

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***PROPIEDADES FUNCIONALES Y ANTIMICROBIANAS DE FILMS BICAPA ALMIDÓN-POLIÉSTERES CON CARVACROL***

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

ALUMNO/A: **Santiago Martín Bascuas Véntola**

TUTOR/A ACADEMICO: **Amparo Chiralt Boix**

COTUTOR/A: **María Vargas Colás**

DIRECTOR EXPERIMENTAL: **Raquel Requena Peris**

*Curso Académico: 2015-2016*

**VALENCIA, JULIO 2016**

# PROPIEDADES FUNCIONALES Y ANTIMICROBIANAS DE FILMS BICAPA ALMIDÓN-POLIÉSTERES CON CARVACROL

Santiago Martín Bascuas Véntola, Raquel Requena Peris, María Vargas Colás, Amparo Chiralt Boix<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se han obtenido films bicapa activos de alta barrera, con almidón y poliésteres biodegradables mediante incorporación de carvacrol en la interfase. Se elaboraron por moldeo por compresión films a base de ácido poliláctico (PLA) y polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) en proporciones 75:25 y 65:35, con y sin la adición de un 15 % de polietilenglicol 1000 Da (PEG1000), como plastificante. La formulación con PLA:PHBV 75:25 y 15 % de PEG, fue la más adecuada para la obtención de los films bicapa, en combinación con una capa de almidón de yuca (AY). Los films bicapa presentaron buena resistencia mecánica y una mayor capacidad barrera al vapor de agua que la obtenida para los films de AY. La incorporación de carvacrol en las bicapas supuso un aumento significativo de la permeabilidad al vapor de agua, así como de la extensibilidad de los films, con respecto al bicapa sin carvacrol. El comportamiento térmico de los materiales, mostró una miscibilidad parcial entre los poliésteres, reflejada, sobre todo, en el descenso de la temperatura de transición vítrea del PLA en presencia de PHBV. La cuantificación del carvacrol presente en los films bicapa, antes y después del contacto con el medio de cultivo, reveló una concentración muy baja de activo, por pérdidas durante el termoformado, así como una muy escasa liberación al medio, sin alcanzarse la concentración mínima inhibitoria del activo frente a *Listeria innocua* y *Escherichia coli*.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido poliláctico, polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato, almidón, moldeado por compresión, carvacrol, propiedades físicas, propiedades térmicas.

## RESUM

S'han obtingut films bicapa actius d'alta barrera, amb midó i polièsters biodegradables mitjançant incorporació de carvacrol en la interfase. Es van elaborar per modelat per compressió films a força d'àcid polilàctic (PLA) i polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV) en proporcions 75:25 i 65:3, amb i sense l'addició d'un 15 % de polietilenglicol 1000 Da (PEG1000), com plastificant. La formulació amb PLA:PHBV 75:25 i 15 % PEG, va resultar les més adequada per a l'obtenció dels films bicapa, combinada amb una capa de midó de tapioca (AY). Els films bicapa van presentar bona resistència mecànica i una major capacitat barrera al vapor d'aigua que l'obtinguda per als films d'AY. La incorporació carvacrol en les bicapes va suposar un augment significatiu de la permeabilitat al vapor d'aigua, així com de l'extensibilitat dels films, pel que fa al bicapa sense carvacrol. El

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo  
Universitat Politècnica de València

comportament tèrmic dels materials, va mostrar una miscibilitat parcial entre els polièsters, reflectida, sobretot, en un canvi de la temperatura de transició vítria del PLA en presència de PHBV. La quantificació del carvacrol present en els films bicapa, abans i després del contacte amb el mitjà de cultiu, va revelar una quantitat molt baixa d'actiu en el film, per pèrdues durant el termoformat, així com una molt escàs alliberament del mateix al mitjà, sense aconseguir-se la concentració mínima inhibidora de l'actiu enfront de *Listeria innocua* i *Escherichia coli*.

**PARAULES CLAU:** Àcid polilàctic, polihidroxibutirato-co-hidroxi valerato, midó, modelat per compressió, carvacrol, propietats físiques, propietats tèrmiques.

## **ABSTRACT**

Active high-barrier bilayer films have been obtained with starch and biodegradable polyesters, which incorporated carvacrol in the interface. Films based on polylactic acid (PLA) and polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) were prepared by compression-molding in proportions 75:25 and 65:35, with and without the addition of 15 % of polyethyleneglicol 1000 (PEG1000), as plasticizer. The formulation PLA:PHBV 75:25 and 15 % PEG was chosen to prepare the PLA:PHBV:cassava starch bilayer. These bilayer films showed good mechanical resistance and better water barrier properties than pure cassava starch films. The incorporation of carvacrol in the bilayer was a significant increase in the water vapour permeability, as well as a significant increase in the stretchability of the bilayer active films, as compared with the bilayers without carvacrol. The thermal behavior of the materials, showed a partial miscibility between polyesters, which was reflected in the change of the temperature of glass transition of PLA due to the presence of PHBV. The quantification of the amount of the carvacrol in the bilayer films, before and after the contact with the culture medium, revealed both the presence of a very low amount of carvacrol in the film, due to losses during thermoprocessing, and a low release of carvacrol, without reaching the minimum inhibitory concentration of active against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*.

**KEY WORDS:** Polylactic acid, polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate, starch, compression molding, carvacrol, physical properties, thermal properties.

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda por parte de los consumidores de materiales de envase biodegradable obtenidos a partir de fuentes renovables, junto con las nuevas normativas medioambientales, ha supuesto un punto de inflexión en la búsqueda de alternativas biodegradables para el envasado de alimentos. Con más de 40 millones de residuos plásticos generados anualmente en la Unión Europea (Klingbeil, 2000), el ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxicanoatos (PHAs) se han convertido en alternativas respetuosas con el medio ambiente muy prometedoras (Avérous, 2004; Corre et al., 2012).

El PLA es actualmente el biopolímero más utilizado en la industria del envasado de alimentos puesto que presenta propiedades similares a las de polímeros termoplásticos tradicionales (Auras et al., 2004), las cuales dependen de la estereoquímica de la cadena, el peso molecular y el porcentaje de cristalinidad (Nascimento et al., 2010). La producción de este biopolímero se lleva a cabo mediante polimerización del ácido láctico por fermentación o síntesis química a partir de residuos orgánicos ricos en almidón (Jamshidian et al., 2010). No obstante, si se compara con los polímeros convencionales, la aplicación de PLA en films flexibles se ha visto restringida dada su escasa flexibilidad y pobres propiedades barrera, comparadas con las de otros biopolímeros como el PHBV (Delpouve et al., 2012; Marais et al., 2012).

Por su parte, los PHAs son una familia de poliésteres de origen microbiano completamente biodegradables, los cuales pueden ser sintetizados a partir de fuentes renovables tales como sacarosa, almidón, celulosa etc., tanto por bacterias Gram-positivas como por bacterias Gram-negativas (Reddy et al., 2003). De entre todos ellos, el poli-(3-hidroxi-butarato) (PHB) ha sido el más estudiado dada la similitud de sus propiedades físicas con la de algunos polímeros termoplásticos sintéticos como el polipropileno (Siracusa et al., 2008). No obstante, debido a la inestabilidad térmica y su alto grado de cristalinidad, los materiales resultantes son rígidos y quebradizos (Sudesh et al., 2000). En este sentido, el desarrollo de copolímeros como el polihidroxi-butarato-co-valerato (PHBV) ha permitido obtener materiales con un amplio rango de propiedades dado que a medida que se incrementa el porcentaje de HV se obtienen materiales más extensibles (Laycock et al., 2014).

Numerosos trabajos de investigación se han centrado en la modificación de estos biopolímeros con el objetivo de ampliar su rango de aplicación. Así, el PLA se ha mezclado con otros polímeros y/o plastificantes (Arrieta, et al., 2013; Arrieta et al., 2014; Jost y Kopitzky, 2015; Armentano et al., 2015), puesto que los plastificantes actúan incrementando la flexibilidad y la capacidad de procesamiento de polímeros a través de la reducción de su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Esto se debe a que disminuyen las fuerzas intermoleculares entre cadenas, aumentando la movilidad de la red polimérica (Vieira et al., 2011). Jost y Kopitzky (2015) reportan que la

adición de un 25 % de PHBV al PLA da lugar a films PLA-PHBV con una permeabilidad al vapor al agua un 46 % menor y una permeabilidad al oxígeno un 40 % menor, respecto a films de PLA puro. De la misma forma, Arrieta et al., (2014) y Armentano et al., (2015) resaltan el efecto positivo de la adición de PHB sobre las propiedades barrera de los films mezcla resultantes. Adicionalmente, la incorporación de PHB incrementó la cristalinidad del PLA y mejoró la interacción interfacial entre el PLA y los plastificantes (Arrieta et al., 2014). En cuanto al efecto de los plastificantes, se obtiene también una mejora de la flexibilidad, tanto de los films de PHB y PLA puros, como de los films mezcla, al adicionar acetil tributil citrato, limoneno, PEG 300 y oligómero del ácido láctico (Arrieta et al., 2013; Arrieta et al., 2014; Armentano et al., 2015).

Otra estrategia reciente que permite mejorar las propiedades barrera de este tipo de films es el desarrollo de estructuras multicapa donde se combinan materiales con diferentes propiedades en una misma lámina (Martucci y Ruseckaite, 2010). Así, films de PLA o bien PLA-PHBV se podrían combinar con films a base de almidón, que es un material económico, obtenido de fuentes renovables, biodegradable y que además ofrece muy buenas propiedades barrera al oxígeno (Forssell et al., 2002; Dole et al., 2004). De esta forma, el carácter higroscópico y las pobres propiedades mecánicas de los films de almidón podrían mejorarse al combinarse con una mezcla de materiales PLA-PHBV que ofrecen alta resistencia mecánica y buena resistencia al transporte del agua.

Por otra parte, surge la necesidad de compensar el sobrecoste que supone la incorporación de materiales biodegradables en el sector de envases de alimentos, si se comparan con los plásticos sintéticos tradicionales. En este sentido, la incorporación de aditivos con actividad antimicrobiana y/o antioxidante se plantea como una opción prometedora para incrementar la vida útil de alimentos envasados. De entre todas las sustancias con propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales (AE), y algunos de sus compuestos mayoritarios, han sido muy estudiados por su capacidad para proteger los alimentos contra los microorganismos patógenos (Burt, 2004; Friedman et al., 2004; Fratianni et al., 2010). Los AE son sustancias líquidas aceitosas, aromáticas y volátiles, clasificadas como seguras (GRAS) por la FDA (Burt, 2004).

Entre los AE más eficaces en el control del crecimiento microbiano se encuentra el aceite esencial de orégano, el cual ha demostrado ser efectivo contra bacterias tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Listeria innocua* (Hammer et al., 1999; Emiroğlu et al., 2010; Calo et al., 2015), así como especies de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Daferera et al., 2000; Kocic-Tanackov et al., 2012). El carvacrol, componente principal del aceite de orégano, ha demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a microorganismos causantes del deterioro alimentario como *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, debido a su naturaleza fenólica y a su carácter lipofílico (Burt, 2004; Rojas-Graü et al., 2007; López-Mata et al. 2013).

El objetivo de este trabajo fue por una parte, optimizar la formulación de films mezcla PLA-PHB, utilizando PEG como plastificante, en base a sus propiedades funcionales como material de envase. Por otra parte, se planteó obtener films bicapa activos de alta barrera a base de PLA-PHBV y almidón de yuca, incorporando carvacrol pulverizado en la interfase. Los films bicapa se caracterizaron en sus propiedades funcionales y antimicrobianas en ensayos in vitro frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

El almidón de yuca fue suministrado por Roquette (Roquette Laisa España, Benifaió, España). El polihidroxibutirato-co-valerato 8% (PHBV) fue suministrado en forma de pellet por NaturePlast (Caen, Francia) y el PLA amorfo 4060D por Natureworks (Natureworks, USA). Los plastificantes polietilenglicol 1000 Da y 4000 Da (PEG 1000 y PEG 4000, respectivamente) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania), mientras que el glicerol se obtuvo de Panreac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona, España). Por último, el carvacrol fue suministrado por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania).

### **Preparación de los films**

#### **PREPARACIÓN DE LOS FILMS ALMIDÓN**

Se prepararon films de almidón de yuca utilizando la siguientes proporciones de almidón:agua:glicerol:PEG 4000: 100:55:30:0.5. Para la obtención de pellets de almidón, se llevó a cabo la gelatinización de este mediante un mezclador de rodillos (Two-Roll Mill, Labtech Engineering, Thailand) a una velocidad de 12 rpm durante 15 minutos a 160 °C. Los pellets resultantes se equilibraron durante una semana a 25 °C a una humedad relativa (HR) de 53 %. Tras el equilibrado de los pellets, estos se sometieron a moldeado por compresión en una prensa de platos calientes (Labtech Engineering, Thailand). Para ello, 4 gramos de pellet se precalentaron durante 2 minutos a 160 °C. Seguidamente, se aplicó una presión de 50 bar durante los 2 primeros minutos y 120 bar durante los 6 minutos siguientes. Por último, se llevó a cabo un enfriamiento de los films durante 3 minutos hasta una temperatura de 60 °C aproximadamente.

#### **PREPARACIÓN DE LOS FILMS PLA-PHBV-PEG**

En base a estudios previos, se probaron mezclas de PLA con dos proporciones diferentes de PHBV, 25 % y 35 % respecto al PLA (Jost y Kopitzky, 2015). A su vez, se incorporó el PEG 1000, como plastificante, en una proporción constante (15 % respecto a la mezcla total), tanto en los films de polímeros puros como en las mezclas.

Para la obtención de cada uno de los films, se mezclaron los componentes mediante un mezclador de rodillos (Labtech Engineering, Thailand). Las condiciones del proceso fueron 200 °C durante 10 minutos a una velocidad de 12 rpm, salvo para la obtención de pellets de PHBV puro que se utilizaron las mismas condiciones pero a una temperatura de 180 °C.

Seguidamente, los pellets (2,5 g) se sometieron a moldeado por compresión en una prensa de platos calientes (Labtech Engineering, Thailand) en un proceso en tres etapas. Una primera etapa de precalentamiento a 200 °C durante 5 minutos, una segunda etapa de compresión a 200 °C y 100 bar durante 4 minutos y una tercera etapa de enfriamiento durante 3 minutos. Del mismo modo, los films de PHBV puro se obtuvieron variando la temperatura a 180 °C.

## INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN ESTRUCTURAS BICAPA

En base a las propiedades obtenidas para los films mezcla PLA-PHBV, se seleccionó la formulación PLA-25PHBV-15PEG como la más adecuada para formar estructuras bicapa con el almidón de yuca a fin de obtener films activos con carvacrol. Para ello, se aplicó el carvacrol mediante pulverización sobre una de las monocapas, en una proporción de 9,23 g carvacrol/100 g polímero en la bicapa (3,4 mg/cm<sup>2</sup>). Así, ambas monocapas, con o sin carvacrol en la interfase, se sometieron nuevamente a una etapa de prensado en la prensa de platos calientes (Labtech Engineering, Thailand) a 160 °C y 70 bares durante 2 minutos. De este modo, se obtuvieron dos tipos de bicapas; bicapa sin carvacrol (AY/PLA-25PHBV-15PEG) y bicapa con carvacrol (AY/CA/PLA-25PHBV-15PEG).

### **Caracterización de los films**

#### ESPESOR DE LOS FILMS

El espesor de los films utilizado en las diferentes determinaciones se midió en seis posiciones aleatorias empleando un micrómetro digital Palmer.

#### PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se evaluaron empleando el método ASTM estándar D882 (ASTM, 2001), utilizando una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Reino Unido). Para cada formulación, se cortaron 8 muestras independientes de forma rectangular (25 mm por 100 mm), se posicionaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro Systems, Haslemere, Reino Unido) con una separación inicial de 50 mm y se sometieron a extensión a una velocidad de 10 mm min<sup>-1</sup>. Previamente a su caracterización mecánica, los films fueron acondicionados a 25 °C y 53 % HR durante una semana.

Las curvas fuerza-distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión ( $\sigma$ )-deformación de Henky ( $\epsilon_H$ ) que permitieron obtener los parámetros módulo de elasticidad (ME), tensión a la fractura (TF) y porcentaje de deformación en el momento de la rotura (% E).

## PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó por cuadruplicado para cada film, de acuerdo al método gravimétrico ASTM E-96-95 (ASTM, 1995). El montaje experimental se llevó a cabo en copas de permeabilidad Payne (3,5 cm diámetro, Elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica) con cinco mililitros de agua destilada a fin de obtener una HR del 100 % en uno de los lados del film. Seguidamente, 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. Cada una de las copas se pesó periódicamente durante tres días. Los valores de PVA se calcularon a partir de las pendientes de las rectas de pérdida de peso en función del tiempo (una vez alcanzado el estado estacionario), obtenidas mediante regresión lineal (Vargas et al., 2011). Todas las medidas de PVA se llevaron a cabo en films acondicionados a 25 °C y 53 % HR durante una semana.

## CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Los diferentes films se analizaron térmicamente mediante DSC usando un calorímetro de barrido diferencial (Stare System, Mettler-Toledo, Inc., Switzerland). Las muestras (~7 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio y, aplicando una corriente de nitrógeno (20 ml min<sup>-1</sup>), se sometieron a dos barridos de calentamiento: una primera etapa de calentamiento de -30 °C a 180 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>, seguida de una etapa de enfriamiento hasta -30 °C y subsiguiente calentamiento hasta 180 °C, a la misma velocidad. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

## ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

La estabilidad térmica de films monocapa y bicapa se evaluaron mediante un analizador termogravimétrico (Stare System, Mettler-Toledo, Inc., Switzerland). Así, se determinó la pérdida de peso en función del tiempo en un intervalo de temperaturas desde 25 a 600 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>, bajo una corriente de nitrógeno de 20 mL min<sup>-1</sup>.

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Cultivos stock de *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101) suministrados por la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT, Burjassot, España) suplementados con glicerol al 30 % (Panreac, Barcelona,



España), se mantuvieron en Tryptone Soy Broth (TSB, Scharlab, Barcelona, España) en congelación a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La regeneración de las bacterias se llevó a cabo transfiriendo una alícuota a 10 ml de TSB e incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. De este cultivo se tomó nuevamente una alícuota de 10  $\mu\text{l}$ , se transfirió a 10 ml de TSB y se incubó nuevamente a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas a fin de obtener un cultivo de trabajo en fase de crecimiento exponencial. A partir del cultivo de trabajo, se inocularon placas Petri de 55 mm de diámetro con 10 g de Tryptone Soy Agar (TSA, Scharlab, Barcelona, España) a fin de obtener inóculos de aproximadamente  $10^4$  UFC/g. Círculos de 55 mm de diámetro obtenidos de los films bicapas, con y sin carvacrol, se coloraron sobre las placas previamente inoculadas y se mantuvieron en refrigeración a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 días. Los recuentos microbianos se realizaron a día 0 y transcurridos 2, 6 y 12 días. Para ello, cada una de las muestras se diluyó en 90 mL de agua de peptona y se homogeneizó durante 3 minutos en el stomacher (IUL, España). A partir de esta primera dilución, se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras y se transfirió 1 ml de cada una de estas a placas Petri, donde se vertieron seguidamente, 15 ml de TSA. Las placas así inoculadas se incubaron durante 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a fin de poder contar las UFC. Todos los test se realizaron por duplicado. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la cara del film (almidón o poliésteres) en contacto con el medio. Para ello, unos ensayos se realizaron poniendo la monocapa de almidón en contacto con la placa de agar (CA-1) mientras que en otros se puso la monocapa de PLA-25PHBV-15PEG en contacto con el agar (CA-2).

## CUANTIFICACIÓN DE CARVACROL

Se evaluó la distribución del carvacrol a lo largo del film bicapa recién preparado y tras 7 días de equilibrado a 53 % HR. Para ello, se obtuvieron círculos de 3 cm de radio y las correspondientes coronas de 3 a 5 cm, de 5 a 7 cm y de 7 a 7,5 cm. De cada una de las zonas se obtuvieron muestras de 0,2 g aproximadamente, las cuales se deshidrataron durante 24 horas en  $\text{P}_2\text{O}_5$  (0 % HR). Pasado este tiempo, las muestras se sometieron a extracción en 10 mL de metanol durante 72 horas. Adicionalmente, se cuantificó el carvacrol retenido en los films CA-1 y CA-2 tras 6 días de contacto con agar para cuantificar su liberación al medio de cultivo. Para ello, las muestras (~0.4 g) se secaron durante 48 horas en  $\text{P}_2\text{O}_5$  y se sometieron al mismo proceso de extracción en 20 mL de metanol.

Una vez realizadas las extracciones, las muestras se filtraron y se diluyeron adecuadamente a fin de determinar su absorbancia a 275 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 200). Así, a partir de la recta de calibrado se correlacionaron los valores de absorbancia con las concentración de carvacrol en el film (g CA/100g film) en cada uno de los casos. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurion XVI (Manugistics Corp., Rockville, MD). Para ello, se asumieron diferencias significativas con un nivel de confianza superior al 95 %.

## RESULTADOS

### Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas (módulo de elasticidad (ME), tensión a la fractura (TF) y porcentaje de elongación en el momento de rotura (% E)) determinadas para las distintas formulaciones monocapa PLA-PHBV-PEG y sus correspondientes monocapas puras, tras 1 semana de equilibrado a 25 °C y 53 % HR, aparecen recogidas en la Tabla 1. Los resultados evidenciaron la elevada resistencia y escasa flexibilidad del PLA amorfo y PHBV puro, puesto que presentaron un ME de 1667 MPa y 1755 MPa, una TF de 49 MPa y 33 MPa y un % E de 3.23 y 6, respectivamente, lo que concuerda con los valores previamente reportados para estos polímeros (Chen et al., 2002; Courgneau et al., 2012). La adición de un 15 % PEG afectó significativamente a las propiedades mecánicas evaluadas tanto en películas de PLA amorfo como PHBV puro, siendo más significativo el efecto plastificante sobre las películas de PLA. Tal y como reporta Sheth et al., (1997), la adición de PEG a films de PLA mejoró la flexibilidad, con la consecuente disminución de ME y TF, lo cual es proporcional al % de PEG, como consecuencia de la disminución de la  $T_g$  y el aumento de la movilidad de las cadenas.

Por otro lado, la adición de PHBV (25 y 35 %) a films PLA, redujo significativamente la resistencia mecánica del mismo pero no modificó significativamente la extensibilidad del material, dado que la adición de PHBV da lugar a discontinuidades en la matriz de PHBV que debilitan la matriz, potenciando su fractura (Gérard et al., 2014). En cuanto a la adición de PHBV sobre la matriz de PLA plastificado, se observó un descenso significativo de la resistencia del material así como de su capacidad de elongación. No obstante, la adición de un mayor porcentaje de PHBV (35 %) hizo más acusado este efecto, resultando en un material muy quebradizo, mientras que la formulación PLA-25PHBV15PEG mostró globalmente propiedades mecánicas aceptables. Por tanto, esta fue la formulación monocapa seleccionada en la obtención de bicapas con almidón.

**TABLA 1.** Propiedades mecánicas de las monocapa PLA-PHBV-PEG y sus correspondientes monocapas puras. Media  $\pm$  desviación estándar.

Formulación	ME (MPa)	TF (MPa)	% E	Espesor (mm)
PLA	1667 $\pm$ 65 <sup>a</sup>	49 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	3,23 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	124 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
PHBV	1755 $\pm$ 52 <sup>b</sup>	33 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	131 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
PLA-15PEG	566 $\pm$ 85 <sup>c</sup>	17,1 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	57 $\pm$ 6 <sup>c</sup>	107 $\pm$ 4 <sup>c</sup>
PHBV-15PEG	1303 $\pm$ 35 <sup>d</sup>	28 $\pm$ 2 <sup>d</sup>	3,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 7 <sup>c</sup>
PLA-25PHBV	1472 $\pm$ 29 <sup>e</sup>	31 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	126 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
PLA-35PHBV	1486 $\pm$ 43 <sup>e</sup>	32,2 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	2,17 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	120 $\pm$ 5 <sup>d</sup>
PLA-25PHBV15PEG	460 $\pm$ 41 <sup>f</sup>	8,6 $\pm$ 0,9 <sup>e</sup>	7 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	116 $\pm$ 9 <sup>e</sup>
PLA-35PHBV15PEG	514 $\pm$ 41 <sup>cf</sup>	4,1 $\pm$ 0,9 <sup>f</sup>	0,8 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	124 $\pm$ 8 <sup>a</sup>

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

Las propiedades mecánicas tanto de las películas almidón de yuca (AY), como de los bicapa con y sin carvacrol en la interfase (AY/PLA-25PHBV15PEG y AY/CA/PLA-25PHBV15PEG, respectivamente) se muestran en la Tabla 2.

El almidón de yuca formó películas poco resistentes pero muy extensibles. La combinación de AY con PLA-25PHBV15PEG en forma de films bicapa, permitió obtener films más resistentes, con valores de ME y TS intermedios a los de ambas monocapas, pero con menor % E que ambas. No obstante, la adición de carvacrol incrementó significativamente la extensibilidad de los films por encima de los valores obtenidos para el bicapa sin carvacrol y el correspondiente monocapa PLA-25PHBV15PEG, aunque con menor rigidez (menor ME). Esta mejora en la extensibilidad de los films con carvacrol podría deberse a la reducción de las fuerzas intermoleculares de las cadenas del polímero, aportándoles así una mayor movilidad. Estudios previos también atribuyeron un efecto plastificante al carvacrol, en films de alginato-puré de manzana, *Gelidium corneum* y polipropileno (Rojas-Graü et al., 2007; Lim et al., 2010; Ramos et al., 2012).

**TABLA 2.** Propiedades mecánicas de las monocapas (almidón de yuca (AY) y PLA-25PHBV15PEG) y los correspondiente films bicapa con y sin carvacrol. Media  $\pm$  desviación estándar.

Formulación	ME (MPa)	TF (MPa)	E (%)	Espesor (mm)
AY	51 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	155 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
PLA-25PHBV15PEG	460 $\pm$ 41 <sup>b</sup>	8,6 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	7 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	116 $\pm$ 9 <sup>b</sup>
AY/PLA-25PHBV15PEG	293 $\pm$ 43 <sup>c</sup>	5,0 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	3 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	174 $\pm$ 10 <sup>c</sup>
AY/CA/PLA-25PHBV15PEG	182 $\pm$ 36 <sup>d</sup>	5,2 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	25 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	161 $\pm$ 12 <sup>d</sup>

a-d: 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 PLA-PHBV-PEG y sus correspondientes monocapas puras, tras 1 semana de equilibrado a 25 °C y 53 % HR se

representan en la Tabla 3. Tal y como reportan Shogren, (1997) y Jost y Kopitzky (2015), los films de PLA puro presentaron un valor de PVA significativamente más alto que los films de PHBV puro. La adición de un 15 % de PEG disminuyó la capacidad barrera al vapor de agua, tanto en films de PLA como en films de PHBV, como consecuencia de la reorganización de la red polimérica, incrementando el volumen libre de la matriz y en consecuencia la PVA (Byun et al., 2010).

Mientras que la incorporación de un 25 % de PHBV sobre matrices de PLA puras redujo el valor de PVA ligeramente, la adición de un 35 % la redujo aproximadamente un 50 %, puesto que a medida que aumenta el contenido de PHBV en la mezcla aumenta la capacidad barrera al vapor de agua, tal y como reporta Jost y Kopitzky, (2015). Del mismo modo que para las películas puras, la adición de PEG en las mezclas PLA-PHBV incrementó significativamente la PVA de las películas. A diferencia de lo que cabría esperar, la formulación plastificada con mayor contenido de PHBV presentó mayor permeabilidad al vapor de agua que la respectiva formulación con menor contenido de PHBV, probablemente debido a la diferente reorganización estructural de los polímeros.

**TABLA 3.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las monocapa PLA-PHBV-PEG y sus correspondientes monocapas puras. Media  $\pm$  desviación estándar.

Formulación	PVA·10 <sup>12</sup> (g/m.s.Pa)
PLA	3,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
PHBV	1,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
PLA-15PEG	5,4 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>
PHBV-15PEG	3,6 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
PLA-25PHBV	3,1 $\pm$ 0,1 <sup>ad</sup>
PLA-35PHBV	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>bd</sup>
PLA-25PHBV15PEG	4,2 $\pm$ 0,3 <sup>ac</sup>
PLA-35PHBV15PEG	9,0 $\pm$ 2,0 <sup>e</sup>

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

Dada la naturaleza hidrofílica de la matriz polimérica y el alto contenido en glicerol, la PVA de los films de AY fue aproximadamente 100 veces mayor que la obtenida para los poliésteres PLA, PHBV (Chinnan y Park, 1995). En este sentido, la formación de estructuras bicapa AY/PLA-25PHBV15PEG, permitió disminuir en torno a 20 veces la PVA de la correspondiente monocapa de almidón de yuca. Adicionalmente, la incorporación de carvacrol en la formulación de dichos films bicapa dio lugar a un aumento significativo de la PVA con respecto a la formulación control sin carvacrol, AY/PLA-25PHBV15PEG (Tabla 4). Al tratarse de una sustancia hidrofóbica, cabría esperar que la incorporación de carvacrol indujera un descenso de la PVA, como consecuencia de una modificación del balance hidrofílico-hidrofóbico en el film, tal y como reportan Requena et al., (2016) en films de PHBV. Por el contrario, estudios como los de Rojas-Graü et al., (2007) y Du et al., (2008) no reportaron una disminución de la

PVA como consecuencia de la adición de carvacrol en los films de alginato-puré de manzana y a base de tomate, respectivamente. Estas diferencias podrían atribuirse tanto a la distinta proporción de agente activo incorporado como a las diferentes interacciones con la matriz polimérica. No obstante, un descenso de la capacidad barrera del film concuerda con lo observado en las propiedades mecánicas, donde se ha visto que el carvacrol tiene un efecto plastificante, aumentando el volumen libre de la matriz polimérica, lo que favorece el transporte de las moléculas de permeante, tal y como reporta Zinoviadouet al., (2009). No obstante, aun en presencia del activo, los valores de la PVA de los films bicapa almidón-poliéster fueron muy inferiores a los de la monocapa de almidón de yuca.

**TABLA 4.** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las monocapas (almidón de yuca (AY) y PLA-25PHBV15PEG) y los correspondiente films bicapa con y sin carvacrol (AY/PLA-25PHBV15PEG y AY/CA/PLA-25PHBV15PEG, respectivamente). Media  $\pm$  desviación estándar.

<b>Formulación</b>	<b>PVA-10<sup>12</sup> (g/m.s.Pa)</b>
AY	283,0 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>
PLA-25PHBV15PEG	4,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
AY/PLA-25PHBV15PEG	14,0 $\pm$ 2,0 <sup>c</sup>
AY/CA/PLA-25PHBV15PEG	57,0 $\pm$ 17,0 <sup>d</sup>

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

### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La Figura 1 Anexo muestra los termogramas correspondientes al primer barrido de calentamiento de los films monocapa obtenidos con PLA, PHBV y PEG en diferentes proporciones. Pueden apreciarse las diferentes transiciones de fase (transición vítrea, cristalización o fusión) de los diferentes polímeros con la historia térmica correspondiente al tratamiento de mezclado en fundido y moldeo por compresión. El PLA puro o con PEG solo exhibe  $T_g$ , con un endotermo al final de la transición, asociado a la relajación del polímero, lo cual es coherente con su carácter amorfo (según su ficha técnica). Por contra para el PHBV puro o PEG se observa la fusión de la fracción cristalina del polímero. En las mezclas PHBV-PLA se reflejan las transiciones de ambos (fusión y  $T_g$ , respectivamente), pero se observa además un exotermo de cristalización atribuible al PLA, lo que indica que la mezcla promueve la cristalización del PLA durante el calentamiento en el ensayo calorimétrico. Coherentemente, se observa un desdoblamiento del pico de fusión en las mezclas indicando la fusión de zonas cristalinas de ambos polímeros o incluso podría tratarse de zonas mixtas de cristalización con diferentes intervalos de fusión. Los valores de los diferentes parámetros correspondientes al primer barrido de calentamiento y a la etapa de enfriamiento (cristalización) se dan en la Tabla 5 para las distintas formulaciones. La adición de PEG tuvo un fuerte efecto plastificante sobre el PLA, provocando un descenso significativo (39 °C) de su  $T_g$ . En paralelo, la adición de PEG sobre el PHBV indujo un descenso tanto de las

temperaturas de fusión ( $T_f$ ) y cristalización ( $T_c$ ), como de las entalpías asociadas ( $\Delta H_f$  y  $\Delta H_c$ ), dando lugar a un material menos cristalino. No se observó la  $T_g$  de la fase amorfa del PHBV, que según diferentes autores está alrededor de  $-10^\circ\text{C}$  (Branciforti et al., 2013).

La incorporación de PHBV al PLA, tanto al 25 como al 35 %, redujo también significativamente la  $T_g$  del PLA y actuó como agente de nucleación, fomentando la cristalización del PLA durante el barrido de calentamiento (Figura 1 Anexo), tal como se ha comentado. A su vez, el PLA inhibió la cristalización del PHBV, observándose una reducción significativa de la entalpía fusión y también de la de cristalización en el barrido de enfriamiento. La adición de PEG a las mezclas PLA-PHBV tuvo diferente efecto en función del porcentaje de ambos polímeros. Así, la formulación con 25 % de PHBV mostró propiedades térmicas muy similares a la correspondiente formulación sin PEG, mientras que con 35 % hubo un mayor efecto plastificante del PLA (menor  $T_g$ ) y una mayor inhibición de la cristalización del PHBV (menor  $\Delta H_c$ ). Además no se observó cristalización del PLA inducida por la presencia del PHBV, ni el correspondiente desdoblamiento del pico de fusión. En todas las mezclas la  $T_c$  del PHBV fue inferior a la del puro, aunque el nivel de subenfriamiento fue similar en todos los casos, siendo la diferencia entre  $T_c$  y  $T_m$  de  $51,07 \pm 0,24$  °C. El comportamiento observado refleja que ambos polímeros están en dominios distintos en la mezcla (fases ricas en PLA o en PHBV), y que las interacciones entre ambos y el PEG están afectadas por su proporción relativa.

**TABLA 5.** Propiedades térmicas de los diferentes films monocapa PLA-PHBV-PEG: temperatura de fusión ( $T_f$ ), temperatura de cristalización ( $T_c$ ), temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) (J/g polímero), entalpía de cristalización ( $\Delta H_c$ ).

Formulación	$T_g$ (°C)	$\Delta C_p$ (J/gK)	$T_f$	$\Delta H_f$ (J/g)	$T_c$	$\Delta H_c$ (J/g)
PLA	$57,2 \pm 0,7^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	-	-	-	-
PLA-15PEG	$18 \pm 2^b$	$1,9 \pm 0,7^b$	-	-	-	-
PHBV	-	-	$170,6 \pm 0,4^a$	$92 \pm 2^a$	$129,6 \pm 1,2^a$	$129,6 \pm 1,2^a$
PHBV-15PEG	-	-	$166,7 \pm 0,5^b$	$68,7 \pm 0,4^b$	$124,20 \pm 0,04^b$	$124,20 \pm 0,04^b$
PLA-25PHBV	$50,75 \pm 0,01^c$	$0,36 \pm 0,02^a$	$170,835 \pm 0,106^a$ ( $163,01 \pm 0,13$ )	$21 \pm 5^c$	$119,9 \pm 0,2^c$	$119,9 \pm 0,2^{ce}$
PLA-35PHBV	$53,3 \pm 0,4^d$	$0,28 \pm 0,06^a$	$172,01 \pm 0,11^c$ ( $164,9 \pm 0,2$ )	$29,3 \pm 0,4^d$	$120,9 \pm 0,4^c$	$120,9 \pm 0,4^d$
PLA-25PHBV-15PEG	$53,67 \pm 0,12^d$	$0,35 \pm 0,01^a$	$172,06 \pm 0,11^c$ ( $165,47 \pm 0,10$ )	$23,5 \pm 0,3^c$	$121,00 \pm 0,12^c$	$121,00 \pm 0,12^e$
PLA-35PHBV-15PEG	$34,4 \pm 0,5^e$	$0,20 \pm 0,07^a$	$160,45 \pm 0,10^d$	$23,3 \pm 0,3^c$	$109,4 \pm 0,3^d$	$109,4 \pm 0,3^{cd}$

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

### Análisis termogravimétrico (TGA)

La Tabla 6 recoge la temperatura de inicio ( $T_{onset}$ ) y final ( $T_{enset}$ ) de degradación y la máxima velocidad de degradación ( $T_{peak}$ ) de las diferentes formulaciones. El PLA fue térmicamente más estable que el PHBV con  $T_{peak}$  de  $329 \pm 2$  y  $233,15 \pm 0,08$ , respectivamente, tal y como reportan Ferreira et

al., (2002) y Zhao et al., (2013). La incorporación del plastificante provocó un descenso significativo de la estabilidad térmica del PLA, mientras que no afectó significativamente al PHBV. Tal como han observado Requena et al., (2016), el PHBV con PEG, presentó una segunda etapa de degradación a temperaturas superiores (Figura 2 Anexo), lo cual no se observó para el PLA. En las mezclas se observaron dos etapas de degradación correspondientes a ambos polímeros, con algunos cambios en las temperaturas de degradación, lo cual podría indicar una cierta miscibilidad de ambos polímeros. Tal y como muestran las curvas, el PLA y el PHBV tienden a degradarse de forma individual cuando forman parte de mezclas PLA-PHBV, con  $T_{peak}$  sobre 300 °C y 225 °C, respectivamente. Además, también se observó una disminución de estabilidad térmica del PLA al adicionar tanto un 25 como un 35 % de PHBV, análogamente a lo observado por Ferreira et al., (2002) y Modi et al., (2011) en mezclas PLA-PHBV. Este efecto sobre las propiedades térmicas de las mezclas se acentuó con la incorporación de PEG. Por el contrario, la estabilidad térmica del PHBV no se vio significativamente afectada por la presencia del PLA.

Los resultados de DSC y TGA revelan una miscibilidad parcial entre el PHBV y el PLA, pero con clara separación de fases, con dominios ricos en PLA y otros ricos en PHBV y un grado de cristalinidad más reducido que el obtenido para el PHBV puro, a pesar del efecto inductor del PHBV en la cristalización del PLA. De forma similar Mofokeng et al., (2015) reportan imágenes de mezclas PLA(70)-PHBV(30), obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde el PHBV aparece claramente dispersado formando esferas en una fase continua de PLA. Análogamente, Modi et al., (2011) comenta una cierta compatibilidad entre ambos polímeros debido a la disminución de la  $T_g$  del PLA en las mezclas PLA-PHBV y a la ausencia de separación de fases observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

**TABLA 6.** Temperatura de inicio de degradación ( $T_{onset}$ ), temperatura de fin de degradación ( $T_{enset}$ ) y temperatura de degradación máxima ( $T_{peak}$ ) de las diferentes monocapas PLA-PHBV-PEG. Media  $\pm$  desviación estándar.

Formulación	$T_{onset}^1$	$T_{peak}^1$	$T_{enset}^1/T_{onset}^2$	$T_{peak}^2$	$T_{enset}^2$
PLA	-	-	$309 \pm 2^a$	$329 \pm 2^a$	$340 \pm 2^a$
PLA-15PEG	-	-	$281 \pm 4^b$	$314 \pm 3^b$	$328,9 \pm 1,2^b$
PHBV	$233,15 \pm 0,08^a$	$243,09 \pm 0,12^a$	$246,7 \pm 0,7^c$	-	-
PHBV-15PEG	$229 \pm 3^{ab}$	$241 \pm 3^a$	$249,3 \pm 0,9^c$	-	-
PLA-25PHBV	$224,6 \pm 0,9^{abc}$	$240 \pm 2^a$	$245 \pm 2^c$	$306 \pm 3^c$	$327 \pm 2^b$
PLA-35PHBV	$226 \pm 7^{abc}$	$240,5 \pm 0,7^a$	$247,6 \pm 1,4^c$	$299,97 \pm 0,05^d$	$332,67 \pm 0,02^{ab}$
PLA-25PHBV-15PEG	$219 \pm 7^{bc}$	$235 \pm 5^a$	$241 \pm 4^c$	$297,42 \pm 1,06^d$	$325 \pm 2^b$
PLA-35PHBV-15PEG	$216 \pm 3^c$	$239 \pm 4^a$	$256 \pm 2^d$	$286 \pm 8^e$	$306 \pm 9^c$

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

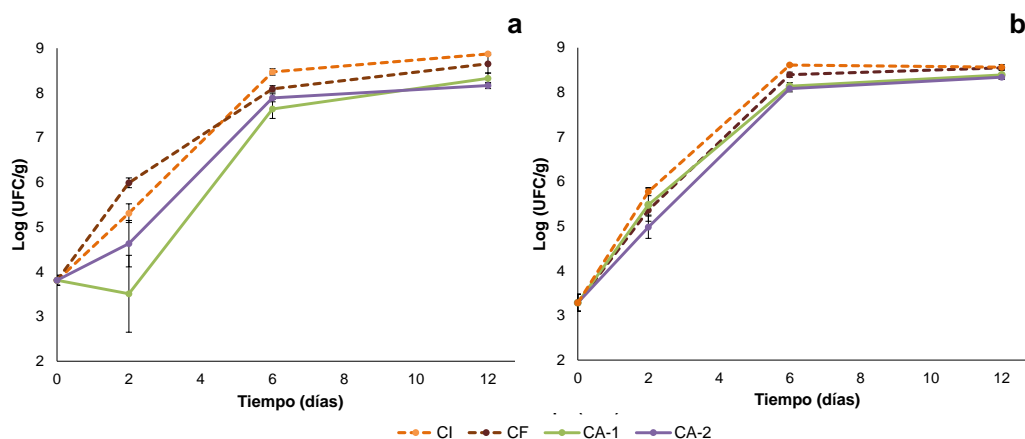
1. Temperaturas correspondientes a la degradación del PHBV.

2. Temperaturas correspondientes a la degradación del PLA.

El análisis por TGA de los films bicapa almidón poliéster (Figura 3 Anexo) reveló un comportamiento similar al monocapa de almidón de yuca, observándose una pérdida inicial de peso asociada al agua ligada al almidón y la posterior degradación del material polimérico, con una temperatura del máximo del orden de 287 °C. La mayor proporción másica de la capa de almidón (61,5 % del ensamblado) y de PLA en la capa de poliésteres (75 %), ambos con temperaturas muy próximas de degradación, llevan a un comportamiento térmico de la bicapa donde no se observa de forma notable la degradación del PHBV (8,17 % del total de la bicapa) a menor temperatura.

### Actividad antimicrobiana

Las curvas de crecimiento de *L. innocua* y *E. coli* a 10 °C durante 12 días en contacto con los films activos (CA-1 y CA-2), con los films control (CF) y sin film (CI) aparecen representadas en la Figura 4. La presencia de films bicapa con carvacrol no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de ambas bacterias. No obstante, Kurek et al., (2013), Shemesh et al., (2015) y Requena et al., (2016) reportaron una actividad antimicrobiana significativa del carvacrol frente *L. Innocua* y *E. coli*, incorporado en films de polietileno de baja densidad, quitosano y PHBV, respectivamente. La falta de actividad antimicrobiana detectada en el film bicapa podría atribuirse a una escasa liberación de carvacrol al medio, sin alcanzarse la concentración mínima inhibitoria (MIC) del activo para cada una de las bacterias. A su vez, la escasa liberación podría deberse a una fuerte retención del activo en la matriz del film o a pérdidas importantes del compuesto durante la etapa de moldeo por compresión, ya que se observó un flujo radial notable de material durante la misma. Para confirmar estos aspectos, se planteó el análisis de la concentración de carvacrol en el film en función de la distancia al centro del mismo y el análisis de la cantidad de carvacrol residual en el film después de 6 días de contacto con el medio de cultivo, tal como se describe en la siguiente sección.



**FIGURA 4.** Curvas de crecimiento de *E. coli* (a) y *L. innocua* (b) a 10 °C durante 12 días en contacto con los films activos (CA-1 y CA-2), con los films control sin activos (CF) y sin film (CI).



## Cuantificación de carvacrol

La cuantificación de la pérdida de material por flujo radial de este durante el termoprensado de la bicapa, mediante pesada de las monocapas y bicapa final arrojó un valor de  $33 \pm 3$  %. Estas pérdidas se atribuyen al flujo parcial de los polímeros durante la segunda compresión, favorecido por el efecto plastificante del carvacrol, previamente comentado. Durante este flujo, parte del carvacrol incorporado podría escapar de la bicapa, provocando pérdidas importantes del activo en el film final. Por ello, se analizó la distribución radial de carvacrol presente en el film recién prensado y tras 7 días de equilibrado a 53 % HR (Tabla 7). Así, se observó que el CA se distribuye de forma heterogénea en función del radio, siendo significativamente mayor la concentración en la zona más externa (corona de 7-7,5 cm de radio), tanto en los films recién preparados como después de 7 días de equilibrado. Estos resultados confirman la difusión radial del compuesto durante la compresión de la bicapa y la resistencia a la difusión interna del compuesto dentro de la matriz polimérica, tanto durante la compresión como después de la formación del film. De esta forma, y puesto que la corona 7-7.5 cm se descartaba tanto para las determinaciones físicas como para los ensayos microbiológicos, la concentración de carvacrol media estimada en el film fue 1,2 g CA/100 g film y además no uniformemente distribuida.

**TABLA 7.** Distribución de CA (g/100g film) en los films AY/CA/PLA-25PHBV15PEG recién preparados (D0) y tras 7 días de equilibrado al 53 % HR (D7). Media  $\pm$  desviación estándar.

Muestra (radio)	D0 (g/100 g film)	D7 (g/100 g film)
0 a 3 cm	$0,9 \pm 0,3^{a1}$	$0,7 \pm 0,2^{a1}$
3 a 5 cm	$0,9 \pm 0,1^{a1}$	$1,4 \pm 0,5^{a1}$
5 a 7 cm	$1,5 \pm 0,3^{b1}$	$1,2 \pm 0,2^{a1}$
7 a 7,5 cm	$3,4 \pm 0,4^{c1}$	$10,2 \pm 1,4^{b2}$

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

1-2: Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas para las mismas formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Por otro lado, la concentración de carvacrol presente en los films en contacto con el medio de cultivo (CA-1 y CA-2) tras 6 días en contacto a 10 °C fue  $0,8 \pm 0,2$  y  $1,3 \pm 0,4$  g CA/100 g film, no mostrando diferencias significativas entre las diferente cara de contacto). La comparación de estos valores con el valor inicial determinado, permitió estimar la cantidad de carvacrol liberada al medio de cultivo durante los 6 días de contacto, siendo esta  $9 \cdot 10^{-5}$  g/ml de medio. Esta concentración es significativamente inferior a la MIC de carvacrol reportada para *Listeria innocua* ( $3,7 \cdot 10^{-4}$  g/ml) y *Escherichia coli* ( $3,1 \cdot 10^{-4}$  g/ml) (Burt, 2004; Ye et al., 2013). En base a estos resultados, se justifica la falta de actividad antimicrobiana observada para los films bicapas estudiados. Por tanto, aunque en films bicapa de PHBV elaborados por Requena et al., (2016), la incorporación de una cantidad

equivalente de carvacrol (3,4 mg/cm<sup>2</sup>) conllevó una notable actividad antimicrobiana contra estas bacterias, las pérdidas de carvacrol durante el termoprocesado y la ineficaz liberación al medio de la cantidad residual, no permitieron observar efecto antimicrobiano para los films bicapa almidón-poliésteres. Por esta razón, y dadas las mejoras en otras propiedades funcionales de los films, sería conveniente otra forma de incorporación del activo que minimice sus pérdidas, como su incorporación directa en la formulación de la capa de poliéster por disolución en solventes, extensión y secado, puesto que la incorporación durante la etapa de mezclado en fundido supondría también grandes pérdidas del activo por evaporación.

## CONCLUSIÓN

Fue posible la obtención de films bicapa almidón-poliésteres (mezclas de PLA-PHBV con PEG) con adecuadas propiedades mecánicas y una reducción del 80 % de la permeabilidad al vapor de agua respecto a la de los films de almidón yuca. Las mezclas de poliésteres PLA-PHBV con proporciones 75:25 y 65:35 presentaron buena adhesión con la capa de almidón, pero los films con 25 % de PHBV y 15% de PEG presentaron mayor extensibilidad y resistencia a la fractura, por lo que se seleccionaron para la obtención de los films bicapa. La incorporación de carvacrol en el bicapa incrementó en gran medida la fluencia del material durante la termocompresión, en coherencia con su efecto plastificante detectado en las propiedades mecánicas (incremento de la extensibilidad del film). Esto provocó pérdidas notables del activo en el film bicapa reduciendo en un 86 % su concentración en el film, respecto a la cantidad teórica incorporada. Además, el carvacrol retenido en el bicapa no se liberó al medio de cultivo de forma efectiva en los ensayos antimicrobianos, ni desde la capa de almidón, ni desde la capa de poliésteres. Todo esto implicó que su concentración efectiva en el medio de cultivo no superara la concentración mínima inhibitoria de carvacrol para *Escherichia. coli* y *Listeria innocua*, con lo que no se observó actividad antimicrobiana contra estas dos bacterias en los ensayos *in vitro*. Por consiguiente, es necesaria la optimización del método de incorporación del activo en el film bicapa en aras a obtener una mayor concentración final en el film, así como estudios de liberación en simulantes alimentarios para conocer el reparto efectivo del activo entre el film y el sustrato alimentario, en función de la afinidad relativa del activo con ambas fases.

## REFERENCIAS

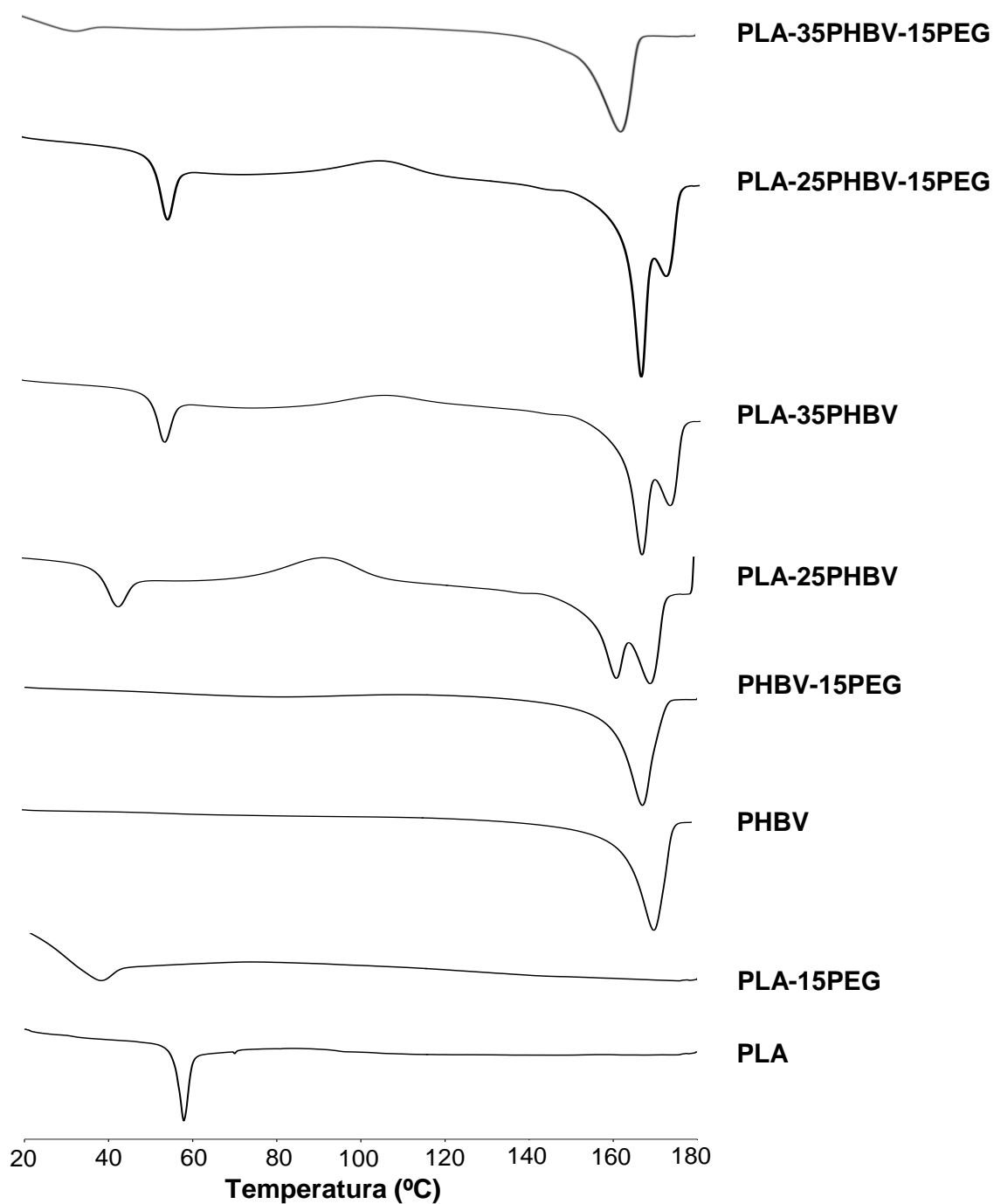
- Armentano, I.; Fortunati, E.; Burgos, N.; Dominici, F.; Luzi, F.; Fiori, S.; Jiménez, S.; Yoon, K.; Ahn, J.; Kang, S.; Kenny, J.M. 2015. Processing and characterization of plasticized PLA/PHB blends for biodegradable multiphase systems. *Polymer Letters*, **9(7)**:583–596.
- Arrieta, M.P.; López, J.; Ferrándiz, S.; Mercedes, A.P. 2013. Characterization of PLA-Limonene Blends for Food Packaging Applications. *Polymer Testing*, **32(4)**:760-768.

- Arrieta, M.P.; Samper, M.D.; López, J.; Jiménez, A. 2014. Combined effect of poly (hydroxybutyrate) and plasticizers on polylactic acid properties for film intended for food packaging. *Journal of Polymers and the Environment*, **22(4)**:460-470.
- 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.
- Auras, R.; Harte, B.; Selke, S. 2004. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*, **4(9)**:835-864.
- Avérous, L. 2004. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, **44(3)**:231-274.
- Branciforti, M.C.; Silveira Corrêa, M.C.; Pollet, E.; Marcondes Agnelli, J.A.; Nascente, P.A.; Avérous, L. 2013. Crystallinity study of nano-biocomposites based on plasticized poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with organo-modified montmorillonite. *Polymer Testing*, **32(7)**:1253-1260.
- 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  $\alpha$ -Tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, **100(2)**:239-244
- Calo, J.R.; Philip G.C.; Corliss A.O.; Steven C.R. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A Review. *Food Control*, **54**:111-119.
- Chen, G.X.; Hao, G.J.; Guo, T.Y.; Song, M.D.; Zhang, B.H. 2002. Structure and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)/clay nanocomposites. *Journal of materials science letters*, **21(20)**:1587–1589.
- Chinnan M.S.; Park, H.J. 1995. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *Journal of Food Process Engineering*, **18(4)**:417-429.
- 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**:226-235.
- Courgneau, C.; Domenek, S.; Lebossé, R.; Guinault, A.; Avérous, L.; Ducruet, V. 2012. Effect of crystallization on barrier properties of formulated polylactide. *Polymer International*, **61(2)**:180-189.
- Daferera, D.J.; Ziogas, B.N.; Polissiou, M.G. 2000. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium Digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48(6)**:2576-2581.
- Delpouve, N.; Stoclet, G.; Saiter, A.; Dargent, E.; Marais, S. 2012. Water Barrier Properties in Biaxially Drawn Poly(lactic Acid) Films. *The Journal of Physical Chemistry B*, **116(15)**:4615-4625.
- Dole, P.; Joly, C.; Espuche, E.; Alric, I.; Gontard, N. 2004. Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers*, **58**:335-343.
- Du, W.X.; Olsen, C.W.; Avena-Bustillos, R.J.; McHugh, T.H.; Levin, C.E.; Friedman, M. 2008. Antibacterial Activity against *E. Coli* O157:H7, Physical Properties, and Storage Stability of Novel Carvacrol-Containing Edible Tomato Films. *Journal of Food Science*, **73(7)**:378-383.

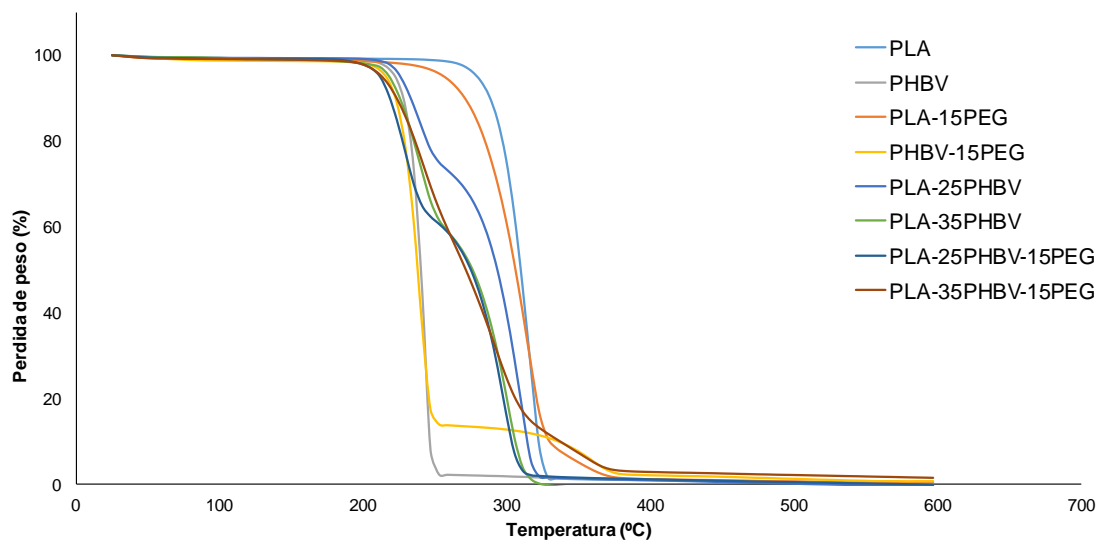
- Emiroğlu, Z.K.; Yemiş, G.P.; Coşkun, B.K.; Candoğan, K. 2010. Antimicrobial Activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, **86(2)**:283-288.
- Ferreira, B.M.P.; Zavaglia, C.A.C.; Duek, E.A.R. 2002. Films of PLLA/PHBV: Thermal, Morphological, and Mechanical Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, **86(11)**:2898-2906.
- Forsell, P.; Lahtinen, R.; Lahelin, M.; Myllärinen P.; 2002. Oxygen permeability of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate polymers*, **47**:125-129
- Fратиани, F.; De Martino, L.; Melone, A.; De Feo, V.; Coppola, R.; Nazzaro, F. 2010. Preservation of Chicken Breast Meat Treated with Thyme and Balm Essential Oils. *Journal of Food Science*, **75(8)**:528-535.
- Friedman, M.; Henika, P.R.; Levin, C.E.; Mandrell, R.E. 2004. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Enterica in Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(19)**:6042-6048.
- Gérard, T.; Budtova, T.; Podshivalov, A.; Bronnikov, S. 2014. Polylactide/poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends: Morphology and mechanical properties. *Polymer Letters*, **8(8)**:609–617.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86(6)**:985-990
- Jamshidian M.; Tehrany E.A.; Imran M.; Jacquot M.; Desobry S. 2010. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **9(5)**:552-571.
- Jost, V.; Kopitzky, R. 2015. Blending of Polyhydroxybutyrate-co-valerate with Polylactic Acid for Packaging Applications – Reflections on Miscibility and Effects on the Mechanical and Barrier Properties. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **29(2)**:221–246.
- Klingbeil M., 2000. Working document of biodegradable waste management Brussels: European Commission. Dirección URL: <[http://cordis.europa.eu/news/rcn/125140\\_en.html](http://cordis.europa.eu/news/rcn/125140_en.html)>. [Consulta: 25 de Mayo 2016].
- Kocic-Tanackov, S.D.; Dimic, G.R.; Tanackov, I.; Pejin, D.J.; Mojovic, V.M.; Pejin, J.D. 2012. Antifungal activity of oregano (*Origanum Vulgare L.*) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. *Hemijaska Industrija*, **66(1)**:33-41.
- Kurek, M.; Moundanga, S.; Favier, C.; Galic, K.; Debeaufort, F. 2013. Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. *Food Control*, **32**:168-175
- 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.
- Lim, G.O.; Hong, Y.H.; Song, K.B. 2010. Application of *Gelidium Corneum* edible films containing carvacrol for ham packages. *Journal of Food Science*, **75(1)**:90-93.
- López-Mata, M.; Ruiz-Cruz, S.; Silva-Beltrán, N.P.; Ornelas-Paz, J.; Zamudio-Flores, P.B.; Burrueal-Ibarra, S.E. 2013. Physicochemical, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Carvacrol. *Molecules*, **18(11)**:13735-13753.
- Marais, A.; Kochumalayil, J.J.; Nilsson, C.; Fogelstrom, L.; Gamstedt, E.K. 2012. Toward an alternative compatibilizer for PLA/cellulose composites: Grafting of xyloglucan with PLA. *Carbohydrate Polymers*, **89(4)**:1038–1043.
- Martucci, J.F.; Ruseckaite, R.A. 2010. Three-Layer Sheets Based on Gelatin and Poly(lactic Acid), Part 1: Preparation and Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, **118(5)**: 3102-3110.

- Modi, S.; Koelling, K.; Vodovotz, Y. 2012. Miscibility of poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) with High Molecular Weight Poly(lactic Acid) Blends Determined by Thermal Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, **124(4)**:3074-3081.
- Mofokeng, J.P.; Luyt, A.S. 2015. Dynamic mechanical properties of PLA/PHBV, PLA/PCL, PHBV/PCL blends and their nanocomposites with TiO<sub>2</sub> as nanofiller. *Thermochimica Acta*, **613(8)**:41-53.
- Nascimento, L.; Gamez-Perez, J.; Santana, O.O.; Velasco, J.I.; Maspoch, M.L.; Franco-Urquiza, E. 2010. Effect of the Recycling and Annealing on the Mechanical and Fracture Properties of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, **18(4)**:654-660.
- 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.
- Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Kalia, V. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, **87(2)**:137-146
- Requena, R.; Jiménez, A.; Vargas, M.; Chiralt, A. 2016. Poly[(3-Hydroxybutyrate)-Co-(3-Hydroxyvalerate)] active bilayer films obtained by compression moulding and applying essential oils at the interface: antimicrobial PHBV active bilayer films obtained by compression moulding. *Polymer International*, **65(8)**:883-891.
- 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.
- Shemesh, R.; Krepker, M.; Goldman, D.; Danin-Poleg, Y.; Kashi, Y.; Nitzan, N.; Vaxman, A.; Segal, E. 2015. Antibacterial and antifungal LDPE films for active packaging. *Polymers for Advanced Technologies*, **26**:110-116.
- Sheth, M.; Kumar, A.; Dave, V.; Gross, R.A.; Mccarthy, S. 1997. Biodegradable Polymer Blends of Poly(lactic acid) and Poly(ethylene glycol). *Journal of Applied Polymer Science*. **66(8)**1495-1505.
- Shogren, R. 1997. Water vapor permeability of biodegradable polymers. *Journal of environmental polymer degradation*, **5(2)**:91-95.
- Siracusa V.; Rocculi P.; Romani S.; Rosa M.D. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science and Technology*, **19(12)**:634-643.
- Sudesh, K.; Abe, H.; Yoi, D. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, **25**:1503-1555.
- Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; Golez-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.
- Vieira, M.; Altenhofen, M.; Oliveira, L.; Masumi, M. 2011. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. *European Polymer Journal*, **47**:254-263.A
- Ye, H.; Shen, S.; Xu, J.; Lin, S.; Yuan, Y.; Jones, G.S. 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, **34**:619-623.
- Zhao, H.; Cui, Z.; Sun, X.; Turng, L.; Peng, X. 2013. Morphology and properties of injection molded solid and microcellular polylactic acid/polyhydroxybutyrate-valerate (PLA/PHBV) blends. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52(7)**:2569-2581.
- Zinoviadou, K.G.; Koutsoumanis, K.P.; Biliaderis, C.G. 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage Flora of fresh beef. *Meat Science*, **82(3)**:338-345.

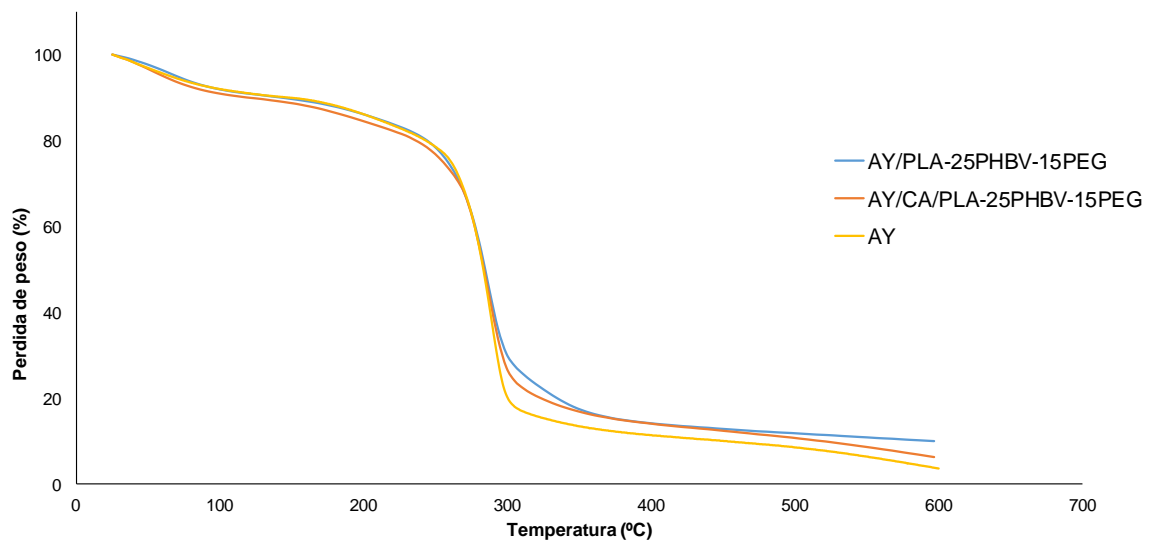
## ANEXO



**FIGURA 1.** Termogramas obtenidos del primer barrido de calentamiento mediante DSC de los diferentes films monocapa PLA-PHBV-PEG.



**FIGURA 2.** Curvas TGA de los diferentes films monocapa PLA-PHBV-PEG.



**FIGURA 3.** Curvas TGA de los films bicapa con (AY/CA/PLA-25PHBV-15PEG) y sin carvacrol. (AY/PLA-25PHBV-15PEG).