



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



DESARROLLO DE FORMULACIONES ENVASE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) (PLA) CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA EL USO EN ENVASADO ACTIVO EN APLICACIONES ALIMENTARIAS

Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Alumna: Victoria Blanot Goossens

Tutor: Pau Talens Oliag

Escuela: E.T.S.I.A.M.N.

DESARROLLO DE FORMULACIONES ENVASE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) (PLA) CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA EL USO EN ENVASADO ACTIVO EN APLICACIONES ALIMENTARIAS

Victoria Blanot¹, Nuria Burgos², Alfonso Jiménez², Pau Talens¹

¹ Departamento Tecnología de Alimentos-Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n 46022, Valencia, España.

² Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, Cta. San Vicente del Raspeig s/n, 03080, Alicante, España.

RESUMEN

Se desarrollaron películas, con características antioxidantes y antimicrobianas, empleando Poli(ácido Láctico) (PLA) como matriz polimérica e incorporando un 20 % en peso de oligómero de ácido láctico (OLA) como plastificante y carvacrol como aditivo activo a tres concentraciones diferentes: 4, 6 y 8 % en peso. Se determinó la cantidad de carvacrol presente en las formulaciones tras el procesado y se demostró, por un lado, su actividad antioxidante y, por otro, su capacidad antimicrobiana frente a *S. aureus*. Se estudiaron las propiedades térmicas de cada una de las películas, así como, las propiedades estructurales, morfológicas, mecánicas y ópticas. Las películas de PLA sufrieron una disminución de su estabilidad térmica a medida que se incrementó la concentración de aditivos en la matriz. Por otro lado, el plastificante disminuyó la rigidez del PLA y, junto con el carvacrol, hizo descender el módulo elástico y aumentar la elongación a rotura, aportando ductilidad al material. Las micrografías SEM mostraron la homogeneidad de todas las muestras y se confirmó la naturaleza amorfa del material con los análisis mediante DSC y DRX. Finalmente, los estudios de permeabilidad, tanto al oxígeno como al vapor de agua, permitieron valorar la funcionalidad de las películas como envase activo alimentario.

PALABRAS CLAVE: PLA, plastificante, carvacrol, caracterización, film antioxidante, antimicrobiano, envase activo.

RESUM

Es van desenvolupar pel·lícules, amb característiques antioxidants i antimicrobianes, utilitzant Poli(àcid Làctic) (PLA) com a matriu polimèrica i addicionant un 20 % en pes d'oligomer d'àcid làctic (OLA) com a plastificant i carvacrol com a additiu actiu a tres concentracions diferents: 4, 6 i 8 % en pes. Es va determinar la quantitat de carvacrol present en les formulacions després del processament i es va demostrar, la seua activitat antioxidant i la seua capacitat antimicrobiana enfront de *S. aureus*. Es van estudiar les

propietats tèrmiques de cadascuna de les pel·lícules, així com, les propietats estructurals, morfològiques, mecàniques i òptiques. Les pel·lícules de PLA van sofrir una disminució de la seua estabilitat tèrmica a mesura que es va incrementar la concentració d'additius en la matriu. D'altra banda, el plastificant va disminuir la rigidesa del PLA i, juntament amb el carvacrol, va fer disminuir el mòdul elàstic i augmentar l'elongació a trencament, aportant ductilitat al material. Les micrografies SEM van mostrar l'homogeneïtat de totes les mostres i es va confirmar la naturalesa amorfa del material amb les anàlisis DSC i DRX. Finalment, els estudis de permeabilitat, tant a l'oxigen com al vapor d'aigua, van permetre valorar la funcionalitat de les pel·lícules com a envàs actiu alimentari.

PARAULES CLAU: PLA, plastificant, carvacrol, caracterització pel·lícula antioxidant, antimicrobià, envàs actiu.

ABSTRACT

Antioxidant and antimicrobial active films based on Poly(lactic acid) (PLA) were prepared by incorporating 20 wt% of lactic acid oligomers as plasticizers and carvacrol as active additive at three different concentrations: 4, 6 and 8 wt%. The amount of carvacrol in the PLA films after processing was determined and it was confirmed, on one hand, their antioxidant activity as well as their antimicrobial activity against *S. aureus*. The thermal, structural, morphological, mechanical and optical properties were studied for each film. PLA films suffered a decrease in their thermal stability as the concentration of additives increased in the matrix. In addition, plasticizers reduced stiffness of PLA films by reducing the elastic modulus and increasing the elongation at break, providing ductility to those films with carvacrol. SEM micrographs showed the homogeneity of all samples and the amorphous structure of the material was confirmed by DSC and XRD analyses. Finally, oxygen barrier properties and water vapor permeability analysis allowed to assess the functionality of the active films in food packaging applications.

KEYWORDS: PLA, plasticizer, carvacrol, characterization, antioxidant, antimicrobial film, active packaging.

INTRODUCCIÓN

Para proteger adecuadamente los alimentos, ya sea de las influencias externas (oxígeno, vapor de agua, microorganismos...) o de las pérdidas en sus propiedades organolépticas, es necesario emplear envases que cumplan con unas características mecánicas, ópticas y de barrera que satisfagan las expectativas de todos los sectores implicados (consumidores, productores de alimentos, fabricantes de envases y distribuidores). Aproximadamente el 50% de los alimentos envasados en Europa utilizan envases de plástico, compitiendo principalmente con el vidrio, el papel y el metal. A pesar de que

la mayoría de los productos plásticos y polímeros sintéticos derivados del petróleo garantizan buenas prestaciones en términos de coste, comodidad, formatos, marketing y protección física, tienen la desventaja de no ser biodegradables, por lo que son responsables de parte de los residuos contaminantes que se acumulan en la Naturaleza. Los consumidores de los países industrializados se interesan cada vez más por los temas de salud y de medio ambiente (González y Alvarez, 2013). Es por todo ello que los envases activos biodegradables, capaces de mejorar las propiedades de los alimentos en base a su interacción positiva con el envase, son considerados una solución potencial con gran posibilidad de desarrollo en la sociedad actual (Ramos et al., 2012; Burgos et al., 2013; Arrieta et al., 2013).

El Poli(ácido láctico) (PLA) es un biopolímero obtenido exclusivamente de recursos renovables, como el maíz y el azúcar, tras un proceso de polimerización controlada de ácido láctico. Sus características de transparencia, inocuidad, biodegradabilidad y facilidad de procesado lo hacen un polímero idóneo para el envasado alimentario. Sin embargo, presenta el inconveniente de que requiere de la adición de un plastificante para aumentar su flexibilidad, de forma que sea más manejable para la industria en la elaboración de films. La utilización de oligómeros de ácido láctico (OLA), altamente compatibles con PLA, permiten obtener un material procedente de fuentes renovables y con características biodegradables (Burgos et al., 2013; Ramos et al., 2014). Se han publicado numerosos estudios que persiguen desarrollar un envase activo con la finalidad de atender las necesidades del consumidor para adquirir alimentos cada vez más frescos y seguros. El carvacrol es un compuesto de naturaleza fenólica presente en el aceite esencial extraído del orégano, que presenta propiedades tanto antioxidantes como antimicrobianas (Burt, 2004).

El desarrollo de películas de PLA plastificadas con OLA y aditivadas con carvacrol permitirían obtener un envase activo que, además de ser sostenible con el medioambiente, podría adaptarse a las necesidades de procesado de la industria y, finalmente, ofrecería al consumidor un producto de mayor vida útil al actuar el carvacrol sobre la oxidación e impedir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas.

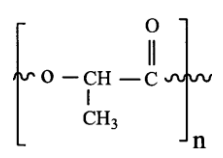
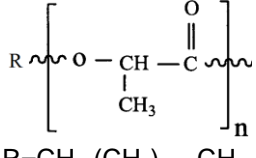
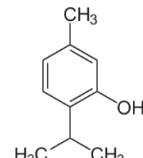
MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para preparar las biopelículas se utilizaron los siguientes materiales: como matriz polimérica se utilizó Poli (ácido láctico) (PLA Ingeo™ 2003D; 4 % en peso de isómero D-Lactida) fabricado por NatureWorks LLC (Minnetonka, USA); como plastificante oligómeros de ácido D, L-láctico (90 % en peso de isómero L-Lactida) (OLA 00A/8, sintetizado y suministrado por Condensia Química S.A. (Barcelona, España) siguiendo un método de polimerización previamente descrito (Fiori y Ara, 2009); como aditivo activo el Carvacrol (97 % pureza) de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las características químicas de todos ellos se muestran en la Tabla 1. Por otro lado, se utilizaron otros reactivos durante los ensayos como, el 1,1-difenil-2-

picrilhidrazil (DPPH) (95 %), metanol (grado HPLC $\geq 99,9$ %) y acetonitrilo (grado HPLC) suministrado por Sigma-Aldrich. El material microbiológico utilizado fue: tubos de agua de peptona tamponada (9 mL), caldo de tripton-soja (TSB), placas Nutritivo Agar tripton-soja (TSA) y placas Agar Mueller-Hinton (MHA). Finalmente, las cepas certificadas sembradas fueron: la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli* CECT 434) y la bacteria *Staphilococcus Aureus* (*S. aureus* CECT 239), ambas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia.

TABLA 1. Propiedades químicas de los materiales empleados en la fabricación de las biopelículas.

Propiedad	PLA	OLA 00A/8	Carvacrol
Masa molar. Mn ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$108\cdot 10^3$	957	150
Densidad a 25°C ($\text{g}\cdot\text{cm}^3$)	1,24	1,10	0,98
Estructura química		 $R = \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{618}-\text{CH}_2-$	

Preparación de las películas

Los pellets de PLA se secaron a 70 °C en estufa de vacío durante 24 horas a fin de evitar la hidrólisis del PLA durante el procesado. Para asegurar una mayor zona de contacto y una incorporación adecuada de la matriz polimérica con el plastificante, los pellets se molieron a un tamaño de partícula ≤ 1 mm usando un molino RETSCH ZM200 Ultra centrífuga Mill (Haan, Germany). Debido a la fricción generada durante el procesado, el PLA sufría un aumento de temperatura por lo que se sumergieron previamente los pellets en nitrógeno líquido antes de introducirlos en el molino. Una vez obtenido el PLA en polvo se mantuvo en un secador a vacío a unos 70 °C y el plastificante (OLA) en estufa a 32 °C. Pasadas 24 horas se procedió a la premezcla manual de las formulaciones estudiadas siguiendo las cantidades que aparecen en la Tabla 2. Tras 1 hora a temperatura ambiente, los materiales premezclados se introdujeron en una mezcladora Haake PolyLab QC, ThermoFischerScientific (Walham, EEUU), equipada con un par de rotores que giraban a 50 rpm durante 8 minutos a una temperatura fija de 170 °C. Las mezclas obtenidas se llevaron a una prensa hidráulica de platos calientes (Carver Inc, Model 3850, USA) donde se moldearon a 160 °C por compresión. La cantidad de muestra utilizada para cada película fue 5 g y se colocaron entre 2 placas de acero inoxidable con 2 films de PET para impedir que la película resultante se adhiriese a ellas. En primer lugar, se dejó el material entre las placas 5 min a presión atmosférica para que funda y, a continuación, se subió gradualmente la presión cada 2 minutos hasta mantenerlo 5 minutos a 5 MPa. El espesor final de las películas fue de unos

220 µm de espesor y un área de 14 cm², almacenándose en nevera hasta ser caracterizadas para evitar su envejecimiento.

TABLA 2. Cantidad de polímero, plastificante y aditivo activo presente en cada formulación y la nomenclatura de la mezcla.

Formulación	Cantidad de PLA (g)	Cantidad de OLA (g)	Cantidad de Carvacrol (g)	Nomenclatura
PLA-puro	50	-	-	PLA
PLA-OLA al 20 %	40	10	-	PLA-OLA
PLA-Carvacrol 4%	48	-	2	P-C-4%
PLA-Carvacrol 6%	47	-	3	P-C-6%
PLA-Carvacrol 8%	46	-	4	P-C-8%
PLA-OLA-Carvacrol 4%	38,4	9,6	2	P-O-C-4%
PLA-OLA-Carvacrol 6%	37,6	9,4	3	P-O-C-6%
PLA-OLA-Carvacrol 8%	36,8	9,2	4	P-O-C-8%

Caracterización del material

CUANTIFICACIÓN DE CARVACROL (HPLC-UV)

La cantidad de carvacrol presente en las películas de PLA tras su procesamiento fue determinada por extracción sólido-líquido seguida de análisis mediante un cromatógrafo de líquidos con detección por espectrofotometría ultravioleta (HPLC-UV). Para ello, las muestras de cada película se tomaron por secciones rectangulares de 0.05 ± 0.01 g, que se extrajeron con 10 mL de metanol en estufa a 40 °C durante 24 horas. Cada formulación se extrajo por triplicado donde el tercer triplicado se mantuvo 24 horas más a 40 °C para asegurar la total extracción del carvacrol (Manzanares-López et al., 2011; Ramos et al., 2012).

La cuantificación de carvacrol se realizó con un cromatógrafo de líquidos Agilent 1260 Infinity equipado con un detector UV a 274 nm y una columna C18 (100 mm x 4.6 mm x 3.5 µm, Zorbox Eclipse Plus). La fase móvil estuvo compuesta de acetonitrilo y agua (40: 60) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se inyectaron 0,02 mL de cada extracción.

La cuantificación del aditivo activo se realizó comparando las áreas de los picos cromatográficos de las muestras, correspondientes al carvacrol, con las áreas de los picos resultantes de la curva de calibrado. Dicha curva se obtuvo diluyendo carvacrol al 98 % en metanol a 6 concentraciones conocidas en un intervalo entre 100 y 700 ppm, que se calcularon en base a la concentración aproximada que debían tener las muestras. La cantidad final de carvacrol extraído se calculó en % en masa de carvacrol en el film.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH)

Se analizó la actividad antioxidante del carvacrol extraído de los films en base a su capacidad de reducir un radical estable. Esta técnica, propuesta por Byun et al., 2010, con algunas modificaciones, se basa en la disminución de la intensidad del color producido cuando se reduce el electrón impar del

radical DPPH al recibir un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante, en este caso del carvacrol (Scherer y Godoy, 2009).

Se mezcló una alícuota de 500 mL del extracto anteriormente obtenido con 2 mL de una solución de DPPH con metanol (0,06 mM) en tubos de polipropileno cerrados y envueltos en papel de aluminio para resguardarlos de la luz. El DPPH en su forma radical adquiere una coloración violácea con un valor de absorción máximo a 517 nm pero a medida que queda reducido por el antioxidante va perdiendo su color y dicho valor decae hasta que la reacción se estabiliza. Se tomó la mezcla con el extracto de PLA-Carvacrol al 4% y tras sacudirla vigorosamente se midió su absorbancia a 517 nm en intervalos de 1 min utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Biomate-3 (Thermospectronic, EE.UU.). El valor de absorbancia quedó estabilizado a las 4 horas y ese fue el tiempo al que se mantuvieron las muestras reaccionando, resguardadas de la luz, hasta la medida.

Se analizó cada una de las extracciones anteriormente cuantificadas mediante HPLC por triplicado. La capacidad antioxidante del carvacrol se calculó como el porcentaje de inhibición (I%) utilizando la siguiente ecuación (1):

$$I(\%) = \left[\frac{(A_{Control} - A_{muestra})}{A_{Control}} \right] * 100 \quad (1)$$

donde $A_{Control}$ es la absorbancia del control (0,5 mL MeOH + 2 mL DPPH) tomada en $t = 0$ minutos y $A_{Muestra}$ es la absorbancia de muestra a $t = 240$ minutos.

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Se obtuvieron datos del análisis termogravimétrico, TGA, en un analizador térmico Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e (Schwarzenbach, Suiza) con la finalidad de estudiar la estabilidad térmica de los materiales. Muestras de unos 7 mg fueron calentadas gradualmente a 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 700 °C bajo atmósfera de nitrógeno (flujo de 50 mL/min). Se tomó como la temperatura inicial de degradación (T_0) aquella a la que la muestra perdía un 5 % respecto a su masa inicial (curva TGA), mientras que la temperatura de degradación máxima (T_{max}) se calculó en base al pico obtenido de la 1ª derivada (curva TGA) que se corresponde con la máxima velocidad de degradación del material.

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Se sometieron las muestras a ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un TA Instruments DSC Q2000 (New Castle, DE, USA) bajo un caudal de nitrógeno a 50 mL/min. Muestras de unos 3 mg (± 1 mg) de film se sellaron en crisoles de aluminio (40 μ L) y se sometieron al siguiente programa térmico: primer ciclo de calefacción de -90 °C a 170 °C a

una velocidad de 10 °C/min (para borrar el historial térmico del material), a continuación se enfrió hasta -90 °C y finalmente tuvo lugar un segundo ciclo de calentamiento hasta 170 °C a 10 °C/min. Las películas de PLA con carvacrol se analizaron hasta 150 °C para evitar la degradación del aditivo. Durante el primer ciclo se muestran los posibles cambios en la cristalización y fusión del material debido al envejecimiento y durante el segundo calentamiento se determina la temperatura de transición vítrea (T_g) como el punto de inflexión de la región donde se detecta un cambio en la línea base de la señal.

Caracterización estructural y morfológica

DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La difracción de rayos X constituye una técnica eficaz para el estudio de polímeros en estado sólido. Los experimentos realizados con DRX pueden generar la siguiente información: Estimación del grado de cristalinidad de la muestra, determinación de la orientación de los cristales y análisis de la “macroestructura” del polímero (forma en la que se empaquetan los cristales y los bucles de las cadenas) entre otros (Llorente U. y Horta Z., 1991).

Es por ello que, se analizó la estructura cristalina de los materiales mediante difracción de rayos X con un difractómetro Bruker D8-Advance (EEUU), equipado con una fuente de radiación Cu K_α (λ : 1,546 Å), operando a 40 kV de voltaje y aplicando una corriente de 40 mA. El ángulo de incidencia (2θ) fue variando gradualmente de 2° a 90° a una velocidad de barrido de 2°/min (0,1°/3 segundos).

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)

Se examinó la morfología superficial y transversal de los films utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo JEOL JSM-840 (Jeol USA Inc., Peabody, Estados Unidos). Secciones de 10 mm² se metalizaron con una capa de oro para aumentar su conductividad eléctrica (con un metalizador (Au) / Evaporador (C) Balzers, SCD 004). Los films plastificados con OLA se sumergieron en nitrógeno líquido antes del corte para obtener una fractura limpia. Se operó a 10 kV y las imágenes, tanto transversales como superficiales, se registraron a 500 aumentos.

Propiedades mecánicas

Se realizaron ensayos de tracción utilizando una máquina universal de ensayos Ibertest ELIB 30 (Madrid, España) equipada con una célula de carga de 5 kN. Las pruebas se realizaron sobre tiras rectangulares (10-100 mm²) previamente acondicionadas durante 2 horas a 23 °C y 50 % de HR en una cámara climática modelo Dycometal-CM81 (Barcelona, España). La separación inicial entre mordazas fue 50 mm y se estiró hasta la rotura a una velocidad de 25 mm/min. El porcentaje de elongación a la rotura (ϵ %), módulo de elasticidad (E) y resistencia a la tracción (TS) se calcularon a

partir de los resultados obtenidos de las curvas de tensión-deformación, tal como indica la Norma ASTM D882-01, 2001. Todos los valores corresponden al promedio de 5 mediciones de diferentes películas de cada composición (\pm desviación estándar).

Propiedades ópticas

La transparencia de las películas fue determinada a través de los espectros de reflexión, aplicando la teoría Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) de dispersión múltiple. Los espectros de reflexión de las películas se determinaron entre 360 y 740 nm con un Espectrocolorímetro CM-3600d (Minolta Co., Tokio, Japón) sobre fondo blanco y fondo negro. La transmitancia interna (T_i) de las películas fue cuantificada usando la ecuación (2). En esta ecuación R_0 es la reflectancia de la película sobre un fondo negro. Los parámetros a y b fueron calculados a través de las ecuaciones (3) y (4), donde R es la reflectancia de la muestra sobre una superficie blanca y R_g es la reflectancia de la superficie blanca usada como referencia. Las medidas fueron tomadas sobre 3 películas de cada formulación.

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

$$a = \frac{1}{2} \cdot \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 \cdot R_g} \right) \quad (3)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (4)$$

El brillo se midió sobre la superficie del film usando un brillómetro de superficie plana (modelo 268 Multi.Gloss, Minolta, Alemania). Se estableció el ángulo de 20° para tomar los valores de luz reflejada por la superficie de la muestra, tal como recomienda el método D523 de la Norma ASTM (ASTM, 1999) para muestras de brillo alto. La medida se tomó por triplicado considerando tres películas de cada formulación. Todos los resultados se expresan como unidades de brillo, en relación con una superficie de vidrio negro estándar altamente pulido cuyo valor está próximo a 100.

Propiedades de barrera

VELOCIDAD DE TRANSMISIÓN DE OXÍGENO (OTR)

OTR es definido como la cantidad de oxígeno que pasa a través de un área determinada de una película plástica por unidad de tiempo. Se utilizó un analizador de permeabilidad de oxígeno Systech modelo 8500 (Metrotec S.A, España). Las pruebas se llevaron a cabo introduciendo oxígeno puro (99,9%) en la parte superior de la cámara de difusión mientras el nitrógeno fue inyectado en la parte inferior donde se encuentra localizado el sensor de oxígeno. Tres películas de cada formulación, con un espesor medio de $200 \pm 50 \mu\text{m}$, se cortaron en círculos de 14 cm de diámetro. Se monitorizó el

caudal volumétrico de oxígeno por unidad de superficie de película y por unidad de tiempo (OTR, $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1}$) hasta que se alcanzó el estado estacionario. El coeficiente de permeabilidad (OP) es proporcional al valor $\text{OTR} \cdot e$ (e = espesor, mm). De esta manera, se han calculado los valores de $\text{OTR} \cdot e$ para comparar las propiedades de barrera al oxígeno de los diferentes films.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas se determinó por triplicado siguiendo el método gravimétrico del desecante de la Norma ASTM E96-96M, 2005 (González y Álvarez, 2013)

La "Permeabilidad al vapor de agua" se define como la cantidad de vapor de agua que penetra por unidad de tiempo y área a través del material, inducida por la diferencia de presión de vapor a ambos lados de la película, bajo condiciones de temperatura y humedad especificadas. En el método del desecante la muestra estudiada se selló con parafina en cápsulas de aluminio que contienen CaCl_2 anhidro (previamente desecado a $200\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas) dejando un espacio entre film y desecante. Estas cápsulas se pesaron y se introdujeron en una cámara climática a $23\text{ }^\circ\text{C}$ y 50 % HR durante un tiempo suficiente para alcanzar el estado estacionario. Las masas se determinaron cada 24 horas y estos valores se trazaron como variación de peso frente al tiempo, obteniéndose un gráfico lineal cuya ecuación permitió el cálculo de la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVT) siguiendo la ecuación (5):

$$WVT = (G/t)/A \quad (5)$$

donde (G/t) es la pendiente de la línea recta (variación de peso (gramos)/tiempo (horas)) y A es la superficie expuesta (m^2). La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calculó siguiendo la ecuación (6):

$$WVP = WVT/\Delta P = WVT/S \cdot (R_1 - R_2) \quad (6)$$

donde S es la presión de vapor de saturación (Pa) a la temperatura del ensayo ($23\text{ }^\circ\text{C}$) y $(R_1 - R_2)$ es la diferencia en la humedad relativa (RH) entre el interior y exterior de la cápsula. Los resultados se han expresado como permeabilidad media, calculado multiplicando el valor de WVP por su espesor.

Actividad antimicrobiana de las películas

Se evaluó la capacidad antimicrobiana de las películas de PLA y PLA-OLA como control, y las formuladas con carvacrol frente a dos microorganismos diferentes: *E. coli* (bacteria gram-negativa) y *S. aureus* (bacteria gram-positiva). El método empleado fue el de difusión en disco de agar de la Norma NCCLS M2-A9, 2006 (Suppakul et al., 2011) que consiste en depositar una sección de la película (6 cm^2) sobre el centro de una placa de agar Mueller-Hinton (MHA), previamente inoculado con 0,1 mL del cultivo

microbiano. La concentración de los inóculos para ambas cepas fue 10^6 UFC·mL⁻¹, correspondiendo a la concentración que podría encontrarse en un alimento contaminado, obtenida cuando la turbidez del caldo de cultivo alcanzó el valor de 0,5 en la escala McFarland. Se diluyó posteriormente y de forma consecutiva (1:10) en agua de peptona tamponada (Ramos et al., 2012). Las placas sembradas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La capacidad antimicrobiana de cada película se evaluó, por duplicado para cada formulación, observando el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de la muestra.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de carvacrol y de la capacidad antioxidante en las películas formuladas

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de carvacrol perdido durante el procesado y, de esta manera, conocer la concentración real del mismo en las diferentes películas desarrolladas, se ha procedido a su análisis mediante HPLC-UV y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. A las 48 horas no se detectó carvacrol en los extractos por lo que se concluye que a las 24 horas la extracción es completa. A la vista de los resultados se aprecia que todas las formulaciones a las que se les incorporó el carvacrol sufrieron una pérdida alrededor del 1 %, según la formulación, del compuesto activo. Los datos obtenidos tras el análisis termogravimétrico (TGA) mostraron que el carvacrol inicia su degradación a unos 120 °C. Por tanto, la pérdida durante el procesamiento podría deberse a la evaporación del compuesto al ser sometido a las temperaturas empleadas en la mezcladora y en el prensado, ya que se alcanzan los 170 y 160 °C respectivamente. Otros estudios han atribuido estas pérdidas a factores tales como una pobre mezcla, evaporación, degradación térmica o por la propia actividad antioxidante del compuesto activo al proteger al polímero de oxidaciones durante el procesado (Ortiz-Vázquez et al., 2011; Ramos et al., 2014).

Se observó que las muestras de PLA plastificadas con OLA retuvieron menos carvacrol en la matriz que las películas que únicamente contenían PLA y carvacrol. Esto podría deberse a que los oligómeros de ácido láctico interactúan con las cadenas poliméricas de PLA generando ramificaciones que abren la estructura. Como consecuencia, el carvacrol dispone de menos puntos activos para enlazarse con el polímero (ya que están ocupados por los oligómeros), teniendo así mayor facilidad para escapar y mayor

susceptibilidad de ser degradado. Si se observa la cantidad final de carvacrol en las películas PLA-OLA-Carvacrol 8 % y PLA-OLA Carvacrol 6 % se ve que la pérdida fue más acusada para la primera formulación que, debido a las causas anteriormente citadas, no consigue retener de la misma manera que los otros films el compuesto activo.

TABLA 3. Cuantificación mediante HPLC-UV de carvacrol extraído y actividad antioxidante expresado como porcentaje de inhibición (I%), de las diferentes formulaciones.

Muestras	Carvacrol inicialmente añadido (% p/p)	Carvacrol extraído (% p/p)*	Inhibición (%)**
PLA	-	n.d.	8,9 ± 1,9 ^{1,a}
	4	3,2 ± 0,3 ^{1,a}	51,0 ± 4,4 ^{1,a,c}
	6	5,0 ± 0,2 ^{1,a}	60,3 ± 12,3 ^{1,b}
	8	7,3 ± 0,5 ^{1,a}	64,3 ± 7,9 ^{1,b,c}
PLA + 20% OLA	-	n.d.	7,7 ± 2,0 ^{2,a}
	4	3,0 ± 0,6 ^{2,b}	29,3 ± 7,5 ^{2,b}
	6	4,9 ± 0,4 ^{2,b}	41,6 ± 4,6 ^{2,b}
	8	5,6 ± 0,6 ^{2,b}	42,9 ± 5,3 ^{2,b}

n.d.: no detectado; *(n=3, media ± SD); **(n=9, media ± SD)

Diferentes números superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con y sin OLA ($p < 0.05$).

Diferentes letras superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con distinto % de carvacrol ($p < 0.05$).

Para la evaluación de la capacidad antioxidante del carvacrol se seleccionó el ensayo basado en la utilización de DPPH por su simplicidad y aceptación con fines comparativos. Este método se basa en la afinidad de los antioxidantes para actuar como aceptores de radicales libres interrumpiendo el mecanismo de oxidación (Pereira et al., 2012).

La actividad antioxidante de los extractos se calculó a partir del valor de absorbancia, tomado a $t = 240$ minutos, con el fin de evaluar si la cantidad restante de carvacrol presente en la matriz del polímero resulta suficiente para actuar reduciendo los radicales de DPPH de manera eficaz. Los resultados obtenidos para las distintas formulaciones se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar, todos los extractos que contienen carvacrol presentaron valores de porcentaje de inhibición (I %), lo cual indica que, independientemente de las pérdidas encontradas durante el procesamiento, existe una actividad antioxidante apreciable. Dicha actividad viene ligada a la cantidad de carvacrol que tiene la película, esto es, a medida que el porcentaje de carvacrol aumenta también lo hace la actividad antioxidante. Por otro lado, las películas de PLA-OLA presentaron menor capacidad antioxidante que las películas sin plastificar, que podría asociarse al hecho de que son aquellas que han sufrido mayor pérdida de compuesto activo durante el procesado, tal y como se observó al cuantificar la cantidad real de carvacrol (Tabla 3). Se observó que las películas sin el compuesto activo mostraban un ligero porcentaje de inhibición del radical DPPH lo que indicaría que el PLA y el OLA presentan, en cierta medida, carácter

antioxidante. Esta aparente capacidad antioxidante del PLA podría deberse a que, durante el procesado, el polímero ha sufrido un cierto grado de degradación termodinámica, dando lugar a la rotura de cadenas y a la formación de ácido láctico, el cual aportaría cierto carácter antioxidante a la película.

Caracterización térmica (TGA y DSC)

El efecto de la adición de OLA y carvacrol en la estabilidad térmica de las películas de PLA fue estudiado mediante TGA en atmósfera de nitrógeno. La Figura 1 muestra las curvas de TGA obtenidas para todas las muestras, observándose en todos los casos una única etapa de degradación asociada a la pérdida de masa de la matriz polimérica. A medida que la concentración de carvacrol aumenta en estas muestras, la temperatura a la que inicia esa pérdida de masa disminuye de acuerdo con lo observado por Martino et al., 2009; Carrasco et al., 2010 y Burgos et al., 2013 para otras formulaciones en base a PLA.

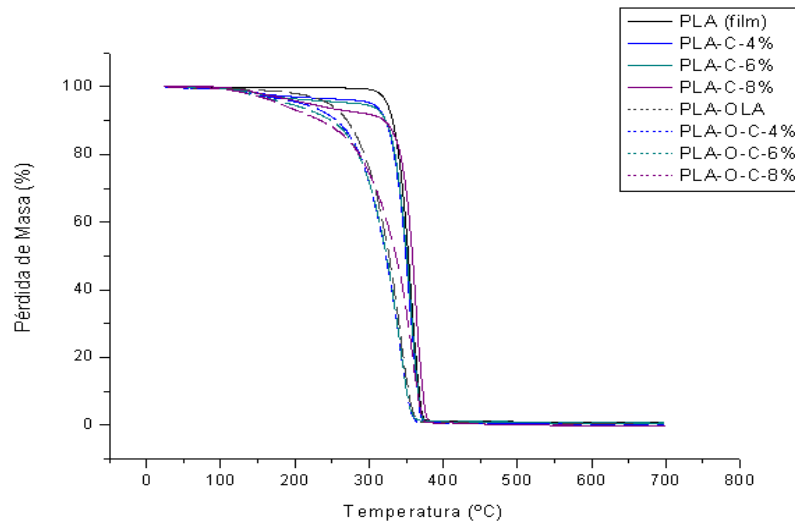


FIGURA 1. Curvas obtenidas de TGA

Estos resultados quedan confirmados con los valores mostrados en la Tabla 4, donde se observa que tanto la adición de OLA como de carvacrol disminuyeron la temperatura inicial de degradación (T_i) de las películas de PLA. En este sentido, las muestras de PLA-OLA presentaron una T_i inferior a las de PLA y a medida que se incrementó el porcentaje de carvacrol el descenso se acentuaba. La T_i del carvacrol es 120 °C, lo que explicaría las pérdidas producidas del mismo al someterse a las temperaturas del procesado (Ramos et al., 2012).

En lo que respecta a la temperatura de máxima velocidad de degradación ($T_{m\acute{a}x}$), las películas de PLA-OLA presentaron una $T_{m\acute{a}x}$ inferior a las de PLA, sin embargo, a medida que el porcentaje de carvacrol aumentaba la $T_{m\acute{a}x}$ se incrementó. De manera general, tanto los valores de T_i como los de $T_{m\acute{a}x}$

muestran que el plastificante y el carvacrol disminuyen la estabilidad térmica de las películas de PLA.

Los valores de temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_{cc}) y temperatura de fusión (T_f) se obtuvieron durante el segundo calentamiento mediante DSC (Tabla 4). Los resultados mostraron que, tanto la adición de carvacrol como la de OLA, disminuyeron los valores de T_g del PLA debido al aumento de la movilidad de las cadenas al introducirse en la matriz polimérica. A medida que se incrementaba la concentración de carvacrol aumentó el efecto plastificante reduciendo los valores de T_g . Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores (Hwang et al., 2012; Byun et al., 2010; Burgos et al., 2013; Ramos et al., 2014).

TABLA 4. Parámetros obtenidos en el análisis de TGA y DSC.

Muestras:	T_i (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	T_g (°C)	T_{cc} (°C)	T_m (°C)
PLA (pellet)	316,0	355,1	57,4	-	-
Carvacrol	120,5	185,8	-61,2	-17,2	2,5
PLA (film)	324,2	357,8	59,1	129,9	150,0
PLA-Carva 4%	303,7	355,6	51,0	124,3	146,3
PLA-Carva 6%	284,2	357,0	47,4	123,3	144,5
PLA-Carva 8%	216,7	363,9	41,4	117,8	141,7
OLA	183,7	270,5	-33,2	-	-
PLA-OLA	245,8	342,5	31,6	103,6	146,2
PLA-OLA-Carva 4%	209,4	341,6	24,6	101,0	141,8
PLA-OLA-Carva 6%	192,5	342,1	22,5	102,8	141,2
PLA-OLA-Carva 8%	179,0	358,4	21,8	98,1	140,3

La entalpía total, determinada entre 70 y 160 °C durante el primer calentamiento, fue cercana a cero en todas las muestras analizadas. Este resultado indica que los procesos de cristalización y de fusión tenían entalpías similares y que, por tanto, las películas procesadas tenían una estructura amorfa (Martino et al., 2009; Burgos et al., 2013).

Las Figuras 2 y 3 corresponden a las curvas DSC de las películas de PLA y PLA-OLA, respectivamente, obtenidas durante el segundo calentamiento. El aumento en la movilidad molecular por la presencia de OLA y carvacrol favorece la formación de cristales durante el calentamiento que posteriormente funden. Se observó que al aumentar la cantidad de carvacrol en las películas disminuyó el valor de T_{cc} y de T_m lo que es indicativo de la formación de cristales de distintos tamaños que se traducen en picos más anchos (Burgos et al., 2013).

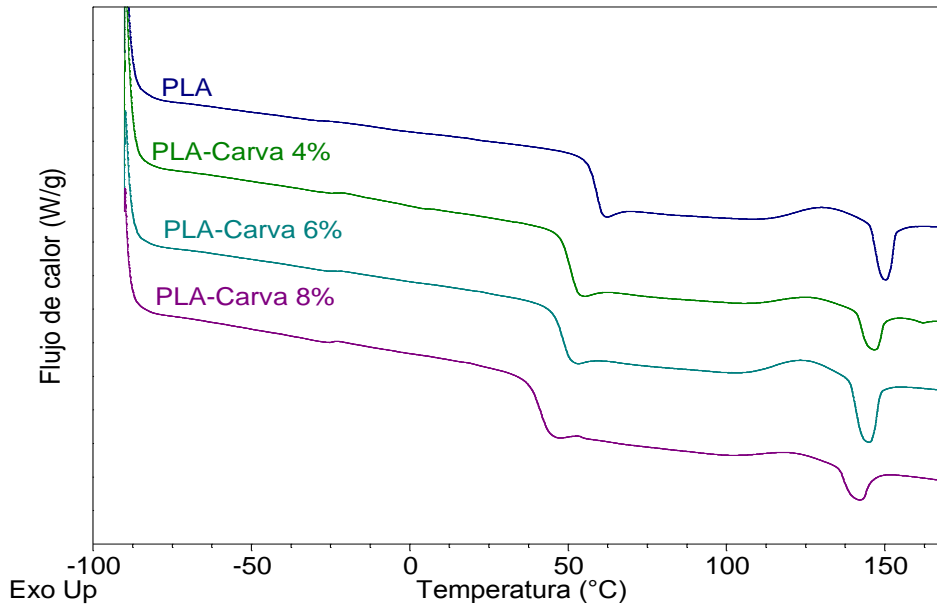


FIGURA 2. Curvas DSC de las películas de PLA durante el segundo calentamiento.

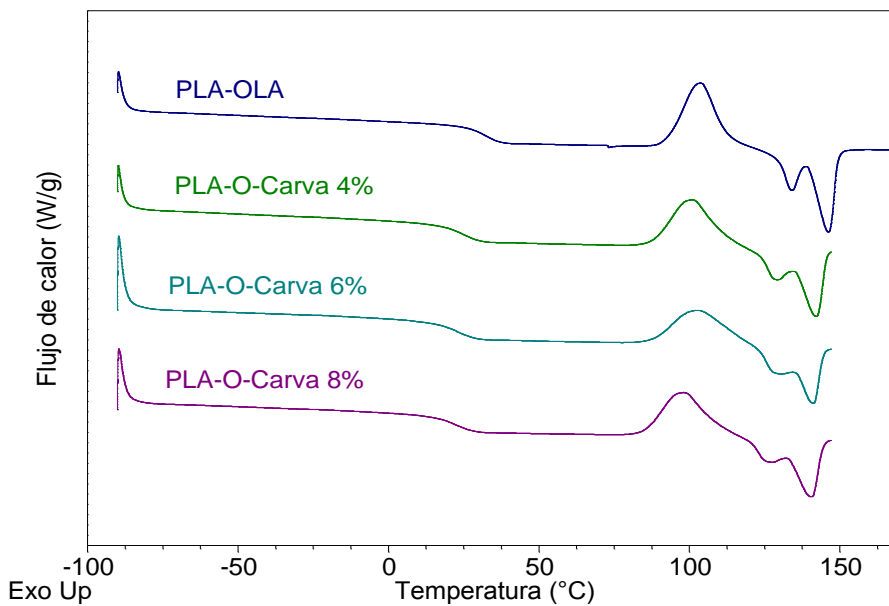


FIGURA 3. Curvas DSC de las películas de PLA-OLA durante el segundo calentamiento.

Caracterización estructural y morfológica (DRX y SEM)

La difracción de rayos X (DRX) permite determinar el porcentaje de cristalinidad, que a menudo se relaciona con métodos de procesamiento y es de gran importancia en la química de polímeros. La Figura 4 muestra los difractogramas de las películas de PLA y carvacrol con y sin plastificante. Todos los materiales presentaron una estructura amorfa después del procesado, indicado por la formación de un halo en la señal y la ausencia de

picos de cristalinidad. De esta manera, se confirman los resultados observados en el análisis DSC.

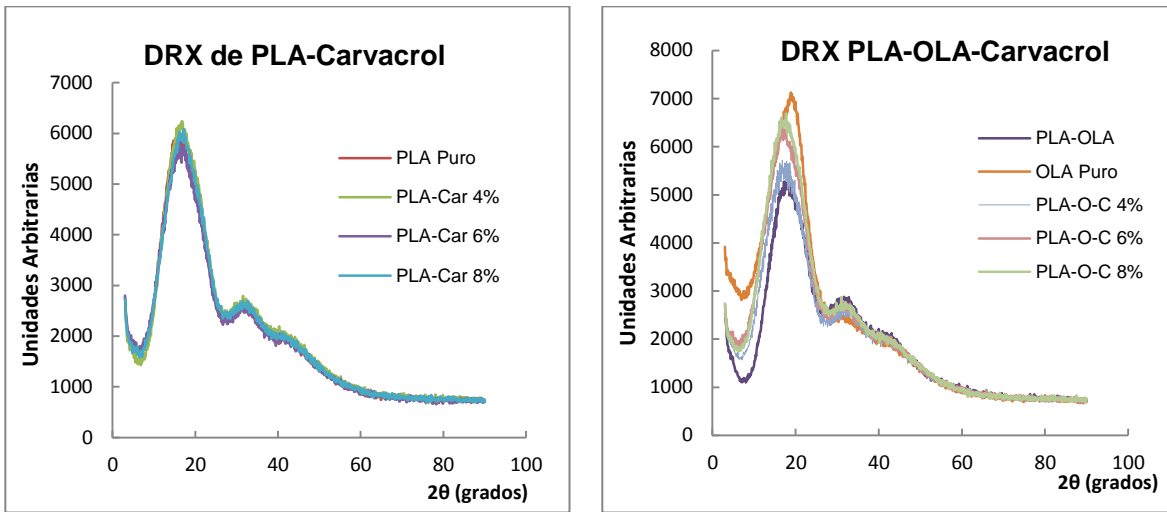


FIGURA 4. Difractograma de las películas de PLA formuladas.

En la Figura 5 se muestran varias micrografías SEM tomadas de la sección transversal y de la superficie de las películas. Se observó que superficialmente los films son bastante homogéneos y lisos. En general, no se apreció separación de fases ni oquedades producidas por la evaporación de los compuestos durante el proceso de fusión, lo cual indica que, independientemente de la presencia o no de plastificante, el carvacrol, a pesar de su hidrofobicidad, está bien incorporado a la matriz polimérica. Otros autores también observaron superficies homogéneas y lisas en películas de PLA plastificado (Martino et al., 2009; Burgos et al., 2013).

		Sin carvacrol	8 % en peso de carvacrol
PLA	Superficial		
	Transversal		

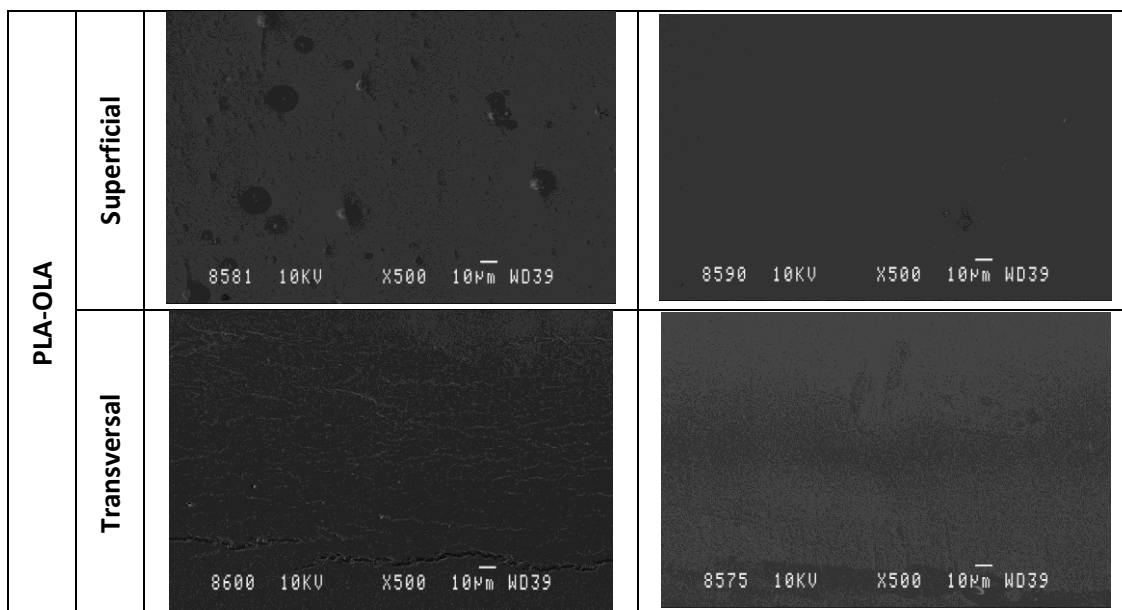


FIGURA 5. Micrografías de SEM tomadas a 500 aumentos de las películas de PLA y PLA-OLA

Propiedades mecánicas

Con el fin de evaluar la influencia del plastificante y del compuesto activo sobre el comportamiento mecánico de las películas de PLA, se llevaron a cabo ensayos de tracción donde se obtuvieron los siguiente parámetros: módulo de elasticidad (E), elongación a la rotura (% ϵ) y resistencia a la tracción (TS) (Tabla 5).

TABLA 5. Resultados obtenidos del módulo de elasticidad (E), elongación a la rotura (% ϵ) y resistencia a la tracción (TS) de las películas formuladas.

Formulación	E (MPa)*	ϵ (%)*	TS (MPa)*
PLA	2444 \pm 55 ^{1,a}	5,4 \pm 0,4 ^{1,a}	62,8 \pm 4,4 ^{1,a}
PLA-Carvacrol 4%	2409 \pm 80 ^{1,a}	5,0 \pm 0,3 ^{1,a}	52,9 \pm 4,0 ^{1,a}
PLA-Carvacrol 6%	2331 \pm 78 ^{1,a}	5,0 \pm 0,6 ^{1,a}	41,1 \pm 5,5 ^{1,a}
PLA-Carvacrol 8%	1995 \pm 81 ^{1,a}	5,0 \pm 0,8 ^{1,a}	40,9 \pm 2,7 ^{1,a}
PLA-OLA	875 \pm 139 ^{2,b}	247,6 \pm 20,2 ^{2,b}	16,5 \pm 1,6 ^{2,b}
PLA-OLA-Carva 4%	226 \pm 83 ^{2,b,c}	290,9 \pm 30,9 ^{2,b}	14,8 \pm 1,2 ^{2,b}
PLA-OLA-Carva 6%	99 \pm 25 ^{2,c}	247,0 \pm 43,2 ^{2,b}	11,9 \pm 2,6 ^{2,b}
PLA-OLA-Carva 8%	14 \pm 5 ^{2,d}	374,9 \pm 16,5 ^{2,b}	9,4 \pm 1,8 ^{2,b}

*(n=5, media \pm SD)

Diferentes números superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con y sin OLA ($p < 0.05$).

Diferentes letras superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con distinto % de carvacrol ($p < 0.05$).

El PLA puro presentó un bajo valor de % ϵ (alrededor del 5 %) y un valor alto del módulo de elasticidad (E= 2,4 GPa), lo que muestra la alta rigidez del polímero (González y Alvarez, 2013). Como era de esperar, el proceso de plastificación con OLA causó una disminución del 67 % en el módulo

elástico y un aumento de hasta un 250 % en el porcentaje de elongación, lo que evidencia la disminución de la rigidez. Este comportamiento también viene reflejado en los valores de TS, donde la incorporación de OLA redujo un 75 % la resistencia a la tracción, hecho que podría explicarse por la reducción de la cohesión de las cadenas macromoleculares cuando el plastificante penetra a través de la matriz de polímero (Burgos et al., 2013).

Por otro lado, aunque la adición de OLA modificó de forma significativa las propiedades mecánicas, también se apreció el efecto plastificante del carvacrol al reducir los valores de E conforme aumenta su concentración en las películas de PLA-OLA. Estos resultados fueron observados también por otros autores en formulaciones de PLA con carvacrol (Persico et al., 2009; Hwang et al, 2012; Arrieta et al., 2013; Ramos et al., 2014).

Se sabe que, en términos generales, las películas para embalaje requieren alta flexibilidad a temperatura ambiente para evitar la rotura tanto durante el procesado como durante su uso (Martino et al., 2006). En este sentido, todas las formulaciones plastificadas demostraron tener una respuesta mecánica adecuada ya que presentan una flexibilidad adecuada para ser utilizado en formulaciones de envasado alimentario (Arrieta et al., 2013).

Propiedades ópticas

La Tabla 6 muestra los valores de transmitancia interna, brillo a 20°, coordenadas de color L*a*b*, y las diferencias de color (ΔE) de las películas tomando como referencia control la película de PLA pura.

TABLA 6. Transmitancia interna (Ti), brillo a 20°, Coordenadas L*a*b* y diferencias de color de las películas estudiadas.

	Ti (620nm)	Brillo 20°**	L*	a*	b*	ΔE
PLA	86,6 ± 0,5 ^{1,a}	95 ± 2 ^{1,a}	75,1 ± 1,3 ^{1,a}	0,24 ± 0,03 ^{1,a}	6,78 ± 0,34 ^{1,a}	-
P-C 4%	87,0 ± 0,3 ^{1,a}	95 ± 3 ^{1,a}	76,1 ± 1,4 ^{1,a}	-0,01 ± 0,02 ^{1,a}	8,14 ± 0,64 ^{1,a}	2,1 ± 0,6 ^{1,a}
P-C 6%	87,2 ± 0,2 ^{1,a}	93 ± 3 ^{1,a}	76,7 ± 0,7 ^{1,a}	-0,07 ± 0,16 ^{1,b}	8,78 ± 0,46 ^{1,a}	2,7 ± 0,1 ^{1,a}
P-C 8%	87,1 ± 0,4 ^{1,a}	91 ± 11 ^{1,a,b}	76,6 ± 1,8 ^{1,a}	-0,18 ± 0,12 ^{1,a,b}	8,70 ± 0,56 ^{1,a}	2,9 ± 0,4 ^{1,a}
PLA-OLA	87,8 ± 0,2 ^{1,a}	87 ± 6 ^{2,b}	78,8 ± 1,2 ^{1,a}	0,28 ± 0,08 ^{1,a}	8,77 ± 0,36 ^{1,a}	4,2 ± 0,9 ^{1,a}
P-O-C 4%	87,7 ± 0,3 ^{1,a}	85 ± 7 ^{2,b}	78,8 ± 1,8 ^{1,a}	0,23 ± 0,24 ^{1,a}	9,63 ± 1,17 ^{1,a}	4,9 ± 1,0 ^{1,a}
P-O-C 6%	87,4 ± 0,2 ^{1,a}	78 ± 11 ^{2,b}	77,2 ± 1,0 ^{1,a}	0,22 ± 0,03 ^{1,a,b}	10,12 ± 0,32 ^{1,a}	4,0 ± 0,2 ^{1,a}
P-O-C 8%	87,8 ± 0,3 ^{1,a}	68 ± 9 ^{2,b}	80,1 ± 1,8 ^{1,a}	-0,25 ± 0,23 ^{1,a,c}	9,07 ± 0,76 ^{1,a}	5,7 ± 1,2 ^{1,a}

** (n=3, media ± SD)

Diferentes números superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con y sin OLA ($p < 0.05$).

Diferentes letras superíndices dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones con distinto % de carvacrol ($p < 0.05$).

No se observan diferencias significativas en los valores de T_i , lo que indicaría que su nivel de transparencia es bastante constante en todos ellos (Jiménez et al., 2013). Similares resultados han observado otros autores (González y Álvarez, 2013) trabajando con mezclas de PLA y proteína de soja. Donde sí se observan diferencias significativas es en los valores de brillo. Siguiendo la norma ASTM D523 (1999), la Tabla 6 presenta las medidas a un ángulo de 20° ya que se trata de materiales con brillo alto. Se observa una tendencia a disminuir el brillo para las mezclas PLA plastificadas con OLA y con las concentraciones mayores de carvacrol (6 y 8 % en peso). La presencia de carvacrol (a las distintas concentraciones) y la incorporación de OLA, de forma general, no parece modificar demasiado esta propiedad.

En cuanto a las diferencias de color, la mayor diferencia se alcanza en la muestra de PLA plastificado con un 8 % de carvacrol el cual alcanza un valor de $\Delta E = 5,7$. A partir de un valor de diferencia de 5 puede llegar a percibirse diferencias visualmente. Sin embargo, viendo el resto de valores, no parece que el carvacrol por sí solo llegue a afectar a la apariencia global de la película, incluso a altas concentraciones. Similares resultados se han observado por otros autores trabajando con carvacrol (Ramos et al., 2012; Arrieta et al., 2013).

Propiedades de barrera (OTR y WVP)

Una de las propiedades más importantes de los materiales para envasado de alimentos es la permeabilidad al oxígeno, ya que, a menudo es necesario controlar este parámetro en envases alimentarios bajo condiciones controladas que protegen al alimento de la degradación oxidativa. Esta permeabilidad puede ser determinada a través de la velocidad de transmisión de oxígeno (OTR). En este estudio se multiplicó el valor de OTR por el espesor promedio de cada película ($OTR \cdot e$) para poder compararlos entre sí. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

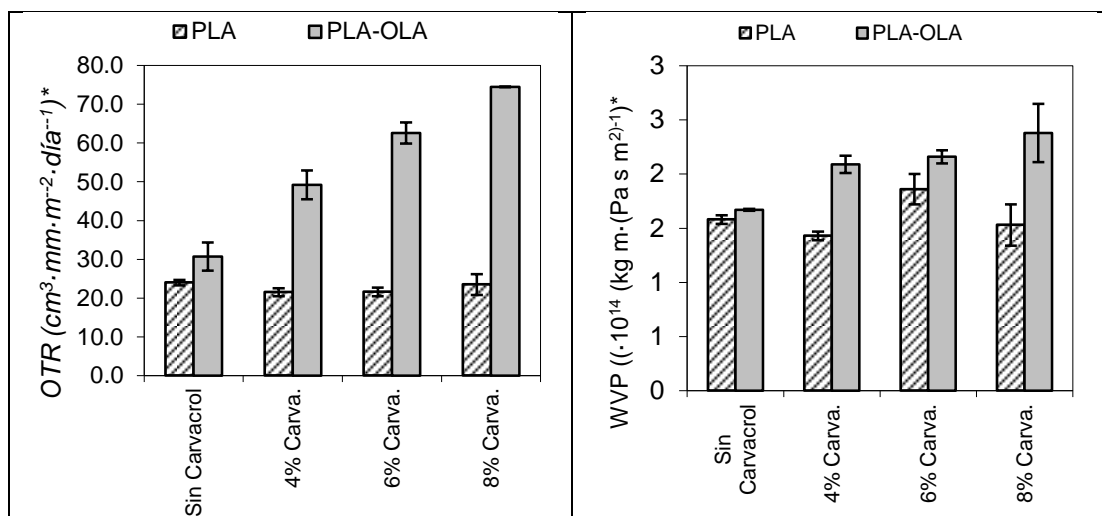


FIGURA 6. Resultados obtenidos de OTR y WVP de los diferentes films. *(n=3, media ± SD)

Como puede observarse, la incorporación de plastificante a la matriz de PLA incrementó la velocidad de transmisión de oxígeno. Sin embargo, la presencia de carvacrol no afecta a las propiedades barrera del film de PLA, aunque si se aprecia una tendencia a aumentar el valor de OTR-e a concentraciones altas en la matriz de PLA-OLA. Uno de los parámetros que afectan al paso de oxígeno a través de las matrices poliméricas es la cristalinidad, ya que dificulta el paso de pequeñas moléculas de gas, las cuales pasan a través de la región amorfa del polímero (George y Thomas, 2001; Jamshidian et al., 2012). Por otro lado, ciertos autores vieron que existe una correlación lineal entre la permeabilidad al oxígeno y el volumen libre (Byun et al., 2010). El plastificante y el carvacrol unidos a la red polimérica deben ocupar un espacio que dificulta la orientación de las cadenas de PLA de forma que aumenta el volumen libre y, por consiguiente, la transmisión al oxígeno. Esto explicaría que las películas de PLA con OLA y carvacrol hayan aumentado su velocidad de transmisión al oxígeno (un 51 % en P-O-C-4 %, un 62 % en P-O-C 6 % y un 68 % en P-O-C-8 %). Este fenómeno también se observó en otros estudios (Jamshidian et al., 2012; Ramos et al., 2014). Finalmente, Burgos et al., 2013 compararon películas de PLA-OLA con otras películas poliméricas que se emplean actualmente para el envasado de alimentos, polietileno de baja densidad (LDPE) ($160 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1}$) y tereftalato de polietileno (PET) ($3 \text{ cm}^3 \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{día}^{-1}$), observando que los valores de OTR-e para los films de PLA-OLA se encuentran entre ambos, por lo que se podrían considerar aceptables para esta aplicación.

En cuanto a WVP, en general, los resultados mostraron valores bajos de permeabilidad al vapor de agua para todas las formulaciones, lo que concuerda con los obtenidos por otros autores (González y Alvarez, 2013). No se observaron diferencias significativas en el valor de WVP entre la película de PLA y la de PLA-OLA. Sin embargo, la presencia de carvacrol incrementó la permeabilidad de las películas plastificadas, probablemente por el aumento en el volumen libre en la matriz (Byun et al., 2010; Jamshidian et al., 2012).

Determinación de la capacidad antimicrobiana de las películas

Diversos estudios han comprobado la capacidad antimicrobiana del carvacrol, el cual actúa sobre la pared bacteriana afectando a su permeabilidad y a su integridad (Burt, 2004). La Figura 7 muestra los resultados obtenidos en el test antimicrobiano, mediante el método de difusión en disco de agar sobre *S. aureus* y *E. coli*, de los films de PLA-OLA con una concentración del 6 y 8% en peso de compuesto activo. Este método está basado en la medida del halo generado por la inhibición del crecimiento debido al contacto del cultivo bacteriano con el agente antimicrobiano del film (Ramos et al., 2012)

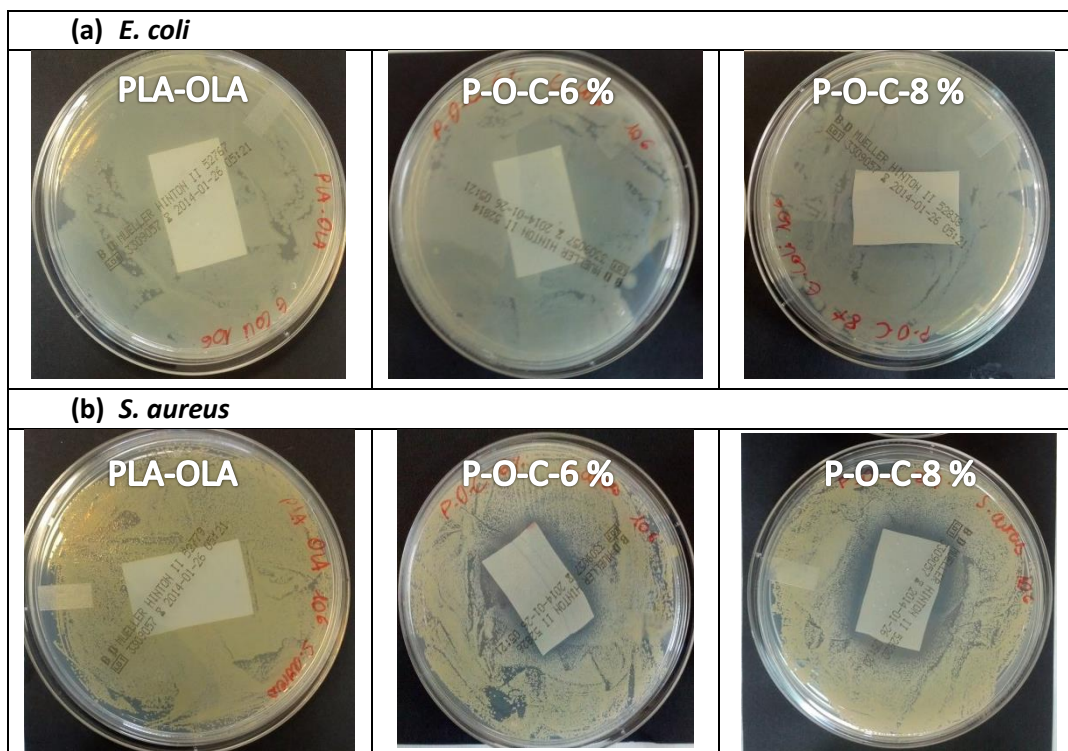


FIGURA 7. Actividad antimicrobiana de los films de PLA plastificados y aditivados con carvacrol. (a) *E. coli*; (b) *S. aureus*.

Los resultados muestran un halo de inhibición para el crecimiento de *S. aureus* en las películas de PLA-OLA con un 6 y un 8% en peso de carvacrol, siendo mayor en el segundo caso, lo que indica la acción antimicrobiana del carvacrol sobre dicha bacteria. Para películas no plastificadas o con un porcentaje inferior al 6 % no se observó halo. Esto puede ser debido a que el OLA ejerce una clara influencia sobre la disposición de las cadenas de la matriz polimérica de forma que, al quedar una estructura abierta, el carvacrol tiene mayor facilidad para difundir hacia el agar actuando como agente antimicrobiano. Sin embargo, para *E. coli* no se observó inhibición del crecimiento para ninguna de las formulaciones, por lo que el agente antimicrobiano estudiado parece ser más efectivo contra determinadas bacterias. Estos resultados coinciden con otro estudio en el que se trabajó con un 4, 6 y 8% en peso de carvacrol sobre estos mismos microorganismos y concluyó que bacterias gram negativas, como *E. coli*, han adquirido cierta resistencia a estos compuestos haciendo necesario incrementar la concentración del mismo a más de un 8% en peso en el film (Ramos et al., 2012)

CONCLUSIONES

En este estudio se han obtenido películas de PLA plastificadas con OLA y aditivadas con un 4, 6 y 8 % en peso de carvacrol, así como, películas de PLA sin plastificar a las mismas concentraciones de aditivo activo. Estas

películas han resultado transparentes, homogéneas y con estructura amorfa en todos los casos. Los resultados han mostrado que la plastificación de la matriz disminuye la estabilidad térmica del material (a tener en cuenta a lo largo del procesado), mejora la ductilidad de las películas obtenidas, incrementa la velocidad de paso de oxígeno en las formulaciones con carvacrol y mantiene unas adecuadas propiedades de barrera al vapor de agua, lo que constituye una ventaja, principalmente por el papel significativo del agua en reacciones de deterioro y en el crecimiento microbiano (Jamshidian et al., 2012). Por otro lado, las películas de PLA-OLA, por tener una estructura más abierta, han retenido menos carvacrol durante el procesado, por lo que la capacidad antioxidante se ha visto reducida, aunque han permitido una mayor difusión del compuesto activo gracias a lo cual ha quedado reducido el crecimiento de ciertos microorganismos. Como conclusión final todas las películas desarrolladas son válidas para su aplicación en sistemas de envase activo, resultando unas más convenientes que otras según la funcionalidad que se pretenda sobre el alimento a comercializar. La formulación de PLA-OLA-Carvacrol al 6 % permite obtener un envase flexible con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Grupo de Investigación de Análisis de Polímeros y Nanomateriales de la Universidad de Alicante por permitirme realizar la parte experimental de este trabajo en sus instalaciones. También se expresa el agradecimiento a la empresa Condensia Química S.A. (Barcelona) por la preparación y suministro de OLA.

REFERENCIAS

- Arrieta, M.P.; Peltzer, M.A.; Garrigós, M.; Jiménez, A. 2013. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4):486-494.
- ASTM D523-99. 1999. Standard test method for specular gloss. In: *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 06.01, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM D882-09. 2009. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: *468 Annual book of ASTM standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM E 96/E 96M-05. 2005. Standard test method for specular gloss. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Bang, G.; Woo, K.S. 2012. Biodegradable poly(lactic acid)-based hybrid coating materials for food packaging films with gas barrier properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(3):1063-1068.
- Burgos, N.; Tolaguera, D.; Fiori, S.; Jiménez, A. 2013b. Synthesis and Characterization of Lactic Acid Oligomers: Evaluation of Performance as Poly(Lactic Acid) Plasticizers. *J Polym Environ*, DOI 10.1007/s10924-013-0628-5.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-253.
- Byun, Y.; Kim, Y. T.; Whiteside, S. 2010. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100(2):239-244.

- Carrasco, F.; Pagès, P.; Gámez-Pérez, J.; Santana, O.O.; Maspoch, M.L. 2010. Processing of poly(lactic acid): characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties. *Polym Degrad Stab*, 95:116-125.
- Fiori S, Ara P. Method for plasticizing lactic acid polymers. Patent WO 2009/092825, 2009.
- George, S. C.; Thomas, S. 2001. Transport phenomena through polymeric systems. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(6):985–1017.
- Gonçalves, M.B.C.; Tomé, C.L.; Garcia, H.; Brandão, L.; Mendes, M.A.; Marrucho, M.I. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants incorporation on the gas permeation properties of poly(lactic acid) films. *Journal of Food Engineering*, 116(2):562-571.
- González, A.; Alvarez, I.C. 2013. Soy protein – Poly (lactic acid) bilayer films as biodegradable material for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 33(2):289-296.
- Hutchings, J.B. 1999. *Food and Colour Appearance*, second ed. Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- Hwang, S. W.; Shim, J. K.; Selke, S.E.M.; Soto-Valdez, H.; Matuana, L.; Rubino, M.; Auras, R. 2012. Poly(L-lactic acid) with added α -tocopherol and resveratrol: optical, physical, thermal and mechanical properties. *Polymer International*, 525 61(3):418-425.
- Jamshidian, M.; Arab, T.E.; Cleymand, F.; Leconte, S.; Falher, T.; Desobry, S. 2012. Effects of synthetic phenolic antioxidants on physical, structural, mechanical and barrier properties of poly lactic acid film. *Carbohydrate Polymers*, 87(2):1763-1773.
- Jamshidian, M.; Arab, T.E.; Desobry, S. 2012. Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control*, 28(2):445-455.
- Jamshidian, M.; Arab, T.E.; Imran, M.; Javeed, A.M.; Cleymand, F.; Desobry, S. 2012. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA–antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 110(3):380-389.
- Jiménez, A.; Fabra, M.; Talens, P.; Chiralt, A. 2013. Physical properties and antioxidant capacity of starch–sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, 116(3):695-702.
- Llorente, U.M.; Horta Z.A. 1991. *Técnicas de Caracterización de polímeros*. UNED, Madrid.
- Manzanarez-López, F.; Soto-Valdez, H.; Auras, R.; Peralta, E. 2011. Release of [α]-Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4):508-517.
- Martino, V.P.; Jiménez, A.; Ruseckaite, R.A. 2009. Processing and characterization of poly(lactic acid) films plasticized with commercial adipates. *J Appl Polym Sci*, 112:2010-2018
- Martino, V.P.; Ruseckaite, R.A.; Jiménez, A. 2006. Thermal and mechanical characterization of plasticized poly(L-lactide-co-D, L-lactide) films for food packaging. *J Therm Anal Calorim*, 86:707-719.
- NCCLS M2-A9. "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests", Ed. 9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol 26 No 1. (2006)
- Ortiz-Vazquez, H.; Shin, J.; Soto-Valdez, H.; Auras, R. 2011. Release of butylated hydroxytoluene (BHT) from Poly(lactic acid) films. *Polymer Testing*, 30(5):463-471.
- Pereira, D.A.; Villalba, K.; Cruz, J. M. 2012. Extraction, purification and characterization of an antioxidant extract from barley husks and development of an antioxidant active film for food package. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13:134-141.
- Persico, P.; Ambrogi, V.; Carfagna, C.; Cerruti, P.; Ferrocino, I.; Mauriello, G. 2009. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polymer Engineering & Science*, 49(7):1447-1455.
- Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; Garrigós, M. C. 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3):513-519.
- Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; Garrigós, M. C. 2014. Development of novel nanobiocomposite antioxidant films based on poly (lactic acid) and thymol for active packaging. *Food Chemistry*, en revision.
- Scherer, R.; Godoy, H. T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3):654-658.
- Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Miltz, J., 2011b. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering* 105 (2), 270-276.