

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural



Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

**INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES
EN FILMS BICAPA DE PHBV Y ANÁLISIS DE
SUS PROPIEDADES FÍSICAS Y
ANTIMICROBIANAS**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Realizado por:
Juan Andrés Marqués Laliga

Directora:
Amparo Chiralt Boix

Directora experimental:
Raquel Requena Peris

Valencia, Julio 2015

INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN FILMS BICAPA DE PHBV Y ANÁLISIS DE SUS PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIMICROBIANAS

Juan Andrés Marqués Laliga, Raquel Requena Peris, Alberto Jiménez Marco, Amparo Chiralt Boix¹

RESUMEN

Se emplearon por separado cuatro compuestos activos (aceite esencial de orégano y su respectivo compuesto mayoritario, carvacrol; aceite esencial de clavo y su respectivo compuesto mayoritario, eugenol) para la obtención de films bicapa de polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) con actividad antimicrobiana, mediante moldeo por compresión. Los compuestos activos se pulverizaron (al 15 % respecto al total de polímero) en la interfase entre dos capas de PHBV, que se unieron mediante termo-compresión. Se caracterizaron las propiedades físicas (mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y ópticas) de los films bicapa de PHBV tras 1 semana de equilibrado a 25 °C y 53 % de humedad relativa. En paralelo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los films frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. La metodología empleada permitió obtener films bicapa de PHBV con capacidad barrera al agua mejorada, mayor transparencia y actividad antimicrobiana frente a ambas bacterias.

PALABRAS CLAVE: polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), moldeo por compresión, propiedades físicas, aceites esenciales, antimicrobianos.

RESUM

Es van emprar per separat quatre compostos actius (oli essencial d'orenga i el seu respectiu compost majoritari, carvacrol; oli essencial de clau i el seu respectiu compost majoritari, eugenol) per a l'obtenció de films bicapa de polihidroxibutirat-co-hidroxivalerat (PHBV) amb activitat antimicrobiana, mitjançant un procés de moldeig per compressió. Els compostos actius es van polvoritzar (al 15 % respecte al total de polímer) en la interfase entre dues capes de PHBV, que es van unir mitjançant un procés de termo-compresió. Es van caracteritzar les propietats físiques (mecàniques, permeabilitat al vapor d'aigua i òptiques) dels films bicapa de PHBV després d'una setmana d'equilibrat a 25 °C i 53 % d'humitat relativa. En paral·lel, es va avaluar l'activitat antimicrobiana dels films front a *Listeria innocua* i *Escherichia coli*. La metodologia emprada va permetre l'obtenció de films bicapa de PHBV amb capacitat barrera a l'aigua millorada, major transparència i activitat antimicrobiana front ambdós bacteris.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

PARAULES CLAU: polihidroxibutirat-co-hidroxivalerat (PHBV), moldeig per compressió, propietats físiques, olis essencials, antimicrobians.

ABSTRACT

Four active compounds were used separately (oregano essential oil and his respective main compound, carvacrol; clove essential oil and his respective main compound) to obtain bilayer films of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) with antimicrobial activity by compression-moulding. Active compounds were sprayed with 15 g oil/100 g polymer in the interface between two layers of PHBV that were joined by thermo-compression. Equilibrated films to 25 °C and 53 % of relative moisture for 1 week were characterized in its physical properties. At the same time, the antimicrobial activity of the films was evaluated against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. Thus, the used methodology allowed to obtain bilayer films of PHBV with better water barrier capacity, more transparency and antimicrobial activity against both bacteria.

KEY WORDS: polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV), compression-moulding, physical properties, essential oils, antimicrobials.

INTRODUCCIÓN

El sector de envases es el principal consumidor de materiales plásticos, la mayoría de ellos derivados del petróleo. En este contexto, el sector alimentario es el principal demandante de materiales de envase, puesto que estos juegan un papel fundamental en el transporte y la conservación de los alimentos. No obstante, la creciente preocupación por el impacto ambiental que generan estas actividades ha supuesto un punto de inflexión en la búsqueda de alternativas biodegradables (Reddy et al., 2003; Shah et al., 2008). Una de las opciones prometedoras en el desarrollo de biomateriales para el envasado son los polihidroxialcanoatos (PHA) (Catoni et al., 2013), una familia de poliésteres de origen microbiano completamente biodegradables. Estos biopolímeros pueden ser sintetizados a partir de fuentes renovables, como sacarosa, almidón, celulosa, triglicéridos, etc. (Reddy et al., 2003), tanto por bacterias Gram-positivas como por bacterias Gram-negativas. Cuando algún nutriente esencial como nitrógeno, oxígeno o fósforo es limitante y el carbono se encuentra en exceso, los PHAs se acumulan en el interior de las células en forma de gránulos constituyendo una reserva de energía para el microorganismo (Arcos-Hernández et al., 2013; Corre et al., 2012; Reddy et al., 2003).

Dentro de esta gran familia de biopolímeros, el poli-3-hidroxi-butarato (PHB) es el más estudiado, puesto que presenta propiedades similares a las de algunos polímeros termoplásticos sintéticos como el polipropileno (Sudesh et al., 2000). No obstante, la elevada cristalinidad de su estructura hace que sea un material rígido y frágil lo cual limita su rango de aplicación (Fabra et al., 2014; Modi et al., 2011). Con el propósito de solventar dichos inconvenientes se ha desarrollado un copolímero por inserción de unidades de 3-hidroxi-valerato (HV), conocido como poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV) (Keshavarz y Roy, 2010; Ray y Bousmina, 2005). De esta forma, variando el porcentaje de HV se pueden obtener materiales con un amplio rango de propiedades, puesto que conforme aumenta la proporción de HV, aumenta la flexibilidad del material y disminuye su punto de fusión (Laycock et al., 2014; Laycock et al., 2014). No obstante, la presencia de HV afecta negativamente a las propiedades barrera del material (Fabra et al., 2014).

El uso de plastificantes es otra estrategia que permite obtener materiales con características similares a los plásticos convencionales, es decir, más flexibles y menos quebradizos (Jost y Langowski, 2015). Entre los plastificantes de origen natural existentes, el polietilenglicol (PEG) es un plastificante de carácter hidrofílico que permite obtener films de PHBV con propiedades mecánicas mejoradas (Catoni et al., 2013; Jost y Langowski, 2015).

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

La incorporación de materiales biodegradables en el envasado requiere un incremento de su funcionalidad que permita absorber su sobrecoste en comparación con los materiales sintéticos convencionales. En este contexto, el desarrollo de envases activos proporciona funciones adicionales que permiten alargar la vida útil de los alimentos. Así, las películas biodegradables con propiedades antimicrobianas y antioxidantes presentan una ventaja adicional por su capacidad para reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos y el deterioro asociado a los procesos oxidativos (Falguera et al., 2011). En este sentido, se han identificado compuestos naturales como los aceites esenciales que exhiben propiedades antimicrobianas y antioxidantes y que son clasificados como seguros (GRAS) por la FDA (López et al., 2007; Sánchez-González et al., 2011). Los aceites esenciales son sustancias líquidas aceitosas, aromáticas y volátiles de composición compleja, donde suelen predominar 2 o 3 componentes mayoritarios, que pueden llegar a representar hasta el 85 % del total. Además, hay otros componentes minoritarios presentes en cantidades traza (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004; Gutierrez et al., 2008). Entre los aceites esenciales más eficaces en el control del crecimiento microbiano se encuentran el aceite esencial de orégano y el aceite esencial de clavo. El aceite esencial de orégano ha sido efectivo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* (Aguirre et al., 2013; Benavides et al., 2012; Calo et al., 2015; Hosseini et al., 2015; Martucci et al., 2015; Rojas-Graü et al., 2007). La actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano se atribuye, principalmente, a sus dos componentes mayoritarios, timol y carvacrol. De forma aislada, el carvacrol ha demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a microorganismos causantes del deterioro alimentario como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, la cual se atribuye a su naturaleza fenólica y a su carácter lipofílico (Burt, 2004; Martucci et al., 2015; Ramos et al., 2012; Rojas-Graü et al., 2007). El aceite esencial de clavo ha demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Shewanella putrefaciens* (Debiagi et al., 2014; Muppalla et al., 2014; Teixeira et al., 2014), la cual se atribuye principalmente al eugenol, que representa aproximadamente el 85 % de su composición. El eugenol es un compuesto fenólico con buenas propiedades bactericidas frente a *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* (Devi et al., 2010; Filgueiras y Vanetti, 2006).

La incorporación de aceites esenciales como compuestos activos en films biodegradables presenta el inconveniente de las grandes pérdidas de volátiles durante el proceso de obtención del film, tanto por extensión y secado de las dispersiones formadoras de films como en el termoprocesado por extrusión o mezcla en fundido. Su incorporación mediante pulverización en una cara del film y posterior termo-compresión de dos films, obteniendo un film bicapa con los compuestos activos en la interfase, podría representar una adecuada estrategia para la optimización del proceso de obtención de films biodegradables activos, donde la liberación del compuesto activo

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

ocurriría de forma progresiva al espacio de cabeza del envase alimentario. Esta metodología evitaría la aplicación directa del compuesto activo sobre el alimento la cual presenta serios inconvenientes en numerosas ocasiones (Ben Arfa et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue la incorporación de aceites esenciales en films bicapa de PHBV obtenidos por termo-compresión, mediante pulverización de los mismos en una de las capas del film y posterior unión de dos capas por termo-compresión, así como analizar sus propiedades físicas y antimicrobianas frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato 8 % (PHBV) fue suministrado en forma de pellet por NaturePlast (Caen, Francia). El polietilenglicol (PEG1000) (peso molecular 950-1050 Da) usado como plastificante, fue suministrado por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). Los aceites esenciales de orégano y clavo se obtuvieron de Herbes del Molí (Alicante, España), mientras que el carvacrol y el eugenol fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).

Preparación de los films

PREPARACIÓN DE LOS FILMS DE PHBV

Los films de PHBV se obtuvieron mediante moldeo por compresión. Para ello, el PHBV se sometió a un proceso de mezclado con PEG1000 (10 % p/p) en un mezclador de rodillos (Labtech Engineering, Tailandia) a 180 °C y 12 rpm durante 8 minutos. Los films monocapa se obtuvieron a partir de los pellets extraídos del mezclador de rodillos mediante un proceso en tres etapas, empleando una prensa de platos calientes (Labtech Engineering, Tailandia). Una primera etapa de precalentamiento durante 5 minutos, una segunda etapa de compresión a 180 °C y 100 bares durante 4 minutos y, por último, una etapa de enfriamiento durante 3 minutos.

INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN ESTRUCTURAS BICAPA

Los aceites esenciales se aplicaron mediante pulverización sobre una de las monocapas de PHBV en una proporción constante de 15 g aceite/100 g de polímero. A continuación, la capa pulverizada se cubrió con una segunda capa de PHBV y juntas se sometieron nuevamente a una etapa de prensado en una prensa de platos calientes. En este caso el prensado se llevó a cabo en dos etapas. Una primera etapa de compresión a 160 °C y 70 bares

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

durante 2 minutos y una segunda etapa de enfriamiento durante 3 minutos. Como compuestos potencialmente activos se emplearon aceite esencial de orégano, aceite esencial de clavo, carvacrol y eugenol. De esta forma se obtuvieron cinco formulaciones diferentes: film bicapa control de PHBV sin compuesto activo (PHBV), films bicapa de PHBV con carvacrol (PHBV-CA), eugenol (PHBV-EU), aceite esencial de orégano (PHBV-OR) y aceite esencial de clavo (PHBV-CLA). Los films bicapa se pesaron una vez obtenidos, así como previamente al prensado, a fin de poder estimar las pérdidas de volátiles ocurridas durante el termo-formado.

Caracterización de los films bicapa

ESPESOR DE LOS FILMS

El grosor de los films, usado en diferentes determinaciones, se midió en seis posiciones aleatorias empleando un micrómetro digital Palmer.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se evaluaron de acuerdo al método ASTM estándar D882 (ASTM, 2001), empleando una prensa universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra). De las curvas esfuerzo-deformación de Henky se obtuvieron los parámetros módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TF) y porcentaje de deformación en el momento de la rotura (% E). El test se llevó a cabo en 8 muestras independientes para cada una de las formulaciones. Para ello, muestras rectangulares (2,5 x 10 cm) se colocaron en las pinzas para ensayos de tensión y se estiraron hasta su rotura a una velocidad de 50 mm·min⁻¹, partiendo de una separación inicial de 50 mm. Previamente a su caracterización mecánica, los films fueron acondicionados a 25 °C y 53 % de humedad relativa (HR) durante 1 semana.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó por cuadruplicado de acuerdo al método gravimétrico ASTM E-96-95 (ASTM, 1995). Para ello, los films se montaron en copas de permeabilidad Payne (3,5 cm diámetro, Elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica) con agua destilada en el interior a fin de obtener una HR del 100 % en uno de los lados del film. Una vez montados los films en las copas, cada una de ellas se introdujo en un desecador independiente a 25 °C, donde mediante una solución de nitrato de magnesio sobresaturada se controló la HR (53 %) en el otro lado del film. Además, a fin de reducir la resistencia al transporte de vapor de agua, se colocó un ventilador en la parte superior de cada una de las copas. Las copas se pesaron periódicamente durante cuatro días y la PVA se calculó a partir de las pendientes de las curvas de pérdida de peso en función del tiempo, obtenidas mediante regresión lineal (Vargas et al., 2011). Las

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

medidas de PVA se llevaron a cabo en films acondicionados a 25 °C y 53 % HR durante una semana.

PROPIEDADES ÓPTICAS

La transparencia de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999). El espectro de reflexión de los films se determinó entre 400 y 700 nm usando un espectrocolorímetro CM-3600d (Minolta Co., Tokio, Japón). Las medidas se tomaron en fondo blanco (R) y fondo negro (R₀). A partir de estos, empleando las ecuaciones (1) y (2) se calcularon los espectros de reflectancia de una lámina de muestra de grosor infinito (R_∞) (ecuación 3) y transmitancia interna (T_i) (ecuación 4).

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

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

$$R_\infty = a - b \quad (3)$$

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (4)$$

A partir de los espectros de R_∞, se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIE- L*a*b* (CIE, 1986), utilizando como sistema de referencia observador 10° e iluminante D65. La luminosidad (L*), el tono (h_{ab}*), el croma (C_{ab}*) y la diferencia de color respecto al film control (ΔE) se calcularon mediante las ecuaciones (5)-(7).

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (5)$$

$$h_{ab}^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (6)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (7)$$

Las propiedades ópticas se determinaron en tres films independientes de cada formulación, realizando medidas por triplicado en cada uno de ellos. Los films evaluados fueron previamente acondicionados a 25 °C y 53 % HR durante una semana.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La metodología empleada para probar la efectividad antimicrobiana de los films fue una modificación del método propuesto por Jiménez et al., (2014). Un cultivo stock de *L. innocua* (CECT 910) y *E. coli* (CECT 101) facilitado por la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT, Burjassot, España) suplementado con glicerol al 30 % (Panreac, Barcelona, España), se mantuvo en Tryptone Soy Broth (TSB, Scharlab, Barcelona, España) en congelación a -25 °C. Ambas bacterias se regeneraron mediante la transferencia de una alícuota en 10 ml de TSB e incubación a 37 °C durante 24 horas. De este cultivo se tomó nuevamente una alícuota de 10 µl, se transfirió a 10 ml de TSB y se incubó a 37 °C durante 24 horas a fin de obtener un cultivo de trabajo en fase de crecimiento exponencial. Este cultivo, diluido adecuadamente, se empleó para inocular tubos de TSB con el objetivo de obtener inóculos de aproximadamente 10⁵ UFC/ml. Círculos de 55 mm de diámetro obtenidos de los diferentes tipos de films se introdujeron en tubos de TSB inoculados y se mantuvieron en refrigeración a 10 °C durante 13 días. Transcurridos 2, 6, 9 y 13 días se llevó a cabo el recuento microbiológico en los distintos tubos de TSB. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de los mismos y se transfirió 1 ml de cada una de estas placas Petri donde se vertieron seguidamente 15 ml de Tryptone Soy Agar (TSA, Scharlab, Barcelona, España). Estas placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C a fin de poder contar las UFC. Todos los test se realizaron por duplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se sometieron a análisis estadísticos a través de análisis de varianza (ANOVA), utilizando Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Corp., Rockville, MD). Se asumieron diferencias significativas con un nivel de confianza superior al 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los films bicapas de PHBV

Durante la etapa de prensado se estimaron pérdidas del 50 %, atribuibles a la volatilización de los aceites esenciales presentes en los films, puesto que el material presentó una humedad de 0,9 %, antes y después de la formación de doble capa. Este nivel de retención de los aceites es muy superior al normalmente obtenido en los procesos de extensión y secado de los films que es del orden del 10 %, dependiendo de la viscosidad de la disolución polimérica.

Los films bicapa de PHBV sin compuestos activos presentaron un espesor medio de 0,188 mm. Los films con activos no vieron modificados significativamente su espesor, por lo que las diferencias respecto al film

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

control en cuanto a sus propiedades físicas no pueden atribuirse a este factor.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas estudiadas para cada una de las formulaciones aparecen recogidas en la Tabla 1. La incorporación de los compuestos activos estudiados en films bicapa de PHBV dio lugar a un descenso significativo de los valores de ME, TF y % E. No obstante, pese a que la adición de todos los compuestos activos implicó una reducción de la flexibilidad del material, el carvacrol dio lugar a films significativamente más deformables que los obtenidos por adición de eugenol, aceite esencial de orégano y aceite esencial de clavo, sin observarse diferencias significativas entre estos tres últimos. Estudios previos han mostrado resultados similares tras la adición de aceite esencial de clavo y eugenol en films de proteína de pescado y en láminas de harina termoplástica (Teixeira et al., 2014; Woranuch y Yoksan, 2013). En contraposición, estudios llevados a cabo con aceite esencial de orégano y carvacrol en films de proteína de triticale, polipropileno y alginato han mostrado un aumento del % E de los films tras la adición de los mismos, atribuyendo un efecto plastificante al aceite esencial de orégano (Aguirre et al., 2013; Benavides et al., 2012; Ramos et al., 2012; Rojas-Graü et al., 2007). El descenso del ME y la TF observado tras la incorporación de los compuestos activos también ha sido previamente descrito para el eugenol, aceite esencial de orégano y carvacrol por Woranuch y Yoksan, (2013), Aguirre et al., (2013) y Ramos et al., (2012), respectivamente.

Las diferencias observadas entre los diferentes casos son atribuibles tanto a la distinta proporción de compuesto activo incorporada en la formulación de los films, así como a las diferencias en cuanto a las interacciones entre estos compuestos y la matriz polimérica. En el caso de la incorporación de los compuestos a nivel de interfase entre dos capas, es de destacar que los compuestos activos no se incorporaran en el seno de la matriz polimérica, sino que, por el contrario, su presencia puede representar una discontinuidad entre ambas que afectará al comportamiento mecánico del ensamblado, dependiendo del balance de interacciones moleculares entre los compuestos y las cadenas más superficiales de las capas en contacto, donde ocurrirá la difusión de los activos en cierta proporción. El comportamiento observado reveló una buena adhesión de las capas de PHBV, lo que indica que los compuestos activos permiten el establecimiento de enlaces entre las cadenas superficiales del film. A pesar de esto, la menor fuerza de cohesión entre cadenas en la zona interfacial, donde difunden los compuestos activos, podría explicar el descenso del módulo de elasticidad, la resistencia a la fractura y la extensibilidad de los films bicapa con activos. De todos ellos, el carvacrol es el que permite una mayor extensibilidad de los bicapa, lo cual sugiere una mayor adhesión interfacial entre las capas.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

TABLA 1. Propiedades mecánicas (módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TF) y porcentaje de elongación en el momento de la rotura (% E)) de los films bicapa de PHBV con diferentes compuestos activos. Valores medios y desviación estándar.

Formulación	ME (MPa)	TF (MPa)	E (%)
PHBV	1141 ± 12 ^a	27,6 ± 0,6 ^a	5,3 ± 0,4 ^a
PHBV-CA	780 ± 85 ^b	17,63 ± 1,14 ^b	4,4 ± 0,6 ^b
PHBV-EU	773 ± 118 ^b	17 ± 2 ^b	3,8 ± 0,4 ^c
PHBV-OR	768 ± 71 ^b	17,3 ± 0,6 ^b	3,8 ± 0,4 ^c
PHBV-CLA	808 ± 91 ^b	18,22 ± 1,16 ^b	3,9 ± 0,4 ^c

a-c: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$).

Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) obtenidos para cada una de las formulaciones tras 1 semana de equilibrado a 25 °C y 53 % HR se presentan en la Tabla 2. Excepto en el caso del aceite esencial de clavo, para el cual no se observaron diferencias respecto a los films control, la incorporación de compuestos activos en la formulación de films bicapa de PHBV dio lugar a valores de PVA significativamente menores. El aceite esencial de orégano y su respectivo componente mayoritario, el carvacrol, fueron los más efectivos en la reducción de la PVA. Análogamente a lo observado, Woranuch y Yoksan, (2013) y Benavides et al., (2012) observaron una mejora en las propiedades barrera frente al vapor de agua de láminas de harina termoplástica y films de alginato tras la incorporación de eugenol y aceite esencial de orégano, respectivamente. Sin embargo, estudios como los de Aguirre et al., (2013), Teixeira et al., (2014) y Rojas-Graü et al., (2007) no reportan un descenso en la PVA tras la adición de aceite esencial de orégano y carvacrol. Tal como se ha comentado, estas diferencias podrían atribuirse tanto a la distinta proporción de agente activo incorporado como a las diferentes interacciones con la matriz polimérica.

Las diferencias observadas en los valores de PVA entre los films con diferentes compuestos activos pueden atribuirse a su diferente composición química y la polaridad de las moléculas, ya que el proceso de transferencia de vapor de agua a través del film depende del balance hidrófilo-lipófilo de los componentes del mismo (Teixeira et al., 2014). En ese sentido, excepto el aceite esencial de clavo, los compuestos implicaron un aumento significativo en la capacidad barrera al vapor de agua de los films, puesto que se trata de sustancias hidrofóbicas, y concretamente el carvacrol, con menor polaridad, resultó ser el más efectivo para potenciar el poder barrera, seguido del aceite de orégano donde es mayoritario.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

TABLA 2. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los films bicapa de PHBV con diferentes compuestos activos. Valores medios y desviación estándar.

Formulación	PVA · 10¹² (g/m.s.Pa)
PHBV	21±4 ^a
PHBV-CA	9,23 ± 1,18 ^b
PHBV-EU	15±2 ^c
PHBV-OR	12±2 ^b
PHBV-CLA	21±6 ^a

a-c: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$).

Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas determinadas en cada una de las formulaciones se muestran en la Tabla 3. Valores altos de T_i se relacionan con una mayor homogeneidad del film y por tanto se corresponden con films más transparentes, mientras que valores bajos de T_i se relacionan con una mayor heterogeneidad en el film y por tanto con un aumento de la opacidad del mismo. En este estudio, la incorporación de compuestos activos en la interfase de las bicapas dio lugar a films ligeramente más transparente, con valores de T_i a 550 nm significativamente mayores. Este resultado contrasta con lo esperado en un sistema teóricamente heterogéneo (dos capas con material interfacial diferente), lo que indica una buena miscibilidad de los activos en las capas poliméricas al difundir desde la interfase hacia el interior de la matriz. Esta difusión podría debilitar las fuerzas intercadena del poliéster, disminuyendo la compacidad de la matriz y, por tanto, aumentando su transparencia. Este efecto sería también coherente con el comportamiento mecánico observado: la disminución de las fuerzas intercadena supondrían un descenso en el módulo de elasticidad y la resistencia de la matriz.

En cuanto al color, la adición de aceites esenciales no produjo cambios significativos en la luminosidad de los films, tal como observaron Teixeira et al., (2014) y Martucci et al., (2015) en otros casos. La adición de carvacrol y eugenol supuso una disminución significativa del croma, que no se dio cuando se incorporaron los aceites esenciales. En estudios similares en films de proteína de pescado y etilen-vinil-alcohol tampoco se observaron cambios de croma por la adición de aceites esenciales (Muriel-Galet et al., 2015; Teixeira et al., 2014). Sin embargo, la tonalidad de los films se vio significativamente afectada con la incorporación tanto aceite esencial de orégano como su respectivo compuesto mayoritario, carvacrol. A diferencia de estos, el aceite esencial de clavo y su respectivo componente mayoritario, eugenol, no tuvieron un efecto significativo en la tonalidad de los films.

Los films que presentaron mayores diferencias de color respecto a los films control fueron aquellos que incluían carvacrol en su formulación. No obstante, estas diferencias de color no son relevantes en términos prácticos

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

ya que son del orden del umbral de percepción visual y dentro de niveles de tolerancia bajos (5 unidades).

TABLA 3. Transmitancia interna a 550 nm (Ti) y parámetros de color de los films bicapa de PHBV con diferentes compuestos activos. Valores medios y desviación estándar.

Formulación	Ti	L*	C _{ab} *	H _{ab} *	ΔE
PHBV	50,2±0,8 ^a	75,7±0,2 ^a	20,79±0,16 ^a	80,32±0,13 ^a	0,00
PHBV-CA	60±2 ^b	76,1±0,3 ^a	19,3±0,4 ^c	81,8±0,2 ^b	1,64
PHBV-EU	58,8±0,4 ^b	75,8±0,3 ^a	20,23±0,15 ^b	80,28±0,10 ^a	0,56
PHBV-OR	58±2 ^b	75,8±0,6 ^a	20,0±0,4 ^{ab}	81,2±0,5 ^b	0,47
PHBV-CLA	58±2 ^b	75,58±0,12 ^a	20,3±0,2 ^{ab}	80,73±0,13 ^a	0,50

a-c: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0,05$).

Actividad antimicrobiana

Las curvas de crecimiento de *L. innocua* y *E. coli* en tubos de TSB sin film y en tubos de TSB con los diferentes tipos de films obtenidos en el estudio se muestran en la Figura 1 y Figura 2, respectivamente. La presencia de films bicapa de PHBV sin compuesto activo no tuvo efecto sobre el crecimiento de ambas bacterias de manera que el posible efecto antimicrobiano de los films con activos no puede atribuirse a la matriz polimérica per se. La incorporación de compuestos activos en los films, independientemente de su naturaleza, redujo significativamente tanto el crecimiento de *L. innocua* como el crecimiento de *E. coli*.

L. innocua se vio significativamente más afectada por los films con aceite esencial de orégano y su compuesto mayoritario, carvacrol, que por los films con aceite esencial de clavo y eugenol. Estudios previos con aceite esencial de orégano reportaron resultados similares (Benavides et al., 2012; Hosseini et al., 2015). Los films con carvacrol y aceite esencial de orégano presentaron actividades antimicrobianas similares a día 2 y día 13. No obstante, a tiempos intermedios su comportamiento fue diferente. Mientras que con carvacrol se observó un descenso gradual de la población de *L. innocua*, con aceite esencial de orégano se observó una actividad antimicrobiana mucho más acusada a partir del día 2. Esto podría deberse a una cinética más rápida de liberación de los activos desde el film en el caso del aceite o a la acción sinérgica de otros compuestos del aceite, además del carvacrol, que le confiere una mayor actividad a los films.

Las curvas de crecimiento de *L. innocua* obtenidas con films con aceite esencial de clavo y eugenol fueron muy similares entre ellas en cuanto a tendencia excepto a los 13 días de cultivo, donde la actividad antimicrobiana del aceite esencial de clavo se intensificó mientras que la del eugenol se mantuvo constante. Así pues, el efecto antimicrobiano de los films con eugenol fue significativamente mayor que el de los films con aceite esencial de clavo durante los primeros 9 días, mientras que a los 13 se invirtió el

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

efecto. Este comportamiento sugiere la liberación retardada de algún compuesto activo del aceite de clavo.

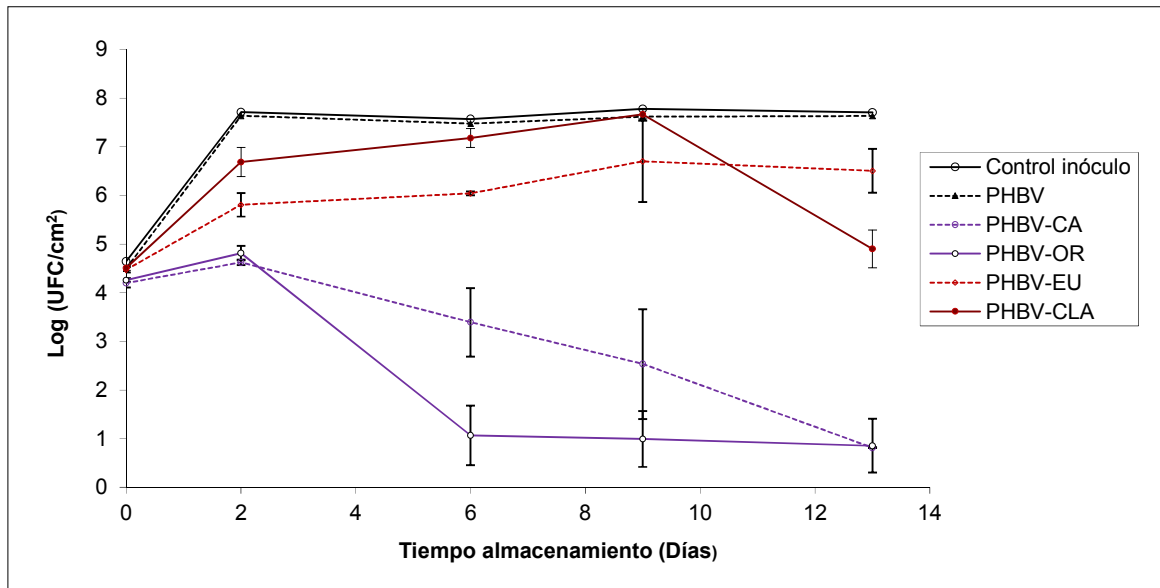


FIGURA 1. Efecto de los diferentes films bicapa de PHBV en el crecimiento y supervivencia de *L. innocua* en TSB a 10 °C. Valores medios y desviaciones estándar para cada tiempo.

Las curvas de crecimiento representadas en la Figura 2 revelan una mayor sensibilidad de *E. coli* frente a los compuestos activos estudiados, puesto que a día 2 ya se obtuvieron reducciones de aproximadamente 7 logs, a excepción de los films con aceite esencial de clavo, que fue menos efectivo. La respuesta de *E. coli* frente a carvacrol, eugenol y aceite esencial de orégano fue muy similar durante todo el periodo de incubación, puesto que, a excepción del recuento a día 2 con los films con carvacrol donde hubo un crecimiento microbiano de 1 log, la inhibición fue total. Estudios previos en films con aceite esencial de orégano y carvacrol mostraron actividades antimicrobianas similares frente a *E. coli* (Aguirre et al., 2013; Arrieta et al., 2013; Debiagi et al., 2014; Hosseini et al., 2015; Martucci et al., 2015; Ramos et al., 2012).

Los films con aceite esencial de clavo fueron los que presentaron menor actividad antimicrobiana tanto frente a *E. coli* como a *L. innocua*. No obstante, durante el ensayo se observó un aumento progresivo de su efecto antimicrobiano, alcanzándose una reducción máxima de aproximadamente 5 logs. La menor actividad antimicrobiana de los films con aceite esencial de clavo también se observó en un estudio llevado a cabo por Debiagi et al., (2014) al comparar las actividades antimicrobianas de films con aceite esencial de clavo y aceite esencial de orégano.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

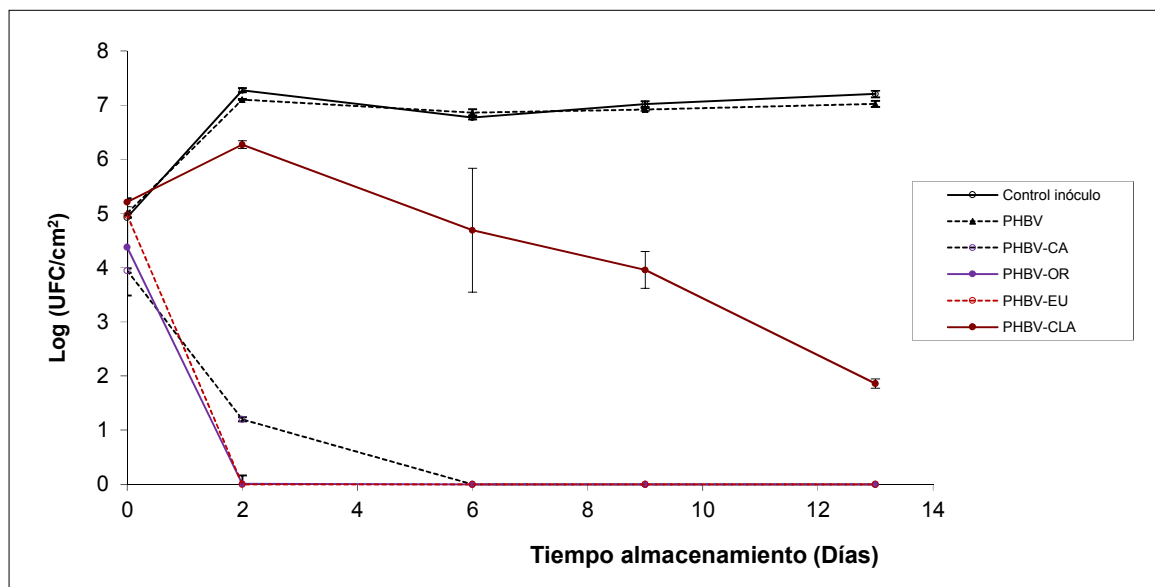


FIGURA 2. Efecto de los diferentes films bicapa de PHBV en el crecimiento y supervivencia de *E. coli* en TSB a 10 °C. Valores medios y desviaciones estándar para cada tiempo.

En base a los resultados obtenidos, los agentes activos estudiados han sido más efectivos contra bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, que contra bacterias Gram-positivas, como *L. innocua*. Por contra, estudios previos con films antimicrobianos con los mismos compuestos observaron un mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram-positivas, debido a la presencia de una membrana externa que cubre la pared celular de las bacterias Gram-negativas, la cual restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cubierta de lipopolisacáridos (Aguirre et al., 2013; Arrieta et al., 2013; Benavides et al., 2012; Muppalla et al., 2014; Ramos et al., 2012; Teixeira et al., 2014). No obstante, Hosseini et al., (2015) no observó diferencias significativas en cuanto a la actividad antimicrobiana de films con aceite esencial de orégano frente a *E. coli* y *L. monocytogenes*. Esto indica, que no sólo los compuestos, sino la matriz de la que se liberan tienen un papel importante en la efectividad antimicrobiana del film. Por tanto, no cabe esperar siempre un mayor efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram-positivas cuando se emplean films con aceites esenciales, puesto que hay otros factores determinantes como la cantidad de aceite esencial incorporado, diferencias composicionales del aceite y el tipo de matriz polimérica con una cinética de liberación determinada del activo.

CONCLUSIONES

Fue posible obtener films bicapa de PHBV por moldeo por compresión con aceites esenciales en la interfase entre las capas, con buena adhesión entre ellas. La incorporación de aceites esenciales en la interfase permitió obtener films activos con actividad antimicrobiana con adecuadas propiedades mecánicas, ópticas y de barrera al vapor de agua. La adición de aceites esenciales tuvo un efecto significativo sobre las propiedades

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

mecánicas, la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades ópticas de los films. Pese a que la incorporación de los agentes activos estudiados no mejoró las propiedades mecánicas de los films, se obtuvieron materiales con mejor capacidad barrera al vapor de agua y más transparentes como resultado de cambios estructurales provocados en la matriz polimérica. Los films fueron significativamente más efectivos contra *E. coli* que contra *L. innocua*, presentando ambas bacterias mayor sensibilidad frente al aceite esencial de orégano y a su respectivo compuesto mayoritario, el carvacrol. Por tanto, la incorporación de agentes antimicrobianos naturales como los aceites esenciales estudiados, y especialmente carvacrol y aceite esencial de orégano, en films bicapa de PHBV se plantea como una opción prometedora en el desarrollo de films activos biodegradables. No obstante, son necesarios estudios adicionales para conocer tanto la microestructura, así como las cinéticas de liberación de los compuestos activos en diferentes simulantes alimentarios para optimizar la dosis de compuesto activo en el film.

REFERENCIAS

- Aguirre, A.; Borneo, R.; León, A.E. 2013. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, **1**:2-9.
- Arcos-Hernández, M.V.; Laycock, B.; Donose, B.C.; Pratt, S.; Halley, P.; Al-Luaibi, S.; Werker, A.; Lant, P.A. 2013. Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV). *European Polymer Journal*, **49(4)**:904-913.
- Arrieta, M.P.; Peltzer, M.A.; Garrigós, M.C.; 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, 1995. Standard test method for water vapour transmission of materials. In Standards Designations: E96-95. Annual Book of American Standard Testing Methods. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 406-413.
- ASTM, 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In: Standard D882. Annual Book of American Standard Testing Methods. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 162-170.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46(2)**:446-475.
- Ben Arfa, A.; Preziosi-Belloy, L.; Chaliar, P.; Gontard, N. 2007. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(6)**:2155-2162.
- Benavides, S.; Villalobos-Carvajal, R.; Reyes, J.E. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, **110(2)**:232-239.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94(3)**:223-253.
- Calo, J.R.; Crandall, P.G.; O'Bryan, C.A.; Ricke, S.C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems-A review. *Food Control*, **54**:111-119.
- Catoni, S.E.; Trindade, K.N.; Gomes, C.A.; Schneider, A.L.; Pezzin, A.; Soldi, V. 2013. Influence of Poly(Ethylene Glycol) – (PEG) on the Properties of Influence of Poly(3-Hydroxybutyrate-CO-3-Hydroxyvalerate) –PHBV. *Polímeros*, **23(3)**:320-325.
- CIE. 1986. Colorimetrie, second ed. Publication CIE 15.2. Comission Intenationale L'Eclairage, Viena.
- Corre, Y.M.; Bruzaud, S.; Audic, J.L.; Grohens, Y. 2012. Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polymer Testing*, **31(2)**:226-235.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

- Debiagi, F.; Kobayashi, R.K.; Nakazato, G.; Panagio, L.A.; Mali, S. 2014. Biodegradable active packaging based on cassava bagasse, polyvinyl alcohol and essential oils. *Industrial Crops and Products*, **52**:664-670.
- Devi, K.P.; Nisha, S.A.; Sakthivel, R.; Pandian, S.K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, **130**(1):107-115.
- Fabra, M.J.; Sánchez, G.; López-Rubio, A.; Lagaron, J.M. 2014. Microbiological and ageing performance of polyhydroxyalkanoate-based multilayer structures of interest in food packaging. *LWT-Food Science and Technology*, **59**(2):760-767.
- Falguera, V.; Quintero, J.P.; Jiménez, A.; Muñoz, J.A.; Ibarz, A. 2011. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, **22**(6):292-303.
- Filgueiras, C.T.; Vanetti, M.C.D. 2006. Effect of eugenol on growth and listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **49**(3):405-409.
- Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, **124**(1):91-97.
- Hosseini, S.F.; Rezaei, M.; Zandi, M.; Farahmandghavi, F. 2015. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, **67**:403-413.
- Hutchings, J.B. Food colour and appearance. Aspen Publishers, Maryland (1999).
- Jiménez, A.; Sánchez-González, L.; Desobry, S.; Chiralt, A.; Tehrani, E.A. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, **35**:159-169.
- Jost, V.; Langowski, H.C. 2015. Effect of different plasticisers on the mechanical and barrier properties of extruded PHBV cast films. *European Polymer Journal*, **68**:302-312.
- Keshavarz, T.; Roy, I. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, **13**(3):321-326.
- Laycock, B.; Arcos-Hernandez, M.V.; Langford, A.; Pratt, S.; Werker, A.; Halley, P.J.; Lant, P.A. 2014. Crystallisation and fractionation of selected polyhydroxyalkanoates produced from mixed cultures. *New Biotechnology*, **31**(4):345-356.
- Laycock, B.; Halley, P.; Pratt, S.; Werker, A.; Lant, P. 2014. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, **39**(2):397-442.
- López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(21):8814-8824.
- Martucci, J.F.; Gende, L.B.; Neira, L.M.; Ruseckaite, R.A. 2015. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, **71**:205-213.
- Modi, S.; Koelling, K.; Vodovotz, Y. 2011. Assessment of PHB with varying hydroxyvalerate content for potential packaging applications. *European Polymer Journal*, **47**(2):179-186.
- Muppalla, S.R.; Kanatt, S.R.; Chawla, S.P.; Sharma, A. 2014. Carboxymethyl cellulose-polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, **2**(2):51-58.
- Muriel-Galet, V.; Cran, M.J.; Bigger, S.W.; Hernández-Muñoz, P.; Gavara, R. 2015. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, **149**:9-16.
- 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.
- Ray, S.S.; Bousmina, M. 2005. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science*, **50**(8):962-1079.
- Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Kalia, V. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, **87**(2):137-146.

¹ Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
Universitat Politècnica de València

- Rojas-Graü, M.A.; Avena-Bustillos, R.J.; Olsen, C.; Friedman, M.; Henika, P.R.; Martín-Belloso, O.; Pan, Z.; McHugh, T.H. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, **81(3)**:634-641.
- Sánchez-González, L.; Cháfer, M.; Hernández, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. 2011. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, **22(8)**:1302-1310.
- Shah, A.A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, **26(3)**:246-265.
- Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, **25(10)**:1503–1555.
- Teixeira, B.; Marques, A.; Pires, C.; Ramos, C.; Batista, I.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. 2014. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and organum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT-Food Science and Technology*, **59(1)**:533-539.
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. 2011. Water interactions and microstructure of chitosan-methylcellulose composite films as affected by ionic concentration. *LWT-Food Science and Technology*, **44(10)**:2290-2295.
- Woranuch, S.; Yoksan, R. 2013. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: II. Application in bio-based plastics for active packaging. *Carbohydrate Polymers*, **96(2)**:586-592.