

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y LIBERACIÓN DE CINAMALDEHÍDO EN FILMS DE PLA

ALUMNA: Alba Casado Quesada

TUTORA ACADÉMICA: Amparo Chiralt Boix
DIRECTORA EXPERIMENTAL: Justine Muller

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, Septiembre de 2016

PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y LIBERACIÓN DE CINAMALDEHÍDO EN FILMS DE PLA

Alba Casado Quesada, Justine Muller¹, Amparo Chiralt Boix¹

RESUMEN

Propiedades antimicrobianas y liberación de cinamaldehído en films de PLA.

Se han obtenido films de PLA con cinamaldehído como antimicrobiano por extensión y secado de sus disoluciones en acetato de etilo. También se han obtenido films de almidón por termoprocesado y se han formado films bicapa almidón-PLA con el activo, por termo-compresión, en aras a desarrollar films biodegradables antimicrobianos de alta barrera al oxígeno (por la capa de almidón) y al vapor de agua (por la capa del poliéster). Se ha probado la actividad antimicrobiana de los films monocapa y bicapa con cinamaldehído contra *Escherichia coli* y *Listeria innocua*. Se ha analizado también la capacidad de liberación del activo desde los films en el medio de cultivo y en simulantes alimentarios polares con pHs neutro y ácido. La incorporación de cinamaldehído en el PLA fue muy efectiva, aunque la cuantificación por extracción en metanol reveló una alta retención del activo en la matriz polimérica. Todos los films con cinamaldehído fueron efectivos en el control antimicrobiano de *E. coli* y *L. innocua*, en coherencia con una liberación del activo al medio superior a las MICs de ambas bacterias. La liberación del activo en simulantes alimentarios acuosos neutros y ácidos fue sostenida en el tiempo y muy similar para ambos films en simulantes neutros, pero más lenta en medio ácido para el film bicapa con almidón. Esto explica la prolongada acción antibacteriana observada.

PALABRAS CLAVES: cinamaldehído, acción antibacteriana, films activos, PLA, films bicapa, almidón, cinética de liberación.

RESUM

Propietats antimicrobianes i lliberament de cinamaldehído en films de PLA.

S' han obtés films de PLA amb cinamaldehído com antimicrobià per extensió i assecat de Les seves dissolucions en acetat d'etil. També pel·lícules s'han obtés films de midó per termoprocesa i s'han format films bicapa midó - PLA amb l'actiu, per termo -compresió, amb l'objectiu desenvolupar films biodegradables antimicrobians d'alta barrera a l'oxigen (per la capa de midó) i al vapor d' aigua (per la capa de polièster). S'ha

¹ Instituto de la ingeniería de alimentos para el desarrollo (IIAD), Camino de Vera s/n, Universidad Politécnica de Valencia (UPV), 46022 Valencia.



provatl' activitat antimicrobiana dels films monocapa i bicapa amb cinamaldehído contra *Escherichia coli* i *Listeria innocua*. S'ha analitzat també la capacitat d'alliberament de l'actiu dels films en el medi de cultiu i en simulants alimentaris polars amb pH neutre y acid. L'incorporació del cinamaldehído en els films de PLA va ser molt efectiva, encara que l'extracció amb metanol revelà una alta retenció del actiu a la matriu polimèrica. Tots als films amb CIN foren efectius al control antimicrobià de *E. coli* y *L. innocua*, en coherencia amb la concentració d' actiu alliberat, superior a la MICs de les dues bacteries. L' alliberament del actiu en simulants alimentaris acuosos neutres y acids va ser sostinguda amb el tems i molt similar per els dues films en medi neutre, pero algo mes lenta per al film bicapa amb mido al medi acid. Aço explica la prolongada acció antibacteriana observada.

PARAULES CLAU: cinamaldèhído, acció antibacteriana, films actius, PLA, films bicapa, midó, cinètica d'alliberament.

ABSTRACT

Antimicrobial properties and release of cinnamaldehyde in PLA films.

PLA films were obtained by means of a casting technique with ethyl acetate as a solvent and with cinnamaldehyde as an antimicrobial agent. Cassava starch films were also obtained by compression moulding and PLA-starch bilayer films, with the active compound, were formed through thermocompression, in order to develop biodegradable and antimicrobial films with a high oxygen barrier (through the starch layer) and water vapour barrier (through the polyester layer). The antimicrobial activity of the mono and bilayer films with cinnamaldehyde was proven against *Escherichia coli* and *Listeria Innocua* through in vitro tests. The release kinetics of the active agent from the films into the culture media and polar food simulants of neutral and acid pH was also analyzed. Cinnamaldehyde incorporation to into PLA films was very effective, although its methanol extraction revealed a high retention of the active compound in the polymer matrix. All films containing cinnamaldehyde were effective at controlling bacterial growth of *E. coli* y *L. innocua*, in agreement with the active amount released to the culture media, which was greater than MIC of both bacteria. The release of active compound to the aqueous food simulants, neutral and acid, was highly sustained throughout time and similar for both kinds of films in neutral medium, but slower in acid medium for the bilayer film with starch. This explains the observed prolonged antibacterial action.

KEY WORDS: cinnamaldehyde, bacterial action, active films, PLA, cassava starch, bilayer films, release kinetics.

INTRODUCCIÓN

El aceite esencial de canela contiene cinamaldehído (CIN) o aldehído cinámico entre otros compuestos terpenoides fenólicos. Se extrae de la corteza de canela (*Cinnamomum* spp.), la cual contiene además del aceite esencial, mucílago, taninos, azúcar y resina y que además puede ser utilizada como especia o hierba. Es una sustancia antimicrobiana natural que se encuentra categorizada como GRAS (generalmente reconocida como segura) por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos. Esta sustancia posee alta actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria y antioxidante, y en la actualidad se utiliza ampliamente en las industrias de cosméticos, de alimentos y de productos farmacéuticos. Sin embargo, posee algunos inconvenientes como son su fuerte olor y su alta volatilidad (Sun et al., 2015; Wang et al., 2015; Xing et al., 2014).

Existe un interés reciente en el desarrollo de nuevas combinaciones de extractos naturales de plantas con efecto antimicrobiano para llevar a cabo una mejora en la calidad y en la seguridad de los productos agroindustriales (Periago y Moezelaar, 2001; Periago et al., 2001). Este interés y su aplicación en la conservación de los alimentos se ha intensificado en los últimos años debido a la mayor percepción negativa del consumidor hacia los conservantes sintéticos. Además, los brotes infecciosos alimentarios son un problema de salud pública lo que conlleva el requerimiento de intensificar las estrategias de conservación (Hyltdgaard et al., 2012).

La actividad antimicrobiana del CIN se debe principalmente a los grupos aldehído de la molécula que son reactivos y tienen la habilidad de entrecruzarse de forma covalente con el DNA y las proteínas a través de los grupos amino, interfiriendo con su función normal (Feronetal et al., 1991). Sin embargo, los estudios realizados sobre el mecanismo de acción del CIN son poco concluyentes, lo que limita su desarrollo y su utilización como conservante en alimentos, ya que no se dispone de la suficiente información para predecir su efecto sobre los diferentes microorganismos y de cómo interactúa con los diferentes componentes en cada matriz alimentaria (Hyltdgaard et al., 2012). Algunos autores establecen al menos tres mecanismos de acción: a) a bajas concentraciones el CIN podría inhibir las diferentes enzimas que participan en la citocinesis o en otras funciones de la célula menos importantes, b) a concentraciones más altas, podría actuar como un inhibidor de la ATPasa (Kwon et al., 2003; Denyer, 1990) y c) se ha comprobado que concentraciones muy altas de CIN provocan perturbaciones en la membrana citoplasmática de las células, que es principalmente la diana de muchos agentes antibacterianos; las interacciones de las membranas bacterianas con biocidas causan con frecuencia cambios fundamentales en la estructura y en la función de la membrana (Denyer et al., 1990). Se han llevado a cabo varios estudios para determinar los efectos del CIN en las membranas bacterianas (Shen et al., 2015) y los resultados demuestran que el CIN generalmente permeabiliza las membranas internas de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, y que la tasa de

permeabilidad se correlaciona bien con la concentración correspondiente de CIN. Esta conclusión es coherente con lo descrito por Hammera y Hell, (2012), que utilizaron la citometría de flujo multiparamétrica para examinar los cambios en la polaridad de la membrana y la permeabilidad en *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus*, y cuyos resultados también mostraron que las células presentaron modificaciones externas, probablemente porque el CIN penetró en la envoltura celular, alterando su estructura. Se ha reportado también que el CIN es un inhibidor de la β -(1,3) glucano sintasa y quitina sintasa 1, que son importantes durante la síntesis de enzimas en la pared celular de las levaduras y los mohos (Bang et al., 2000). Estas alteraciones en la pared celular pueden ser atribuidas a las propiedades lipofílicas de los compuestos del aceite esencial, que los hace permeables a la pared celular y a la membrana citoplasmática y ayuda a la acumulación de polisacáridos bajo condiciones de estrés hídrico (Ultee et al., 2002; Yamamoto- Ribeiro et al., 2013). La interacción de los compuestos del aceite de canela con la pared celular contribuye a inhibir las reacciones enzimáticas que regulan la síntesis de la pared celular y por tanto la integridad de la célula resulta afectada (Maffei et al., 2001; Rasooli et al., 2006; Tyagi y Malik, 2010). Como consecuencia de este mecanismo se deteriora la fluidez de la membrana, cambiando la estructura de varias capas de fosfolípidos, ácidos grasos, proteínas y polisacáridos, lo que lleva a la filtración de los contenidos citoplasmáticos (Rasooli et al., 2006; Tyagi y Malik, 2010).

No obstante, uno de los principales obstáculos para el uso de los aceites esenciales es su efecto organoléptico negativo cuando se añaden en la suficiente cantidad para ejercer efecto antimicrobiano, y/o el hecho de que algunos de sus compuestos, por sí solos, no lo poseen. Se ha sugerido como una solución a este problema utilizar el efecto sinérgico entre varios compuestos (Hyldgaard et al., 2012). Los estudios de los efectos sinérgicos podrían ser utilizados para hacer mejor uso de su actividad antibacteriana y así reducir las concentraciones requeridas para lograr un determinado efecto antibacteriano y mejorar la seguridad alimentaria (Nazzaro et al., 2013). Se han realizado estudios (Ye et al., 2013) que demuestran que el CIN y el carvacrol, además de exhibir actividad antibacteriana por sí mismos, poseen un elevado efecto sinérgico, lo que indica que la combinación de ambos compuestos podría utilizarse como conservante no sintético con menor dosis, con excelente actividad bactericida para la conservación de los alimentos.

Para evitar las consecuencias negativas del uso de muchos fungicidas, Sun *et al.* (2015) han demostrado la efectividad del CIN, como compuesto alternativo, para prevenir el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la aflatoxina producida B1 (AFB1) durante el almacenamiento de granos, así como en el campo, por lo que podría ser utilizado como conservante natural en el control de hongos y micotoxinas. Estudios anteriores también demostraron que el aceite esencial de canela y el CIN resultan muy eficaces contra el crecimiento de hongos, tales como *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus ochraceus* (Hua et al., 2014; Xing et al., 2014).



El uso prolongado de antibióticos ha generado bacterias resistentes a múltiples fármacos y, por otro lado, muchas bacterias forman biofilms, que se adhieren a diferentes superficies, como poliestireno, vidrio, o acero inoxidable, de diferentes entornos, lo que las hace menos susceptibles a los antibióticos (Goulter et al., 2009; Patel et al., 2011). Los biofilms patógenos se pueden encontrar en dispositivos médicos o equipos de los procesos alimentarios, constituyendo focos de contaminación relevantes que requieren métodos de control. En este sentido, Kim et al. (2015) demostraron que se el uso de aceite de corteza de canela y CIN disminuyó significativamente la formación de biofilms de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 de *P. aeruginosa*.

A pesar de que los aceites esenciales han sido ampliamente probados en sus propiedades antimicrobianas *in vitro*, se sabe menos acerca de sus propiedades inhibitorias del crecimiento microbiano en matrices alimentarias. Específicamente, en el caso de las levaduras, Monu et al. (2016) demostraron que el CIN y el aceite de corteza de canela fueron los más efectivos contra las levaduras en aderezos de ensalada modelo, en comparación con los demás aceites estudiados (de clavo, tomillo, eugenol, carvacrol y timol). Romero-Gil et al. (2016) probaron que este compuesto activo poseía un amplio efecto inhibitorio tanto contra el crecimiento de bacterias ácido-lácticas como de levaduras y que podía ser aplicado como alternativa a otros conservantes que se utilizan en el envasado de las aceitunas de mesa. Diferentes estudios han demostrado que el CIN podría ser potencialmente utilizado, a distintas concentraciones, como agente antimicrobiano eficaz contra *E. coli* O157: H7 en el zumo de manzana y sidra (Baskaran et al., 2010), *Enterobacter sakazakii* en leches reconstituidas para lactantes (Amalaradjou et al., 2009), *E. coli* en empanadas de carne de vacuno (Amalaradjou et al., 2010), *Salmonella spp* en el lavado de tomates (alternativa al hipoclorito sódico) (Mattson et al., 2010) o combinados de cepas de bacteriófagos y *E. coli* O157:H7 en vegetales de hoja verde (Viazis et al., 2011). El aceite esencial de canela o el CIN también causaron la inhibición del crecimiento de cepas psicotrofas de *Bacillus cereus* (EPSO-35As y el INRA TZ415) en productos mínimamente procesados con zanahoria como ingrediente principal (Hernández-Herrero et al., 2008). A pesar de la eficacia del CIN como antimicrobiano, existen el inconveniente de su fuerte olor y volatilidad (Wang et al., 2015) por lo que la mayoría de los estudios realizados en matrices alimentarias indican la necesidad de realizar estudios adicionales sobre la calidad del producto final y el impacto sensorial del compuesto (Amalaradjou et al., 2009; Baskaran et al., 2010; Hernández-Herrero et al., 2008; Mattson et al., 2010; Romero-Gil et al., 2016).

La aplicación del CIN como conservante en alimentos requiere un conocimiento detallado acerca de la concentración mínima inhibitoria (MIC), es decir, de la concentración más baja de compuesto activo que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo. En este sentido, diversos estudios reportan valores específicos de las MICs del CIN para distintos microorganismos. En la tabla 1, se dan estos valores para diferentes bacterias, hongos y levaduras. En general, los valores son muy

dependientes del tipo de microorganismo, destacando por su sensibilidad algunas bacterias como *Enterococcus faecalis* o *Aeromonas hydrophila* y levaduras como *Fusarium verticilloides*.

TABLA 1. Valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$) del cinamaldehído para bacterias (Gram+ y Gram-), hongos (H) y levaduras (L).

GRAM +	MIC	GRAM -	MIC	H y L	MIC
<i>Bacillus cereus</i>	3.12 ¹	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.78 ¹	<i>Candida albicans</i>	6.25 ¹
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.78 ¹		12.5 ¹	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.56 ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	6.25 ¹	<i>Escherichia coli</i>	310 ^{2y3}	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1.56 ¹
<i>Micrococcus luteus</i>	6.25 ¹		400 ⁶	<i>Fusarium verticilloides</i>	0,053 ⁴
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.56 ¹	<i>Escherichia coli O157: H7</i>	6.25 ¹	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	50 ⁵
	310 ²	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5 ¹	<i>Candida krusei</i>	50 ⁵
<i>Staphylococcus intermedius</i>	160 ²		6.25 ¹	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	50 ⁵
		<i>Salmonella enteritidis</i>			
<i>Kocuria kristinae</i>	310 ²		310 ²	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	50 ⁵
<i>Lactococcus garviceae</i>	630 ²	<i>Yokenella regensburgei</i>	310 ²	<i>Aspergillus flavus</i>	100 ⁷
<i>Streptococcus sanguinis</i>	630 ²	<i>Enterobacter cloacae</i>	630 ²	<i>Aspergillus niger</i>	100-200 ⁷
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	160 ²	<i>Salmonella typhimurium</i>	330 ³	<i>Penicillium roqueforti</i>	100 ⁷
<i>Streptococcus pyogenes</i>	83 ³	-	-	<i>Penicillium expansum</i>	100 ⁷

¹ (Sanla-Ead et al., 2012); ² (Ye et al., 2013); ³ (Palaniappan et al., 2010) ; ⁴ (Xing et al., 2014) ; ⁵ (Monu et al., 2016).

Cabe destacar que se han obtenido films, recubrimientos, nanopartículas u otros materiales con CIN encapsulado, con fines antimicrobianos, utilizando diferentes matrices como celulosa (Sanla - Ead et al , 2012) , pectina (Otoni et al.,2014, PLA (Ahmed et al.,2016;Makwana et al.,2014; (Qin et al.,2015)), almidón (Souza et al.,2013), proteínas (Balaguer et al.,2013) o alginatos (Rojas-Graü et al.,2007). En las tablas 2 y 3 se muestran algunos de los diferentes estudios sobre el efecto antimicrobiano de estos materiales, llevados a cabo tanto “in vitro” como en matrices

alimentarias. Todos los films en los que se incorporó CIN resultaron ser efectivos contra los microorganismos testados.

TABLA 2. Cinamaldehído (CIN) incorporado en diferentes matrices poliméricas (films activos) y microorganismos estudiados en ensayos “in vitro”.

Matriz	g CIN/g polímero	Microorganismo	Referencia
PP ¹	0.02-0.06	<i>A. flavus</i>	(Manso et al.,2015)
		<i>A. niger</i>	
		<i>P. roqueforti</i>	
		<i>P.expansum</i>	
MC ²	0.08	<i>B. cereus</i>	(Sanla-Ead et al.,2012)
		<i>E. faecalis</i>	
		<i>L. monocytogenes</i>	
		<i>M. luteus</i>	
		<i>S. aureus</i>	
		<i>A. hydrophila</i>	
		<i>E.coli</i>	
		<i>E.coli O157: H7</i>	
		<i>P.aeruginosa</i>	
		<i>S. Enteritidis</i>	
		<i>C.albicans</i>	
<i>S.cerevisiae</i>			
<i>Z.rouxii</i>			
PLA ³	0.025	<i>E.coli W1485</i> <i>B. cereus</i>	(Makwana et al.,2014)
PLA ³	0.0008	<i>C. jejuni</i> <i>S. aureus</i>	(Ahmed et al.,2016)
PEC ⁴	1.19	<i>E.coli</i>	(Otoni et al.,2014)
		<i>S. enterica</i>	
		<i>L.monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	
CAS ⁵	0.068	<i>E. amstelodami</i> <i>P. commune</i>	(Souza et al.,2013)

¹ Polipropileno; ² Metilcelulosa ³ Ácido poliláctico; ⁴ Pectina; ⁵ Almidón de yuca

En términos de las matrices poliméricas utilizadas para el desarrollo de materiales activos para el envasado o recubrimiento de alimentos, los plásticos derivados del petróleo representan un grave problema medioambiental ya que la mayoría no son biodegradables y pueden llegar a permanecer en el medio de 100 a 450 años (Alvira et al., 2007). Por ello, para el desarrollo de estos materiales requiere atender a las necesidades del

consumidor en sus nuevos hábitos como son la alimentación libre de sustancias químicas sintéticas, y que sean fabricados de una manera sostenible. Esto ha generado interés por la investigación sobre el desarrollo de nuevos materiales activos biodegradables destinados a productos alimenticios y que pueden incrementar su vida útil. La incorporación de sustancias activas naturales como los aceites esenciales en films biodegradables constituye actualmente un medio alternativo para prevenir del deterioro de los alimentos principalmente por sus propiedades funcionales como son su capacidad antioxidante y antimicrobiana (Corrales et al., 2014; Lanciotti et al., 2004). En este sentido, tanto el almidón termoplástico como el ácido poliláctico (PLA) son biodegradables con buenas propiedades para el desarrollo de envases alimentarios. Los primeros presentan muy buenas propiedades barrera al oxígeno (Ortega-Toro et al. 2016) y los segundos muy buena barrera al vapor de agua (Muller et al., 2016). La formación de films bicapa de ambos polímeros permitiría obtener materiales para envasado de alimentos con propiedades barrera óptimas (Ortega-Toro et al., 2015). Además la incorporación de compuestos antimicrobianos en estos films, permitiría obtener films activos con propiedades adecuadas para alargar la vida útil de los alimentos.

TABLA 3. Cinamaldehído (CIN) incorporado en diferentes matrices poliméricas (films activos) y microorganismos estudiados en ensayos con distintos productos alimentarios.

Matriz	g inerte	CIN/g	Producto	Microorganismo	Referencia
ALG ¹	0.005		Puré de manzana	<i>E. coli</i> O157: H7	(Rojas-Graü et al., 2007)
GL ²	0.06-0.2		Pan y queso para untar	<i>A. flavus</i> <i>P. commune</i> <i>P. expansum</i> , <i>P. nalgiovense</i> <i>P. roqueforti</i>	(Balaguer et al., 2013)
PLA ³	1.5-45		Champiñón	Bacterias mesófilas y psicrófilas	(Qin et al., 2015)

¹ Alginato; ² Gliadina; ³ Ácido poliláctico

El objetivo del presente estudio consiste en analizar las propiedades antimicrobianas de films monocapa de PLA y films bicapa de almidón-PLA con CIN como compuesto activo contra una bacteria tipo GRAM+ (*E. coli*) y otra GRAM- (*Listeria innocua*), mediante ensayos in vitro, así como la capacidad de liberación del activo desde los films en diferentes simulantes alimentarios.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales

El PLA amorfo 4060D utilizado para obtener films por extensión fue suministrado por Natureworks (Natureworks, USA). El acetato de etilo se obtuvo de Indukern S.A. (Barcelona, España) y el trans-cinnamaldehído (CIN) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El almidón de yuca fue suministrado por Quimidroga S.A. (Barcelona, España) y el glicerol de Panreac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona, España). El nitrato de magnesio ($Mg(NO_3)_2$) usado para el acondicionamiento de la humedad relativa (HR) se obtuvo de Vidra Foc S.A. (Barcelona, España). Para la parte de cuantificación y cinética de liberación de CIN, se utilizaron metanol, etanol y ácido acético puros, calidad UV-IR-HPLC, de Panreac (Barcelona, España). El pentóxido de fósforo (P_2O_5) usado para general HR 0 secar los films también se compró a Panreac (Barcelona, España). Para el estudio microbiológico, se utilizaron *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101) de la Colección Española de cultivos tipo (CECT; Valencia, España) y los medios de cultivo: Tryptic Soy Broth (TSB), Trypcasein Soy Agar (TSA), agua de peptona (Buffered peptone Water ISO) fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

2.2 Obtención de los films

Se obtuvieron films monocapa (M) de PLA y almidón y films bicapa de ambos polímeros con (B-CIN) y sin CIN (B).

2.2.1 FILMS MONOCAPA DE PLA

Para la preparación de los films monocapa de PLA se empleó la técnica denominada de extensión y secado (casting), utilizando disoluciones de PLA amorfo en acetato de etilo al 10%. Se obtuvieron films con y sin CIN. Este se disolvió al 2.5 %, lo que supone una relación PLA: CIN de 10:2.5. En el film seco, la concentración nominal de CIN fue, por tanto, 20 g de CIN por 100 g de film. Las soluciones resultantes, en una cantidad equivalente 1.5 g, se vertieron en placas de teflón niveladas de 150 mm de diámetro (1.5 g/cm^2) y se evaporó el disolvente. Posteriormente se despegaron los films y se almacenaron en desecador con silicagel a 25°C hasta su utilización.

2.2.2 FILMS MONOCAPA DE ALMIDÓN

Los films monocapa de almidón de yuca (S) se obtuvieron por mezclado en fundido, mediante un equipo de rodillos de mezclado (Labtech engineering Co., Ltd., Samut Prakan, Tailandia) y moldeo por compresión mediante una prensa hidráulica de platos calientes (Labtech engineering Co., Ltd., Samut Prakan, Tailandia). Para ello el almidón se mezcló con el

glicerol (30 g/100 g de almidón) y agua (55 g/100 g de almidón). La mezcla se homogenizó manualmente y se termoprocesó en los rodillos a 160°C durante 20 min a 10 rpm para la obtención de almidón termoplástico. Este se acondicionó a 25°C en un desecador con una disolución sobresaturada de $Mg(NO_3)_2$ para conseguir una humedad relativa (HR) de 53%. A los 10 días, se prensaron 4 g de almidón termoplástico a 160°C para la obtención de los films. Las condiciones de termoprensado fueron: pre-calentamiento de 1 min, prensado de 2 min a 50 bares seguidos por 6 min a 120 bares y enfriamiento de 3 min hasta 70°C.

2.2.3. FILMS BICAPA DE ALMIDÓN-PLA

Los films bicapa de almidón-PLA (B) se obtuvieron mediante termocompresión. Se prensaron ambos films de almidón y PLA (con o sin CIN) durante 3 min a 160°C y 100 bares y se enfriaron durante 3 min hasta 70°C. De esta forma se obtuvieron las muestras bicapa con y sin activo incorporado en la capa de PLA. Estas últimas se utilizaron como films control.

2.3 Análisis microbiológico

L. innocua y *E. coli*, suplementados con glicerol al 30 %, se almacenaron en caldo TSB a una temperatura de congelación de -25°C. Para llevar a cabo la regeneración de cada cepa bacteriana, se descongelaron y revivieron en tubos de 10 mL de TSB durante 24 horas a 37°C. Para obtener el cultivo de trabajo (CT) se inocularon 10 μ l en tubos de 10 mL de TSB y se incubaron a 37°C otras 24 horas. Se realizó una dilución decimal del CT en 9 ml de agua de peptona estéril y se inocularon 100 μ L de CT diluido en placas Petri de 55 mm de diámetro con 10 g de TSA con el fin de obtener inóculos de 10^7 UFC/g. Posteriormente se recortaron círculos de films del mismo tamaño que las placas Petri, se desinfectaron bajo luz UV durante 15 min y se colocaron en las placas inoculadas durante 13 días a una temperatura de refrigeración de 10°C. Se analizaron también controles de inóculo (CI) sin film y controles con film sin activo (CF). Se realizó el recuento bacteriano de cada muestra por duplicado a los días 0, 2, 6, 9 y 13. Para ello se diluyeron 10 g de muestra en 90 mL de agua de peptona y se homogenizaron en un stomacher (IUL, España) durante 3 min. Se realizaron las diluciones seriadas necesarias y se inoculó 1 mL en placas Petri junto con 15 mL de TSA. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 h para recuento microbiano, que se realizó en las placas con un número de unidades formadoras de colonias (UFC) entre 30 y 300. En el caso del film bicapa (B), se analizó la actividad antibacteriana considerando el contacto de las dos caras del film con el medio de cultivo: el almidón (B-S) y el PLA (B-PLA), donde inicialmente se incorporó el activo. Todas las manipulaciones se realizaron en un ambiente estéril bajo campana de flujo laminar (Telstar, Bio II Advance, Barcelona, España).

2.4 Cuantificación de cinamaldehído en los films

Para llevar a cabo la determinación de cantidad de CIN extraíble de los films se realizó primero un estudio para conocer el tiempo de extracción total del activo. Para ello, se cortaron y se pesaron cuadrados de films por triplicado para cada formulación y se añadieron 100 mL de metanol. Estas disoluciones se mantuvieron en agitación constante y se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro UV visible (Thermo Scientific Evolution 201, EEUU) a las 6, 12 y 24 h, a una longitud de onda de 286 nm (máximo de absorción del CIN en metanol). Como blanco se utilizó metanol en contacto con los films controles sin activo, en las mismas condiciones que las muestras. Los tiempos de medición se establecieron hasta que no hubo cambios significativos en la absorbancia. Para determinar la concentración de CIN en el film, se utilizó una recta de calibrado obtenida de las medidas de absorbancia de disoluciones patrón de CIN.

Para cuantificar el CIN liberado al medio de cultivo, se realizó un ensayo paralelo en el que círculos de films se colocaron en contacto con el medio (placas Petri de 55 mm de diámetro con 10 g de TSA) sin inocular y se mantuvieron 13 días en las mismas condiciones que el cultivo (10°C). Los films se retiraron de las placas a los 2, 6, 9 y 13 días, se secaron en un desecador con P₂O₅ durante 3 días y se cuantificó el CIN retenido por procedimiento previamente descrito. En este caso, la extracción se realizó durante 24 h ya que es el tiempo en el que se determinó la extracción máxima.

2.5 Cinética de liberación del activo en simulantes alimentarios

Se analizó la cinética de liberación del activo desde los films en dos simulantes alimentarios polares: disoluciones acuosas de etanol (10%), simulante A, y ácido acético (3%), simulante B, según el Reglamento (UE) N° 10/2011. Para ello se cortaron y se pesaron muestras de films (unos 50 mg) y se añadieron 100 mL de cada simulante. Se midió la absorbancia de las disoluciones a lo largo del tiempo a una longitud de onda de 286 y 285 nm (máximos de absorción en cada simulante) para simulante A y B, respectivamente, mediante espectrofotometría. Se obtuvo también la correspondiente curva de calibrado en cada simulante. Los datos de masa de CIN liberada frente al tiempo se ajustaron al modelo de Peleg (1980) (ecuación 1), obteniendo las constantes K₁ (inversa de la velocidad inicial de liberación del activo) y K₂ (relacionada con el valor asintótico de la curva). El valor de la cantidad liberada en el equilibrio (m_∞) se dedujo de K₂ (ecuación 2).

$$m_t = m_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (1)$$

$$m_\infty = m_0 + \frac{1}{K_2} \quad (2)$$

Donde: m_t = masa de CIN liberado en un tiempo t (mg); m_0 = masa de CIN liberado a tiempo 0 (mg); K_1 = parámetro del modelo de Peleg (min/mg); K_2 = parámetro del modelo de Peleg (mg^{-1}).

2.6 Análisis estadístico

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de la concentración de CIN en los films activos mediante extracción con metanol (tabla 4), arrojó valores inferiores a los correspondientes a la cantidad incorporada en la capa de PLA (11.7 g en vez de 20 g/100g de film). Respecto a los valores teóricos, la extracción supuso un 58.5 y 45.5 %, respectivamente, para los films M y B. Sin embargo, la determinación del peso de los films de PLA no reflejó pérdidas notables respecto al peso esperado de la masa de disolución extendida en cada placa, lo que parece indicar que no hubo pérdidas significativas de CIN durante la etapa de evaporación del solvente. La concentración extraíble en el film bicapa es también inferior a la esperada desde el valor teórico (2.7 g en vez de 6 g/100g de film), siendo en este caso el % de extracción ligeramente inferior, lo que podría indicar pérdidas de CIN durante el proceso de termocompresión, bien por evaporación o bien por difusión junto a la fracción de polímero que fluye radialmente y que no se incorpora al film bicapa (material que sale de las placas de compresión). La extracción por defecto del CIN de los films parece indicar que una parte del activo está fuertemente ligada a la matriz polimérica, con lo que no es extraíble con metanol a pesar de que en ningún caso se superó el límite de solubilidad del CIN en metanol. No obstante, las interacciones CIN-polímero afectarán a su capacidad de liberación al medio y por tanto a su potencial antimicrobiano.

TABLA 4. Concentraciones (C) de CIN teórica y extraíble en los films monocapa (M) y bicapa (B).

Film	C teórica (g/100g film)	C extraíble (g/100g film)	% Extracción
M	20	11.7 \pm 0.8	58.5
B	6	2.7 \pm 0.2	45.5

3.1. Propiedades antimicrobianas de los films

La figura 1 presenta los recuentos microbianos para *E. coli* y *L. innocua* para las diferentes muestras y controles en función del tiempo de incubación.



En los films monocapa con CIN, aplicados en las placas con *E. coli*, se observó un periodo inicial de 6 días donde hubo un efecto bacteriostático del activo, en comparación con los controles, mientras que a partir de 6 días se observó efecto bactericida. Las monocapas de PLA sin CIN (CF) no tuvieron efecto inhibitor sobre el crecimiento de la bacteria (Fig.1a). En el caso de *L. innocua*, se observó inhibición del crecimiento de la bacteria durante los primeros 9 días, posteriormente, se obtuvieron recuentos muy similares a los de los controles (Fig.1b). Esto podría explicarse por la evaporación del activo o por la progresiva adaptación de la bacteria.

En el caso de los films bicapa se obtuvieron menores recuentos para las dos bacterias cuando la capa de almidón estuvo en contacto con el medio de cultivo, indicando la mayor difusión del activo a través de la capa de almidón. En el caso de *E. coli* se observó efecto bactericida a partir del primer recuento, acentuándose ligeramente con el tiempo cuando el contacto fue con la capa de almidón (muestra B-S); con la capa de PLA (muestra B-PLA), el efecto fue bacteriostático durante los 13 días controlados (Fig.1c). En el caso de *Listeria*, las bicapas ejercieron un papel bacteriostático por ambas caras de contacto (muestras B-S y B-PLA) hasta los 6 días; en el segundo periodo, el contacto con la cara de almidón ejerció cierto efecto bactericida, mientras que con la cara de PLA hubo crecimiento bacteriano, sin llegar en ningún caso a los niveles de los controles (Fig.1d). Los resultados ponen de manifiesto que los films bicapa poseen una mayor efectividad antibacteriana en comparación con los monocapas a pesar de que los bicapa contienen una menor concentración de CIN por unidad de masa del film, ya que solo la monocapa de PLA era portadora del activo. Por tanto, parece que la termocompresión provoca cambios estructurales en la matriz que favorecen la difusión del CIN al medio de cultivo, especialmente por la cara del almidón. En este sentido, al tratarse de un material hidrofílico, su hidratación en contacto con el medio podría favorecer la movilidad molecular y por tanto la difusión del CIN al medio.

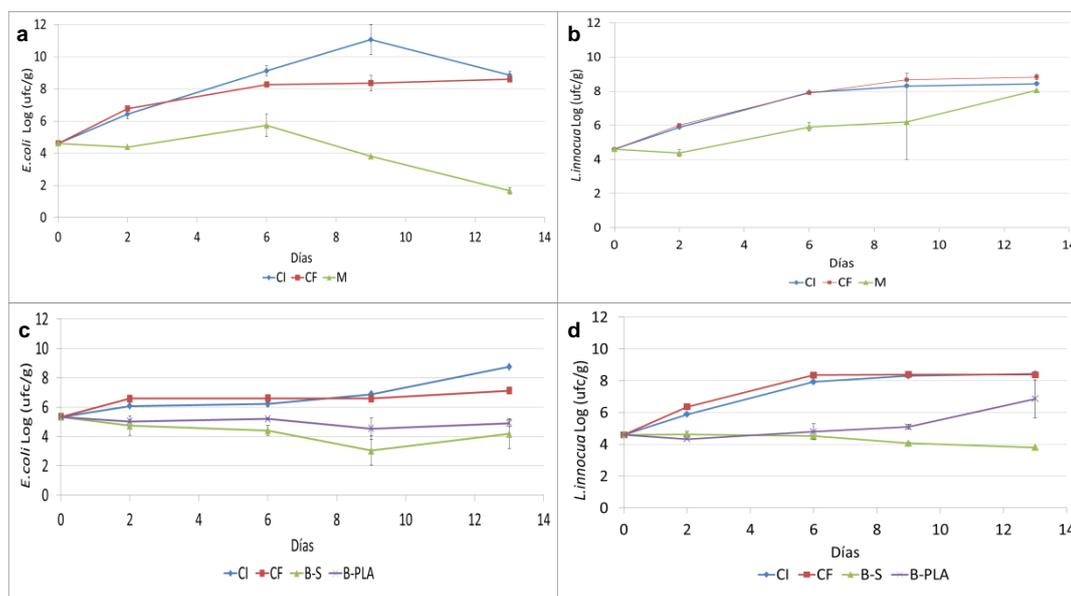


FIGURA 1. Crecimiento microbiano en función del tiempo para *E. coli* y *L. innocua* en las muestras con films monocapa (a y b) y bicapa (c y d) en comparación con sus respectivos controles (CF y CI). Para el film bicapa se dan los valores para el contacto con la cara de almidón (B-S) y de PLA (B-PLA).

Para evaluar la cantidad de CIN difundido al medio de cultivo y analizar su coherencia con los recuentos obtenidos, se extrajo la cantidad de CIN residual en el film después de un tiempo de contacto igual al de los recuentos. La figura 2 muestra las concentraciones efectivas de CIN en el medio de cultivo, determinadas a partir de la residual en el film en contacto y la correspondiente concentración inicial. En ese sentido, se ha considerado para los cálculos tanto los valores teóricos de concentración de CIN en el film como los determinados por extracción con metanol.

En todos los casos, la concentración de CIN estimada en el medio fue superior a la MIC tanto de *L. innocua* como de *E. coli*, cuando se consideraron las cantidades teóricas del activo, lo que es coherente con la actividad observada en los recuentos microbiológicos. Para los films bicapa, esta concentración estimada fue menor cuando el contacto fue con la capa de almidón, lo que no se corresponde con la actividad antimicrobiana observada. Los valores, en este caso, fueron incluso negativos cuando se consideró la concentración de CIN en base a la cantidad extraíble. En este sentido cabe señalar que el proceso de secado de los films tras el contacto con el medio pudo comportar pérdidas razonables del activo que se evapora por arrastre de vapor junto con el agua del film. Por otro lado la extractabilidad del activo antes y después del secado pudo cambiar de forma notable debido a cambios estructurales en la matriz. Por consiguiente, la concentración estimada de CIN en el medio para los films bicapa está sujeta a la incertidumbre asociada a los factores mencionados. En el caso de los films monocapa, los valores ofrecen mayor certidumbre y, en estos casos se

observa una ligera tendencia creciente de la concentración del activo con el tiempo, así como una leve disminución al tiempo final, probablemente debida a la evaporación del activo, lo que es coherente con el comportamiento antimicrobiano observado frente a *L.innocua* (descenso de la efectividad a tiempo final).

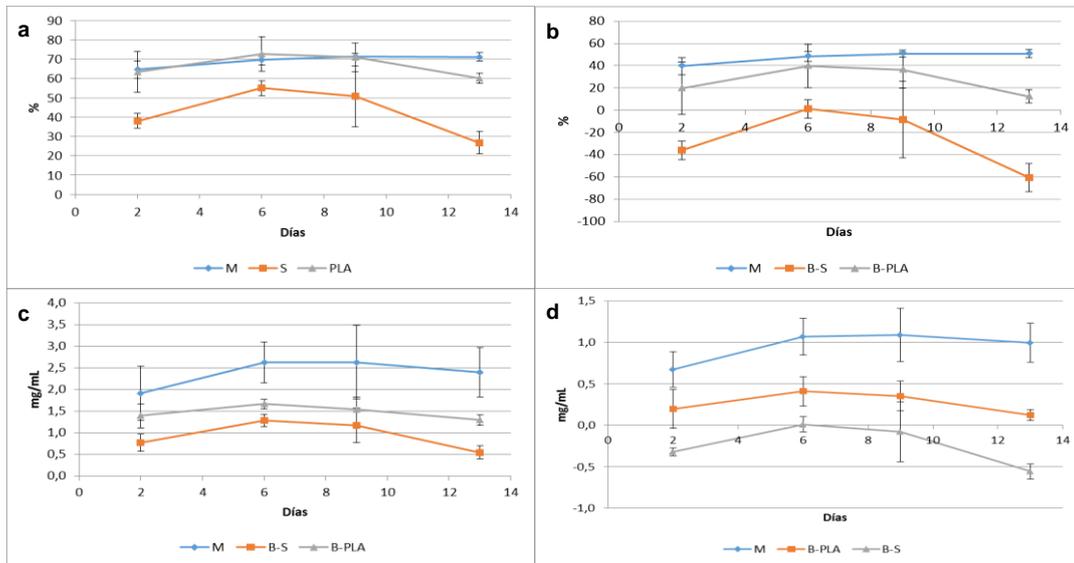


FIGURA 2. Concentraciones (mg/ml TSA) estimadas de CIN en el medio de cultivo en función del tiempo de incubación y porcentaje de liberación del CIN del film al medio. Valores referidos tanto a la concentración teórica (a y c) como a la determinada por extracción (b y d).

De los resultados obtenidos se concluye que los films de PLA con CIN son efectivos en el control antimicrobiano de *E. coli* y *L. innocua*, de forma sostenida en el tiempo, tanto en forma de monocapa como formando bicapas con almidón. En este último caso parece potenciarse su liberación, especialmente desde la capa de almidón. La combinación con almidón permitiría además potenciar el poder barrera de los film frente al oxígeno, mientras que la capa de PLA aporta buenas propiedades barrera al vapor de agua.

3.2 Cinética de liberación del cinamaldehído

Para un análisis más fiable de la cinética de liberación del activo, se analizó su liberación con el tiempo en dos simulantes alimentarios polares (simulando alimentos acuosos) con pH neutro (etanol al 10% en agua) y pH ácido (ácido acético al 3 % en agua). La figura 3 muestra la evolución con el tiempo de la cantidad de activo liberado en relación a la concentración máxima liberada en cada uno de los simulantes (valor de equilibrio). Este cociente se corresponde con los valores de $1-Y$ (Y : fuerza impulsora reducida del proceso de liberación) y por tanto varía entre 0 (tiempo inicial) y 1 (tiempo de final de equilibrio).

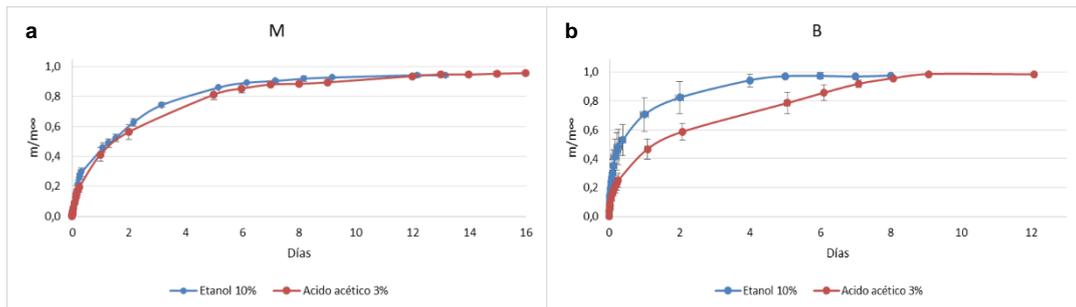


FIGURA 3. Evolución de la cantidad de CIN liberado con el tiempo para los films monocapa (a) y bicapa (b) en relación a la concentración máxima liberada en cada uno de los simulantes.

Puede observarse que los valores de equilibrio se alcanzan a tiempos largos de contacto (del orden de 8-16 días), dependiendo del simulante y del film. La liberación en los films bicapa es ligeramente más rápida que en los monocapa en medio neutro y en ambos films la velocidad de liberación es menor en el simulante ácido, aunque para las monocapas de PLA la diferencia es muy pequeña para ambos simulantes. Esto se refleja en la tabla 5 donde se dan las constantes del modelo de Peleg, así como el porcentaje de liberación máximo del activo en cada simulante referido, tanto a la concentración teórica de CIN en el film como a la cantidad extraíble en metanol. En relación a la cantidad teórica, los porcentajes de liberación máxima son ligeramente inferiores en el simulante ácido para ambos tipos de film, lo cual puede ser debido a la menor solubilidad del activo en este solvente, aunque en el caso de los films bicapa, la variabilidad es mayor y no existen diferencias significativas. En este caso, es destacable, el mayor retardo en la liberación del activo en el simulante ácido. Esto podría explicarse por la difusión del CIN hacia la capa de almidón durante la termocompresión, que lo va liberando más lentamente a medida que el polímero se disgrega en el medio acuoso.

TABLA 5. Parámetros del ajuste de Peleg a los datos de liberación en los simulantes A y B. Se incluye el porcentaje máximo de liberación del activo referido a la cantidad en el film (teórica y extraíble en metanol). Media \pm desviación estándar.

Film	Simulante	K_2 (mg^{-1})	K_1 (min/mg)	m_∞ (mg)	m_∞/m teórico	m_∞/m extraíble en metanol
M	A	0.199 ± 0.009^a	238 ± 28^a	5.0 ± 0.2^b	48 ± 1^a	83 ± 2^{ab}
	B	0.207 ± 0.004^a	257 ± 40^a	4.83 ± 0.09^b	45 ± 1^a	77 ± 2^a
B	A	0.671 ± 0.108^b	226 ± 32^a	1.5 ± 0.2^a	48 ± 7^a	113 ± 18^b
	B	0.8 ± 0.2^b	628 ± 89^b	1.3 ± 0.3^a	40 ± 8^a	95 ± 18^{ab}

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

CONCLUSIONES

La incorporación de CIN a films de PLA obtenidos por casting fue muy efectiva en términos de retención del compuesto activo, así como la obtención de films bicapa almidón-PLA. No obstante, la extracción del CIN de los films mono y bicapa con metanol rindió un menor contenido en activo respecto al incorporado, lo que parece indicar una fuerte retención del compuesto en la matriz polimérica y algunas pérdidas mediante la termocompresión de la bicapa. Todos los films con CIN fueron efectivos en el control antimicrobiano de *E. coli* y *L. innocua*. Los monocapa presentaron acción bacteriostática hasta seis días y bactericida a tiempos más largos frente a *E. coli* e inhibieron el crecimiento de *L. innocua*. Los films bicapa ejercieron un efecto bacteriostático frente a ambas bacterias, que fue más efectivo cuando el contacto fue por la cara de almidón. En todos los casos, las concentraciones de activo liberadas al medio de cultivo fueron superiores a las MICs de ambas bacterias. La cinética de liberación del activo en simulantes alimentarios acuosos neutros y ácidos reveló una velocidad de liberación sostenida en el tiempo, muy similar para ambos films en simulantes neutros, pero más lenta en medio ácido para el film bicapa con almidón. Esta lenta velocidad de liberación explica el prolongado efecto antimicrobiano de los films.

REFERENCIAS

- Ahmed, J., Hiremath, N. y Jacob, H. 2016. Antimicrobial, Rheological, and Thermal Properties of Plasticized Polylactide Films Incorporated with Essential Oils to Inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of food science*.
- Alvira, M.I. 2007. Los plásticos como residuos Antecedentes y Problemática Ambiental, Boletín Ambiental IDEA, Universidad Nacional de Colombia.
- Amalaradjou, M. A. R., Baskaran, S. A., Ramanathan, R., Johny, A. K., Charles, A. S., Valipe, S. R. y Venkitanarayanan, K. 2010. Enhancing the thermal destruction of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef patties by trans-cinnamaldehyde. *Food microbiology*, 27(6): 841-844.
- Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T. A. y Venkitanarayanan, K. 2009. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde. *International journal of food microbiology*, 129(2): 146-149.
- Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R. y Hernandez-Munoz, P. 2013. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International journal of food microbiology*, 166(3): 369-377.
- Bang, K. H., Lee, D. W., Park, H. M., & Rhee, Y. H. 2000. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(5), 1061-1063.
- Baskaran, S. A., Amalaradjou, M. A. R., Hoagland, T. y Venkitanarayanan, K. 2010. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International journal of food microbiology*, 141(1), 126-129.
- Corrales, M., Fernández, A., & Han, J. H. 201). Chapter 7: Antimicrobial packaging systems. *Innovations in Food Packaging*, 2nd ed.; Han, JH, Ed, 133-170

- Denyer, S. P. 1990. Mechanisms of action of biocides. *International Biodeterioration*, 26(2-4), 89-100.
- Feron, V. J., Til, H. P., De Vrijer, F., Woutersen, R. A., Cassee, F. R., & Van Bladeren, P. J. 1991. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3-4), 363-385.
- Goulter, R. M., Gentle, I. R., & Dykes, G. A. 2009. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in applied microbiology*, 49(1), 1-7.
- Hammer, K. A., & Heel, K. A. 2012. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International journal of antimicrobial agents*, 40(3), 239-245.
- Hernández-Herrero, L. A., Giner, M. J., & Valero, M. 2008. Effective chemical control of psychrotrophic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth. *Food microbiology*, 25(5): 714-721.
- Hua, H., Xing, F., Selvaraj, J. N., Wang, Y., Zhao, Y., Zhou, L. y Liu, Y. 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PloS one*, 9(9): e108285.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. y Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components.
- Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S. I., Baek, K. H., & Lee, J. 2015. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International journal of food microbiology*, 195: 30-39.
- Kwon, J. A., Yu, C. B., & Park, H. D. 2003. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in applied microbiology*, 37(1), 61-65.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in food science & technology*, 15(3), 201-208.
- Maffei, M., Camusso, W., & Sacco, S. 2001. Effect of *Mentha piperita* essential oil and monoterpenes on cucumber root membrane potential. *Phytochemistry*, 58(5), 703-707.
- Makwana, S., Choudhary, R., Dogra, N., Kohli, P. y Haddock, J. 2014. Nanoencapsulation and immobilization of cinnamaldehyde for developing antimicrobial food packaging material. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2): 470-476.
- Manso, S., Becerril, R., Nerin, C., & Gómez-Lus, R. 2015. Influence of pH and temperature variations on vapor phase action of an antifungal food packaging against five mold strains. *Food Control*, 47, 20-26.
- Mattson, T. E., Johny, A. K., Amalaradjou, M. A. R., More, K., Schreiber, D. T., Patel, J., & Venkitanarayanan, K. 2011. Inactivation of *Salmonella* spp. on tomatoes by plant molecules. *International journal of food microbiology*, 144(3): 464-468.
- Monu, E. A., Techathuvanan, C., Wallis, A., Critzer, F. J. y Davidson, P. M. 2016. Plant Essential Oils and Components on Growth of Spoilage Yeasts in Microbiological Media and a Model Salad Dressing. *Food Control*.
- Muller, J., Jiménez, A., González-Martínez, C., & Chiralt, A. 2016. Influence of plasticizers on thermal properties and crystallization behaviour of poly (lactic acid) films obtained by compression moulding. *Polymer International*
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Ortega-Toro, R., Collazo-Bigliardi, S., Talens, P., & Chiralt, A. 2016. Influence of citric acid on the properties and stability of starch-polycaprolactone based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2).
- Ortega-Toro, R.; Morey, I.; Talens, P.; Chiralt, A. 2015. Active bilayer films of thermoplastic starch and polycaprolactone obtained by compression molding. *Carbohydrate polymers*, 127, 282-290.

- Otoni, C. G., de Moura, M. R., Aouada, F. A., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Lorevice, M. V. y Mattoso, L. H. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids*, 41: 188-194.
- Palaniappan, K y Holley, R. A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology*, 140(2): 164-168.
- Patel, J., Sharma, M., & Ravishakar, S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of Escherichia coli O157: H7 on attachment to fresh produce surfaces. *Journal of applied microbiology*, 110(3), 737-745.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P. y Xu, J. 2009. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method. *Journal of food science*, 74(7): M379-M383.
- Periago, P. M., & Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus. *International journal of food microbiology*, 68(1), 141-148.
- Periago, P. M., Palop, A., & Fernandez, P. S. 2001. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of Bacillus cereus heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International*, 7(6), 487-492.
- Qin, Y., Liu, D., Wu, Y., Yuan, M., Li, L. y Yang, J. 2015. Effect of PLA/PCL/cinnamaldehyde antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biology and Technology*, 99: 73-79.
- Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17(5), 359-364.
- REGLAMENTO (UE) No 10/2011 DE LA COMISIÓN de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario oficial de la unión europea.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O. y 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.
- Romero-Gil, V., García-García, P., Garrido-Fernández, A. y Arroyo-López, F. N. 2016. Susceptibility and resistance of lactic acid bacteria and yeasts against preservatives with potential application in table olives. *Food Microbiology*, 54: 72-79.
- Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V., & Suppakul, P. 2012. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde and Eugenol and Their Activity after Incorporation into Cellulose-based Packaging Films. *Packaging Technology and Science*, 25(1): 7-17.
- Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., Lin, S., Xu, J., & Ye, H. 2015. Effects of cinnamaldehyde on Escherichia coli and Staphylococcus aureus membrane. *Food Control*, 47: 196-202.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V. y Tadini, C. C. 2013. Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2): 346-352.
- Sun, Q., Wang, L., Lu, Z., & Liu, Y. 2015. In vitro anti-aflatoxigenic effect and mode of action of cinnamaldehyde against aflatoxin B 1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104: 419-425.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. 2010. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 1.
- Ultee, A., Bennis, M. H. J., & Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.



Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J. y Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food microbiology*, 28(1): 149-157.

Wang, H; Yuan, H; Li, S; Li, Z. y Jiang, M. 2015. Synthesis, antimicrobial activity of Schiff base compounds of cinnamaldehyde and amino acids. *Bioorganic & medicinal chemistry letter*, 26: 809–813

Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X. y Liu, Y. 2014. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. *Food Control*, 46: 343-350.

Yamamoto-Ribeiro, M. M. G., Grespan, R., Kohiyama, C. Y., Ferreira, F. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., & Junior, M. M. 2013. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food chemistry*, 141(3), 3147-3152.

Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S., Yuan, Y. y Jones, G. S. 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food control*, 34 (2): 619-623.