

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

*Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i d'el Medi Natural*



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**TRABAJO FIN DE GRADO - GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

# Films activos de quitosano para la conservación de carne

**Curso 2015-2016**

**Alumno-a:** Jennifer Soler Beatty

**Tutor-a:** Lorena María Atarés Huerta

**Primer cotutor-a:** M<sup>a</sup> Desamparados Vargas Colás

**Segundo cotutor-a:** M<sup>a</sup> Amparo Chiralt Boix

**Cotutor-a experimental:** Cristina Encarnación Valencia Sullca



**Valencia, 29 de julio de 2016**

# Films activos de quitosano para la conservación de carne

## RESUMEN

Actualmente existe la necesidad creciente de desarrollar envases bioactivos para prolongar la vida útil de los alimentos. En este trabajo se ha evaluado la capacidad antimicrobiana de películas de quitosano (CH) con eugenol (EU) y aceite esencial de hoja de canela (CLEO), encapsulados y en emulsión, frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*, en medio líquido y sólido (*in vitro*), y en carne inoculada. Tanto los estudios *in vitro* como los de aplicación en carne, mostraron que las películas eran capaces de reducir la carga microbiana, siendo más eficaces frente a *E. coli*. Además se observó que los recuentos de microorganismos en muestras de carne de cerdo almacenadas durante 13 días a 10 °C, fueron menores para las muestras recubiertas con las películas con aceite esencial encapsulado, debido a su liberación controlada y sostenida en el tiempo de los ingredientes activos. La capacidad de retención de ingrediente activo de los nanoliposomas se puso de manifiesto a través de la evaluación de la cinética de liberación de eugenol en cuatro simulantes alimentarios (etanol 10%, etanol 50%, ácido acético 3% e iso octano). Para todos los simulantes la constante de velocidad ( $K_1$ ), obtenida por la aplicación del modelo de Peleg, fue mayor para las películas que incorporaron lecitina. Adicionalmente se evaluó el efecto de las películas sobre la variación de color de muestras de cerdo. Así, las películas fueron capaces de frenar los cambios de luminosidad, croma y tono, debido a un aumento de la presión parcial de oxígeno, y por la capacidad antioxidante de los aceites esenciales. Los estudios de migración total de las películas, mostraron que en todos los casos se superó el límite legal en simulantes hidrofílicos (etanol 10% y ácido acético 3%), por lo que la aplicación potencial de estas películas se vería limitada a alimentos lipofílicos.

**PALABRAS CLAVES:** biopolímero, aceite esencial, canela, eugenol, antimicrobiano, migración.

## ABSTRACT

Nowadays there is an increasing demand for the developing of bioactive packaging systems in order to extend the shelf-life of food products. Therefore, in this work the antimicrobial capacity of CH-based films with eugenol (EU) and cinnamon leaf essential oil (CLEO), both encapsulated as well as in emulsion, have been evaluated against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*, in liquid and solid medium (*in vitro*), and inoculated on meat. Films were able to reduce microbial load in coated meat, and the effect was more significant for *E. coli*. In

addition, microbial counts in meat samples stored for 13 days at 10 °C were lower in samples coated with films with encapsulated essential oil, due to its controlled-release during storage. The retention capacity of nanoliposomes, was revealed by the kinetics of eugenol release in four food simulants (ethanol 10%, ethanol 50%, acetic acid 3% and isooctane). For all of them, the rate constant ( $K_1$ ) obtained by applying Peleg's model, was higher for films with lecithin. Coatings were able to slow down the changes in lightness, chroma and hue, due to the increase in partial oxygen pressure, and the antioxidant capacity of essential oils. The evaluation of the overall migration of the films showed that in all cases the legal limit in hydrophilic simulants (ethanol 10% and acetic acid 3%) was exceeded, thus the potential application of these films would be limited to lipophilic food products.

**KEYWORDS:** biopolymer, essential oil, cinnamon, eugenol, antimicrobial, migration.

## Agradecimientos

*Gracias a mis padres Miguel y Debra Carol por la ayuda y soporte durante toda mi educación tanto académica como en el día a día. A mi hermano Michael por sus consejos y ayuda. Y a todos aquellas personas que han transcurrido por mi vida que han sabido valorar mi esfuerzo y darme una oportunidad para evolucionar como persona.*

*Gracias por ese apoyo y amor incondicional, este trabajo es el resultado del mismo.*

*"El genio se hace con un 1% de talento, y un 99% de trabajo"- Albert Einstein*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo general .....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Materiales.....	13
3.2. Obtención de las suspensiones de nanoliposomas.....	13
3.3. Obtención de las películas.....	13
3.4. Migración total en simulantes alimentarios.....	14
3.5. Retención de eugenol en las películas.....	14
3.6. Cinética de liberación de eugenol a diferentes simulantes alimentarios.....	15
3.7. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a <i>E. coli</i> y <i>L. innocua</i> .....	16
3.7.1. Obtención del cultivo de <i>E. coli</i> y <i>L. innocua</i> .....	16
3.7.2. Ensayos en medio líquido.....	16
3.7.3. Ensayos en medio sólido.....	16
3.8. Aplicación de las películas a carne de cerdo fileteada.....	16
3.8.1. Migración específica de eugenol.....	17
3.8.2. Calidad microbiológica.....	17
3.8.3. Actividad antimicrobiana contra <i>L. innocua</i> y <i>E. coli</i> .....	17
3.8.4. Color.....	18
3.9. Análisis estadístico.....	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
4.1. Migración total en simulantes alimentarios.....	19
4.2. Retención de eugenol en las películas.....	20
4.3. Cinética de liberación de eugenol a diferentes simulantes alimentarios.....	21
4.4. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a <i>E. coli</i> y <i>L. innocua</i> .....	24
4.5. Aplicación de las películas a carne de cerdo fileteada.....	26
4.5.1. Migración específica de eugenol.....	26
4.5.2. Calidad microbiológica.....	26
4.5.3. Actividad antimicrobiana contra <i>L. innocua</i> y <i>E. coli</i> .....	28
4.5.4. Color.....	30
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>

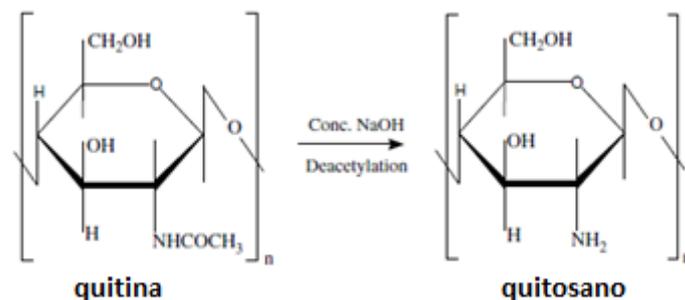


## 1. INTRODUCCIÓN

Las películas comestibles se definen como capas finas de material que se colocan sobre el alimento o entre diferentes partes del mismo, con el fin de aumentar su vida útil (Guilbert et al., 1996). Estas películas pueden actuar como barrera frente a la humedad, el oxígeno y la contaminación bacteriana de tal modo que su aplicación constituye una técnica antimicrobiana no térmica.

En función de su estructura, las películas comestibles pueden describirse como homogéneas - obtenidas a partir de soluciones en una única fase de polisacáridos, proteínas o lípidos- o heterogéneas. Éstas últimas, también llamadas biocomposites, están compuestas por una matriz continua con algunas inclusiones como glóbulos de lípidos (emulsiones) o partículas sólidas (fibras, proteínas hidrofóbicas). Esta conformación suele suponer una mejora de las propiedades de las películas.

Actualmente existe una necesidad creciente de envases bioactivos para preservar la calidad de los alimentos, mediante la incorporación de recubrimientos con agentes antimicrobianos. En este contexto las películas de quitosano han demostrado tener una gran aplicación, gracias a su capacidad de actuar como soporte para componentes antimicrobianos y antioxidantes. El quitosano (Figura 1) es un polisacárido derivado de la desacetilación de la quitina, constituyente del exoesqueleto de los crustáceos. La quitina es insoluble en agua y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, por detrás de la celulosa (Dutta et al., 2009).



**Figura 1.** Estructura de la quitina y del quitosano, y proceso de desacetilación alcalina de la quitina.

Las principales características que hacen al quitosano apto en su uso en la industria alimentaria, son su biodegradabilidad, su biocompatibilidad, su no toxicidad, su carácter renovable y su capacidad para formar películas sin la necesidad de plastificantes. Otra característica de gran interés del quitosano es su actividad antimicrobiana de amplio espectro, frente a hongos, levaduras y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Dutta et al., 2009). Además, a

diferencia del almidón, el quitosano no presenta variación del comportamiento mecánico a lo largo del tiempo de almacenamiento (Jiménez et al., 2014).

La producción convencional de quitosano por desacetilación alcalina de la quitina presenta dos inconvenientes: la dependencia de los residuos pesqueros y las implicaciones medioambientales derivadas del vertido de soluciones alcalinas concentradas. Una alternativa es la extracción de quitosano de la pared celular de hongos en condiciones controladas. Una técnica propuesta recientemente se basa en el cultivo de *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404 para este fin (Tayel et al., 2014). Otra alternativa sería sustituir los tratamientos químicos por procesos enzimáticos o microbianos. Para la eliminación de las proteínas fuertemente unidas a la quitina se puede utilizar tripsina, quimiotripsina y papaína obtenidas de *A. niger* o *Bacillus subtilis*. Para el tratamiento de desmineralización se pueden utilizar bacterias lácticas.

La actividad antimicrobiana del quitosano ha sido justificada en la bibliografía a través de diferentes mecanismos. Uno de los mecanismos descritos se fundamenta en las fuerzas electroestáticas entre los grupos aniónicos de la membrana plasmática y los grupos NH<sub>2</sub> cargados positivamente del quitosano a pH < 6. Esta interacción produce una desestabilización y posterior lisis de la membrana, conduciendo a la liberación de los constituyentes intracelulares de la bacteria. Otro mecanismo propuesto se basa en la actuación del quitosano como quelante de metales traza, en condiciones ácidas, reduciendo los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Un último modo de actuación describe la penetración de oligómeros de quitosano en la célula inhibiendo el funcionamiento de enzimas intracelulares y/o interfiriendo en la síntesis de mRNA y proteínas (Dutta et al., 2009). La actividad antimicrobiana del quitosano se ve influenciada por el peso molecular, el grado de desacetilación, el grado de polimerización, su concentración, el microorganismo diana, la hidratación de la película y el pH del medio. Las condiciones descritas para el aumento de la actividad antimicrobiana del quitosano son un peso molecular menor a 10 kDa, mayor grado de desacetilación, menor pH y carácter catiónico por dilución en ácido acético glacial.

A pesar de las ventajas que presenta la utilización de quitosano para la elaboración de películas, actualmente su aplicación está limitada por su elevada permeabilidad al vapor de agua. Con el fin de mejorar las propiedades de barrera, se han estudiado combinaciones con otros biopolímeros compatibles baratos y abundantes, como el almidón de trigo. De ese modo se puede reducir la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (Salgado et al., 2013). Con el mismo fin se pueden llevar a cabo modificaciones en el solvente o técnicas de entrecruzamiento para reducir la solubilidad y el hinchamiento de las películas de quitosano (Dutta et al., 2009). Otra estrategia es la elaboración de composites mediante la incorporación de lípidos, de tal modo que, debido al carácter

hidrofóbico de éstos, se mejora la barrera a la humedad reduciéndose la solubilidad del quitosano en soluciones acuosas (Jiménez y Chiralt, 2015). La incorporación de aceites esenciales y de lecitina, mejoró la barrera al vapor de agua de películas de quitosano debido a que la transferencia de vapor de agua se ve afectada por el equilibrio hidrofílico-lipofílico de los componentes que constituyen la película (Jiménez y Chiralt, 2015; Pastor et al., 2013).

Entre la gran variedad de compuestos de naturaleza lipídica que se pueden incorporar para la formación de composites, destacan los aceites esenciales, por su efecto antimicrobiano y antioxidante. Debido a este carácter bioactivo, la incorporación de estos aditivos en las películas de quitosano podría favorecer la protección frente a la oxidación (Talón et al., 2013) y al crecimiento microbiano.

Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles y no volátiles. Su fracción volátil está compuesta por terpenos, terpenoides y compuestos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular. Se obtienen por extracción con solventes orgánicos o mediante destilación de diferentes partes de las plantas. Su uso en productos alimentarios está permitido, ya que son clasificados por la FDA como compuestos seguros (GRAS). El mecanismo de acción antimicrobiano de los aceites esenciales no se ha establecido de forma consensuada, pero puede atribuirse al carácter hidrofóbico de los diferentes terpenos que los constituyen (Sánchez-González et al., 2011). Estos compuestos pueden llegar a actuar produciendo daños a nivel de la membrana plasmática, sistema enzimático de la bacteria, material genético o bien pueden contribuir a la formación de hidroperóxidos, por la oxidación de ácidos grasos insaturados (Jayasena y Jo, 2013). El efecto sinérgico de los componentes de los aceites esenciales tiene un papel fundamental en su poder antimicrobiano, tal como se ha demostrado al comparar la acción antimicrobiana del aceite con la de algunos de sus componentes principales aislados (Sánchez-González et al., 2011).

El aceite esencial de hoja de canela presenta actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica, por lo que es ampliamente aplicable en la industria alimentaria. Su actividad antifúngica se debe mayoritariamente a los compuestos fenólicos que lo constituyen, como el eugenol. Este compuesto presenta además buenas propiedades bactericidas frente a *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* (Preedy, 2016), dos de los microorganismos patógenos prevalentes en productos cárnicos (Jayasena y Jo, 2013).

Por otro lado, la aplicación de los aceites esenciales sobre los alimentos puede provocar alteraciones organolépticas en los mismos, por lo que se propone su incorporación en películas comestibles, de modo que se posibilite una liberación controlada al alimento. Además los aceites esenciales son poco solubles en agua, sensibles a la luz, volátiles, y establecen interacciones hidrófobas con

componentes de los alimentos. Debido a dichas limitaciones, actualmente se está investigando la encapsulación de aceites esenciales, previamente a la elaboración de las películas. Algunos sistemas de encapsulación estudiados han sido la formación de nanoemulsiones (Severino et al., 2015), nanopartículas de CH o proteína vegetal (Wu et al., 2012), nanogel (Abreu et al., 2012), microsferas de alginato (Benavides et al., 2016), nanofibras de poli-vinil-alcohol, ciclodextrinas injertadas en quitosano o liposomas (Boelter and Brandelli, 2016). Esta última encapsulación podría mejorar la cinética de liberación de los agentes activos al alimento.

Los nanoliposomas son vesículas esféricas de fosfolípidos, organizadas en una sola capa (unilamelares) o varias capas (multilamelares), con un núcleo interno acuoso, capaces de autoensamblarse en disoluciones acuosas. La obtención de liposomas se puede llevar a cabo a través de diferentes técnicas, como sonicación, extrusión, homogenización a alta presión o calentamiento (Boelter y Brandelli, 2016).

En estudios anteriores se ha verificado la importancia de la composición de los nanoliposomas en el control de la liberación de los componentes activos (Jiménez y Chiralt, 2015). La liberación depende de la naturaleza lipídica, del agente bioactivo y de las interacciones compuesto-liposoma (Fernández-Pan et al., 2015). Aunque actualmente existen pocos estudios que aborden la liberación de compuestos activos encapsulados, se han descrito diferentes mecanismos de liberación entre los cuales se encuentran la difusión debida a un gradiente de concentración, el hinchamiento debido a la migración de agua, o el efecto de fuerzas externas como el pH o la temperatura (Zhang et al., 2015).

Las ventajas que presentan los nanoliposomas son múltiples. Entre ellas, se encuentra la mejora de la biodisponibilidad del compuesto activo, la posibilidad de favorecer mecanismos de absorción celular, la reducción en la cantidad de compuesto activo incorporado y el aumento de la concentración del mismo en áreas del alimento donde los microorganismos se localicen preferentemente (Severino et al., 2015).

La lecitina ha demostrado su efectividad como agente encapsulante, manteniendo la liberación prolongada de los compuestos bioactivos a los alimentos, y a su vez prolongando la vida útil de los mismos. La lecitina es el constituyente mayoritario del tejido nervioso, y su composición incluye fosfolípidos como los ácidos oleico, linoleico y linolénico, y lípidos neutros (Hasan et al., 2014).

Por otro lado, la carne y sus derivados son altamente perecederos y propensos a la contaminación, debido a que son alimentos ricos en nutrientes esenciales, alta actividad de agua (>0,85 carne fresca) y pH apto para el desarrollo bacteriano (Jayasena y Jo, 2013). El crecimiento microbiano en este sistema

alimentario puede producir tanto deterioro de las propiedades del alimento (descoloración, cambios pH, sabor y olor) como problemas graves de salud pública. Actualmente los métodos de preservación de la carne más comunes se basan en tratamientos térmicos (calentamiento, microondas...), refrigeración, secado o adición de aditivos sintéticos (Jayasena y Jo, 2013). Actualmente, la utilización de envases activos representa una interesante alternativa para la conservación de este tipo de productos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de películas de quitosano con compuestos activos (eugenol y aceite esencial de hoja de canela) sobre la vida útil de carne de cerdo, analizando las diferencias de comportamiento entre películas con aceites esenciales en emulsión o encapsulados.

### **2.2. Objetivos específicos**

Con el fin de alcanzar el objetivo general marcado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la migración total de las películas a diferentes simulantes alimentarios.
- Analizar el efecto del modo de incorporación de los agentes bioactivos (emulsión o encapsulación) en la retención y cinética de liberación de los mismos, tanto en simulantes alimentarios como en carne de cerdo.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* (sobre carne de cerdo) del eugenol y aceite esencial de hoja de canela en las dos conformaciones estudiadas, emulsión y encapsulación, en películas de quitosano.
- Evaluar el efecto del almacenamiento con las películas sobre la conservación de la carne de cerdo, en términos de calidad microbiológica y color.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

El quitosano (CH) y el eugenol (EU) fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania). El aceite esencial de hoja de canela (CLEO) se compró a Herbes del molí (Alicante). La lecitina (Lec), procedente de semilla de girasol y con un 20% de fosfatidilcolina no-GMO, se adquirió de Lipoid H 20 (Lipoid GmbH, Frigenstraße, Alemania). Los disolventes metanol, etanol, ácido acético glacial e isooctano, así como el nitrato de magnesio empleado para el almacenamiento de las películas y el glicerol para el almacenamiento de los cultivos, fueron suministrados por la casa comercial Panreac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona).

Las cepas de *L. innocua* (CECT 910) y *E. coli* (CECT 10) fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot). El agua de peptona tamponada y todos los medios empleados fueron adquiridos de Scharlab S.L. (Mas d'EnCisa, Barcelona).

#### **3.2. Obtención de las suspensiones de nanoliposomas**

Se preparó una disolución acuosa de lecitina al 5% (p/p), que se mantuvo en agitación a 650 rpm y temperatura ambiente durante 3-4 h. A partir de ésta, se obtuvieron tres tipos de liposomas, sin incorporación de agente bioactivo (Lec), con eugenol (Lec-EU) y con aceite esencial de hoja de canela (Lec-CLEO). Para obtener Lec-Eu y Lec-CLEO, a 40 g de la dispersión de lecitina se adicionaron 2 g del compuesto activo. Finalmente, la mezcla se sometió a sonicación a 20 kHz durante 10 min, con pulsos de un segundo para encapsular el aceite en los nanoliposomas (Vibra-Cell, Sonics & Materials, Inc. USA).

#### **3.3. Obtención de las películas**

Se obtuvieron 6 formulaciones diferentes: dos controles sin y con nanoliposomas de lecitina (CH y CH-Lec), dos formulaciones con activos no encapsulados (CH-EU y CH-CLEO) y dos formulaciones con los activos encapsulados en lecitina (CH-Lec-Eu y CH-Lec-CLEO). La proporción másica agente activo:quitosano fue 0.476:0.900.

En todos los casos se partió de una solución de quitosano al 1% (p/p) en ácido acético al 1% (v/p), que se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Para obtener las películas con nanoliposomas de lecitina, se adicionó 10 g de la suspensión de liposomas (que contenía 0.476 g de agente activo) a 90 g de la disolución de quitosano, y se mantuvo en agitación durante 2 h antes del vertido. Con el fin de mantener constante la proporción agente activo:quitosano, en la obtención de las películas con agentes activos emulsionados, a 90 g de la solución de quitosano se incorporó 0,476 g de compuesto activo. Tras ello, se

homogeneizó con Ultraturrax a 13.500 rpm durante 4 minutos (Yellow Line DI 25 basic, IKA, Alemania). Finalmente se desgasificó mediante una bomba de vacío.

Las formulaciones se vertieron en placas de teflón de 150 mm de diámetro, manteniendo constante la masa de sólidos totales (1 g de sólidos totales / placa). Las películas se obtuvieron secando a 25 °C y 46 % HR durante 24-48h. Posteriormente se acondicionaron en desecadores herméticos a 53%HR, utilizando disoluciones saturadas de nitrato de magnesio Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

### 3.4. Migración total en simulantes alimentarios

Se cuantificó la migración total de las diferentes formulaciones en distintos tipos de simulantes alimentarios, de acuerdo con el reglamento N° 10/2011 (UE) de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Los tres simulantes empleados fueron etanol 10 % (v/v), que se asigna a alimentos con carácter hidrofílico; ácido acético 3% (p/v), que se asimila a alimentos hidrofílicos con pH inferior a 4.5, e isooctano, que simula alimentos lipofílicos con grasas libres en la superficie. La proporción entre película y simulante fue 6 dm<sup>2</sup>/kg, y el contacto entre ambos se mantuvo durante 10 días a 20 °C.

Finalizado el tiempo de contacto, se recuperaron las películas y se dejó evaporar el simulante alimentario durante 24-48 h en estufa a 60 °C. El residuo generado se pesó para determinar la migración total como masa de constituyentes liberados por dm<sup>2</sup> de superficie de contacto con el alimento (mg/dm<sup>2</sup>). El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

### 3.5. Retención de eugenol en las películas

La masa de eugenol retenido en las películas CH-EU y CH-Lec-EU tras el proceso de vertido y secado se cuantificó a través de extracción en metanol. Se recortaron muestras de película de 4 cm<sup>2</sup> de área, y se pusieron en contacto con 100 ml de metanol durante 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente y en agitación (300 rpm). La concentración de eugenol extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Helios Zeta UVeVis, Thermo Fisher Scientific, United Kingdom) a 282 nm, utilizando metanol como blanco. La masa de eugenol extraído con metanol se refirió a g EU / g CH.

Se calculó el porcentaje de retención de eugenol en las películas refiriendo la masa de eugenol extraído en metanol a la masa de eugenol inicialmente incorporado en cada formulación (ecuación 1). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada formulación y tiempo.

$$\% \text{ Índice de retención} = \frac{\text{g Eu extraído en metanol}}{\text{g Eu incorporado}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.6. Cinética de liberación del eugenol a diferentes simulantes alimentarios

Se estudió la cinética de liberación del eugenol en cuatro simulantes alimentarios: etanol en agua (10% v/v), etanol en agua (50 % v/v), ácido acético al 3% (p/v) e isooctano. Muestras de película de 4 cm<sup>2</sup> se pusieron en contacto con 100 mL de simulante, a temperatura ambiente y en agitación continua. A diferentes tiempos (hasta 24 horas) se determinó la absorbancia a 282 nm de muestras extraídas del matraz con el fin de cuantificar el eugenol liberado al simulante (para lo cual se habían determinado previamente las curvas patrón para cada simulante). Se utilizó como blanco el correspondiente disolvente. El ensayo se realizó por triplicado para cada formulación (CH-EU y CH-Lec-EU) y simulante.

Para modelizar la cinética de liberación en cada uno de los disolventes, se utilizó el modelo empírico propuesto por Peleg (1980) para la descripción cuantitativa de curvas asintóticas (ecuación 2) cuya linealización (ecuación 3) permite el cálculo de los parámetros a través de un ajuste lineal.

$$m_t = m_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (2)$$

$$\frac{t}{m_t - m_0} = K_1 + K_2 \cdot t \quad (3)$$

donde:

$m_t$ : masa de eugenol liberado en un tiempo  $t$  (g)

$m_0$ : masa de eugenol liberado en al inicio (g)

$K_1$  parámetro del modelo de Peleg (min/g)

$K_2$  parámetro del modelo de Peleg (g<sup>-1</sup>)

La constante cinética  $K_1$  está inversamente relacionada con la velocidad inicial de transferencia de EU al disolvente, y  $K_2$  está inversamente relacionada con la masa de EU liberada en el equilibrio ( $m_\infty$ ) de acuerdo con la ecuación 4.

$$m_\infty = m_0 + \frac{1}{K_2} \quad (4)$$

Una vez determinado el valor asintótico de la masa de eugenol liberado al simulante ( $m_\infty$ ) se calculó la ratio  $m_t/m_\infty$  para evaluar la cinética de cambio. Además se calculó el cociente  $m_\infty/m$  extraído en metanol, con el fin de comparar la eficacia de los diferentes disolventes en la extracción del eugenol.

### **3.7. Actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua***

#### **3.7.1. Obtención del cultivo de *E. coli* y *L. innocua***

Las cepas en stock almacenadas a  $-25^{\circ}\text{C}$  en TSB con un 30% de glicerol se revivieron por siembra en 10 mL de TSB e incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Posteriormente una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  fue transferida a 10 mL de TSB y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento del microorganismo.

#### **3.7.2. Ensayos en medio líquido**

Se utilizó una modificación del método propuesto por Jiménez et al. (2014). El cultivo inicial se diluyó en Buffered Peptone Water hasta obtener una concentración de trabajo de  $10^6$  UFC/mL (cultivo madre). Se esterilizaron tubos con 9,9 mL de TSB, a los que se incorporó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  del cultivo madre y un fragmento circular de película de 55 mm de diámetro. Este procedimiento se llevó a cabo para cada cepa y diferentes tiempos de almacenamiento a  $10^{\circ}\text{C}$  (0, 2, 6, 9 y 13 días). Además se utilizaron como control tubos sin película.

A cada tiempo se llevaron a cabo los recuentos mediante diluciones seriadas en agua de peptona, hasta alcanzar la dilución  $10^{-5}$ , y posterior siembra en profundidad en TSA. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 h para *E. coli* y 48 h para *L. innocua*. Los recuentos se realizaron por duplicado.

#### **3.7.3. Ensayos en medio sólido**

Se recortaron círculos de película (50 mm de diámetro) y se esterilizaron con UV en cabina de flujo laminar. Se prepararon placas Petri con 10 g de medio TSA, y una vez solidificado se inoculó su superficie con 100  $\mu\text{l}$  del cultivo madre. Se cubrió el medio con cada una de las películas y se envolvió la placa con parafina para evitar la deshidratación. Se prepararon también controles sin película. Todas las placas se almacenaron en nevera a  $10^{\circ}\text{C}$  y se evaluaron a diferentes tiempos (0, 2, 6, 9 y 13 días).

Para realizar los recuentos, se homogenizó el medio TSA con 90 mL de agua de peptona, en un Stomacher durante 2 min. Posteriormente, empleando la misma metodología que en el análisis microbiano en suspensión, se llevaron a cabo diluciones en agua peptona ( $10^{-5}$ ) y siembras en profundidad en TSA. Los recuentos se llevaron a cabo por duplicado.

### **3.8. Aplicación de las películas a carne de cerdo fileteada**

La carne de cerdo, adquirida en un mercado local, se fileteó en cabina de flujo laminar. Se cortaron porciones redondas de 50 mm de diámetro y unos 10 g, que se introdujeron en bolsas a vacío y se almacenaron en congelación hasta la realización de los análisis.

Cada muestra de carne se colocó en una placa Petri y se recubrió con una porción de película de 50 mm de diámetro. Además, se incluyeron muestras control sin película. Las placas se sellaron con parafina y se almacenaron durante 13 días a 10 °C.

### **3.8.1. Migración específica de eugenol**

Las formulaciones ensayadas fueron CH-EU y CH-Lec-EU. A diferentes tiempos de almacenamiento, se separó la película de la muestra de carne, y se realizó una extracción total del eugenol de la película mediante el mismo protocolo descrito en la sección 3.5, con un tiempo de contacto con el metanol de 24 horas. La masa de eugenol liberada a la muestra de carne se expresó en mg eugenol / g carne.

### **3.8.2. Calidad microbiológica**

En este caso, las seis formulaciones fueron ensayadas, y los discos de película empleados se esterilizaron con UV previamente al contacto con la carne, que tuvo lugar por la cara de la película que había estado expuesta a la atmósfera durante el secado.

A lo largo del almacenamiento se realizaron recuentos de aerobios mesófilos (PCA: Plate Count Agar) y de coliformes totales (VRBA: Violet Red Bile Agar). Para ello, cada muestra de carne se homogeneizó en Stomacher con 90 ml de agua de peptona durante 2 minutos. Se realizaron diluciones seriadas por duplicado hasta alcanzar una concentración de  $10^{-3}$ . Posteriormente las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y 48 h para coliformes totales y aerobios mesófilos respectivamente.

### **3.8.3. Actividad antimicrobiana contra *L. innocua* y *E. coli***

Las cepas en stock de *L. innocua* y *E. coli* se revivieron siguiendo el mismo procedimiento que en la sección 3.7.1. Para este ensayo, antes del almacenamiento en refrigeración, las porciones de carne fueron inoculadas con 100 µl de una disolución de  $10^6$  UFC/mL de *L. innocua* o bien de *E. coli*. Los discos de películas fueron previamente esterilizados con UV en cabina de flujo laminar. Se ensayaron las seis formulaciones y se añadieron muestras control sin película.

Los recuentos microbianos de *E. coli* y *L. innocua* se llevaron a cabo en profundidad utilizando los medios selectivos para coliformes fecales (con ácido rosólico al 1 %) y Palcam (con suplemento selectivo para *L. innocua*). En primer lugar, los diez gramos de carne fileteados fueron extraídos mediante asas estériles y homogeneizados con 90 mL de agua de peptona en un Stomacher durante 2 min. El recuento se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento empleado en los ensayos *in vitro* y por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en ambos casos.

### 3.8.4. Color

Las variaciones de color en las muestras por efecto de las diferentes películas se midieron con un espectrocolorímetro (3600d, Minolta, Tokio, Japón), retirando previamente la película. Se obtuvieron los espectros de reflexión de las muestras sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R<sub>0</sub>) entre 400 y 700nm, para seis puntos por muestra. Además se registró el espectro de fondo blanco (R<sub>g</sub>). A partir de dichos espectros se calculó R<sub>∞</sub>, definida como la reflectancia de una lámina de muestra de grosor suficiente para anular el efecto del fondo (ecuaciones 5–7).

$$R_{\infty} = a - b \quad (5)$$

$$a = \frac{1}{2} \cdot \left( R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (6)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (7)$$

Los parámetros de color del espacio CIE-L\*a\*b\* se obtuvieron utilizando como sistema de referencia el observador 10° y iluminante D<sub>65</sub>, a partir de los valores de R<sub>∞</sub>. Las coordenadas de color croma (C<sub>ab</sub><sup>\*</sup>) y tono (h<sub>ab</sub><sup>\*</sup>), así como la diferencia de color respecto a las muestras iniciales no recubiertas (ΔE), se hallaron con las ecuaciones 8-10.

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (8)$$

$$h_{ab}^* = \arctg \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (9)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (10)$$

### 3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.2.04 (32-bits).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Migración total en simulantes alimentarios

Los valores de migración total para cada formulación en los tres simulantes alimentarios ensayados (etanol 10%, ácido acético 3% e isooctano) se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1** .Migración total (mg eugenol / dm<sup>2</sup> de película) de las seis formulaciones estudiadas en etanol 10 % (v/v), ácido acético 3% (w/v) e isooctano. Valores promedio y desviación estándar.

	Etanol 10 %	Ácido acético 3%	Isooctano
<b>CH</b>	485 ± 2 <sup>a 1</sup>	655 ± 8 <sup>a 2</sup>	9,2 ± 0,3 <sup>a 3</sup>
<b>CH-Lec</b>	144 ± 2 <sup>b 1</sup>	309 ± 5 <sup>b 2</sup>	3,30 ± 0,14 <sup>b 3</sup>
<b>CH-EU</b>	397 ± 3 <sup>c 1</sup>	567 ± 10 <sup>c 2</sup>	5,30 ± 0,14 <sup>c 3</sup>
<b>CH-CLEO</b>	383 ± 4 <sup>d 1</sup>	561 ± 4 <sup>c 2</sup>	4,95 ± 0,12 <sup>c 3</sup>
<b>CH-Lec-EU</b>	93,5 ± 1,5 <sup>e 1</sup>	139 ± 2 <sup>d 2</sup>	0,9 ± 0,4 <sup>d 3</sup>
<b>CH-Lec-CLEO</b>	91,0 ± 1,3 <sup>e 1</sup>	134 ± 5 <sup>d 2</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>d 3</sup>

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las diferentes formulaciones para un mismo simulante alimentario ( $p < 0,05$ ). Números diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre los diferentes simulantes alimentarios para una misma película ( $p < 0,05$ ).

La migración de cada película está determinada por el tipo de simulante alimentario, en relación a su pH y polaridad, y la solubilidad de los constituyentes de la película en el mismo. Para todas las formulaciones ensayadas, los valores de migración total en simulantes hidrofílicos (etanol 10% y ácido acético 3%) exceden ampliamente el límite establecido en la legislación (10 mg / dm<sup>2</sup>) para materiales plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos (Reglamento (UE) No 10/2011).

Para todas las formulaciones, los valores de migración total más elevados se obtuvieron en el caso del ácido acético debido a la influencia del pH sobre el grado de hinchamiento de la matriz polimérica de CH. En medio ácido, se favorece la solubilización de este polímero y por tanto la difusión de los constituyentes de la película al medio. Hromiš et al. (2015) demostraron que el incremento del pH del medio producía un descenso de la ratio de hinchamiento de los films de CH puro.

A pesar de los elevados resultados de migración en simulantes hidrofílicos, estas películas podrían en principio considerarse aptas para el envasado de alimentos grasos. Los constituyentes hidrofílicos de la matriz tienen una tendencia reducida a migrar hacia el disolvente apolar y por lo tanto, la película mantiene la estructura polimérica cerrada (Sánchez-González et al., 2011).

En los tres simulantes, las películas obtenidas por combinación con lecitina, EU o CLEO presentan valores de migración total menores que las de CH puro, siendo la lecitina el componente que reduce en mayor medida la migración. Independientemente del simulante, las dos películas con compuestos bioactivos emulsionados tuvieron valores de migración total similares, sin efecto específico del agente añadido. Lo mismo ocurrió con las películas con Eu o CLEO encapsulados. Se observó un efecto significativo de la incorporación del aditivo, y los valores de migración total se vieron significativamente reducidos en el caso de películas con agentes encapsulados. Esta tendencia sugiere una reducción del hinchamiento de la película al incorporarse los agentes lipídicos, debido a su menor capacidad de captación de agua (Hromiš et al., 2015).

Estos resultados apuntan a un efecto determinante de la estructura de las películas sobre su migración total. En un estudio anterior con estas mismas formulaciones (Valencia-Sullca et al., 2016) se observó la formación de estructuras laminares cuando los compuestos activos son incorporados en nanoliposomas, en contraposición con una estructura emulsificada. Las estructuras laminadas en las películas con agentes encapsulados se habrían formado durante la etapa de secado, coherentemente con cambios de fase de las asociaciones lipídicas. En esta disposición, los agentes activos ocupan el core de las estructuras laminares (Valencia-Sullca et al., 2016). CH-LEC mostró también una estructura laminar. Las estructuras laminares supondrían una limitación para la interacción de la película con el solvente, reduciéndose significativamente la migración de las películas con lecitina en su formulación en comparación con las mismas películas sin este componente.

## 4.2. Retención de eugenol en las películas

La masa de eugenol extraído con metanol referida a la masa de quitosano, así como el % de retención de CH-EU y CH-Lec-EU se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Eugenol extraído en metanol (g eugenol / g CH) y retención (g eugenol extraído en metanol / 100g de eugenol incorporado a las formulaciones) de películas de CH-EU y CH-Lec-EU, para diferentes tiempos de contacto con metanol (24, 48 y 72 h). Valores promedio y desviación estándar.

	g Eu / g CH			% retención		
	24h	48 h	72h	24h	48h	72h
<b>EU</b>	0,305 ± 0,002 <sup>a1</sup>	0,256 ± 0,018 <sup>a2</sup>	0,273 ± 0,005 <sup>a3</sup>	57,7 ± 0,2 <sup>a1</sup>	48 ± 4 <sup>a2</sup>	51 ± 2 <sup>a12</sup>
<b>Lec-EU</b>	0,207 ± 0,016 <sup>b1</sup>	0,219 ± 0,017 <sup>b1</sup>	0,174 ± 0,008 <sup>b2</sup>	39 ± 2 <sup>b1</sup>	41 ± 4 <sup>a1</sup>	33 ± 2 <sup>b1</sup>

Letras diferentes en la misma columna (<sup>a, b</sup>) indican diferencias significativas entre las dos formulaciones en el mismo tiempo ( $p < 0,05$ ). Números diferentes en la misma fila (<sup>1,2</sup>) indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos para una misma formulación ( $p < 0,05$ ).

La masa de eugenol extraído con metanol fue significativamente mayor para un tiempo de contacto de 24 h, y disminuyó para tiempos de contacto mayores. Estas variaciones son atribuibles a fenómenos de evaporación en el espacio de cabeza del matraz y/o a procesos de oxidación de los aceites esenciales en el transcurso del ensayo. Por este motivo, se puede considerar que en la extracción con metanol, la mayor eficiencia de la extracción del eugenol presente en las películas se alcanza para 24h de inmersión.

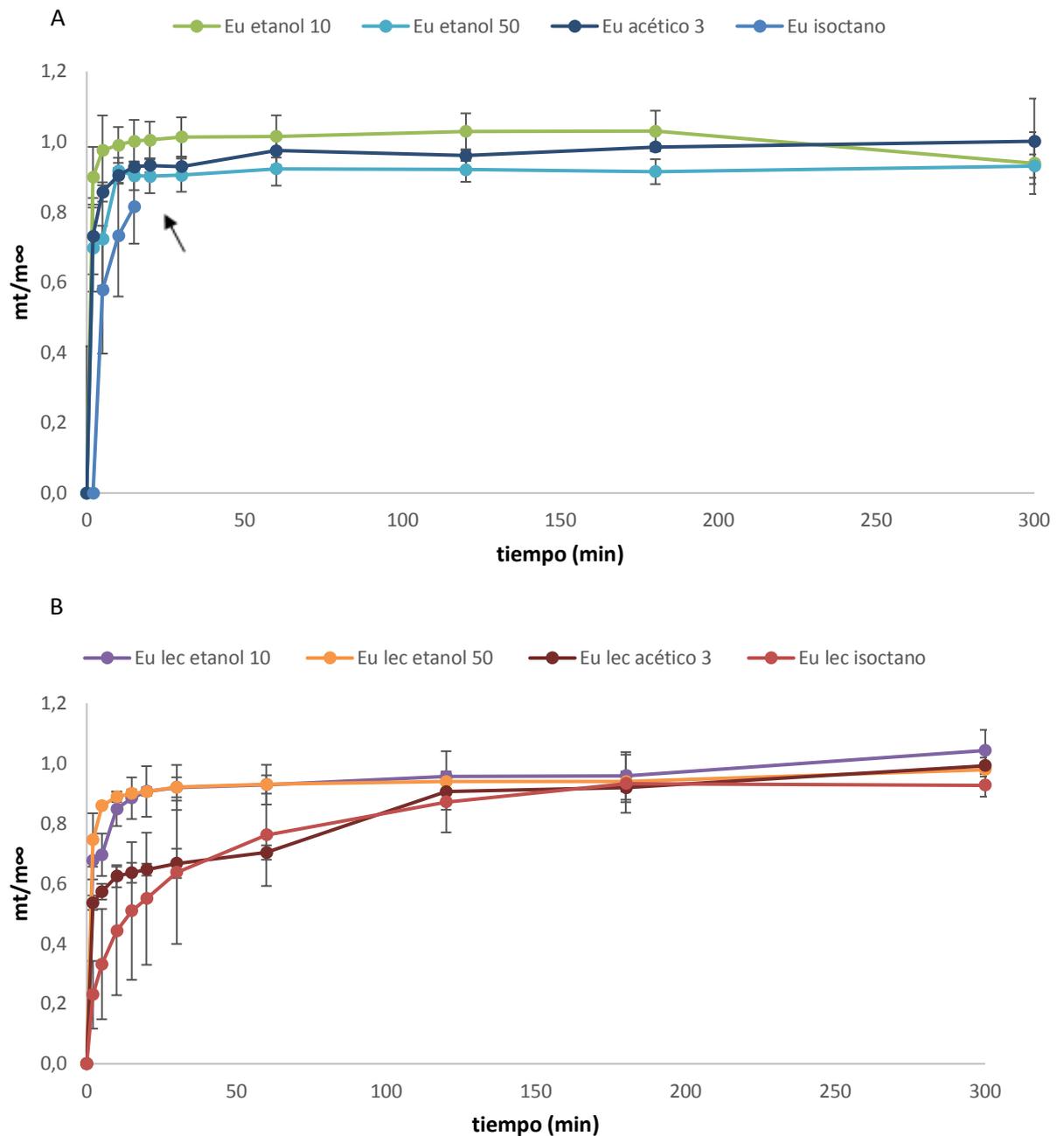
Se observaron además diferencias significativas debidas a la encapsulación del eugenol ( $p < 0,05$ ). En base a la extracción de eugenol conseguida, la encapsulación tuvo un impacto negativo sobre el porcentaje de retención de eugenol en las películas. Este resultado podría deberse a las diferencias estructurales entre ambas películas, que tendrían un impacto en la eficiencia de la extracción con metanol. Probablemente utilizando este disolvente no se consigue extraer todo el eugenol extraíble de las películas, con el consiguiente defecto de cuantificación para las películas con lecitina.

#### **4.3. Cinética de liberación del eugenol en diferentes simulantes alimentarios**

La masa de EU liberado en un tiempo  $t$  referida a la masa de EU liberado en el equilibrio ( $m_t/m_\infty$ ) se representó frente al tiempo para las dos formulaciones en los cuatro simulantes (Figura 2).

La liberación de eugenol a los simulantes alimentarios fue rápida en el caso de las películas con eugenol emulsionado. En estas curvas (figura 2A) puede observarse un aumento repentino del parámetro  $m_t/m_\infty$ , y un mantenimiento próximo al valor asintótico, desde tiempos cortos de ensayo. En este proceso bifásico, durante la primera etapa de liberación muy rápida tiene lugar la difusión de agente activo desde la superficie de la película, fomentada por la hidratación e hinchamiento de la matriz polimérica de CH. En la segunda etapa de liberación más lenta tiene lugar la difusión del agente activo disperso en la matriz polimérica de la película.

En el caso del contacto CH-EU con isooctano, se detectó una liberación rápida de eugenol que alcanzó un máximo a los 20 minutos de ensayo. Tras ello, tuvo lugar una etapa de degradación del agente activo en el disolvente. Esta baja solubilidad y difusión del eugenol sin encapsular hacia el isooctano, pone de manifiesto cierto grado de carácter hidrofílico de este compuesto.



**Figura 2.** Curvas de liberación de EU a partir de las películas de CH-EU (a) y CH-Lec-EU (b) en los simulantes alimentarios: etanol 10% (v/v), etanol 50 % (v/v), ácido acético 3% (p/v) e isooctano. La flecha indica la liberación máxima del CH-EU en isooctano a los 20 min.

Por otro lado, las películas con nanoliposomas presentaron curvas de liberación menos abruptas (figura 2B), en coherencia con una cinética de liberación más lenta a lo largo de las 24 horas de contacto con los disolventes. La estructura laminada de estas películas dificulta la difusión del eugenol, obteniéndose por lo tanto cinéticas de liberación más lentas.

Se observó además una curva creciente de liberación de eugenol a partir de la película con lecitina en isooctano. Este comportamiento parece indicar cierto efecto protector de la lecitina frente a la oxidación del agente bioactivo en presencia del isooctano, al contrario de lo observado para la formulación con eugenol emulsionado.

Los parámetros del modelo de Peleg ( $K_1$ ,  $K_2$ ), la asíntota del ajuste (masa de eugenol extraída a tiempos largos,  $m_\infty$ ) y la ratio  $m_\infty/m$  extraído en metanol se muestran en la tabla 3 para las dos formulaciones y los cuatro simulantes alimentarios.

**Tabla 3.** Parámetros del modelo de Peleg ( $K_1$ ,  $K_2$ ,  $m_\infty$ ,  $m_\infty/m$  extraído en metanol) para las películas CH-EU y CH-Lec-EU en los simulantes alimentarios etanol 10%, etanol 50%, ácido acético 3% e isooctano. Valores promedio y desviación estándar.

Simulante	EU			
	$K_2$ ( $g^{-1}$ )	$K_1$ (min/g)	$m_\infty$ ( $g$ )· $10^4$	$m_\infty /m$ extraído en metanol
Etanol 10%	$373 \pm 17^{ax}$	$258 \pm 44^{ax}$	$26,9 \pm 1,5^{ax}$	$0,64 \pm 0,03^{ax}$
Etanol 50%	$290 \pm 48^{ax}$	$1447 \pm 363^{bx}$	$35 \pm 6^{bx}$	$0,83 \pm 0,13^{bx}$
Acético 3%	$337 \pm 17^{ax}$	$732 \pm 208^{abx}$	$29,7 \pm 1,5^{abx}$	$0,71 \pm 0,04^{abx}$
Isooctano	$7 \cdot 10^4 \pm 10^4^{bx}$	$12 \cdot 10^3 \pm 0,4 \cdot 10^3^{cx}$	$1,4 \pm 0,2^{cx}$	$0,03 \pm 0,05^{cx}$
Simulante	EU-Lec			
	$K_2$ ( $g^{-1}$ )	$K_1$ (min/g)	$m_\infty$ ( $g$ )· $10^4$	$m_\infty /m$ extraído en metanol
Etanol 10%	$505 \pm 46^{aby}$	$499 \pm 295^{av}$	$20 \pm 2^{ay}$	$1,05 \pm 0,10^{aby}$
Etanol 50%	$477 \pm 17^{ay}$	$2414 \pm 128^{by}$	$21,0 \pm 0,7^{ay}$	$1,11 \pm 0,04^{ay}$
Acético 3%	$375 \pm 21^{cx}$	$3889 \pm 367^{by}$	$26,7 \pm 1,5^{ax}$	$1,41 \pm 0,08^{cy}$
Isooctano	$560 \pm 29^{by}$	$14 \cdot 10^3 \pm 5 \cdot 10^3^{cx}$	$17,9 \pm 1,0^{ay}$	$0,95 \pm 0,05^{by}$

Superíndices alfabéticos (<sup>a,b,c</sup>) diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores obtenidos para los cuatro simulantes alimentarios ensayados. Superíndices alfabéticos (<sup>x,y</sup>), diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre formulaciones.

Coherentemente con la figura 2, los parámetros del modelo de Peleg ponen de manifiesto una liberación más rápida de eugenol a partir de la película sin lecitina, con menores valores de  $K_1$  debido a la mayor accesibilidad del eugenol al disolvente. Estos resultados son coherentes con estudios previos en películas de gelatina con nanoliposomas de CLEO en lecitina (Wu et al. 2015).

Para los tres simulantes hidrofílicos, la asíntota del modelo de Peleg ( $m_\infty$ ) se ve reducida en las películas con liposomas. Probablemente, el menor ratio eugenol:película seca en estas películas (0.257 frente a 0.346 en películas con eugenol emulsionado) es determinante en este sentido. Para eliminar este efecto y evaluar el papel del simulante en la extracción, se calculó la ratio  $m_\infty/m$  extraído en metanol, obteniéndose ratios superiores a 1 en el caso de películas con lecitina. De hecho, en este ensayo de cinética de liberación se observó que, utilizando ácido acético como disolvente, se podía conseguir la mayor extracción de eugenol a partir de las películas con lecitina, siendo ésta más eficiente que la

extracción en metanol. Por este motivo, se refirieron los valores de  $m_{\infty}$  a la masa de eugenol extraído en ácido acético (tabla 4).

**Tabla 4.** Ratio  $m_{\infty} / m$  extraído en ácido acético 3% para CH-Lec-EU. Valores promedio y desviación estándar.

Simulante	EU-Lec
	$m_{\infty} / m$ extraído en ácido acético
Etanol 10%	$0,75 \pm 0,07$ <sup>ab</sup>
Etanol 50%	$0,79 \pm 0,03$ <sup>b</sup>
Acético 3%	$1,00 \pm 0,05$ <sup>c</sup>
Isooctano	$0,67 \pm 0,04$ <sup>a</sup>

Superíndices alfabéticos (<sup>a,b,c</sup>) diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores obtenidos para los cuatro simulantes alimentarios ensayados.

Así pues, se puede considerar que para determinar el eugenol extraíble de las películas, se debe utilizar metanol para aquéllas con eugenol emulsionado y ácido acético cuando se ha incorporado lecitina. Una vez obtenida la mayor extracción de eugenol utilizando acético al 3% en las películas CH-Lec-EU, se recalculó el porcentaje de retención en las mismas considerando ese disolvente, y se obtuvo un valor de  $56 \pm 2$  % a las 24h, del orden del obtenido para la película emulsionada (tabla 2).

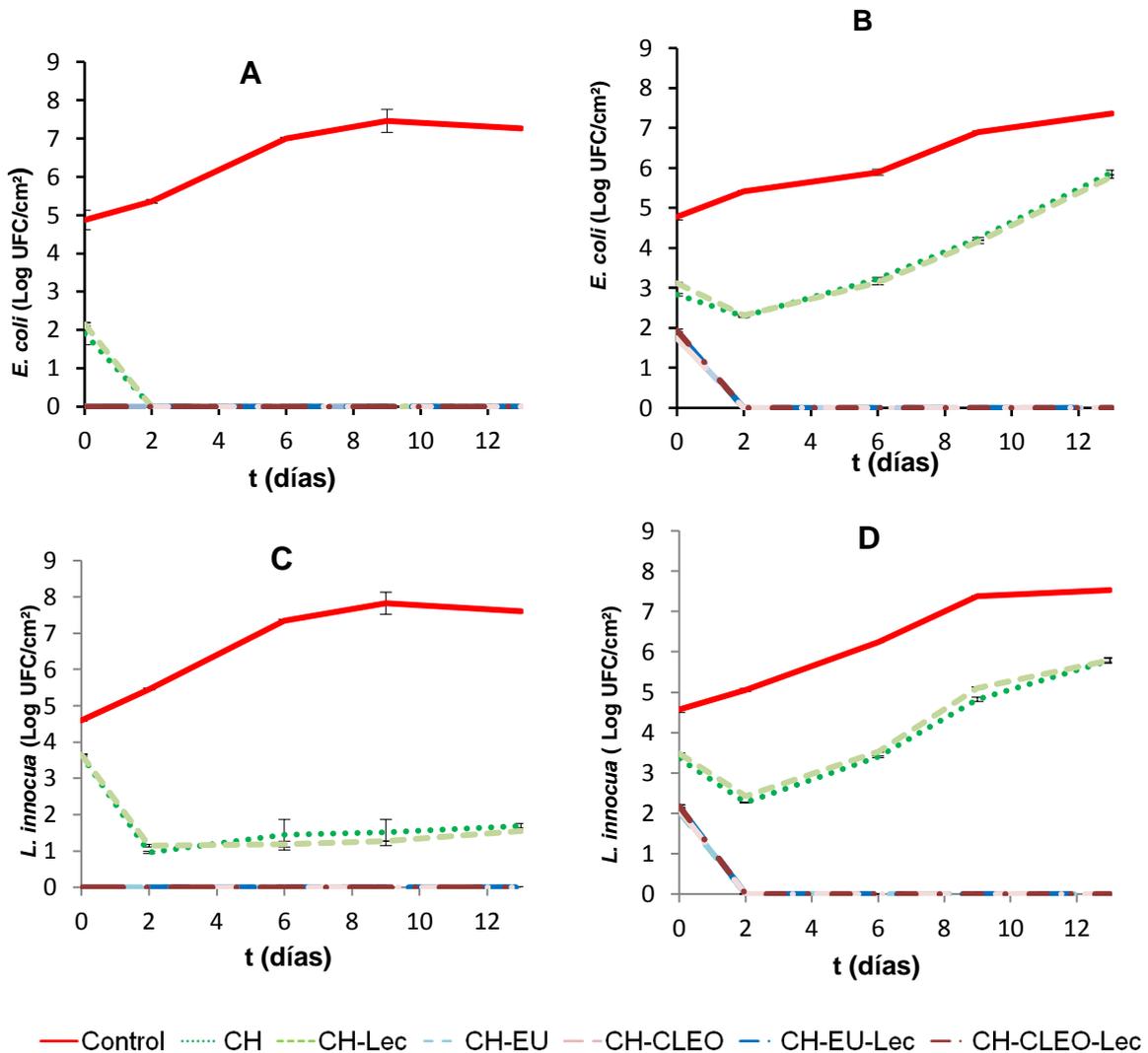
#### 4.4. Actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *E. coli* y *L. innocua*

La figura 3 muestra las curvas de crecimiento de *L. innocua* y *E. coli in vitro* en tubos de TSB y en medio sólido TSA recubierto con películas de 50 mm de diámetro.

En todos los casos se observó un marcado crecimiento de los controles (del orden de 3 log), así como efecto antimicrobiano del quitosano frente a las dos bacterias testadas, sobre todo contra a *E. coli*. Esta tendencia coincide con estudios anteriores que demuestran la mayor actividad antimicrobiana del quitosano frente a bacterias Gram-negativas (O'Callaghan y Kerry, 2016). Este comportamiento se atribuye a la mayor carga negativa de la membrana plasmática de la bacteria *E. coli*, que induce a una mayor interacción electroestática con los grupos catiónicos del CH.

El efecto antimicrobiano del CH fue más relevante en los ensayos en medio líquido, coherentemente con la mayor difusividad del CH en estas condiciones. Por el contrario, en los ensayos en medio sólido la difusividad del polímero se ve

más dificultada, generando una actividad antimicrobiana más limitada y similar para ambos microorganismos.



**Figura 3.** Recuentos microbianos de muestras inoculadas con *Listeria innocua* *Escherichia coli* hasta 13 días de almacenamiento a 10 °C. Figuras A y C: ensayos en medio líquido. Figuras B y D: ensayos en medio sólido. Valores medios y desviación estándar.

El solape entre las curvas correspondientes a CH y CH-Lec sugiere que la incorporación de lecitina no afectó a la actividad antimicrobiana de las películas, coherentemente con estudios previos (Jiménez et al., 2014).

Por el contrario, las cuatro películas con agentes activos, tanto emulsionados como encapsulados, mostraron actividad bactericida frente a ambas cepas sin que se pudieran observar diferencias en función del agente incorporado y el modo de incorporación. En los ensayos en medio líquido, esta actividad antimicrobiana se manifestó ya al inicio del test, lo que puede atribuirse a la alta difusión de los agentes activos en el medio líquido. En medio sólido, transcurridos dos días de almacenamiento ya no se registró supervivencia de las

bacterias inoculadas. Wang et al. (2011), determinó el efecto sinérgico de películas de CH con aceite esencial de canela y clavo, contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* en medio sólido.

#### 4.5. Aplicación de las películas a carne de cerdo fileteadas

##### 4.5.1. Migración específica de eugenol

Los resultados de migración específica de eugenol a muestras de carne de cerdo durante el almacenamiento en refrigeración se muestran en la tabla 5. Para obtener estos resultados, se consideró el eugenol extraíble en cada caso (la masa extraída en metanol para la película CH-EU, mientras que para la formulación CH-Lec-EU se aplicó la corrección correspondiente).

**Tabla 5.** Migración específica de eugenol (mg eugenol/ g carne) a partir de las películas CH-EU y CH-Lec-EU, en contacto con muestras de carne durante el almacenamiento a 10<sup>0</sup> C. Valores promedio y desviación estándar.

Película	Día 0	Día 2	Día 6	Día 13
CH-EU	1,2 ± 0,4 <sup>a 1</sup>	2,12 ± 0,03 <sup>a 2</sup>	2,90 ± 0,03 <sup>a 3</sup>	2,53 ± 0,04 <sup>a 23</sup>
CH-Lec-EU	0,710 ± 0,006 <sup>b 1</sup>	2,133 ± 0,004 <sup>a 2</sup>	2,34 ± 0,05 <sup>b 3</sup>	2,38 ± 0,03 <sup>b 3</sup>

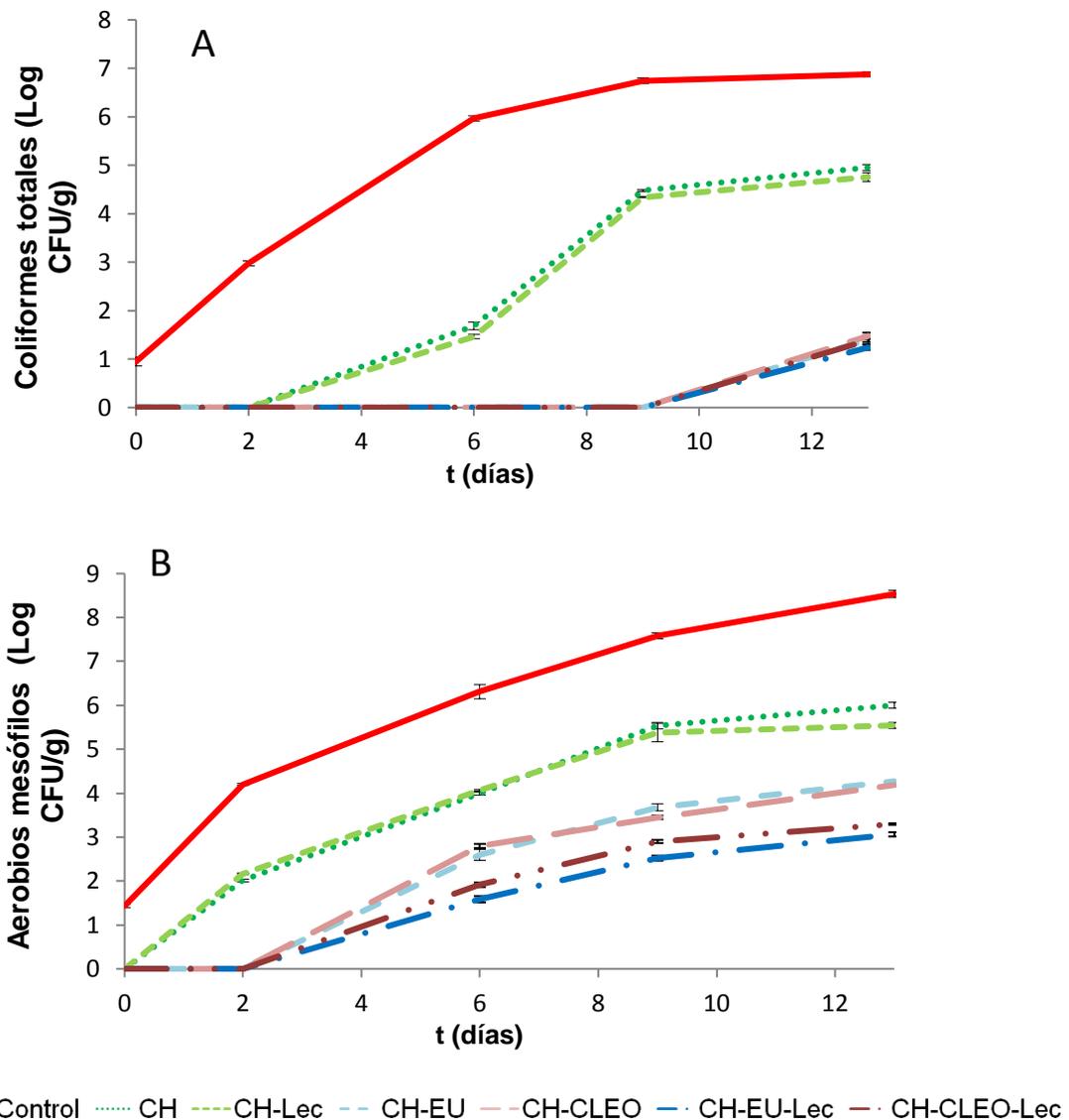
Letras diferentes en la misma columna (<sup>a, b</sup>) indican diferencias significativas entre las dos formulaciones para el mismo tiempo ( $p < 0,05$ ). Números diferentes en la misma fila (<sup>1,2,3,4</sup>) indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos evaluados para una misma formulación ( $p < 0,05$ ).

Para ambas formulaciones, la masa de eugenol liberado a la carne se vio incrementada durante el almacenamiento. La película con eugenol emulsionado exhibió una rápida liberación desde el inicio del ensayo, alcanzándose el máximo de liberación a los 6 días. Por otro lado, la formulación con eugenol encapsulado lo liberó de manera más limitada al inicio del ensayo, y más progresiva en el tiempo, sugiriendo mejores resultados a tiempos largos.

##### 4.5.2. Calidad microbiológica

El recuento de coliformes totales es un indicador de la calidad de los productos cárnicos, de tal modo que recuentos reducidos van asociados a buenas prácticas de manipulación y adecuadas condiciones sanitarias de producción. El recuento de aerobios mesófilos también es un indicador de calidad que nos permite estimar de forma general la carga microbiana presente en los alimentos.

La figura 4 muestra las curvas de crecimiento para coliformes totales (A) y aerobios mesófilos (B), respectivamente, para muestras de carne de cerdo no inoculadas y recubiertas por las seis formulaciones y un control sin película.



**Figura 4.** Recuentos de coliformes totales (A) y aerobios mesófilos (B) en carne de cerdo durante el almacenamiento a 10 °C.

Todas las películas mostraron actividad antimicrobiana, tanto contra coliformes totales como contra aerobios mesófilos. Esta actividad está asociada tanto a la matriz de quitosano, que presenta actividad antimicrobiana, como a los compuestos bioactivos incorporados.

Los resultados obtenidos son coherentes con Bonilla et al. (2014), donde se observó un efecto bactericida y bacteriostático del CH frente a coliformes y aerobios mesófilos, durante un almacenamiento de 13 días a 10 °C de carne de cerdo picada.

Al final de almacenamiento, en las muestras control (sin película) se alcanzaron recuentos de coliformes totales de 6 log. Las películas mostraron un efecto bactericida en las muestras de carne durante los dos primeros días de almacenamiento. A partir de ese momento en las muestras recubiertas con las películas de CH y CH-Lec se comenzó a detectar un aumento en la carga microbiana, sin existir diferencias significativas entre las dos películas. Para las formulaciones que incorporaron ingredientes activos no se detectó un aumento de los niveles de coliformes totales hasta el noveno día de almacenamiento, y no se observaron diferencias significativas en función del agente incorporado o el modo de incorporación.

En los recuentos de aerobios mesófilos el efecto antimicrobiano de las películas fue menos marcado que frente a coliformes. Esta disminución de la efectividad podría deberse a que, dentro de la categoría de aerobios mesófilos se encuentra un conjunto muy amplio de microorganismos, algunos de los cuales no serían tan susceptibles a la acción antimicrobiana de los aditivos seleccionados como los coliformes.

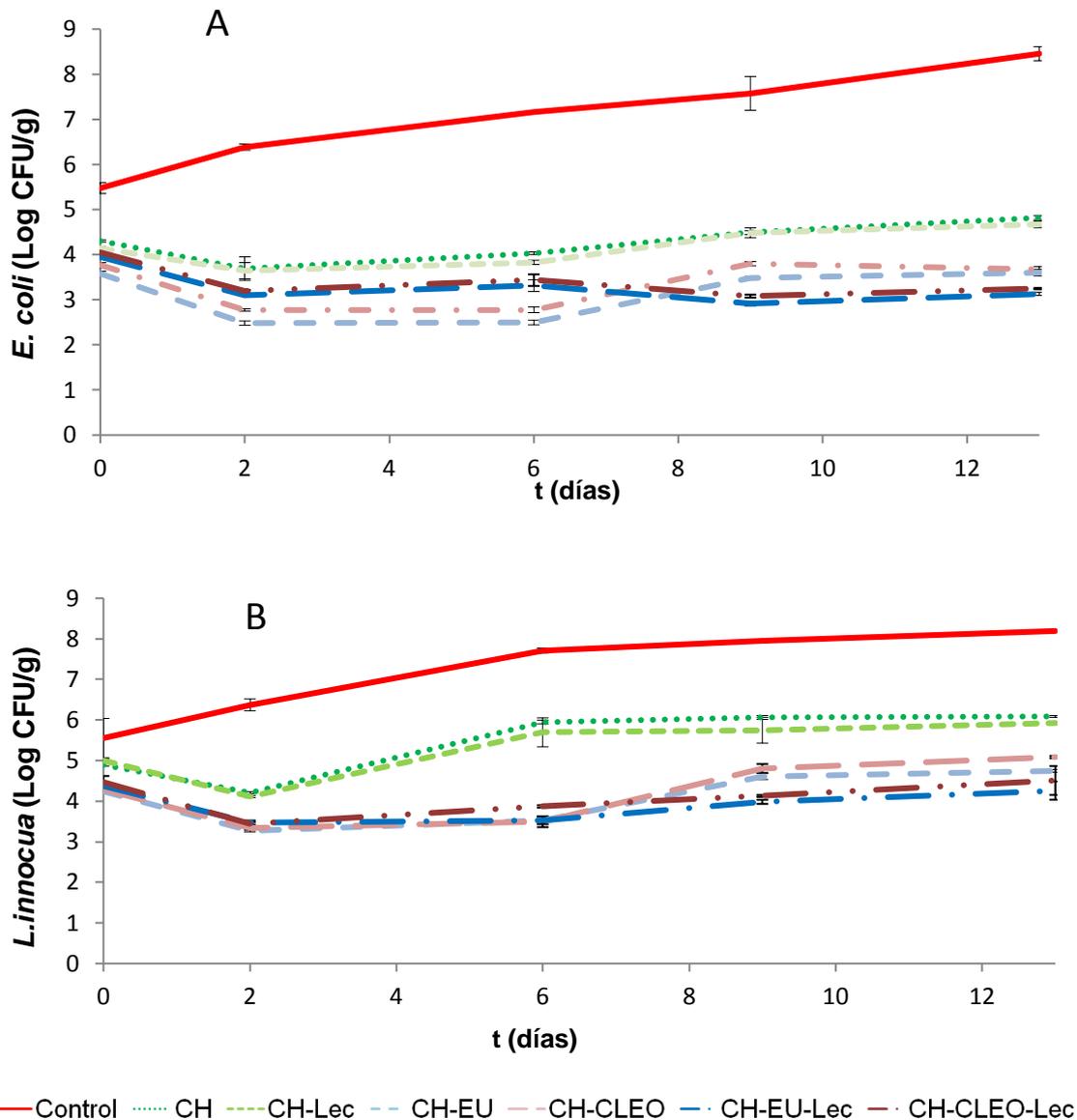
En cualquier caso, solamente las películas que contienen los compuestos activos son capaces de mantener la carga microbiana por debajo del umbral apto para el consumo humano de 5 log UFC/g a lo largo de todo el periodo de almacenamiento, según lo dispuesto en la directiva 88/657/EEC (con respecto a productos cárnicos).

#### **4.5.3 Actividad antimicrobiana contra *L. innocua* y *E. coli***

La figura 5 muestra las curvas de crecimiento de *E. coli* (A) y *L. innocua* (B) durante el almacenamiento en refrigeración de muestras de carne inoculada.

Como se observa en la figura 5, todas las películas mostraron cierto efecto antimicrobiano frente al crecimiento de *E. coli* y *L. innocua* en carne de cerdo, y el crecimiento de ambas bacterias durante el almacenamiento en las muestras recubiertas se redujo en comparación con los controles. El efecto bacteriostático de las películas se vio potenciado con la incorporación de ambos agentes activos, sin diferencias entre los mismos. Sin embargo, se observó cierto efecto del modo de incorporación del EU y CLEO sobre los recuentos. Las películas con activo encapsulado, con potencial antimicrobiano reducido a tiempos cortos, presentaron cierta acción bactericida mantenida en el tiempo, probablemente debido a la liberación progresiva de los compuestos activos a la superficie de la carne. Esta tendencia apunta al efecto protector de los nanoliposomas sobre los agentes activos, aumentando su tiempo de retención en la matriz de la película. Por el contrario, las películas con agentes activos no encapsulados presentaron un potencial antimicrobiano mayor a tiempos cortos, que se redujo a lo largo del tiempo. Este descenso en la capacidad antimicrobiana se puede deber a

pérdidas por volatilización u oxidación de los componentes activos durante el almacenamiento en refrigeración. Estas diferencias en la liberación del compuesto activo fueron previamente observadas por Wu et al. (2015), en películas de gelatina con aceite esencial de canela.



**Figura 5.** Recuentos microbianos de porciones de carne de cerdo inoculadas con *E. coli* (A) o *L. innocua* (B) ( $10^4$  UFC/g) a tiempos  $t = 0, 2, 6, 9$  y  $13$  días en condiciones de refrigeración ( $10^\circ\text{C}$ ).

#### 4.5.4. Color

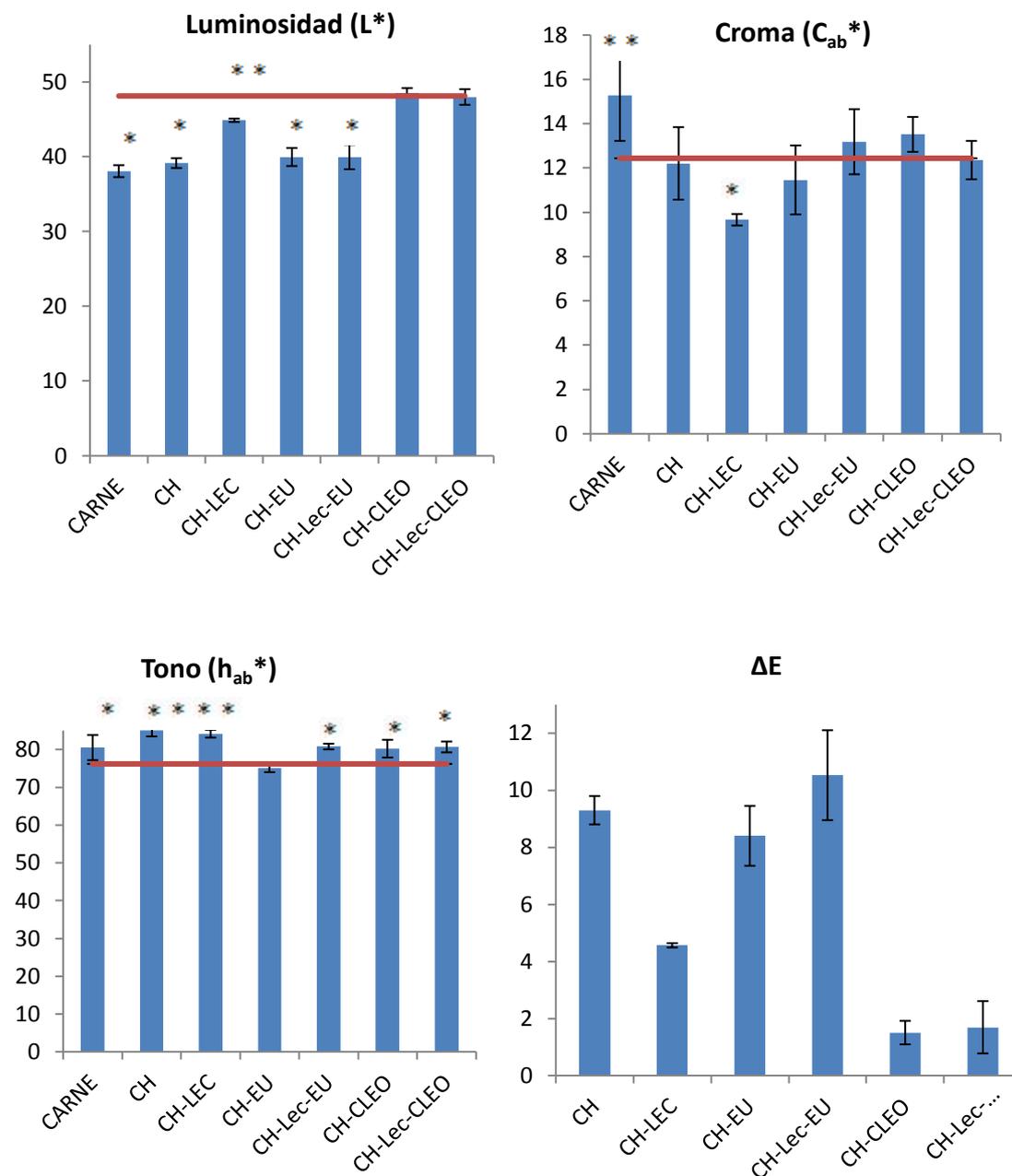
En la figura 6 se muestran los valores de luminosidad, croma, tono y  $\Delta E$  (respecto al valor inicial) para las diferentes muestras recubiertas y sin recubrir (control “carne”) después del almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$  durante 13 días.

La luminosidad de las muestras de carne en general se vio reducida durante el almacenamiento, lo que indica un oscurecimiento de las muestras. Esta tendencia podría atribuirse a la deshidratación de la carne, sólo parcialmente limitada por las películas, dado su carácter hidrofílico. Este oscurecimiento fue también observado por Van beest et al. (2013) en muestras de salmón picado recubiertas con películas de quitosano.

Durante el almacenamiento, las muestras de carne no recubiertas presentaron un aumento significativo del croma, comportamiento previamente observado en muestras de carne de cerdo picada (Bonilla et al., 2014). Esto es probablemente debido a la conversión a la mioglobina a oximioglobina favorecida por el contacto con la atmósfera de las muestras descubiertas, lo que confiere un color más saturado a la carne. Por otro lado, el contacto con las películas evitó este aumento del croma, y en general este parámetro no se vio significativamente modificado durante el almacenamiento.

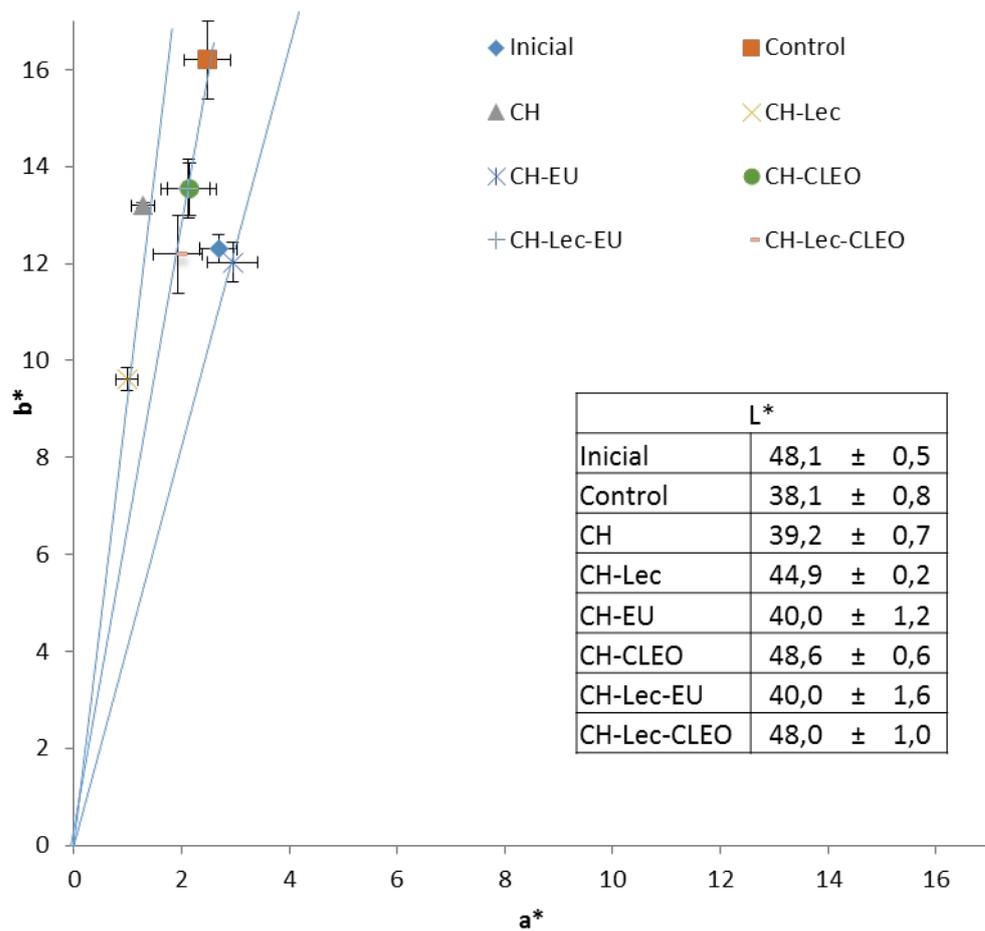
Se observó un aumento en el tono, coherentemente con una pérdida de carácter rojizo de la carne. Probablemente, la disponibilidad de agua en la matriz alimentaria favoreció la formación de metamioglobina con el consiguiente aumento del tono. Las películas que presentaron la menor variación del tono con respecto a la muestra inicial, fueron aquéllas que incorporaron agentes activos, por lo que se puede concluir que fueron éstas las formulaciones más eficientes en el mantenimiento del color de la carne. Esta pérdida de color rojizo de muestras recubiertas con películas de CH más aceites esenciales fue también previamente observado en muestras de carne de cerdo picada en almacenamiento a 10 °C durante una semana (Bonilla et al., 2014).

La proyección en el plano cromático de las muestras de carne control y recubiertas con las diferentes formulaciones, almacenadas a 10 °C durante 13 días se muestran en la figura 7. La muestra control (sin película) tuvo al final del almacenamiento una coloración más viva que el resto, debido al contacto con el oxígeno atmosférico y a la consiguiente oxidación de la mioglobina. Por otro lado, la alta presión parcial de oxígeno, evita la acumulación de metamioglobina durante el almacenamiento en refrigeración.



**Figura 6.** Luminosidad (L\*), croma (C<sub>ab</sub>\*), tono (h<sub>ab</sub>\*) y diferencia de color (ΔE) de las muestras de carne cubiertas, con respecto a las muestras sin recubrimiento (control "carne") a los 13 días de almacenamiento en refrigeración. La línea continua representa el valor inicial de cada parámetro. \*, \*\* indica diferencias significativas con el valor inicial (p < 0,05). El mismo número de asteriscos indican que no hay diferencias significativas entre formulaciones (p>0,05).

La aplicación de películas redujo las variaciones de color de la carne durante el almacenamiento, como consecuencia de la capacidad antioxidante de los compuestos activos incorporados y a la baja permeabilidad de oxígeno de la matriz polimérica de la película (CH).



**Figura 7.** Proyección en el plano cromático de las muestras de carne almacenadas durante 13 días en nevera a 10 °C.

## 5. Conclusiones

La migración total de las películas en simulantes hidrofílicos superó el límite legal establecido. Sin embargo, la encapsulación en nanoliposomas redujo la migración en todos los simulantes, sin efecto significativo del compuesto activo incorporado (eugenol o aceite esencial de hoja de canela). Este efecto es probablemente debido a las modificaciones inducidas en la estructura de las películas al incorporar los nanoliposomas.

La encapsulación del eugenol no mejoró la retención del compuesto activo en la matriz de la película, aunque dio lugar a una liberación retardada del mismo a los simulantes alimentarios. Además, los resultados apuntaron a cierto efecto protector de los nanoliposomas sobre el eugenol, al utilizar isooctano como simulante.

La mayor extracción de eugenol a partir de las películas con nanoliposomas se consiguió con ácido acético.

En ensayos *in vitro* de eficacia antimicrobiana, todas las películas fueron efectivas frente a *L. innocua* y *E. coli*, sin efecto significativo del compuesto activo ni del modo de incorporación.

La encapsulación del eugenol propició su liberación controlada a carne de cerdo, tal como se observó en los ensayos de migración específica. La calidad microbiológica de esta matriz alimentaria durante el tiempo de almacenamiento varió coherentemente con la liberación de eugenol.

Las películas con agente activo fueron capaces de frenar los cambios de coloración que experimentó la carne de cerdo sin recubrimiento.

Por tanto, la encapsulación de eugenol en películas de quitosano permitió desarrollar recubrimientos eficaces para alargar la vida útil de la carne de cerdo.

## 6. Bibliografía

ABREU, F.; OLIVEIRA, E.; PAULA, H.; DE PAULA, R. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 89:1277-1282.

BENAVIDES, S.; CORTÉS, P.; PARADA, J.; FRANCO, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204:77-83.

BOELTER, J.; BRANDELLI, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145:740-747.

BONILLA, J.; VARGAS, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. (2014). Effect of Chitosan Essential Oil Films on the Storage-Keeping Quality of Pork Meat Products. *Food Bioprocess Technol*, 7:2443-2450.

DUTTA, P.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.; DUTTA, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114:1173-1182.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; MATÉ, J.; GARDRAT, C.; COMA, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, 51:60-68.

GUILBERT, S.; GONTARD, N.; GORRIS, L. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29:10-17.

HASAN, M.; BELHAJ, N.; BENACHOUR, H.; BARBERI-HEYOB, M.; KAHN, C.; JABBARI, E.; LINDER, M.; ARAB-TEHRANY, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461:519-528.

HROMIŠ, N.; LAZIĆ, V.; MARKOV, S.; VAŠTAG, Ž.; POPOVIĆ, S.; ŠUPUT, D.; DŽINIĆ, N.; VELIČANSKI, A.; POPOVIĆ, L. (2015). Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *Journal of Food Engineering*, 158:86-93.

JAYASENA, D.; JO, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34:96-108.

JIMÉNEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; DESOBRY, S.; CHIRALT, A.; TEHRANY, E. (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.

JIMÉNEZ, M.; CHIRALT, M. (2015). *Encapsulación en liposomas de aceites esenciales para mejorar su retención en la elaboración de films de quitosano*. Tesis de máster departamento de Tecnología de Alimentos.. Universitat Politècnica de València.

O'CALLAGHAN, K.; KERRY, J. (2016). Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. *Food Control*, 69:256-261.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30:272-280.

PREEDY, V. (2016). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Editorial Elsevier.London. 339pp.

RINKI, K.; DUTTA, P.; HUNT, A.; CLARK, J.; MACQUARRIE, D. (2009). Preparation of Chitosan Based Scaffolds Using Supercritical Carbon Dioxide. *Macromolecular Symposia*, 277:36-42.

SALGADO, I.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; BONILLA, J. (2013). *Efecto de la adición de quitosano en las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, brillo y microestructura en films comestibles a base de almidón de trigo*. Tesis de máster. Universitat Politècnica de València.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHÁFER, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105:246-253.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; DESOBRY, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering*, 105:138-143.

SEVERINO, R.; FERRARI, G.; VU, K.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. (2015). Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on green beans. *Food Control*, 50:215-222.

SANGSUWAN, J.; RATTANAPANONE, N.; AURAS, R.; HARTE, B.; RACHTANAPUN, P. (2009). Factors Affecting Migration of Vanillin from Chitosan/Methyl Cellulose Films. *Journal of Food Science*, 74:549-555.

TALÓN, E.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; BONILLA, J. (2013). *Efecto de la incorporación de ingredientes activos en las propiedades físicas y antioxidantes de películas de almidón de trigo y quitosano*. Tesis de máster. Universitat Politècnica de València.

TAYEL, A.; IBRAHIM, S.; AL-SAMAN, M.; MOUSSA, S. (2014). Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69:471-475.

VALENCIA-SULLCA, C.; JIMÉNEZ, M.; JIMÉNEZ, A.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. (2016). Influence of liposome encapsulated essential oils on properties of chitosan films. *Polymer International*, 65:979-987.

VAN BEEST, I.; VARGAS, M.; ATARÉS, L. (2013). *Recubrimientos comestibles de biopolímeros y aceites esenciales. Aplicación a salmón*. Tesis de máster. Universitat Politècnica de València.

WANG, L.; LIU, F.; JIANG, Y.; CHAI, Z.; LI, P.; CHENG, Y.; JING, H.; LENG, X. (2011). Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. *J. Agric. Food Chem.*, 59:12411-12419.

WU, J.; LIU, H.; GE, S.; WANG, S.; QIN, Z.; CHEN, L.; ZHENG, Q.; LIU, Q.; ZHANG, Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43:427-435.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT - Food Science and Technology*, 48:283-290.

ZHANG, J.; CHANG, P.; ZHANG, C.; XIONG, G.; LUO, H.; ZHU, Y.; REN, K.; YAO, F.; WAN, Y. (2015). Immobilization of lecithin on bacterial cellulose nanofibers for improved biological functions. *Reactive and Functional Polymers*, 91-92:100-107.

BOELTER, J; BRANDELLI, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145:740-747.

### **Bibliografía de consulta:**

BINGJUN, Q.; JUNG, J.; ZHAO, Y. (2015). Impact of Acidity and Metal Ion on the Antibacterial Activity and Mechanisms of  $\beta$ - and  $\alpha$ -Chitosan. *Appl Biochem Biotechnol*, 175:2972-2985.

BOUARAB, L.; MAHERANI, B.; KHEIROLOMOOM, A.; HASAN, M.; ALIAKBARIAN, B.; LINDER, M.; ARAB-TEHRANY, E. (2014). Influence of lecithin–lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115:197-204.

FERNÁNDEZ-PAN, I.; CARRIÓN-GRANDA, X.; MATÉ, J. (2014). Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, 36:69-75.

FEYZIOGLU, G.; TORNUK, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT - Food Science and Technology*, 70:104-110.

HOSSEINI, S.; ZANDI, M.; REZAEI, M.; FARAHMANDGHAHI, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95:50-56.

HU, Q.; GERHARD, H.; UPADHYAYA, I.; VENKITANARAYANAN, K.; LUO, Y. (2016). Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87:130-140.

IMRAN, M.; REVOL-JUNELLES, A.; PARIS, C.; GUEDON, E.; LINDER, M.; DESOBRY, S. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 62:341-349.

KANATT, S.; RAO, M.; CHAWLA, S.; SHARMA, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29:290-297.

KHARE, A. BISWAS, A.; SAHOO, J. (2014). Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55:286-293.

MA, Q.; DAVIDSON, P.; ZHONG, Q. (2016). Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 226:20-25.

MARQUÉS, J.; CHIRALT, M. (2015). *Incorporación de aceites esenciales en films bicapa de phbv y análisis de sus propiedades físicas y antimicrobianas*. Tesis de máster Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València.

PERDONES, Á.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57:271-279.

WEN, P.; ZHU, D.; WU, H.; ZONG, M.; JING, Y.; HAN, S. (2016). Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*, 59:366-376.