buscar alternativas para alargar la vida útil de la carne de cerdo y reducir su desperdicio.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales**

Los materiales utilizados para la obtención de las bolsas de envasado fueron: Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) en forma de pellets suministrados por TianAn Biopolymer (Ningbo, China), con 3-hidroxivalerato (HV) al 2%. La policaprolactona (PCL) de Sigma-Aldrich (Madrid, España) se utilizó para el sellado de las capas de PHBV en la preparación de las bolsas de envasado. Los compuestos activos utilizados fueron el ácido ferúlico de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y el extracto de la paja de arroz suministrado por el grupo de Biopolímeros del Instituto de Ingeniería de Alimentos, donde fue obtenido y caracterizado en sus propiedades, tal como describen *Freitas et al. (2023a)*, a partir de paja de arroz (*var. J Sendra*) del parque natural de l'Albufera (Valencia, España).

Para los ensayos microbiológicos se utilizaron el medio triptona de soja (TSB) y el preparado de medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), suministrados por la empresa Labbox (Barcelona, España), el agar Plate Count (PCA) y agar rojo bilis violeta (VRB), suministrado por Scharlab (Valencia, España), y el agua peptonada tamponada, proporcionada por el laboratorio Labkem (Barcelona, España).

Los reactivos utilizados en el ensayo TBARS fueron ácido tiobarbitúrico (Acros Organics B.V.B.A., USA) y ácido tricloroacético (PanReac AppliChem, España).

La carne de cerdo, (secreto de cerdo), se adquirió en una carnicería local (El Rebot d'Alboraia, Valencia, España).

## **2.2 Método**

### **2.2.1 Obtención de los films y envasado**

Para este estudio se utilizaron 4 tipos de materiales de envase: PHBV puro, PHBV con 6% de ácido ferúlico (PHBV-AF), PHBV con 6 % de extracto liofilizado de paja de arroz obtenido a 180°C (PHBV-E180) y bolsas de plástico con cierre zip de polietileno (PE), como material de referencia.

Para preparar los films, el PHBV, con o sin compuestos activos se sometió a mezclado en fundido, a 180°C y 50 rpm durante 5 min, usando un mezclador interno (Haake PolyLab QC, Thermo Fisher Scientific, Alemania). Posteriormente, cada mezcla fue molida con nitrógeno líquido, para aumentar la fragilidad, en un equipo de trituración (Thermomix®, empresa Vorwerk, Alemania) y el polvo obtenido se conservó en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> hasta su uso.

Para obtener los films, se colocaron 3,5 g de cada formulación (PHBV puro, PHBV-AF o PHBV-E180) en una prensa hidráulica de platos calientes (Modelo LP20, Labtech Engineering, Tailandia). El prensado para cada film se realizó con 4 min de precalentamiento a 180°C, 5 min de prensado a 180°C y 100 bares de presión y un enfriamiento durante 3 min hasta 70°C.

En el caso de PHBV-E180, la temperatura de precalentamiento y prensado fue de 175°C para prevenir la degradación del extracto. Todos los films fueron conservados a 0% de humedad relativa (HR) hasta su uso.

Las láminas de policaprolactona (PCL) utilizadas para el sellado de las bolsas (el PHBV no termosella) se prepararon por termo-prensado de 4 g del producto granulado bajo las siguientes condiciones: precalentamiento a 120°C durante 2 min, 2 min a 120°C con 100 bares de presión y enfriamiento durante 4 min.

La *Figura 1* muestra la disposición de las tres tiras de PCL entre dos láminas de PHBV (en tres de sus lados) para su termo-sellado. Este se llevó a cabo en la prensa de platos calientes, mediante precalentamiento a 120°C durante 30

segundos, prensado a 120°C y 50 bares durante 30 segundos y enfriamiento durante 4 min. Todos los envases fueron conservados a 0%HR hasta su uso.



*Figura 1. Bolsas de PHBV con las tiras de PCL para el sellado de los laterales, antes y después del sellado.*

### 2.2.2 Envasado y evaluación de la vida útil

En esta etapa del estudio, tanto la preparación como el envasado de la carne se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar (Bio II Advance, Telstar, Terrasa, España), para evitar la contaminación cruzada. Se esterilizaron todos los utensilios, así como los envases, utilizando luz ultravioleta durante 30 min.

Se cortó el secreto de cerdo en porciones de  $25,95 \pm 1,8$  g, tal y como puede observarse en la *Figura 2*, y se colocaron inmediatamente dentro de las bolsas preparadas con los films, cuyo tamaño fue de 11x11 cm, y se termo-sellaron con una envasadora a vacío (Thermomix®, empresa Vorwerk, Alemania). Se utilizaron como control las muestras de carne envasadas en bolsas de polietileno de baja densidad (PE) con cierre zip. Las muestras de carne envasadas se almacenaron a 4°C durante 16 días.



*Figura 2 Carne de cerdo*

Se realizó una evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de las muestras en los días 0 (antes del envasado), 4, 8, 12 y 16 de almacenamiento. Se analizaron 2 muestras de carne envasada en cada uno de los materiales para cada tiempo, y cada análisis se realizó por triplicado, excepto para el pH que se realizaron 4 mediciones por muestra y para el análisis microbiológico donde se hicieron 2 repeticiones por muestra.

#### 2.2.2.1 Características fisicoquímicas

Se determinó la humedad inicial de la carne, mediante pesada antes y después del secado en estufa de las muestras (García y Fernández, 2012). La pérdida de masa de las muestras durante el almacenamiento se cuantificó teniendo en cuenta la masa inicial de cada una y su masa medida a un tiempo dado de almacenamiento, con una balanza (Sartorius, Alemania). El pH se



determinó con un pH metro (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suiza) de punción en el interior de la carne.

Para evaluar el color se utilizó el espectrocolorímetro (CM-5, Konica Minolta, sede Madrid, España), con una ventana de 8 mm, obteniendo los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Las coordenadas CIEL  $a^*b^*$  se utilizaron para obtener los valores de tono ( $h_{ab}^*$ ) y croma ( $C_{ab}^*$ ) (ecuaciones 1 y 2), y también se determinó la diferencia del color a cada tiempo respecto a la muestra inicial ( $a_0^*$ ,  $b_0^*$ ,  $L_0^*$ ) utilizando la ecuación (3).

$$h_{ab}^* = \arctg(b^*/a^*) \quad (1)$$

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

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta b^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta L^*)^2} \quad (3)$$

Donde:  $\Delta b^*=(b^*- b_0^*)$ ;  $\Delta a^*=(a^*- a_0^*)$ ;  $\Delta L^*=(L^*- L_0^*)$

El grado de oxidación de lípidos en la carne envasada se determinó mediante el test de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrito por *Siu y Draper (1978)*. Para ello, se obtuvo la recta de calibrado, con distintas concentraciones conocidas de malonaldehído (MDA) y las respectivas medidas de absorbancia a 532 nm. La recta de calibrado obtenida, para la absorbancia (y) en función de la concentración de malonaldehído (x), fue la ecuación (4).

$$y = 0,184 * x \quad (r^2 = 0,99) \quad (4)$$

Para determinar la oxidación de las grasas en cada muestra, se pesaron 10 gramos carne en un vaso de precipitado y se añadieron 50 ml de agua destilada y 50 ml de una disolución al 10% de ácido tricloroacético. Se homogeneizó el contenido durante 3 minutos con un Ultra-turrax (modelo T-25-D, IKA, Alemania). La dispersión obtenida se filtró y se tomaron 8 ml del filtrado que se mezclaron con 2 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,06 mol/L) en un tubo de ensayo. Esto se llevó a una placa calefactora a 80°C durante 90 min. Tras enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 532 nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific™ 840-210600, Fisher Scientific International, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como mg de MDA por kg de carne, utilizando la curva de calibrado y teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

### 2.2.3.2 Análisis microbiológico

Todas las muestras de carne se analizaron en cuanto a los recuentos microbianos de viables totales (TV), bacterias psicrotróficas (PT), coliformes totales (TC) y bacterias ácido lácticas (BAL), a los distintos tiempos de almacenamiento (0, 4, 8, 12 y 16 días). Para ello, en cabina de flujo laminar, las muestras de carne (10 g) se homogeneizaron (Masticador IUL, Barcelona, España) con 100 ml de agua peptonada en una bolsa de Stomacher, durante 3 min. A continuación, se realizaron disoluciones decimales seriadas. Para, el recuento de colonias viables totales (TV) se incubó a 37°C durante 48 horas en un medio PCA, y para las bacterias psicrotróficas (PT) se utilizó el mismo medio,

a 4°C durante 7 días. En el caso del recuento de coliformes totales (TC) se usó un medio de cultivo específico para coliformes (VRB) que se incubó a 37°C durante 48 h. Y, por último, para las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizó como medio de cultivo MRS incubándolo a 30°C durante 72 h. Después de la incubación, se contaron las colonias. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

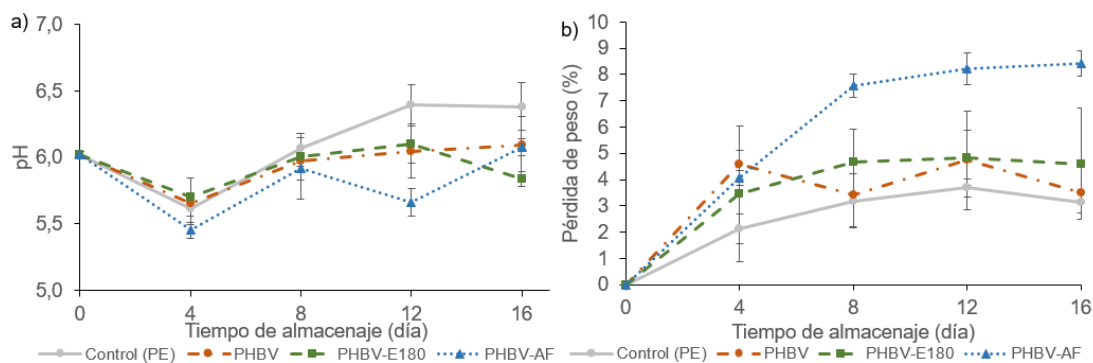
### 2.2.3.3 Análisis estadísticos

Se utilizó el análisis de la varianza multifactorial (ANOVA) del programa Statgraphics Centurion XVI, con un intervalo de confianza del 95% de Fisher's (LSD), para determinar si se encontraban diferencias significativas.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Características fisicoquímicas

La carne de cerdo inicial presentó una humedad del 63.6% (g agua/100 g carne) y un pH de 6, encontrándose este dentro del rango de valores que el consumidor aprecia como aceptables, comprendido entre 5,7 y 6,1 (*Kim et al., 2016*). En la *Figura 3* se muestra la evolución a lo largo del tiempo del pH (*a*) y de la pérdida de peso (*b*) de la carne de cerdo en los diferentes materiales de envasado.



*Figura 3. Evolución del pH (a) y de la pérdida de peso (b) de las muestras de carne envasadas en los diferentes materiales (PE, PHBV, PHBV-AF y PHBV-E180) durante el almacenamiento en refrigeración.*

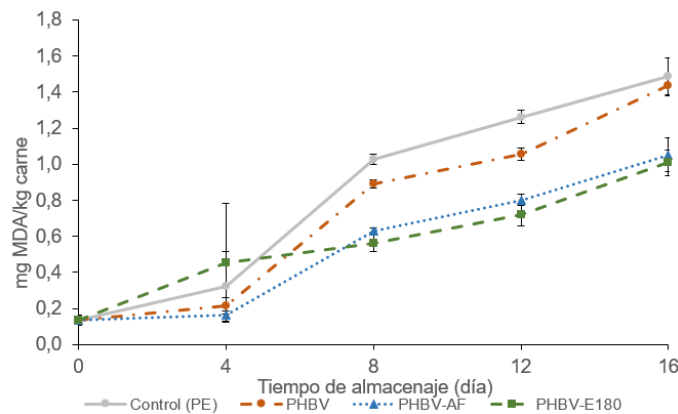
El ANOVA realizado para la variable pH mostró un efecto significativo tanto del tiempo como del tipo de envase ( $p < 0.05$ ). En general, el pH disminuyó en todas las muestras a los 4 días de almacenamiento, con independencia del tipo de envase. Esto puede atribuirse a la acumulación de ácido láctico generado durante la glicólisis del músculo en respuesta al crecimiento de bacterias ácido lácticas y otras fermentativas como las coliformes (*Han et al., 2014*). A partir de este momento, el pH aumentó, dependiendo del tipo de envase, tal como es habitual durante el almacenamiento, debido a la actividad enzimática y microbiana que degrada las proteínas, generando compuestos nitrogenados y un aumento en la alcalinidad (*Karabagias et al., 2011; Athayde et al., 2017*). Este comportamiento se observó claramente en la muestra control (PE) a partir del día 4 hasta el día 16, donde se produjo un aumento significativo del pH respecto

a las muestras envasadas con PHBV. En los envases con PHBV, los valores de pH fueron en general menores durante el almacenamiento, y en especial en aquellos que contenían ácido ferúlico como compuesto activo. Esto puede ser explicado por la mayor barrera al oxígeno de los materiales de PHBV, con y sin compuestos activos, según han demostrado estudios previos (*Moll y Chiralt, 2023*) que dan valores de permeabilidad al oxígeno del orden de  $3-3,70 \times 10^{13}$  cm<sup>3</sup>/msPa. La alta barrera al oxígeno ralentiza la actividad de los microorganismos causantes del deterioro, y promueve la actividad de las bacterias ácido lácticas que producen CO<sub>2</sub>, provocando un descenso de pH por la acción del ácido láctico y el CO<sub>2</sub>, tal como describen *Daniloski et al. (2019)*, para carne de cerdo almacenada al vacío en refrigeración. Los menores valores de pH de las muestras envasadas en PHBV-AF, pueden también atribuirse a la liberación progresiva del ácido ferúlico del envase y su difusión a la carne, tal como han observado otros autores (*Andrade et al., 2022*).

Las pérdidas de peso de la carne envasada (*Figura 3(b)*) oscilaron entre un mínimo de un 2 % a los 4 días en la muestra control envasada en PE, y un máximo de un 8,5 % a los 16 días para las muestras en PHBV-6F. Las pérdidas de peso de las muestras de carne se producen por exudado de fase líquida o deshidratación durante el almacenamiento, en el espacio de cabeza del envase. La permeabilidad al vapor de agua puede afectar a la pérdida de peso, pero también los cambios estructurales que conllevan el exudado de fase líquida, normalmente asociados a la disminución del pH y su efecto sobre la matriz proteica (*Bendall y Swatland, 1988*). En este sentido, la liberación de ácido ferúlico del envase, y su impacto en un menor valor del pH de las muestras envasadas en PHBV-AF, podría promover un mayor exudado de las muestras durante el almacenamiento.

Las muestras envasadas en PE presentaron menores valores de pérdida de peso que las muestras envasadas en los tres tipos de films de PHBV, alcanzando al final del almacenamiento un valor promedio de 3,16%, lo que es coherente con el mayor efecto barrera al vapor de agua del PE en comparación con el PHBV, y al mayor pH de la carne. Estudios previos han demostrado que el PHBV puro tiene valores de permeabilidad al vapor de agua en torno al  $5,4 \times 10^{12}$  g/msPa, con un ligero aumento de la misma al incorporar los compuestos activos (*Moll y Chiralt, 2023*). Esta incorporación conllevó un ligero aumento de las pérdidas de peso de las muestras, lo que también podría estar relacionado con el menor efecto barrera de estos materiales.

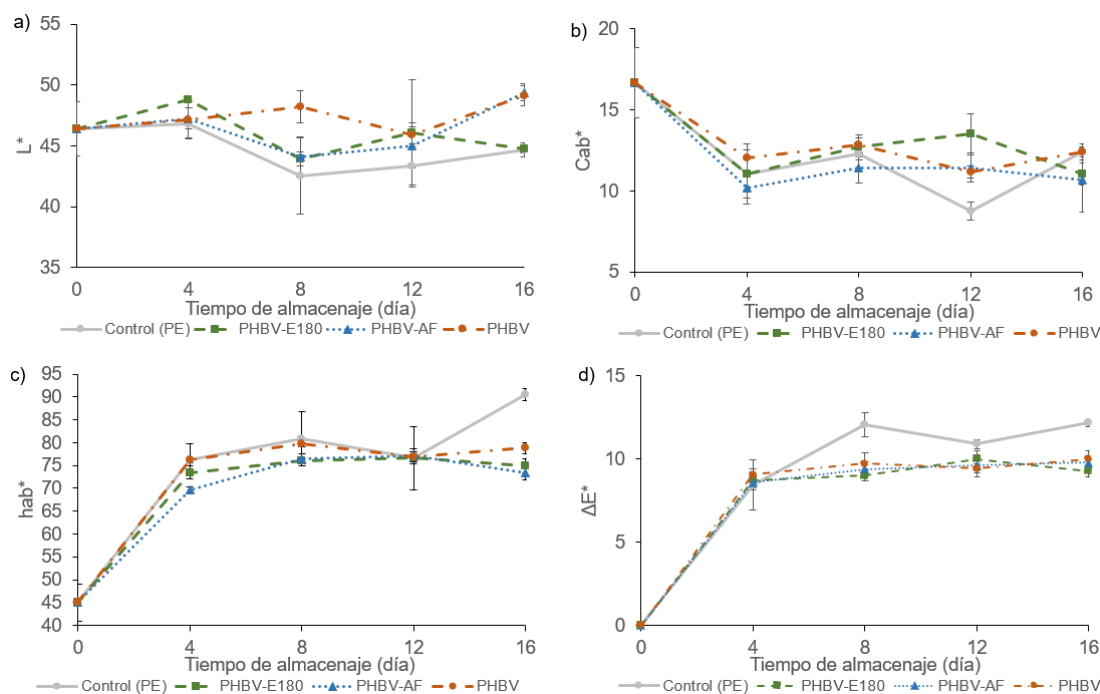
En cuanto a la evolución de la oxidación de las grasas, evaluada mediante el índice TBARS, la *Figura 4* muestra los valores (mg de malonaldehído por Kg de carne de cerdo) en función del tiempo, para las diferentes carnes envasadas. El malonaldehído es uno de los principales productos formados durante la oxidación de las carnes, y en esto se basa la metodología descrita para seguir la evolución del proceso oxidativo.



*Figura 4 Evolución del índice de oxidación (TBARS) de las muestras de carne envasadas en los diferentes materiales (PE, PHBV, PHBV-AF y PHBV-E180) durante el almacenamiento en refrigeración.*

En la *Figura 4* se puede observar que la oxidación de las grasas aumentó con el tiempo de conservación de la carne para todas las muestras, encontrándose los mayores valores al final del almacenamiento, a los 16 días. A partir del día 8 de almacenamiento, las muestras envasadas en PHBV que contenían ácido ferúlico y extracto activo de la paja, presentaron menores valores de oxidación ( $p < 0.05$ ), en comparación con las muestras control (envasadas con PE o PHBV). Esto refleja el poder antioxidante del ácido ferúlico o el extracto de paja incluidos en el material de envase. La menor permeabilidad al oxígeno de estos materiales, así como su opacidad a la luz UV (*Moll y Chiralt, 2023*), contribuirá también al efecto protector de estos materiales frente a la oxidación. Este efecto también ha sido observado en estudios previos en films biodegradables activos por la función antioxidante de los fenoles presentes, tanto para el ácido ferúlico (*Hernández et al., 2022*), como para los componentes del extracto de la paja de arroz (*Freitas et al., 2023b*). Por tanto, ambos componentes activos fueron efectivos para retrasar la oxidación de las grasas en la carne cuando se incorporaron en films de PHBV.

La evolución del color de las diferentes muestras envasadas también está relacionada con los efectos oxidativos y se muestra en la *Figura 5*, a través las diferentes coordenadas de color ( $L^*$ ,  $C_{ab}^*$ ,  $h_{ab}^*$ ), así como de la diferencia total de color respecto al valor inicial de cada muestra ( $\Delta E^*$ ). El ANOVA mostró diferencias significativas entre los valores de cada coordenada debidas al tiempo y al tipo de envase utilizado ( $p < 0.05$ ), con tendencias diferentes dependiendo de cada coordenada.



**Figura 5** Evolución de los parámetros de color (Luminosidad:  $L^*$  (a), croma  $C_{ab}^*$  (b) y tono  $h_{ab}^*$  (c) y la diferencia total de color respecto a la muestra inicial ( $\Delta E^*$  (d)) de las muestras de carne envasadas en los diferentes materiales (PE, PHBV, PHBV-AF y PHBV-E180) durante el almacenamiento en refrigeración.

En la *Figura 5(a)*, se puede observar que los valores de  $L^*$ , variable que se asocia a la retención de agua en la carne, y también a su oscurecimiento, sufrieron pocos cambios con el tiempo o tipo de envase, pero se observan diferencias en su evolución. Al final del almacenamiento las muestras envasadas en PHBV y PHBV-AF tuvieron valores de luminosidad ligeramente mayores ( $p < 0.05$ ) a los de las muestras envasadas en PE y PHBV-E180. Esto puede atribuirse a diferentes motivos: un mayor oscurecimiento en las muestras envasadas en PE debido a su mayor oxidación (*Figura 4*) y una migración de compuestos coloreados del extracto (E180) a la superficie de la carne, en las muestras envasadas en PHBV-E180. En relación con la saturación o croma ( $C_{ab}^*$ ), solo se observaron diferencias significativas por efecto del tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ), descendiendo este parámetro a los 4 días en las diferentes muestras, probablemente debido al bajo valor de la presión de oxígeno que afecta al equilibrio mioglobina-oxi-mioglobina (*Tomasevic et al., 2021*). Así mismo, los valores de tono ( $h_{ab}^*$ ), también relacionados con el estado de los pigmentos de la carne (oxi-mioglobina y meta-mioglobina), aumentaron con el almacenamiento de las muestras (viraje a tonos menos rojos), mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el tiempo de almacenamiento y el material de envasado. Los envases activos de PHBV (con E180 o ácido ferúlico) mantuvieron mejor los tonos rojos a lo largo del almacenamiento, lo que se explica por el efecto antioxidante de los fenoles. La mioglobina es la proteína hemo de la carne responsable de su color rojo. La oxidación del ion hierro central del grupo hemo da lugar al cambio de color: de rojo en la oxi-mioglobina a pardo

en la meta-mioglobina. La oxidación de lípidos y de la mioglobina están relacionadas y la oxidación de uno de ellos lleva a la formación de compuestos que exacerban la oxidación de los otros. Así, diferentes estudios han demostrado la preservación del color de la carne por incorporación de compuestos antioxidantes (*Faustman et al., 2010; Andrade et al., 2022*).

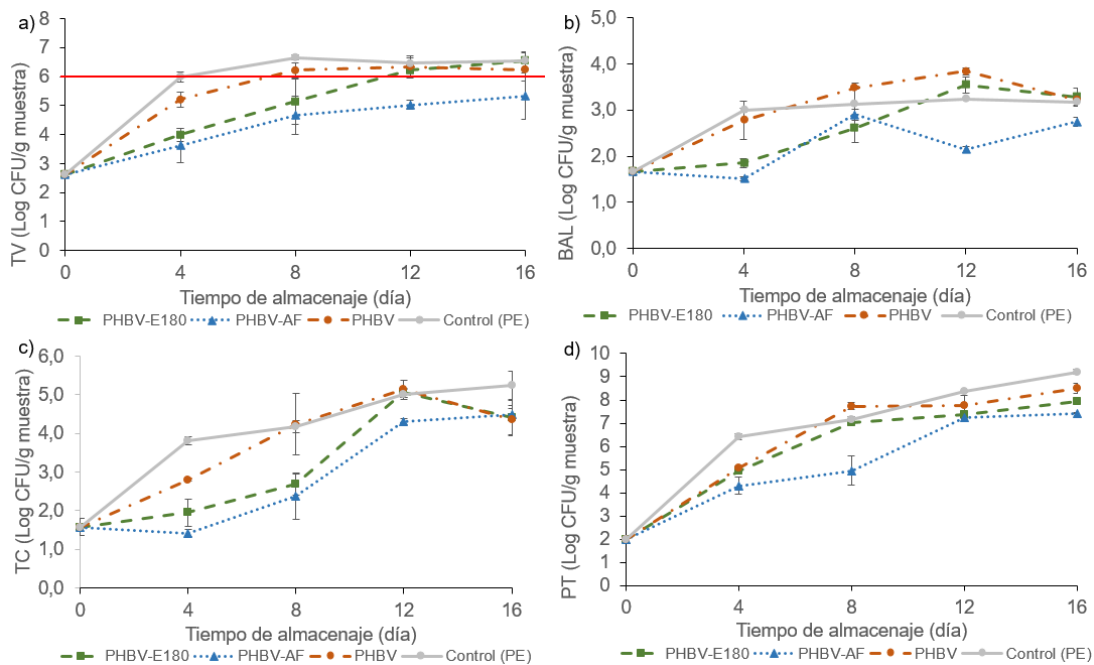
Las diferencias de color ( $\Delta E^*$ ) estimadas, mostraron valores notables ( $\Delta E^* > 5$ ) en todas las muestras y tiempos, destacando la carne control envasada en PE, que mostró una mayor diferencia de color respecto a las demás a partir de los 8 días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Una parte del cambio de color es atribuible al envasado con la consecuente disminución de la presión de oxígeno disponible y otra parte a los procesos oxidativos de las grasas junto con los pigmentos cárnicos que modifican su color (*Faustman et al., 2010*). Los menores cambios de color de las muestras envasadas en films activos de PHBV (con AF o E180), reflejan el efecto protector de estos compuestos en la preservación del estado oxidativo de la carne. En la *Figura 6*, se puede comprobar visualmente el cambio de color, a los 12 días de almacenamiento, en las muestras de carne envasadas en PE.



*Figura 6 Muestra de carne el día 0 y muestra en PE a los 12 días*

### 3.2 Análisis microbiano

En la *Figura 7* se muestran los recuentos de los principales grupos de bacterias que afectan al deterioro de la carne, en función del tiempo de almacenamiento y los diferentes materiales de envase.



**Figura 7** Evolución de los recuentos microbianos (viables totales (VT (a)), bacterias ácido-lácticas (BAL (b)), bacterias coliformes totales (TC (c)) y psicrótróficas (PT (d))) de las muestras de carne envasadas en los diferentes materiales (PE, PHBV, PHBV-AF y PHBV-E180) durante el almacenamiento en refrigeración.

Según el ANOVA, en todos los recuentos de bacterias realizados, el efecto del tipo de material de envasado y el tiempo de almacenamiento fue significativo ( $p < 0.05$ ). Como es esperable, hubo un aumento en todos los recuentos a lo largo del tiempo, pero con efectos diferentes según el tipo de envasado.

Para las bacterias viables totales (Figura 7(a)), el límite de crecimiento aceptable de  $10^6$  UFC para la carne refrigerada (Hernández y Schneck, 2016), se alcanzó a partir del día 4, en las muestras envasadas en PE y PHBV. Los envases de PHBV con E180 mostraron un control efectivo hasta los 8 días de almacenamiento, mientras que los que contenían ácido ferúlico resultaron aceptables durante todo el periodo ensayado de 16 días. Esto implica que los compuestos activos alargaron la vida útil microbiológica de la carne, en especial con ácido ferúlico.

Las bacterias ácido lácticas (Figura 7(b)) son el grupo dominante de microorganismos aislados de la carne y los productos cárnicos envasados al vacío (Xu et al., 2018). En general, se observaron menores recuentos de bacterias ácido lácticas en las muestras envasadas en PHBV-AF, en comparación con las muestras control PE. A los 4 y 8 días de almacenamiento también se observaron menores niveles en las muestras PHBV-E180. Por tanto, las muestras de carne envasadas en PHBV con compuestos activos tuvieron mejores resultados microbiológicos que las muestras envasadas en PHBV puro o PE, lo que confirma la efectividad de los fenoles del envase en el control del crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Esto indica también la liberación de

los compuestos activos de la matriz de PHBV, tal como predicen *Moll et al. (2023)*.

En el crecimiento de las bacterias coliformes (*Figura 7(c)*), se observan también diferencias entre los cuatro tipos de envases. A los 4 días de almacenamiento, todas las muestras envasadas en PHBV tuvieron niveles más bajos de coliformes totales que las muestras control en PE, pero a partir del día 8, esto solo ocurrió para los envases con componentes activos, indicando su efecto inhibitorio en el crecimiento de coliformes, principalmente para el ácido ferúlico. Al final del almacenamiento, no se apreciaron diferencias entre los envases de PHBV, con valores siempre por debajo de las muestras control envasadas en PE.

En la *Figura 7(d)* se puede observar la evolución de las bacterias psicotróficas. Los envases de PHBV-AF provocaron una mayor inhibición en el crecimiento de estas bacterias, en comparación con el resto de materiales durante todo el periodo estudiado. Esta inhibición se observó también para los envases con E180, pero en menor proporción.

Por lo tanto, los envases activos de PHBV con AF o E180 resultaron efectivos para el control del crecimiento microbiano en carne de cerdo, especialmente con ácido ferúlico que dio lugar a los mayores niveles de inhibición y al mantenimiento de los viables totales por debajo del límite admitido durante todo el periodo de almacenamiento de 16 días.

#### **4 CONCLUSIÓN**

Se pudieron obtenerse films activos de PHBV mediante mezclado en fundido y moldeo por compresión con ácido ferúlico y con un extracto activo de la paja de arroz obtenido por extracción en agua subcrítica a 180°C. Estos films pudieron termo-sellarse mediante tiras de PCL para la obtención de bolsas, que se utilizaron para el envasado de carne de cerdo.

La conservación a 4°C durante 16 días de la carne de cerdo envasada en los films activos, en comparación con la envasada con films de PHBV sin activos y en PE, reflejó mejores parámetros de calidad de la carne y mayor extensión de su vida útil. La oxidación de la carne reflejada en el índice TBARS y en el color, estuvo muy inhibida cuando los materiales contenían ácido ferúlico o extracto activo, demostrando la efectividad de los antioxidantes en la conservación de la carne. Los recuentos bacterianos fueron también menores en las muestras envasadas en PHBV con compuestos activos. El ácido ferúlico permitió mantener los recuentos de viables totales por debajo del límite establecido durante todo el tiempo del ensayo (16 días). El extracto activo de la paja fue algo menos efectivo, pero también redujo los recuentos microbianos por debajo de los obtenidos para las muestras envasadas en materiales sin compuestos activos.



## 5 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del programa Agroalnext (AGROALNEXT/2022/026), financiado por el MCIN con fondos de la Unión Europea Next Generation (PRTR-C17.11) y del proyecto CIPROM/2021/071 (Generalitat Valenciana).

## 6 REFERENCIAS

- Abril, D., Navarro, E., & Abril, A. (2009). La paja de arroz. Consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. [https://www.researchgate.net/publication/268872442\\_La\\_paja\\_de\\_arroz\\_Consecuencias\\_de\\_su\\_manejo\\_y\\_alternativas\\_de\\_aprovechamiento](https://www.researchgate.net/publication/268872442_La_paja_de_arroz_Consecuencias_de_su_manejo_y_alternativas_de_aprovechamiento)
- Andrade, J., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2022). Antimicrobial PLA-PVA multilayer films containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 375, 131861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131861>
- Athayde, D. R., Flores, D. R. M., da Silva, J. S., Genro, A. L. G., Silva, M. S., Klein, B., Mello, R., Campagnol, P. C. B., Wagner, R., de Menezes, C. R., Barin, J. S., & Cichoski, A. J. (2017). Application of electrolyzed water for improving pork meat quality. *Food Research International*, 100, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.009>
- Baghi, F., Gharsallaoui, A., Dumas, E., & Ghnimi, S. (2022). Advancements in biodegradable active films for food packaging: Effects of nano/microcapsule incorporation. *Foods*, 11(5), 760. <https://doi.org/10.3390/foods11050760>
- Bendall, J. R., & Swatland, H. J. (1988). A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Science*, 24(2), 85–126. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(88\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90052-6)
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Daniloski, D., Petkoska, A. T., Galić, K., Ščetar, M., Kurek, M., Vaskoska, R., Kalevska, T., & Nedelkoska, D. N. (2019). The effect of barrier properties of polymeric films on the shelf-life of vacuum packaged fresh pork meat. *Meat Science*, 158, 107880. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107880>
- Dędek, K., Rosicka-Kaczmarek, J., Nebesny, E., & Kowalska, G. (2019). Characteristics and biological properties of ferulic acid. *Biotechnology and Food Science*, Vol. 83(nr 1). <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-dda700ed-7591-4c8a-8efc-ce61b778731b>
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>
- Freitas, P. A. V., Bas Gil, N. J., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2022). Antioxidant poly (Lactic acid) films with rice straw extract for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 101003. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.101003>
- Freitas, P. A. V., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2020). Application of ultrasound pre-

- treatment for enhancing extraction of bioactive compounds from rice straw. *Foods*, 9(11), 1657. <https://doi.org/10.3390/foods9111657>
- Freitas, P. A. V., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023a). Active poly (Lactic acid) films with rice straw aqueous extracts for meat preservation purposes. *Food and Bioprocess Technology*, 16(11), 2635–2650. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03081-6>
- Freitas, P. A. V., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023b). Using rice straw fractions to develop reinforced, active PLA-starch bilayers for meat preservation. *Food Chemistry*, 405, 134990. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134990>
- Freitas, P. A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023c). Antioxidant starch composite films containing rice straw extract and cellulose fibres. *Food Chemistry*, 400, 134073. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134073>.
- Gamboa-Bernal, G. A. (2015). Los objetivos de desarrollo sostenible: Una perspectiva bioética. *Persona y Bioética*, 19(2), 175–181. <https://doi.org/10.5294/pebi.2015.19.2.1>
- García Martínez, Eva & Fernández Segovia, Isabel. (2012). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16339/Determinaci%3fb3n%20de%20humedad.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77–115. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0188-49992013000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Han, C., Wang, J., Li, Y., Lu, F., & Cui, Y. (2014). Antimicrobial-coated polypropylene films with polyvinyl alcohol in packaging of fresh beef. *Meat Science*, 96(2, Part A), 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.003>
- Hernández-García, E., Vargas, M., & Chiralt, A. (2022). Starch-polyester bilayer films with phenolic acids for pork meat preservation. *Food Chemistry*, 385, 132650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132650>
- Hernández Fernández, F. M., & Schneck Castera, M. V. (2016). Calidad microbiológica de carne bovina envasada al vacío y refrigerada. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10374/1/FV-31658.pdf>
- Karabagias, I., Badeka, A. and Kontominas, M.G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Sci.* 88(1), 109– 116.
- Kim, T. W., Kim, C. W., Kwon, S. G., Hwang, J. H., Park, D. H., Kang, D. G., Ha, J., Yang, M. R., Kim, S. W., & Kim, I.-S. (2016). Ph as analytical indicator for managing pork meat quality. *Sains Malaysiana*, 45(7), 1097–1103. [http://www.ukm.my/jsm/english\\_journals/vol45num7\\_2016/contentsVol45num7\\_2016.html](http://www.ukm.my/jsm/english_journals/vol45num7_2016/contentsVol45num7_2016.html)
- Mercasa. (2023, Mayo 9). Alimentación en España – Cereales. *Mercasa*. [https://www.mercasa.es/alimentacion-en-espana-cereales\\_2022/](https://www.mercasa.es/alimentacion-en-espana-cereales_2022/)

- Moll, E., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023). Release and antibacterial action of phenolic acids incorporated into PHBV films. *Food Packaging and Shelf Life*, 38, 101112. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101112>
- Moll, E. & Chiralt, A. (2023). Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (Phbv) with phenolic acids for active food packaging. *Polymers*, 15(21), 4222. <https://doi.org/10.3390/polym15214222>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2021). Physicochemical and antimicrobial properties of cassava starch films with ferulic or cinnamic acid. *LWT*, 144, 111242. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111242>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022a). Biodegradable active materials containing phenolic acids for food packaging applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(5), 3910–3930. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13011>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022b). Antibacterial properties of cinnamic and ferulic acids incorporated to starch and PLA monolayer and multilayer films. *Food Control*, 136, 108878. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108878>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022c). Antilisterial action of PLA films with ferulic acid as affected by the method of incorporation. *Food Bioscience*, 49, 101865. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101865>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022d). Effect of ferulic and cinnamic acids on the functional and antimicrobial properties in thermo-processed PLA films. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100882. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100882>
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2023). Multilayer antimicrobial films based on starch and PLA with superficially incorporated ferulic or cinnamic acids for active food packaging purposes. *Food Chemistry Advances*, 2, 100250. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100250>
- Salgado Lorente, C. (2023). *Influencia de compuestos fenólicos antioxidantes y antimicrobianos en las propiedades de films de PHBV [Proyecto/Trabajo fin de carrera/grado, Universitat Politècnica de València]*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/197491>
- Siu, G. M., & Draper, H. H. (1978). A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. *Journal of Food Science*, 43(4), 1147–1149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb15256.x>
- Tomasevic, I., Djekic, I., Font-i-Furnols, M., Terjung, N., & Lorenzo, J. M. (2021). Recent advances in meat color research. *Current Opinion in Food Science*, 41, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.012>
- Vázquez Alcántara, Luis & Sánchez Sánchez, Alejandro. (Mayo 2023). Bio-plástico, una alternativa sustentable. *Revista LAS/RC*. Volumen 6. No. 1, ISSN: 2711-1814, 79-95.
- Xu, F., Wang, C., Wang, H., Xiong, Q., Wei, Y., & Shao, X. (2018). Antimicrobial action of flavonoids from *Sedum aizoon* L. against lactic acid bacteria in vitro and in refrigerated fresh pork meat. *Journal of Functional Foods*, 40, 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.030>
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin,

T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165–199.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>