

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

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



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**

**Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**ENCAPSULACIÓN DE CARVACROL EN POLIÁCIDO LÁCTICO POR  
ELECTROSPINNING**

**Curso 2018/2019**

**Alumna:** María Elisa Sáez Montesinos

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora experimental:** Alina Tampau

Junio de 2019, Valencia

# ENCAPSULACIÓN DE CARVACROL EN POLIÁCIDO LÁCTICO POR ELECTROSPINNING

**Valencia, Junio de 2019**

**Alumna:** María Elisa Sáez Montesinos

**Tutora:** Amparo Chiralt Boix

**Cotutora experimental:** Alina Tampau

## RESUMEN

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar materiales de envasado activo que permitan prolongar la vida útil de los alimentos para hacer frente a la pérdida de seguridad y calidad de los mismos, principales problemas a los que se enfrenta la industria alimentaria. La creciente preocupación de los consumidores por el medio ambiente y el consumo de productos naturales ha provocado que la investigación se haya orientado hacia los polímeros biodegradables y la utilización de agentes activos procedentes de compuestos naturales.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de encapsular carvacrol (CA), un demostrado compuesto antimicrobiano y antioxidante de origen natural, en matrices de políácido láctico (PLA) (poliéster biodegradable), utilizando la novedosa técnica de electrospinning, en comparación con el método tradicional de extensión y secado de la disolución polimérica (casting).

En la primera fase del estudio, se realizaron varios cribados de solventes y mezclas de solventes permitidos para uso alimentario, que aseguraran una electrodeposición ininterrumpida. Se seleccionaron las mezclas bisolvente acetato de etilo (AcEt): dimetilsulfóxido (DMSO), en proporciones 0:1; 1:3; 2:3 (v/v), por su mejor comportamiento.

En la segunda fase, se prepararon disoluciones de PLA 15 % (p/p) con y sin un 20 % de CA (con respecto al polímero) y se sometieron al electrospinning y al secado por casting. Los materiales obtenidos se caracterizaron en cuanto a su microestructura (por la técnica de FESEM), eficacia encapsulante del agente activo (por método espectrofotométrico) y análisis térmico (termogravimetría-TGA). El proceso de electrospinning fue menos efectivo que el método de casting, aunque permitió obtener una malla de fibras con contenidos de activo entre 10 y 13 % en peso respecto al polímero (inferior al 15-18 % obtenido para los films por casting). No obstante, la termoliberación del activo representó menos del 50 % del contenido encapsulado, lo que indica su fuerte retención en las fibras. La incorporación del AcEt supuso un incremento significativo de la eficacia encapsulante en las fibras (del 50 al casi 70 %). El diámetro de las fibras, en general, disminuyó en presencia de carvacrol y aumentó con la proporción de AcEt en la mezcla solvente.

Por todo lo citado anteriormente, se puede concluir que la aplicación por electrospinning de PLA disuelto en AcEt:DMSO permite la obtención de fibras con buena eficacia encapsulante del CA, para ser utilizadas como recubrimientos de materiales de envasado activo.

**PALABRAS CLAVE:** carvacrol, antimicrobiano, antioxidante, biopolímero, políácido láctico, electrospinning, casting, encapsulación.

## **ABSTRACT**

Nowadays there is a demand for developing active packaging materials, in order to extend foodstuffs shelf-life, cope with the loss of food safety and quality, main problems the food industry is facing. The growing concern of consumers about the environment and the consumption of natural products has led the research to being oriented towards biodegradable polymers and the use of active agents from natural compounds.

In this work, it was evaluated the ability to encapsulate carvacrol (CA), a proven antimicrobial and antioxidant compound of natural origin, in matrices of polylactic acid (PLA) (biodegradable polyester), using the new technique of electrospinning, in comparison with the traditional method of extension and drying of the polymeric solution (casting).

In the first phase, several screenings were carried out for different food-grade solvents and mixtures of solvents, which would ensure an uninterrupted electrodeposition. The mixtures of ethyl acetate (AcEt): dimethyl sulfoxide (DMSO) (in a ratio of 0: 1; 1: 3; 2: 3 v/v) were selected due to their better behavior. In the second phase, solutions of PLA 15 % (w/w) with and without 20 % CA (with respect to the polymer) were prepared and subjected to electrospinning and casting drying. The obtained materials were characterized in terms of their microstructure (by the FESEM technique), CA encapsulating efficacy (by spectrophotometric method) and thermal analysis (thermogravimetry-TGA).

The electrospinning process was less effective than the casting method, although it allowed obtaining a mesh of fibers with active contents between 10 and 13 % in weight with respect to the polymer (lower than 15-18 % obtained for casting films). However, the termoliberación of the active represented less than 50 % of the encapsulated content, which indicates its strong retention in the fibers. The incorporation of the AcEt supposed a significant increase of the encapsulation efficacy in the fibers (from 50 to almost 70 %). The diameter of the fibers, in general, decreased in the presence of CA and increased with the proportion of AcEt in the solvent mixture.

Based on the aforementioned results, it can be concluded that the electrospinning application of PLA dissolved in AcEt:DMSO allows the production of fibers with good CA encapsulation efficiency, that can be used as coatings for active packaging materials.

**KEYWORDS:** carvacrol, antimicrobial, antioxidant, biopolymer, polylactic acid, electrospinning, casting, encapsulation.

*Quisiera agradecer este trabajo a todas las personas que me han ayudado y apoyado durante estos años y han hecho posible que haya llegado hasta aquí, así como a la asociación ACTA Valencia por otorgarme uno de los premios ACTA-CTA el curso pasado.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
3.1. MATERIALES .....	4
3.2. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES.....	4
3.2.1. Elección de la concentración de polímero .....	4
3.2.2. Elección del sistema solvente .....	5
3.3. PROCESO DE <i>ELECTROSPINNING</i> .....	7
3.4. PROCESO DE CASTING.....	7
3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS.....	7
3.5.1. Microestructura .....	7
3.5.2. Eficacia encapsulante de carvacrol .....	7
3.5.3. Análisis térmico.....	8
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
4.1. ELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLÍMERO Y DEL SISTEMA SOLVENTE .....	9
4.2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MATERIALES OBTENIDOS POR ES.....	14
4.3. LA EFICACIA ENCAPSULANTE .....	17
4.4. ANÁLISIS TÉRMICO.....	17
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>21</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Propiedades de los solventes empleados:  $T_e$ -temperatura de ebullición;  $\sigma$ -tensión superficial;  $\epsilon$ -constante dieléctrica (Smallwood, 1996).

**Tabla 2.** Observaciones del comportamiento de disoluciones con diferentes concentraciones poliméricas en acetato de etilo durante electrospinning.

**Tabla 3.** Observaciones del comportamiento durante electrospinning de las disoluciones con 15 % PLA en diferentes sistemas solventes y parámetros de proceso.

**Tabla 4.** Parámetros de proceso y observaciones microscópicas del material obtenido durante ES de las disoluciones con 15 % PLA en diferentes sistemas solventes.

**Tabla 5.** Diámetros de las fibras obtenidas por ES. Las letras (a, b, c) y los números (1, 2) en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la misma fila y la misma columna respectivamente.

**Tabla 6.** Valores de la eficacia encapsulante expresados como % de CA encapsulado respecto al teórico y en gramos de CA retenido por gramo de polímero, en las fibras electrodepositadas y en las películas obtenidas por casting. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras.

**Tabla 7.** Temperaturas de degradación térmica ( $T_o$  - T a cuál comienza la degradación,  $T_p$  - T de máxima velocidad de degradación), fracción de masa termoliberada en la primera etapa (M) y diferencia calculada entre la cantidad de CA cuantificada por extracción y la masa perdida por termo-liberación ( $\Delta m$ ). Las letras en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las formulaciones con o sin carvacrol en las respectivas columnas.

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura química de la molécula de carvacrol.

**Figura 2.** Diagrama esquemático del funcionamiento de un equipo horizontal de electrospinning. (Bhardwaj y Kundu, 2010).

**Figura 3.** Tabla de miscibilidad de algunos solventes orgánicos. Las zonas sombreadas en verde indican la miscibilidad del acetato de etilo con los solventes elegidos. Fuente: <http://scharlab.com/tabla-reactivos-mezclabilidad.php>

**Figura 4.** Recta patrón de carvacrol en etanol absoluto, concentración de carvacrol expresada como función de la absorbancia obtenida a 275 nm.

**Figura 5.** Micrográficas FESEM del material electrodepositado, con y sin carvacrol. Magnificaciones de 1500x y 10000x.

**Figura 6.** Termogramas TGA del material encapsulante de carvacrol (PLA+CA) o no (PLA), obtenido por electrospinning (líneas discontinuas) y casting (líneas continuas).

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

- CA: carvacrol
- PLA: poliácido láctico
- ES: electrospinning
- C: casting
- AcEt: acetato de etilo
- DMSO: dimetilsulfóxido
- AAG: ácido acético glacial
- AcBut: acetato de butilo
- EtOH: etanol
- TGA: análisis termogravimétrico
- EE: eficacia encapsulante
- FESEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la pérdida de seguridad y de calidad organoléptica y nutritiva de los alimentos son los problemas que más preocupan a la industria alimentaria. Los alimentos se deterioran con el paso del tiempo principalmente por tres razones: la acción de organismos vivos, la acción físico-química del entorno y la acción biológica del propio alimento. Entre las medidas que se han tomado para evitar o minimizar los efectos adversos causados por los factores anteriormente citados se encuentra el envasado (Catalá y Guevara, 2001).

Tradicionalmente las funciones de los envases alimentarios eran la protección, comunicación, contención y seguridad en el transporte. Sin embargo, últimamente la innovación en envasado de alimentos se ha dirigido hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que aporten un beneficio extra. Entre estas recientes tecnologías, encontramos los llamados envases activos e inteligentes (Martínez y López, 2011).

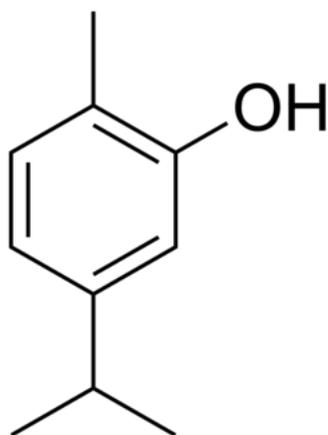
De acuerdo con el Reglamento (CE) No. 450/2009 (EU, 2009) un material de envasado activo se define como aquel destinado a prolongar la vida útil o mantener o mejorar el estado del alimento envasado y está diseñados para incorporar intencionadamente componentes que interaccionarán con el alimento o su entorno. Por otra parte, el mismo Reglamento define un material de envasado inteligente como aquel que controla el estado de los alimentos o de su entorno. Los envases activos pueden obtenerse a partir de dos formas distintas: mediante la introducción del elemento activo dentro del envase junto con el producto o mediante la introducción del agente activo en el propio material de envasado. Esta segunda opción sería la más atractiva para el consumidor ya que no encontraría dentro del envase nada extraño que le llamara la atención o le hiciera dudar de la calidad sanitaria del alimento, es por ello por lo que en la última década ha sido la más estudiada (Catalá y Guevara, 2001).

En los últimos años se ha observado una creciente preocupación del consumidor por su salud y por el consumo de alimentos lo más naturales posible, prueba de ello es el incremento en la demanda de alimentos con el sello de orgánico o ecológico (Innova Markets, 2016).

Por esta razón, la utilización de compuestos naturales procedentes de plantas como agentes activos en la obtención de materiales de envasado activo para alimentos sería una opción muy interesante. Entre estos compuestos, se encuentran algunos componentes presentes en los aceites esenciales naturales de plantas, los cuales han sido estudiados y se ha demostrado su capacidad antimicrobiana y antioxidante (Majeed *et al.*, 2015). Además, cabe destacar que la mayoría de estos aceites esenciales han sido clasificados como *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Sin embargo, estos aceites son inestables y sensibles a la degradación cuando son expuestos a diferentes agentes ambientales como el oxígeno, la luz o las altas temperaturas por ello una manera de preservarlos es mediante su encapsulación química, física o mecánica (Majeed *et al.*, 2015). Dentro de estos componentes naturales con actividad antimicrobiana y antioxidante se encuentra el carvacrol (CA) que es un fenol monoterpenoide presente en los aceites esenciales de plantas como el orégano y el tomillo (De Vicenzi *et al.*, 2004). Este compuesto ha sido reconocido por la EFSA (2012) como saborizante alimentario por ello es uno de los compuestos más utilizados como agente activo (Higueras *et al.*, 2014).

La actividad antimicrobiana del carvacrol ha sido estudiada frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphilococcus aureus* y *Bacillus subtilis*;

levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y hongos como *Botrytis cinerea* obteniéndose como resultado la inhibición del crecimiento de dichos microorganismos (Ben Arfa *et al.*, 2006). Además, se ha concluido que esta capacidad del carvacrol está directamente relacionada con su estructura química (Ultee *et al.*, 2002), pues la presencia de un grupo hidroxilo (**Figura 1**) le otorga una adecuada hidrofobicidad que actúa desintegramiento la membrana de los microorganismos (García-García *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura química de la molécula de carvacrol.

Por otra parte, la actividad antioxidante del compuesto fue demostrada exitosamente mediante test de screening en placas de TLC a las cuales se les había añadido  $\beta$ -caroteno (Lagouri *et al.*, 1992).

Sin embargo, este compuesto también presenta algunos problemas que se deben solventar para su correcta utilización en materiales de envasado activo. Entre ellos destaca su elevada volatilidad (Gorostiague, 2016) y su escasa solubilidad en agua (1250 mg/L, Yalkowsky, He & Jain, 2010.) Además, ha sido demostrado que tiene un elevado impacto sensorial, es decir, está asociado a sabores que alteran el gusto de los alimentos en los que se aplica (Hsieh *et al.*, 2001).

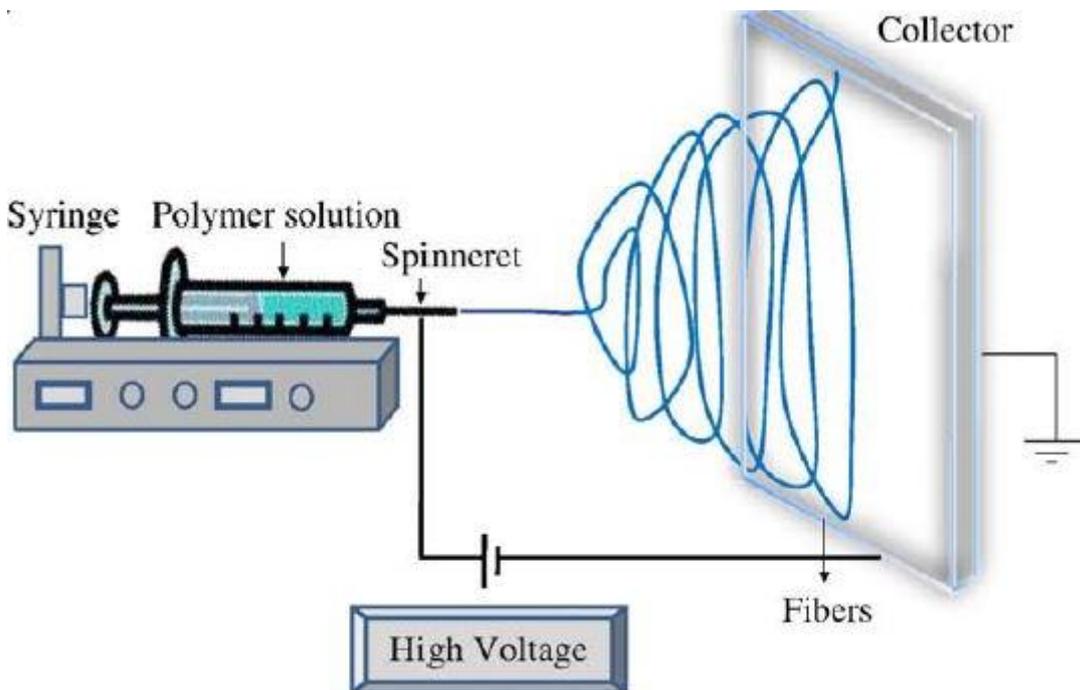
Una forma de mitigar estos efectos es mediante la encapsulación del carvacrol en una matriz polimérica, lo que permite, además, la protección del compuesto, su liberación controlada y una mejora en sus funciones biológicas (Majeed *et al.*, 2015).

Siguiendo en la línea de la preocupación de los consumidores por los productos naturales y la creciente inquietud de la población por la protección y cuidado del medio ambiente (García, 2004), la utilización de polímeros biodegradables como material polimérico en el envasado activo de alimentos es una opción muy interesante. Esta es la razón de la utilización del poliácido láctico (PLA) en la investigación. Este es un poliéster biodegradable cuyo precursor es el ácido láctico, que se puede obtener por vía química o biotecnológica mediante la fermentación microbiana de sustratos con elevado contenido en carbohidratos (Serna *et al.*, 2005).

Para la obtención de envases activos, una estrategia consiste en la extensión de una capa polimérica con el activo sobre el material de envasado lo que permitiría obtener materiales multicapa con funcionalidades complementarias. Una técnica usualmente empleada en la elaboración de films multicapa es la extensión de la disolución polimérica sobre el otro material de envasado y la posterior evaporación del disolvente (*casting*) (Rhim *et al.*, 2005) generando un nuevo film sobre la capa en la que se extiende. Con esta técnica se favorecen las interacciones polímero-agente activo en la fase disolución y puede conllevar una alta retención del mismo (Muller *et al.*, 2017).

No obstante, la utilización de esta técnica a nivel industrial supone la evaporación de grandes cantidades de disolvente.

Una técnica alternativa para la obtención de materiales multicapa es el electrospinning (ES). Ésta permite la formación de fibras o partículas capaces de encapsular un compuesto activo en una malla polimérica sobre el material donde se deposita. La técnica de ES utiliza las fuerzas electrostáticas para producir el estirado de la disolución a la vez que se evapora el disolvente, produciendo fibras de diámetro nano y micrométrico a partir de disoluciones poliméricas (Bhardwaj y Kundu, 2010). El equipo utilizado en el proceso de electrospinning se esquematiza en la **Figura 2**. Éste consta de tres elementos principales: un inyector biaxial con agujas metálicas, conectado a una jeringa (Luer Lok, BD Plastik) que contiene la muestra a electrodepositar, un generador de campo eléctrico y un colector. Cuando se inyecta a través de la aguja una solución polimérica, bajo la acción del campo eléctrico se estira la gota de disolución en la punta del inyector hasta que se genera una formación llamada “cono de Taylor”, momento en cual las fuerzas de repulsión electrostática inducidas por el campo eléctrico en el seno de la muestra están en equilibrio con la tensión superficial de la misma. Al aumentar el voltaje, esas fuerzas vencen a la tensión superficial y un chorro muy fino de líquido es expulsado hacia el colector. Durante su trayecto en el espacio aguja-colector, el solvente del chorro de muestra se evapora progresivamente debido a la gran superficie de contacto con el aire llegando al colector el material electroestirado seco. Con esta técnica se obtienen mallas poliméricas de elevada relación área superficial/volumen y con un tamaño de poro muy pequeño (Liang *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Diagrama esquemático del funcionamiento de un equipo horizontal de electrospinning. (Bhardwaj y Kundu, 2010).

La posibilidad de utilizar el electrospinning en producciones a gran escala combinada con la simplicidad del proceso hacen que esta técnica sea muy interesante en multitud de aplicaciones (Agarwal *et al.*, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

El presente trabajo tiene como objetivo la encapsulación de carvacrol en matrices de PLA amorfo, empleando la técnica del electrospinning y la caracterización del material en cuanto a su eficacia encapsulante y a su estructura, en comparación con la encapsulación obtenida en películas producidas por casting de disoluciones de la misma composición.

### **2.2. Objetivos específicos**

Con el fin de alcanzar el objetivo general del trabajo se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Encontrar el sistema solvente o bisolvente de grado alimentario (“food-grade”) que se adecue al proceso, es decir, aquel que sea capaz de disolver tanto al polímero como al compuesto activo y que permita la obtención de fibras electroestiradas en densidad y características morfológicas adecuadas.
- Determinar la concentración de polímero y de agente activo a utilizar para obtener un buen rendimiento del proceso de ES.
- Evaluar la eficacia del equipo en flujo biaxial, utilizando solvente puro en el inyector externo para prevenir la evaporación del solvente en la punta del inyector.
- Ajustar las condiciones de proceso (voltaje, caudal y distancia “D” aguja-colector) del equipo de electrospinning para conseguir una deposición continua de fibras.
- Comparar la eficacia encapsulante de la técnica ES con la de casting una vez optimizada la composición de la disolución polimérica

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Materiales**

El políácido láctico amorfo (PLA) 4060D, con una densidad de 1,24 g/cm<sup>3</sup>, se obtuvo de NatureWorks (Minnesota, EEUU) mientras que el carvacrol (CA) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). En cuanto a los solventes utilizados: el dimetilsulfóxido (DMSO), el ácido acético glacial (AAG) y el etanol absoluto se compraron a Panreac Química S.L.U. (Castellar del Vallès, Barcelona, España); el acetato de butilo (AcBut) se adquirió de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y el acetato de etilo (AcEt) de Indukern (El Prat de Llobregat, Barcelona, España).

### **3.2. Preparación de formulaciones**

#### **3.2.1. Selección de la concentración de polímero**

En principio se pretendía utilizar la mayor concentración posible de polímero (de al menos 15 %, como previamente había sido utilizado por Tampau *et al.* (2017)) para asegurar una alta deposición de sólidos por unidad de tiempo. Para ello, se utilizó como disolvente único el acetato de etilo, que ha sido empleado exitosamente por otros autores (Muller *et al.*, 2017). Se realizaron soluciones con PLA a 15 % y 20 % (p/p) que se pasaron por el equipo de ES y se observó su comportamiento.

### 3.2.2. Selección del sistema solvente

En base a los resultados obtenidos para el punto anterior, se pudo observar que la alta volatilidad del AcEt (punto de ebullición 77 °C), limitaba el electrospunado sostenido de la disolución por largo tiempo por lo que se procedió a considerar un cosolvente que aumentara el punto de ebullición del sistema. La elección de este se hizo en base a la miscibilidad con el AcEt, usando la tabla de miscibilidad presentada en la **Figura 3**. Las propiedades de los solventes elegidos, relevantes para la aplicación por electrospinning, se dan en la **Tabla 1**. Como primer cosolvente se eligió el AAG, debido a su mayor punto de ebullición con respecto al AcEt, buen solvente del polímero (valor del parámetro  $[\chi]$  de Flory-Huggins  $< 0,5$ , según Casasola *et al.*, 2016), previamente utilizado por Tampau *et al.* (2017) para el electrospunado de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL). De esta manera, se prepararon disoluciones utilizando PLA al 15 % (p/p) y sistemas solventes AcEt:AAG (0:1), AcEt:AAG (1:1), AcEt:AAG (2:1) y AcEt:AAG (4:1) (v/v). En base a las observaciones efectuadas en este paso, se amplió el rango de los solventes adicionales, probando los siguientes sistemas: AcEt:AcBut (0:1), AcEt:AcBut (1:1), AcEt:DMSO (0:1), AcEt:DMSO (1:1), AcEt:DMSO (1:3) y AcEt:DMSO (2:3) (v/v). Algunas condiciones del proceso de ES se mantuvieron constantes: distancia "D" 15 cm y el caudal de 1 mL/h, ajustando para cada caso el voltaje con el fin de obtener una aplicación lo más continua posible.



### **3.3. Proceso de *electrospinning***

Los sistemas solventes seleccionados en los pasos anteriores se utilizaron para generar por ES material encapsulante de carvacrol, que se añadió al 20 % (p/p) con respecto al polímero. El electroestirado de las soluciones poliméricas se llevó a cabo en condiciones ambientales (25 °C, 45 % HR) en el equipo Fluidnatek de la casa comercial Bioinicia SA (Valencia, España). Para cada sistema solvente utilizado se ajustaron empíricamente los parámetros de proceso (caudal, distancia inyector-colector y voltaje) para conseguir que en la punta de la aguja se formara el “cono de Taylor” estable, con el fin de asegurar un electroestiramiento sostenido.

Además, se realizaron experimentos en sistema mono y biaxial. En el caso de emplear el sistema biaxial, por la aguja externa se hizo fluir solo el solvente utilizado en la disolución. De este modo se consigue mantener húmeda la gota en la punta del inyector durante más tiempo. El caudal de solvente empleado se fue modificando para conseguir los resultados más adecuados.

Aquellas disoluciones que se eligieron durante las etapas de cribado, fueron electrodepositadas durante 1 hora, a un caudal de 1,0 mL/h, colectándose el material sobre hojas de papel de aluminio (previamente pesadas) fijadas en el colector colocado a 20 cm. El voltaje se ajustó dependiendo de la solución empleada trabajando entre 13,5 y 15 kV. El material obtenido se conservó en desecadores a vacío con pellets de gel de sílice para favorecer el secado y evitar la humectación. De cada formulación se realizaron tres repeticiones y el material se caracterizó como se describe a continuación en el apartado 3.5.

### **3.4. Proceso de casting**

Para la obtención de films por el método de casting se emplearon las mismas disoluciones utilizadas por ES, seleccionadas tras el estudio inicial. Éstas, se extendieron sobre placas de teflón de 15 cm de diámetro, para obtener una densidad superficial de  $5,6 \cdot 10^{-3}$  g polímero /cm<sup>2</sup> y se colocaron en una cabina para favorecer su secado. Debido al alto punto de ebullición del DMSO, las películas separadas de las placas se sometieron a un secado adicional en desecador a vacío dentro del cual se mantuvieron hasta su caracterización.

### **3.5. Caracterización de los materiales obtenidos**

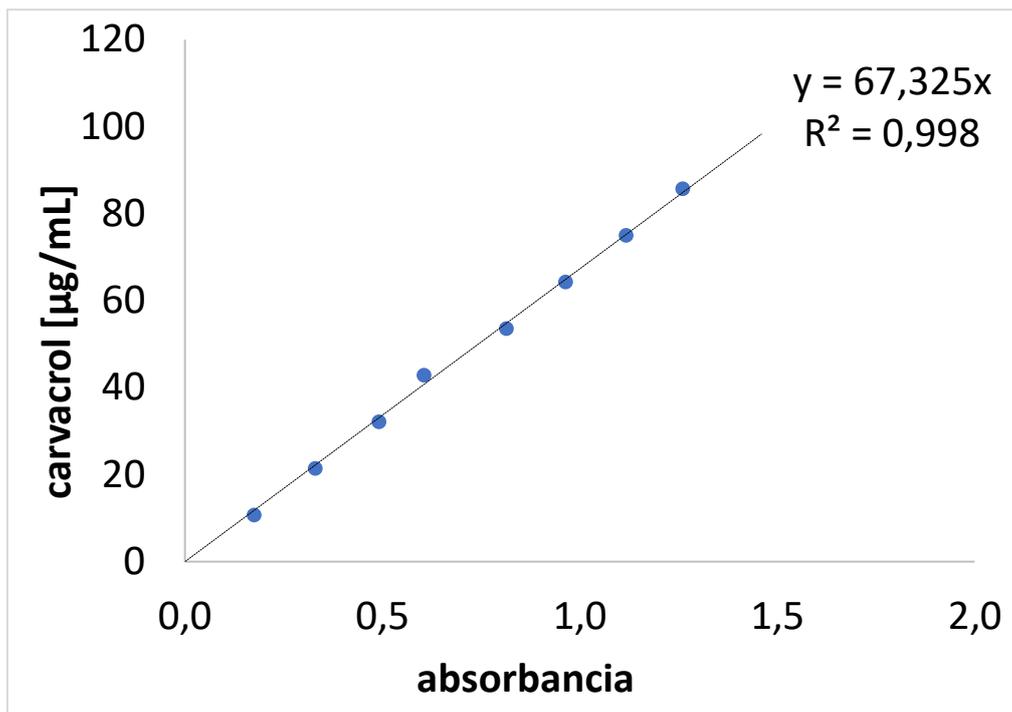
#### **3.5.1. Microestructura**

La observación de las estructuras obtenidas se realizó con un equipo de Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM Ultra 55, Zeiss, Oxford, UK). Las muestras se montaron en cinta de carbono sobre los soportes adecuados, y se recubrieron a vacío con platino, para posteriormente ser observadas utilizando un voltaje de aceleración de 1 kV. Para el análisis de las imágenes obtenidas se empleó el programa ImageJ software (National Institutes of Health, USA). Se realizaron 10 medidas por formulación.

#### **3.5.2. Eficacia encapsulante de carvacrol**

Para evaluar el contenido en carvacrol retenido por las matrices, se usó una recta patrón del CA en etanol absoluto. Para ello, partiendo de una disolución madre con una concentración en carvacrol de 0,5 g/L, se prepararon diluciones desde 10 mg CA/L hasta 85 mg CA/L y se les midió la absorbancia a 275 nm, usando cubetas de cuarzo de 10 mm. La ecuación de la recta que se obtuvo es:

$$\text{Concentración} = \text{Absorbancia} \times 67,325 \quad (R^2 = 0,998)$$



**Figura 4.** Recta patrón de carvacrol en etanol absoluto, concentración de carvacrol expresada como función de la absorbancia obtenida a 275 nm.

Posteriormente, se procedió a la medida de la eficacia encapsulante (EE%) de los materiales obtenidos por casting (films) y por electrospinning (fibras). En el caso de los films, se pesaron aproximadamente 3 mg de cada muestra, que se introdujeron en un vial color ámbar junto a 15 ml de etanol absoluto (EtOH), y se mantuvo en agitación durante 24 horas, después de lo cual se realizó la medida de la absorbancia. En cuanto a las fibras depositadas sobre hojas de papel de aluminio de masa conocida, se pesaron y se dividieron en trozos pequeños que se introdujeron en un matraz aforado junto con 100 mL de EtOH, manteniéndose en agitación durante 24 horas. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 de la cual se midió la absorbancia a 275 nm. En ambos casos se utilizó como blanco para la medida espectrofotométrica el extracto en EtOH de las respectivas matrices sin carvacrol.

### 3.5.3. Análisis térmico

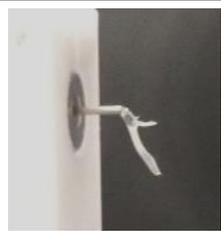
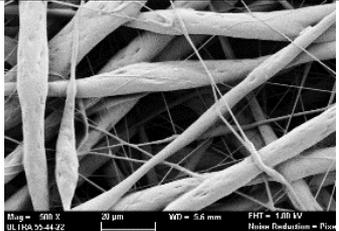
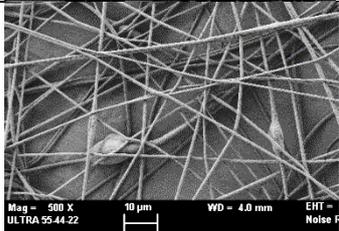
Las muestras obtenidas por casting y ES se analizaron también en su comportamiento térmico mediante termogravimetría. Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) para evaluar la degradación térmica del material electroestirado. El equipo empleado para ello fue el TGA/SDTA 851e (Mettler-Toledo, Suiza). Una cantidad de muestra (aprox. 10 mg) se introdujo en un crisol de alúmina (capacidad total 70 µL) previamente tarado en el equipo. El crisol se calentó a una velocidad de 10 K/min desde 25 °C hasta 700 °C en una atmósfera inerte de nitrógeno (flujo 20 mL/min). Para cada curva de degradación termogravimétrica se obtuvo su primera derivada para destacar los picos de pérdida de peso correspondientes a la pérdida o degradación de cada componente. Se registraron las temperaturas de degradación ( $T_p$ ) de los picos obtenidos y las pérdidas relativas de masas en cada uno. El análisis térmico de las muestras se realizó por triplicado.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Elección de la concentración de polímero y del sistema solvente

En esta primera fase se evaluó el comportamiento y el aspecto de los materiales generados a partir de las disoluciones de PLA a diferente concentración en acetato de etilo. El procesado de la disolución más concentrada (20 %) se vio dificultada por el bombeado defectuoso y el secado muy rápido que se produjo en la punta de la aguja, generando una geometría que no sostenía la electroaplicación (**Tabla 2**). La disolución con 15 % de PLA tampoco se pudo procesar durante más de 10 min sin solidificación en la punta de la aguja. No obstante, se observó que, a mayor concentración de PLA, mayores fueron los diámetros de las fibras obtenidas, disminuyendo la superficie específica de la estructura a través de la cual se produciría la liberación del activo. De este estudio inicial, se eligió la concentración de 15 % (p/p) para el polímero, a fin de generar fibras homogéneas y delgadas, en el rango sub-micrométrico.

**Tabla 2.** Observaciones del comportamiento de disoluciones con diferentes concentraciones poliméricas en acetato de etilo durante electrospinning.

PLA % (p/p)	Parámetros electrospinning			Forma de la gota visualmente seca	Micrografías FESEM del material electrodepositado (500x aumento)
	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Tiempo ES* (min)		
20,0	15	10,0	<10		
15,0	15	10,0	~10		

\* hasta observar visualmente la solidificación de la gota

Una vez fijada la concentración del PLA, se procedió a utilizar las disoluciones con los diferentes sistemas solventes mencionados en el apartado **3.2.2**. Se pasaron por el equipo de ES y se comparó su comportamiento durante el proceso, siendo el principal objetivo mantener el electroestirado durante el máximo tiempo posible. En esta etapa, se utilizó la aplicación también monoaxial y biaxial. Se pudo observar que los sistemas que utilizaban como solvente el DMSO permitían una duración del proceso mucho mayor que con el resto de los solventes, sin solidificación en la punta del inyector. Sin embargo, el material electroestirado no quedó completamente libre de disolvente una vez finalizado el proceso, aspecto que se mejoró con la utilización del DMSO en un sistema bisolvente con AcEt. Las **Tablas 3 y 4** resumen las observaciones efectuadas para las distintas condiciones de operación, así como las características microestructurales de las fibras obtenidas. Cabe destacar la diferente morfología del material obtenido para las diferentes condiciones de operación (**Figura 4**). En la mayor parte de los casos se obtuvieron fibras con algunas formaciones de gotas elongadas,

dependiendo del solvente y condiciones del proceso. Las muestras obtenidas con flujo co-axial con el solvente, presentaron menor formación de fibras con mayor proporción de gotas, e incluso en el caso del AcEt:DMSO 1:1, la muestra fue muy compacta. Así mismo, es mencionable el hecho de que las disoluciones de AcEt:AAG y AcEt:AcBut presentaron un aspecto opalescente, lo cual indicó una disolución parcial del polímero, por lo que quedaron descartadas para su utilización. Por tanto, en base a la morfología del material y al tiempo de procesabilidad se escogieron las mezclas AcEt:DMSO en sus diferentes proporciones (0:1, 1:3 y 2:3) como solventes de procesamiento en flujo monoaxial, una distancia de 20 cm entre el inyector y el colector y con el voltaje ajustado para conseguir una aplicación estable (entre 14 y 18 kV, dependiendo del solvente).

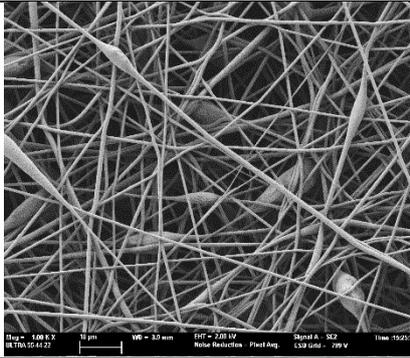
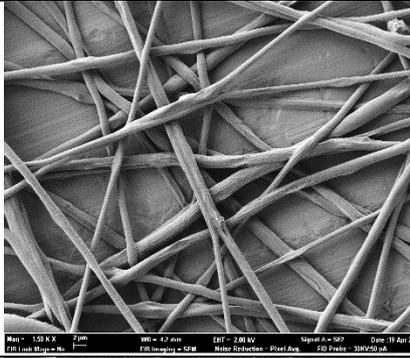
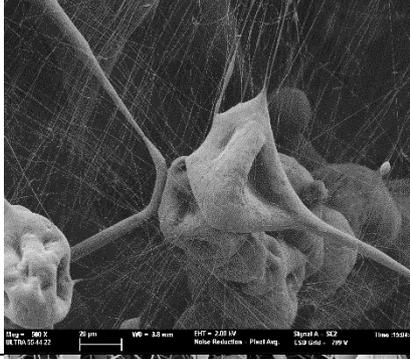
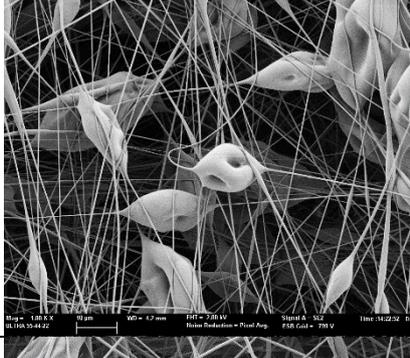
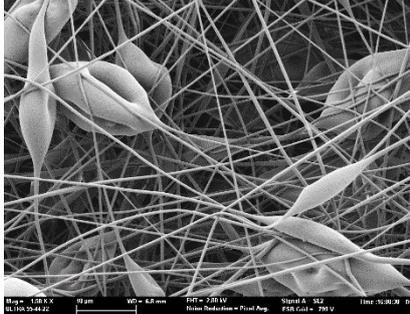
**Tabla 3.** Observaciones del comportamiento durante electrospinning de las disoluciones con 15 % PLA en diferentes sistemas solventes y parámetros de proceso.

Proporción solventes (v/v)				Caudal ( $\mu\text{L/h}$ )		Distancia (cm)	Voltaje (KV)	Tiempo* (min)	Observaciones
AcEt	DMSO	AAG	AcBut	Interior (D int.) disolución	Exterior (D ext.) solvente				
0	1	0	0	1000	0	15	14.6	>60	El material obtenido no queda libre de solvente.
0	1	0	0	1200	0	20	15.7	>60	
0	1	0	0	1000	15	20	14.8	>60	
1	1	0	0	1000	0	15	17	22.5	El cono Taylor se solidifica parcialmente.
1	1	0	0	1000	25	15	13.5	25	
1	1	0	0	1000	0	20	15.0	25	
2	3	0	0	1000	0	20	16	>60	
1	3	0	0	1000	0	15	14.6	40	
1	0	0	1	1100	0	15	12	~10	El cono Taylor se solidifica rápidamente.
1	0	1	0	1200	0	15	12	12.5	El material depositado sobre el colector tiene aspecto macroscópico granular.
1	0	1	0	1100	100	15	11	20	El cono de Taylor empieza a secarse en la parte inferior, empujando el chorro hacia arriba, modificando el campo de aplicación

\* hasta observar visualmente la solidificación del cono Taylor

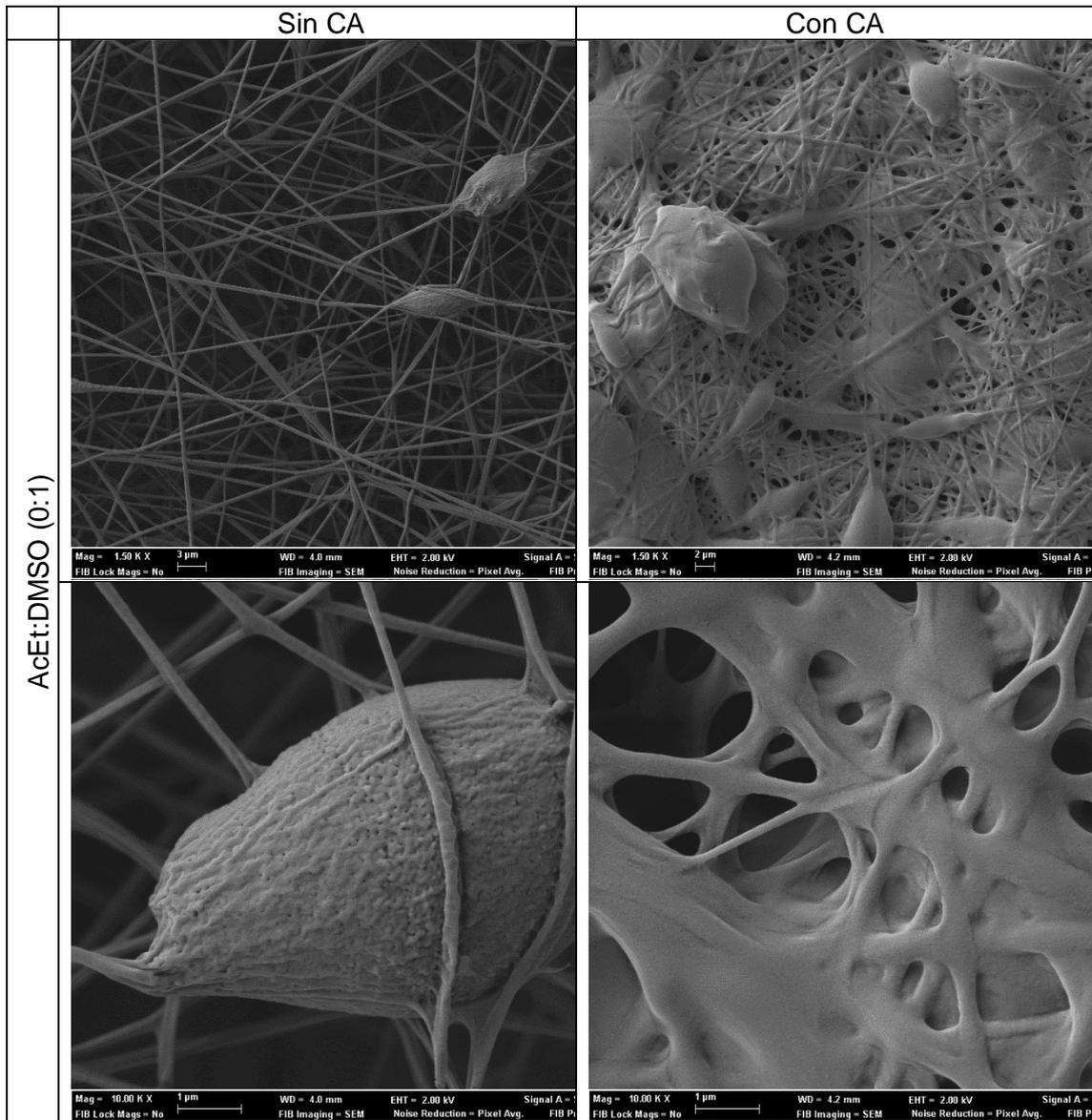
**Tabla 4.** Parámetros de proceso y observaciones microscópicas del material obtenido durante ES de las disoluciones con 15 % PLA en diferentes sistemas solventes.

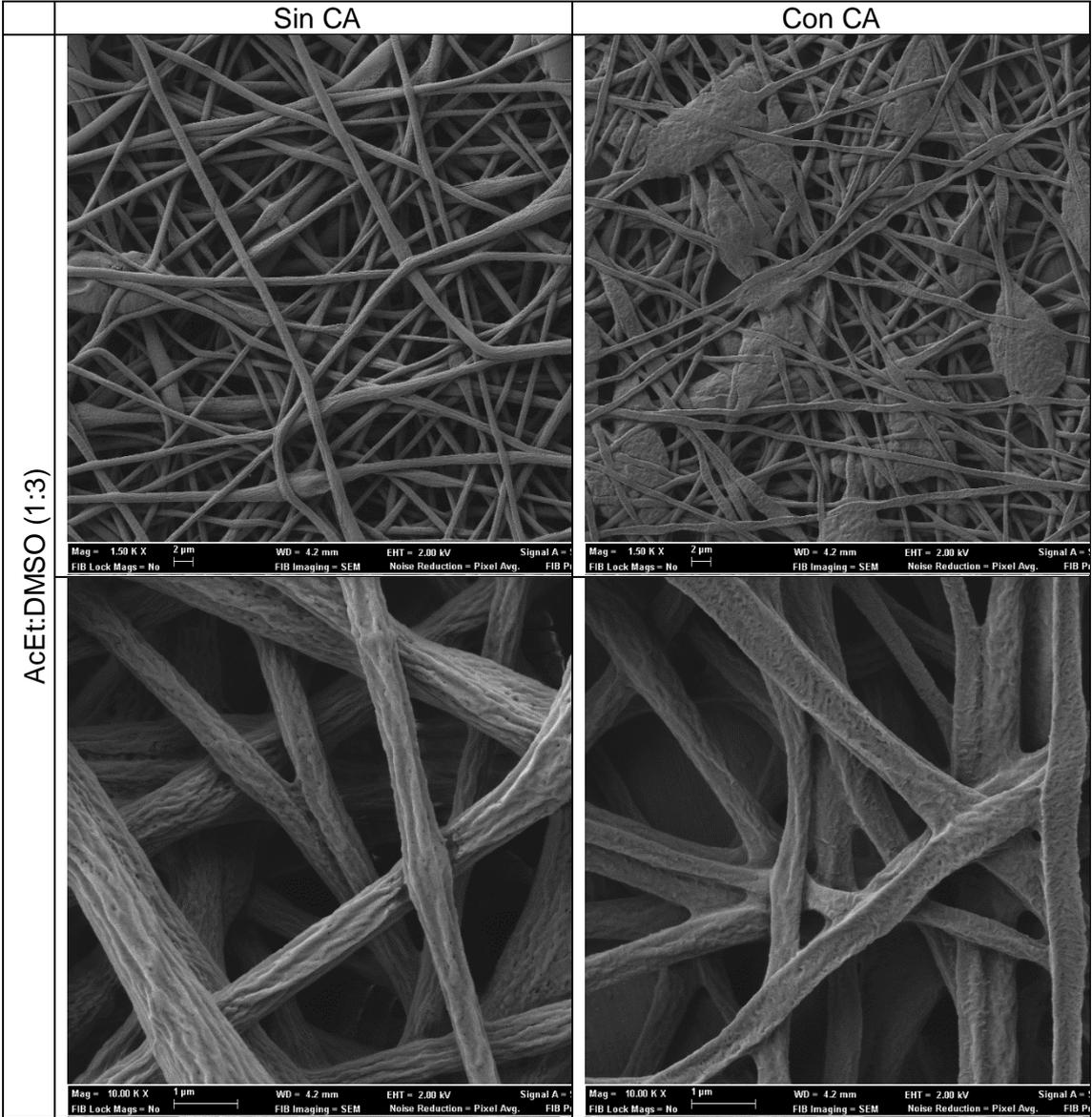
Proporción solventes (v/v)				Caudal (μL/h)		Distancia (cm)	Micrografías FESEM del material electrodepositado (500-1500x aumento)
AcEt	DMSO	AAG	AcBut	D int.	D ext.		
0	1	0	0	1000	0	20	
0	1	0	0	1000	15	20	
1	1	0	0	1000	0	20	
1	1	0	0	1000	25	20	

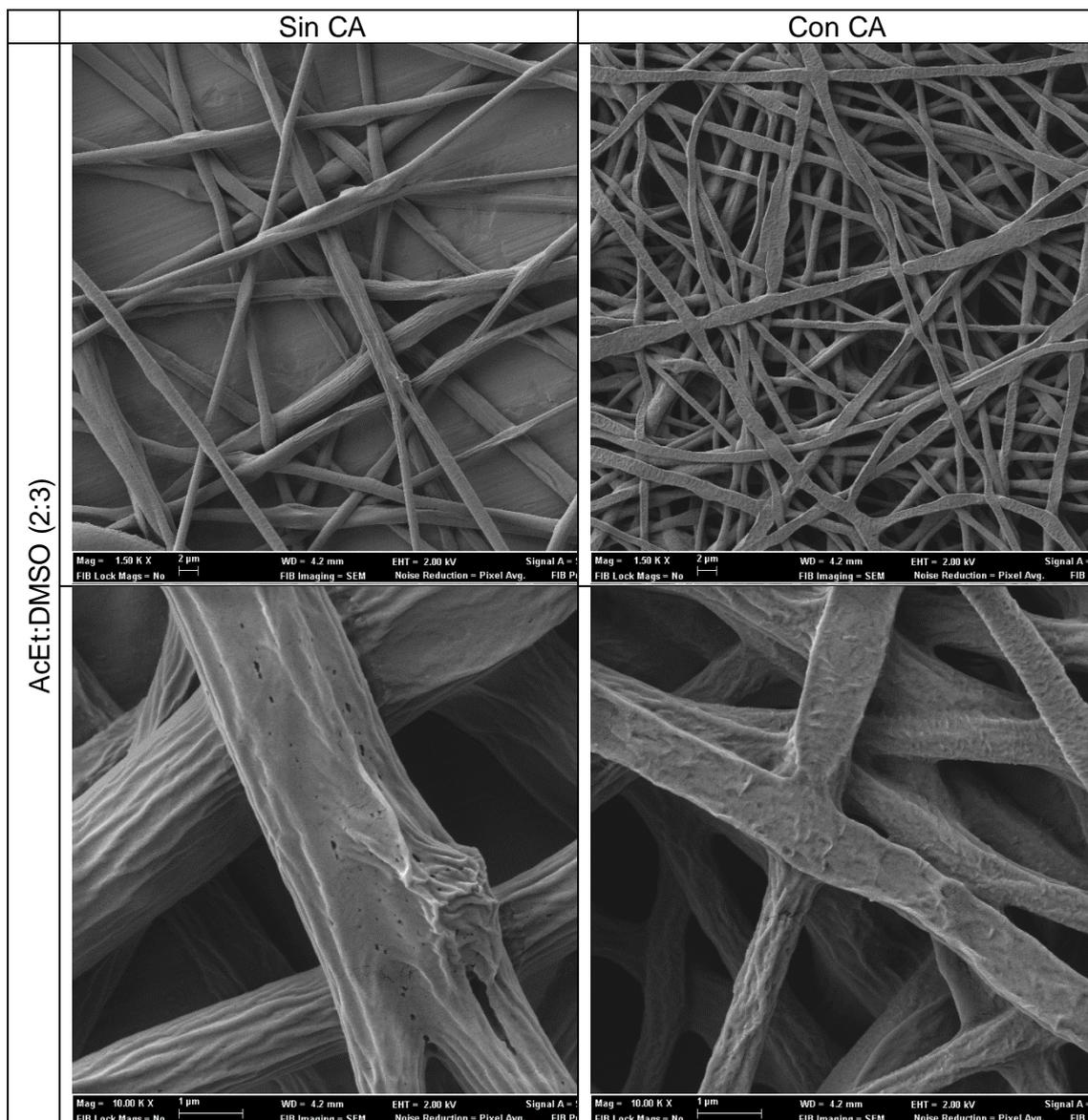
1	3	0	0	1000	0	20	
2	3	0	0	1000	0	20	
1	0	0	1	1100	0	15	
1	0	1	0	1200	0	15	
1	0	1	0	1100	100	15	

## 4.2. Caracterización microscópica de los materiales obtenidos por ES

Con los sistemas bisolventes seleccionados, AcEt y DMSO en las siguientes proporciones (v/v) 0:1, 1:3 y 2:3, se obtuvieron en modo monoaxial las matrices de PLA con CA encapsulado (20 % respecto al polímero), operando en las condiciones ajustadas mencionadas anteriormente. Las estructuras de los materiales electrodepositados, obtenidos con y sin carvacrol para los tres sistemas solventes se dan en la **Figura 5**.







**Figura 5.** Micrografías FESEM del material electrodepositado, con y sin carvacrol. Magnificaciones de 1500x y 10000x.

La incorporación del carvacrol modificó la estructura del material electroestirado, principalmente en la muestra obtenida con DMSO puro, donde presenta un aspecto compacto atribuible a un secado parcial de las fibras que se funden en la malla sobre la superficie del colector. En general, se puede observar en las micrografías que al aumentar la proporción de AcEt en la mezcla solvente, van obteniéndose fibras con diámetros más grandes, efecto comprobado por el análisis de imagen cuyos resultados se presentan en la **Tabla 5**. Este efecto es coherente con lo reportado por otros autores (Wannatong *et al.* (2004) y Casasola *et al.* (2014)) que lo atribuyeron al menor punto de ebullición del solvente. Cuanto más alto es el punto de ebullición, durante el electroestiramiento, la fibra se queda más húmeda y se estira más en el campo eléctrico. Esto genera una mayor superficie específica a través de la cual se puede liberar el agente activo encapsulado.

**Tabla 5.** Diámetros de las fibras obtenidas por ES. Las letras (a, b, c) y los números (1, 2) en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la misma fila y la misma columna respectivamente.

	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )		
	AcEt:DMSO (0:1)	AcEt:DMSO (1:3)	AcEt:DMSO (2:3)
<b>Fibra sin CA</b>	0,29±0,09 <sup>a1</sup>	0,72±0,14 <sup>b2</sup>	1,4±0,7 <sup>c2</sup>
<b>Fibra con CA</b>	0,33±0,07 <sup>a1</sup>	0,50±0,12 <sup>b1</sup>	0,7±0,2 <sup>c1</sup>

También se observa que, en los sistemas bisolventes, la presencia del CA está relacionada con la obtención de fibras más finas que las de los respectivos controles sin el activo. Esto podría estar relacionado con la modificación de las interacciones entre las cadenas del polímero permitiendo un mayor estirado de la fibra en el campo eléctrico. Con DMSO puro la incorporación de carvacrol genera estructuras mucho más compactas para un mismo tiempo de proceso, lo que de nuevo apunta a una retención del solvente en el material depositado.

#### 4.3. La eficacia encapsulante

Los resultados obtenidos de la medida de eficacia encapsulante (EE%) se presentan en **Tabla 6** para los diferentes materiales obtenidos por ES y por casting. Los valores de EE reflejan una mayor capacidad de retención de CA en la matriz cuando se utiliza el método de casting. Además, se observa que, en general, las fibras electroestiradas obtenidas a partir de las mezclas bisolvente presentaron mayor capacidad encapsulante que los obtenidos con el sistema monosolvente (DMSO). La evaporación más rápida en las mezclas con AcEt podrían provocar una solidificación más acelerada del polímero en la fibra, impidiendo la evaporación del activo que queda más atrapado en la matriz. Por tanto, un menor punto de ebullición del solvente provoca la formación de fibras más gruesas con mayor contenido en carvacrol. Las diferencias en la EE fueron menores en los films obtenidos por casting donde la evaporación del solvente ocurre en la superficie del film (con mucho menos superficie específica).

**Tabla 6.** Valores de la eficacia encapsulante expresados en % de CA encapsulado respecto al teórico y en gramos de CA retenido por gramo de polímero, en las fibras electrodepositadas y en las películas obtenidas por *casting*. Las diferentes letras (superíndices) en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras.

Sistema solvente	EE			
	%		g CA/g PLA	
	ES	Casting	ES	Casting
AcEt:DMSO (0:1)	52±4 <sup>a</sup>	78±4 <sup>a</sup>	0,103±0,008 <sup>a</sup>	0,156±0,008 <sup>a</sup>
AcEt:DMSO (1:3)	62±6 <sup>b</sup>	89±6 <sup>b</sup>	0,124±0,013 <sup>b</sup>	0,177±0,012 <sup>b</sup>
AcEt:DMSO (2:3)	68±2 <sup>b</sup>	76±3 <sup>a</sup>	0,136±0,005 <sup>b</sup>	0,151±0,005 <sup>a</sup>

#### 4.4. Análisis térmico

La **Figura 6** y **Tabla 7** la presentan los resultados del análisis termogravimétrico. Se observan dos etapas en la curva termogravimétrica; la primera de menor intensidad hasta temperaturas del orden de 150 °C (en muestras sin carvacrol) o 250 °C (en

muestras con carvacrol) que puede atribuirse a la termoliberación del carvacrol retenido o restos del solvente y la segunda, a temperaturas superiores, mucho más intensa, atribuible a la termodegradación del polímero. Durante la primera etapa de termodegradación, se detectan pérdidas de masa muy variables dependiendo de la muestra. Destacan las pérdidas de hasta el 40 % ocurridas en las fibras sin carvacrol y que indican la retención de una gran cantidad de solvente en la matriz que se libera con el calentamiento. Esta retención aumenta con el contenido en AcEt en la mezcla solvente, lo que sugiere la formación de interacciones específicas del solvente con el polímero, que limitan su evaporación durante el electroestirado. Este efecto de retención de solvente también se observó en los films por casting para el solvente con proporción 1:3 de AcEt:DMSO y fue muy leve para la mezcla 2:3 y el DMSO puro. En las muestras portadoras de carvacrol, la primera etapa de pérdida de peso se extiende hasta temperaturas mayores, dado el mayor punto de ebullición del carvacrol respecto a los solventes, y cobra mayor intensidad para los films por casting que para las fibras, lo cual es coherente con el mayor contenido de carvacrol retenido en el film determinado por espectrofotometría (**Tabla 6**). Es remarcable el hecho de que la presencia de carvacrol parece minimizar la retención de solvente ya que la pérdida de peso ocurre fundamentalmente en el intervalo de temperaturas correspondiente a la liberación del carvacrol. De hecho, asumiendo en base al intervalo de temperatura, que la pérdida corresponde a la termoliberación de carvacrol, se obtiene una diferencia de peso ( $\Delta m$ : diferencia entre la cantidad de activo determinada y la masa termoliberada) con valor positivo en el caso de las fibras, lo que sugiere que una parte del carvacrol está ligado al polímero y no se libera. No obstante, en los films por casting, se obtienen valores negativos indicando que parte de la masa termoliberada debe corresponder a solvente retenido. Esto ocurre con las mezclas solventes con AcEt, en coherencia con lo observado para los materiales sin carvacrol que retienen cantidades importantes de solvente cuando hay más AcEt en la mezcla.

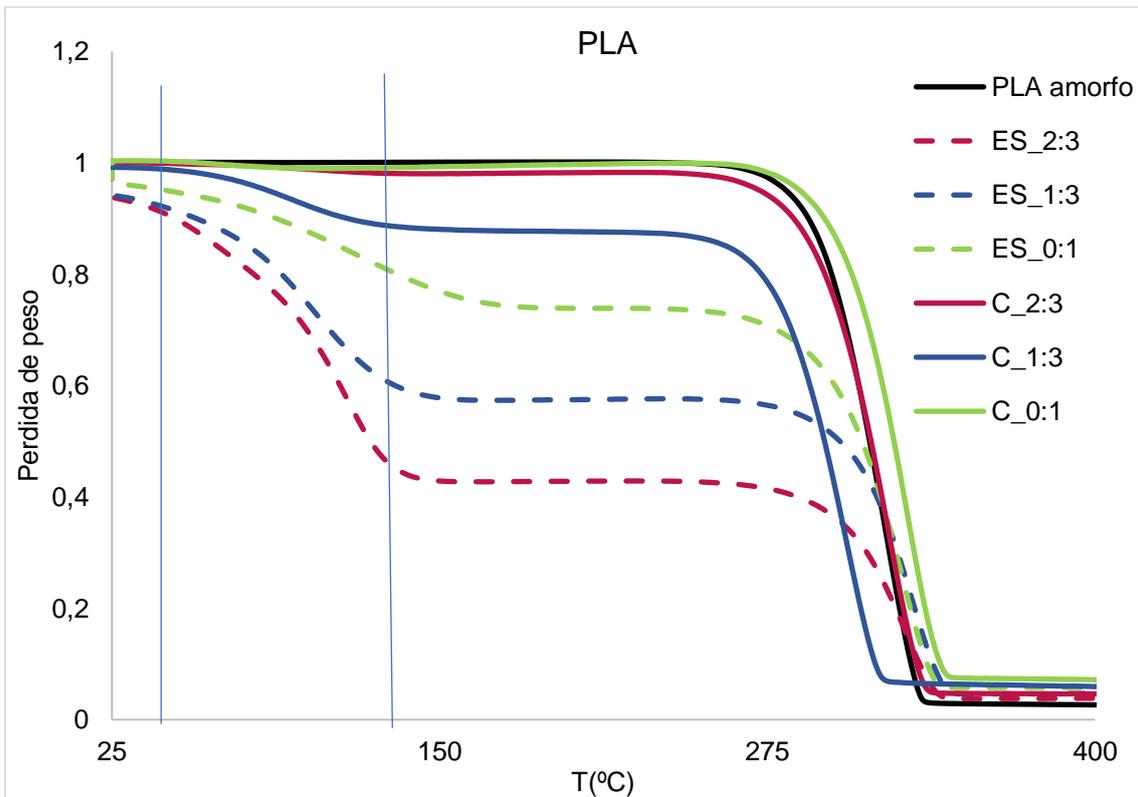
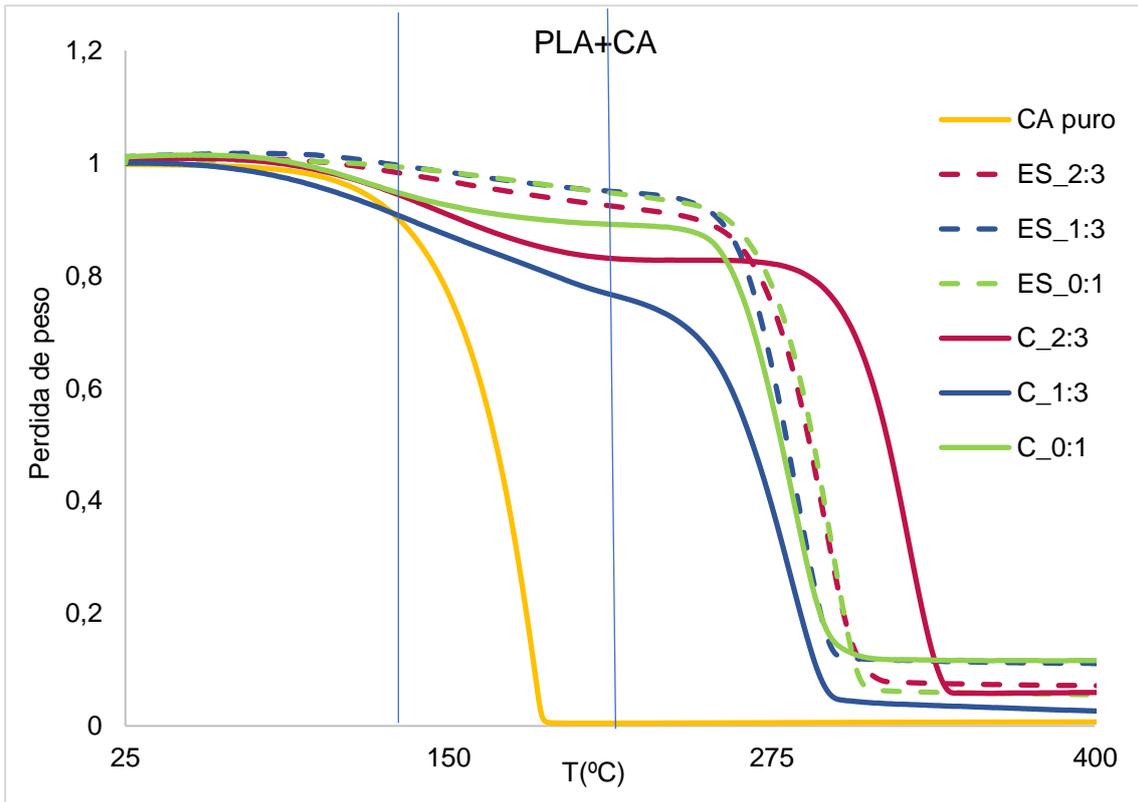
Por otro lado, la etapa de degradación del polímero se presenta en un intervalo de temperaturas que está afectado por el tipo de procesado y la presencia o no de carvacrol. En el material obtenido por casting la temperatura del pico de degradación aumenta al aumentar el contenido en AcEt en el solvente cuando hay carvacrol, alcanzando valores superiores a los del pellet del polímero, mientras que disminuye en ausencia de carvacrol. Por el contrario, en el material electrodepositado sin carvacrol no hay diferencias significativas en la temperatura del pico de degradación por efecto del solvente, siendo esta superior a la del polímero utilizado (pellets). Con carvacrol, tampoco se observan diferencias significativas por efecto del solvente, pero es inferior a la de los pellets del polímero puro. Estos resultados sugieren que en los materiales obtenidos las interacciones del solvente o el carvacrol con las cadenas poliméricas afectan al grado de empaquetamiento de las cadenas en la matriz, dando lugar a estructuras con diferente resistencia térmica. A mayor grado de compacidad de la matriz polimérica es esperable una mayor temperatura de degradación de la matriz. Por otro lado, la presencia de carvacrol parece alterar las interacciones de las cadenas con el solvente, dando lugar a una menor retención del mismo, sobre todo en el material electrodepositado.

Los resultados obtenidos indican que el PLA amorfo parece interaccionar de forma específica con los solventes (AcEt y DMSO) y con el carvacrol, lo que afecta a la retención de estos compuestos en la matriz y a la compacidad de la matriz polimérica que determina su temperatura de degradación térmica. Los efectos del solvente son más relevantes en ausencia de carvacrol, de forma más notable en las fibras que en los films por casting. Esto podría atribuirse al bloqueo de los puntos activos de la cadena

mediante interacciones preferentes con el carvacrol, limitando así su capacidad para interactuar con los solventes y limitando su retención en el material.

**Tabla 7.** Temperaturas de degradación térmica ( $T_o$  - T a cuál comienza la degradación,  $T_p$  - T de máxima velocidad de degradación), fracción de masa termo-liberada en la primera etapa (**M**) y diferencia calculada entre la cantidad de CA cuantificada por extracción y la masa perdida por termo-liberación ( $\Delta m$ ). Las letras en superíndice indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las formulaciones con o sin carvacrol en las respectivas columnas.

Formulación			Primer pico		Segundo pico		M (g/g muestra)	$\Delta m$ (g/g muestra)
			$T_o$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_o$ (°C)	$T_p$ (°C)		
Casting	Con CA	AcEt:DMSO (0:1)	33,8±1,6 <sup>a</sup>	131±16 <sup>ef</sup>	234±5 <sup>a</sup>	283±4 <sup>ab</sup>	0,13	0,0
		AcEt:DMSO (1:3)	34,2±3,0 <sup>a</sup>	141±12 <sup>f</sup>	235±29 <sup>a</sup>	287±25 <sup>ab</sup>	0,17	-0,02
		AcEt:DMSO (2:3)	35,4±3,6 <sup>a</sup>	141±6 <sup>f</sup>	272±1 <sup>cd</sup>	320±1 <sup>d</sup>	0,17	-0,05
	Sin CA	AcEt:DMSO (0:1)	35,4±2,8 <sup>a</sup>	73±5 <sup>a</sup>	291 ±1 <sup>de</sup>	327±1 <sup>d</sup>	0,02	-
		AcEt:DMSO (1:3)	34,6±4,2 <sup>a</sup>	96±7 <sup>abc</sup>	264±7 <sup>bc</sup>	304±9 <sup>c</sup>	0,16	-
		AcEt:DMSO (2:3)	35,1±1,8 <sup>a</sup>	76±23 <sup>a</sup>	250±25 <sup>ab</sup>	297±17 <sup>bc</sup>	0,01	-
ES	Con CA	AcEt:DMSO (0:1)	38,6 ±0,5 <sup>ab</sup>	178±2 <sup>g</sup>	242±3 <sup>a</sup>	291±3 <sup>abc</sup>	0,04	0,04
		AcEt:DMSO (1:3)	35,9±2,3 <sup>ab</sup>	131±17 <sup>ef</sup>	233±2 <sup>a</sup>	280±1 <sup>a</sup>	0,05	0,05
		AcEt:DMSO (2:3)	35,4±2,5 <sup>a</sup>	125±22 <sup>def</sup>	238±8 <sup>a</sup>	289±6 <sup>abc</sup>	0,03	0,08
	Sin CA	AcEt:DMSO (0:1)	43,2±5,1 <sup>bc</sup>	106±25 <sup>bcd</sup>	281±8 <sup>cde</sup>	323±4 <sup>d</sup>	0,14	-
		AcEt:DMSO (1:3)	48,4±8,6 <sup>c</sup>	88±15 <sup>ab</sup>	292±5 <sup>e</sup>	328±2 <sup>d</sup>	0,23	-
		AcEt:DMSO (2:3)	75,7±7,4 <sup>d</sup>	116±4 <sup>cde</sup>	290±5 <sup>de</sup>	326±2 <sup>d</sup>	0,46	-
<b>Carvacrol puro</b>			118±15	159±7	-	-	-	-
<b>PLA pellet</b>			-	-	272±4	311±4	-	-



**Figura 6.** Termogramas TGA del material encapsulante de carvacrol (PLA+CA) o no (PLA), obtenido por electrospinning (líneas discontinuas) y casting (líneas continuas).

## 5. CONCLUSIONES

El proceso de electrospinning para la obtención de fibras de PLA con carvacrol encapsulado fue menos efectivo que el método de extensión y secado de la disolución polimérica (casting), aunque permitió obtener una malla de fibras con contenidos de activo entre 10 y 13 % en peso respecto al polímero (inferior al 15-18 % obtenido para los films por casting). No obstante, la termoliberación del activo representó menos del 50 % del contenido encapsulado, lo que indica su fuerte retención en las fibras. Por el contrario, en los films por casting esta termoliberación fue muy superior y del orden del contenido encapsulado, lo que indica menores fuerzas de retención en la matriz. En cuanto al solvente, la incorporación del AcEt supuso un incremento significativo de la eficacia encapsulante en las fibras (del 50 al casi 70 %), aunque en los films solo se observó un aumento significativo con la proporción 1:3 (proporción menor de AcEt). El diámetro de las fibras, en general, disminuyó en presencia de carvacrol y aumentó con la proporción de AcEt en la mezcla solvente, indicando la influencia de las interacciones de las cadenas poliméricas con los diferentes componentes de la disolución en el electroestirado del material.

En base a los resultados obtenidos, las fibras obtenidas por electrospinning de disoluciones de PLA y carvacrol (20 % respecto al polímero) en mezclas de AcEt:DMSO (ambos válidos para el contacto alimentario) podrían ser utilizadas eficazmente en la obtención de materiales multicapa para el envasado activo de alimentos al aplicarlas sobre películas soporte, preferentemente biodegradables.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49 (2008), 5603-5621.

Ben Arfa, A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., 2006. Antimicrobial Activity of Carvacrol Related to Its Chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology* 43 (2006),149-154.

Bhardwaj, N., Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28 (2010), 325-347.

Catalá, R., Gavara, R., 2001. Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor* CLXVIII 661 (enero 2001), 109-127.

García, E., 2004. Medio ambiente y sociedad: La civilización industrial y los límites del planeta. Madrid, Alianza.

García García, R.M., Palou García, E., 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos 2-2* (2008): 41-51.

Gorostiague, M, 2016. Aspectos moleculares y termodinámicos de la vehiculización de antimicrobianos naturales en nanocomplejos proteicos. XX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral, 2016.

Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Gavara, R., 2014. Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from

chitosan/cyclodextrin films. *International Journal of Food Microbiology* 188 (2014), 53-59.

Hsieh, P.-H., Mau, J.-L., Huang, S.-H, 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology* 18 (2001), 35-43.

Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., Boskou, D., 1993. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1993, 197:20-23.

Liang, D., Hsiao, B.S., Chu, B., 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007), 1392-1412.

Majeed, H., Bian, Y.-Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Khan, Q.F., Iqbal, K.J., Shoemaker, C.F., Fang, Z., 2015. Essential oil encapsulations: uses, procedures and trends. *Royal Society of Chemistry* (2015).

Muller, J., González-Martínez, C., Chiralt, A., 2017. Poly(lactic) acid (PLA) and starch bilayer films, containing cinnamaldehyde, obtained by compression moulding. *European polymer journal* 95 (2017) 56-70.

Serna Cock, L., Rodríguez, A., 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico. *Ciencia y tecnología alimentaria*, vol. 5, nº 1, 54-65.

Tampau, A., González-Martínez, C., Chiralt, A., 2017. Carvacrol encapsulation in starch or PCL based matrices by electrospinning. *Journal of Food Engineering* 214 (2017), 245-256.

Ultee, A. Bennik, 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*, 2002 Apr; 68(4): 1561-1568.

Yalkowsky, S. H., He, Y., Jain, P. (2010). *Handbook of Aqueous Solubility Data*. CRC, 2ª Ed.

## **BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA**

Cassola, R., Thomas, N.L., Georgiadou, S., 2016. Electrospinning of poly (lactic acid): Theoretical approach for the solvent selection to produce defect-free electrospun nanofibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 54 (15), pp. 1483-1498.

Cassola, R., Thomas, N.L., Trybala, A., Georgiadou, S., 2014. Electrospun polylactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer*, 55 (18), pp. 4728-4737.

Doshi, J., Reneker, D.H., 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibres. *Journal of Electrostatics* 35 (1995), 151-160.

Martínez-Tenorio, Y., López-Malo, A., 2011. Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 5 (2011), 1-12.

Nazer, A.I., Kobilinsky A., Tholozan J.-L., Dubois-Brissonnet, F., 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv. Typhimurium*: a synergistic effect? *Food Microbiology* 22 (2005), 391-398.

Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering* 109 (2012), 513-519.

Rhim, J.-W., Mohanty, A.K., Singh, S.P., Perry K. W. Ng, 2005. Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: thermocompression versus solvent casting. Wiley InterScience, 2005.

Sanap, G.S., Dama, G.Y., Hande, A.S., Karpe, S.P., Nalawade, S.V., Kakade, R.S., Jadhav U.Y., 2007. Preparation of transdermal monolithic systems of indapamide by solvent casting method and the use of vegetable oils as permeation enhancer. *International Journal of Green Pharmacy* (abril-junio 2008).

Valencia, A., Rivera, C., Murillo, E.A., 2013. Estudio de las propiedades de mezclas de alcohol polivinílico-almidón de yuca-sorbitol obtenidas por casting. *Revista Colombiana de Materiales* N.4 (2013), 41-55.