

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



Incorporación de polifenoles a films a base de biopolímeros: propiedades físicas y antioxidantes

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: ROSA MARIA HERNÁNDEZ SOLOMANDO

TUTOR/A: CHELO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

COTUTOR/A EXPERIMENTAL: EMMA TALÓN ARGENTE

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2015





UNIVERSIDAD
POLITÉCNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL

Ficha resumen del Trabajo Fin
de Carrera

Datos del trabajo de fin de grado (TFG)

Título del TFG: Incorporación de polifenoles a films a base de biopolímeros: propiedades físicas y antioxidantes.

Autor: Dña. Rosa María Hernández Solomando

Tutor Académico: Prof. Dña. María Consuelo González Martínez

Cotutora experimental: Dña. Emma Talón Argente

Lugar y fecha: Valencia, septiembre de 2015

Resumen

Se elaboraron películas comestibles de diferentes formulaciones a base de almidón de guisante (St), quitosano (CH) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), glicerol como plastificante y ácido tánico como agente cross-linking en algunas formulaciones con quitosano para mejorar sus propiedades mecánicas. Las películas se elaboraron con y sin la incorporación de extracto liofilizado de tomillo, rico en compuestos polifenólicos (PP), en la proporción 1:0.15 (polímero:PP). Se acondicionaron a 25°C y 75% HR. Se caracterizaron sus propiedades mecánicas, contenido en humedad, solubilidad y su capacidad antioxidante por el método DPPH. Los resultados mostraron que las propiedades de las películas se vieron afectadas por la incorporación de polifenoles, de forma que se volvieron más extensibles mecánicamente, aumentó su solubilidad en agua y su capacidad antioxidante. Entre ellas, las que presentaron las mejores características fueron las quitosano y ácido tánico, por sus propiedades mecánicas y su mayor actividad antioxidante, debido a la mayor eficiencia de encapsulación de los polifenoles y al efecto cross-linking del ácido tánico, que también contribuyó al poder antioxidante de las películas obtenidas.

Palabras clave

Películas comestibles, biopolímeros, almidón de guisante, quitosano, tomillo, polifenoles, ácido tánico, HPMC, DPPH.

Abstract

Edible films of different formulations based on pea starch (St), chitosan (CH) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) with glycerol as plasticizer and tannic acid as a cross-linking agent in some chitosan formulations, to improve their mechanical properties, were developed. The films were prepared with and without the addition of lyophilized thyme extract, rich in polyphenol compounds (PP), in the ratio 1:0.15 (polymer:PP). They were conditioned at 25 °C and 75% RH and were characterized its mechanical properties, moisture content, solubility and antioxidant capacity by DPPH method. The results showed that the film properties were affected by the incorporation of polyphenols, so that became more extensible mechanically, increase their water solubility and their antioxidant capacity. Among them, those which showed the best characteristics were chitosan and tannic acid, for their mechanical properties and higher antioxidant activity, because of the greater encapsulation efficiency of polyphenols and cross-linking of tannic acid effect, which also contributed to antioxidant properties of the films obtained.

Keywords

Edible films, biopolymers, pea starch, chitosan, thyme, polyphenols, tannic acid, HPMC, DPPH.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTO DE PELÍCULA O FILM.....	1
1.2 ANTECEDENTES DE FILMS CON ANTIOXIDANTES: TIPOS Y CARACTERÍSTICAS	3
1.3 POLIFENOLES.....	4
1.3.1 POLIFENOLES EXTRAIDOS DEL TOMILLO.....	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 MATERIALES	9
3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE POLIFENOLES	9
3.3 OBTENCIÓN DE LAS DISPERSIONES FORMADORAS DE PELÍCULAS.....	10
3.4 OBTENCIÓN DE LOS FILMS Y ACONDICIONAMIENTO	11
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS	12
3.5.1 HUMEDAD.....	12
3.5.2 SOLUBILIDAD	12
3.5.3 ESPESOR.....	13
3.5.4 PROPIEDADES MECÁNICAS	13
3.5.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	15
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
4. RESULTADOS	17
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS FILMS	17
4.1.1 HUMEDAD Y SOLUBILIDAD.....	17
4.1.2 ESPESOR.....	18
4.1.3 PROPIEDADES MECÁNICAS	19
4.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FILMS	20
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27

Índice de tablas

Tabla 1-1 Principales compuestos utilizados para la obtención de películas comestibles.	1
Tabla 1-2 Clasificación y estructura de los polifenoles más comunes.....	4
Tabla 3-1 Nomenclatura y composición de las diferentes formulaciones ensayadas.....	10
Tabla 3-2 Volúmenes de muestra con 0.15g de PP mezclados con diferentes volúmenes de DPPH· (0.022 g/L).	16
Tabla 4-1 Contenido en humedad (g agua/ g película seca) para las películas sin y con polifenoles. Valores medios y (desviaciones estándar).	17
Tabla 4-2 Solubilidad (g film/L) para películas con y sin PP. Valores medios y (desviación estándar).	18
Tabla 4-3 Espesores de las películas con y sin polifenoles. Valores medios y (desviaciones estándar).	18
Tabla 4-4 Módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TS) y porcentaje de extensibilidad (E) de las películas control y con PP. Valores medios y (desviación estándar)....	20
Tabla 4-5 Valores obtenidos de la absorbancia a tiempo inicial y transcurridos 30min de cada una de las tres repeticiones de la formulación CH:TA:PP. Volúmenes de muestra y DPPH que se hacen reaccionar.	23
Tabla 4-6 Valores de EC ₅₀ (mg compuesto/mg DPPH) del ácido tánico puro, CH puro y del extracto liofilizado obtenido. Valores medio y (desviación estándar).....	24
Tabla 4-7 Valores de EC ₅₀ (mg Film/ mg DPPH) de las películas sin y con PP. Valores medios y (desviaciones estándar).	24

Índice de figuras

Figura 1-1 Película por casting húmedo de HPMC con incorporación de polifenoles.....	2
Figura 1-2 Esquema de formación de películas comestibles por casting húmedo.....	2
Figura 1-3 Estructura química del fenol.....	4
Figura 1-4 Estructura básica de los flavonoides.	6
Figura 1-5 Tomillo. Fotografía "Thyme-Bundle" por Evan-Amos - Own work. Licensed under CC0 via Wikimedia Commons.	7
Figura 1-6 Estructura química de algunos de los compuestos del tomillo.	7
Figura 3-1 Liofilización del extracto acuoso de polifenoles.	9
Figura 3-2 Dispersión formadora de películas en agitación con la incorporación de PP (a) Desgasificador a vacío (b).	11
Figura 3-3 Dispersiones formadoras de películas en placas de teflón.	11
Figura 3-4 Película en placa Petri con agua para el ensayo de solubilidad.	12
Figura 3-5 Desecador con pentóxido de fósforo con las placas Petri para el ensayo de solubilidad.	12
Figura 3-6 Medición de los espesores con el micrómetro electrónico digital.....	13
Figura 3-7 Preparación de las películas para el ensayo de mecánicas.	13
Figura 3-8 Prensa de ensayos mecánicos utilizada para la determinación de las propiedades mecánicas de las películas.	14
Figura 3-9 Curva típica de esfuerzo vs deformación de Hencky durante el ensayo de tracción.....	14
Figura 3-10 Ejemplo de la decoloración del DPPH· al reaccionar con el antioxidante.	15
Figura 4-1 Curvas típicas de esfuerzo de tracción vs deformación de Hencky de cada una de las formulaciones con adición de PP en rojo y películas control en azul.	19
Figura 4-2 Cubetas para la recta de calibrado del DPPH.	21
Figura 4-3 Recta de calibrado del DPPH·.	21
Figura 4-4 Representación de la abs vs t para las diferentes concentraciones de muestra (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) en ml.	22
Figura 4-5 Reducción del DPPH transcurridos los 30min.	22
Figura 4-6 Porcentaje de DPPH que queda cuando la reacción es estable frente a los mg de film/mg de DPPH.....	23
Figura 4-7 Películas de St y HPMC durante el proceso de la obtención del film donde se muestra las coloraciones adquiridas.	25
Figura 4-8 Películas de CH:St sin y con PP.	25

Abreviaturas

St	Almidón de guisante
AA	Ácido acético
TA	Ácido tánico
HPMC	Hidroxipropil metilcelulosa
CH	Quitosano
PP	Polifenoles
DPPH	Radical 2,2 Difetil-1-Picrilhidrazilo

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO DE PELÍCULA O FILM.

Las películas o films biodegradables son finas capas de biopolímeros aplicadas a alimentos que juegan un papel importante en su preservación, distribución y marketing (Bourtoom, 2008; Falguera et al., 2011). Se pueden utilizar diferentes tipos de polímeros como formadores de películas. La Tabla 1-1 muestra los compuestos más utilizados para su desarrollo, clasificados en proteínas, polisacáridos (carbohidratos y gomas), lípidos o una mezcla de estos (Gennadios et al., 1997). El quitosano, el almidón y la celulosa son entre los compuestos más usados para formarlas (Baldwin et al., 2011; Shit and Shah, 2014).

En los últimos años los estudios que abarcan sistemas alternativos para la protección de los alimentos utilizando películas comestibles y/o biodegradables ha incrementado significativamente (Fadini et al., 2013; Martelli and Laurindo, 2012) debido a que el uso de éstos como embalaje puede reemplazar potencialmente de manera parcial o total a los materiales plásticos derivados del petróleo (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997; Petersen et al., 1999). Además, éstos presentan características muy beneficiosas como es su comestibilidad y/o biodegradabilidad inherente (Guilbert et al., 1996; Krochta, 2002).

Tabla 1-1 Principales compuestos utilizados para la obtención de películas comestibles.

Tipos de polímeros	Materiales
Proteínas	Colágeno, gelatina, caseína, proteína del suero, zeína de maíz, gluten de trigo, proteína de soja, proteína de la clara del huevo, proteína miofibrilar del pescado, proteína de sorgo, proteína de guisante, proteína de salvado de arroz, proteína de la semilla de algodón, proteína de cacahuete, queratina.
Polisacáridos	Almidón, almidón modificado, celulosa modificada (CMC, MC, HPC, HPMC), alginato, carragenina, pectina, pululano, quitosano, goma gellan, goma de xantana.
Lípidos	Ceras (cera de abejas, parafina, cera de carnauba, cera de candelilla, resinas de salvado de arroz de cera), resinas (laca, terpenos), acetoglicéridos.
CMC= Carboximetil celulosa; MC= Metilcelulosa; HPC= Hidroxipropil celulosa HPMC= Hidroxipropil metilcelulosa	

Estas biopelículas ofrecen muchas ventajas como envases activos debido a sus propiedades, actuando como barrera al agua y a los gases (oxígeno y dióxido de carbono), buenas propiedades mecánicas, no son tóxicas, no contaminan y además se pueden producir a bajo coste (Galus et al., 2012; Aider, 2010; Elsabee & Abdou, 2013; Perdonés et al., 2012). Estas características hacen que aumente la vida útil del producto y mantenga la calidad (Gennadios and Weller, 1990) al protegerlo de la degradación física, química y biológica (Kester and Fennema, 1986).

Existen dos procesos de formación de películas comestibles; por casting húmedo o por casting seco. En ambos el material que forma la película debería de formar un gel espacialmente reordenado que incorpore todos los agentes que forman la película, tales como biopolímeros, plastificantes u otros aditivos, y en el caso del método por casting húmedo también parte del solvente. El método por casting húmedo utiliza solventes para la dispersión de los materiales que van a formar la película, después se secan para eliminar el solvente y así formar la estructura de la película como podemos ver en la Figura 1-2 (Jung H. Han, 2014). Para este proceso es importante la elección del solvente, ya que éste debe de ser comestible y biodegradable, por tanto sólo el agua, el etanol y sus mezclas son adecuados (Peyron, 1991). En la Figura 1-1 se muestra un ejemplo de una película formada por casting húmedo.



Figura 1-1 Película por casting húmedo de HPMC con incorporación de polifenoles.

Para el proceso en seco, se aplica calor a los materiales que van a formar la película para aumentar su temperatura por encima del punto de fusión y así se hacen fluir. Por tanto se deben de conocer previamente las propiedades termoplásticas de estos materiales para así poder diseñar el proceso.

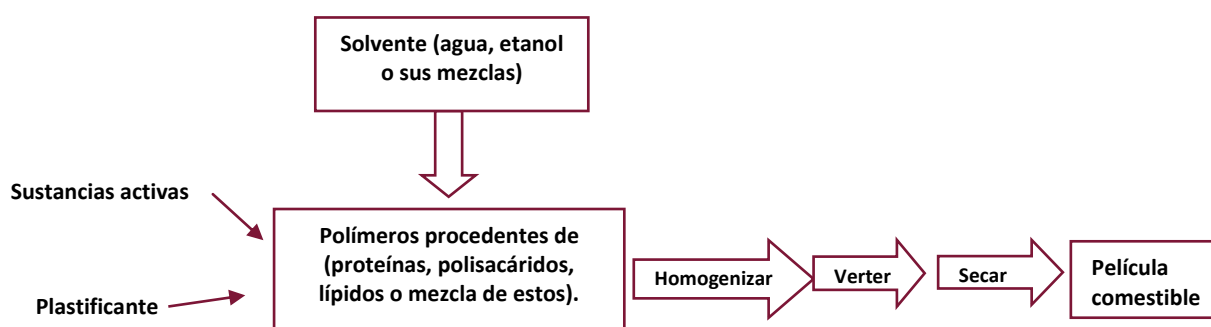


Figura 1-2 Esquema de formación de películas comestibles por casting húmedo.

Las películas comestibles y/o biodegradables además de sus propiedades comentadas muestran un alto potencial para contener ingredientes activos, como pueden ser agentes antioxidantes, colorantes, saborizantes, nutrientes, especias y agentes antimicrobianos que pueden ayudar a alargar la vida útil del alimento y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie del mismo (Gonzalez-Aguilar et al., 2008; Oms-Oliu et al., 2010; Antunes et al., 2012; Zúniga et al., 2012).

Para poder usar estos envases de manera práctica tienen que poseer unas buenas propiedades mecánicas, entre otras propiedades. Por ello, hay ensayos mecánicos estandarizados para evaluar la resistencia estructural de las películas comestibles. Estos ensayos mecánicos pueden incluir resistencia a la tracción, módulo de elasticidad, porcentaje de deformación, rigidez y tensión de fractura entre otros (Jung H. Han, 2014). Las películas comestibles y/o biodegradables en general poseen menor resistencia a la tracción que los plásticos comunes, mientras que su elongación hasta la rotura varía ampliamente. Algunos tienen valores de elongación comparables con los del plástico común. Otro problema asociado a la mayoría de las películas comestibles es que son muy sensibles a la humedad, que determina a su vez, la respuesta mecánica y barrera de las mismas (Guilbert and Gontard, 1995; Guilbert et al., 1996; Krochta, 2002). Por ello, es necesario evaluar su comportamiento mecánico bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

1.2 ANTECEDENTES DE FILMS CON ANTIOXIDANTES: TIPOS Y CARACTERÍSTICAS

El uso de películas comestibles donde se incorporan compuestos activos, como pueden ser los aceites esenciales, ha sido particularmente destacado en los últimos años debido a sus potenciales aplicaciones en la conservación de alimentos (Sung et al., 2013). Estos compuestos activos son conocidos por su actividad antimicrobiana y/o antiviral, insecticida y propiedades antioxidantes (Sivakumar & Bautista-Banos, 2014). Entre estos ingredientes activos, han sido ampliamente estudiados tanto los aceites esenciales como algunos de sus principales constituyentes, como pueden ser el carvacrol, mentol, timol o eugenol debido a su poder antimicrobiano y antioxidante, por ser compuestos naturales y por no producir ningún riesgo para la salud de los consumidores (de Aquino, Blank and de Aquino Santana, 2015).

Aunque la incorporación de agentes activos a películas es un tema en vigor, la mayoría de estos estudios se centran en la actividad antimicrobiana de los mismos. En cambio, se han encontrado pocos estudios donde se utilicen compuestos antioxidantes como agentes activos. Entre ellos, Bonilla et al., (2013) estudió el efecto de la incorporación de aceites esenciales de albahaca, tomillo, ácido cítrico y α -tocoferol en sus propiedades físicas, mecánicas y estructurales en films de almidón de trigo y quitosano. Los resultados mostraron que con la adición de los aceites esenciales, las propiedades de barrera al oxígeno mejoraron; el ácido cítrico promovió un incremento en el módulo elástico y las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas mejoraron ligeramente cuando se añadió ácido cítrico y α -tocoferol. Por otro lado, Peng y Li (2014) realizaron un estudio parecido combinando dos tipos de aceites esenciales de (limón, tomillo o canela) en films de quitosano, y se demostró que cuando se combinan estos dos aceites las propiedades de barrera de agua de las películas mejora y además estas presentan un tamaño de partícula menor, por otro lado se encontraron pocos efectos antimicrobianos sinérgicos sobre las cepas bacterianas estudiadas.

Incorporar antioxidantes en las películas es difícil debido a su inestabilidad bajo las condiciones en el procesamiento y almacenamiento (temperatura, oxígeno, luz) lo que limita la actividad y los posibles beneficios de estos. En estudios previos se ha demostrado que la incorporación de polifenoles en las biopelículas induce cierta capacidad antioxidante (Gómez-Guillén et al., 2007), que depende del poder encapsulante del polímero.

González-Martínez et al. (2013) evaluaron las propiedades físicas y la actividad antioxidante de films a base de quitosano y metilcelulosa con resveratrol, un antioxidante natural que se encuentra en frutas como: uvas, frambuesas y cacahuetes. Los resultados del estudio mostraron que el resveratrol pudo ser incorporado eficientemente en los films, aunque provocó cambios significativos en su estructura y en sus propiedades mecánicas; los

films obtenidos presentaron menor resistencia a la fractura y extensibilidad mientras que aumentó su opacidad y brillo en comparación con los films sin el compuesto activo. Respecto a la actividad antioxidante, los films obtenidos mostraron una capacidad antioxidante proporcional a la cantidad de resveratrol incorporado.

1.3 POLIFENOLES

Los polifenoles con compuestos orgánicos que se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, es decir más de un grupo hidroxilo (OH) unido directamente a un anillo aromático (Figura 1-3). Proceden principalmente de plantas, ya que estas los sintetizan como producto de su metabolismo secundario. Desde el punto de vista de la estructura química son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico) hasta polímeros complejos.

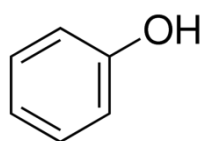
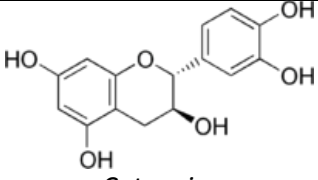
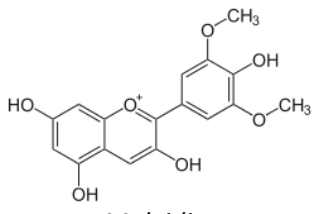
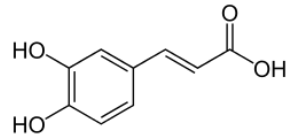
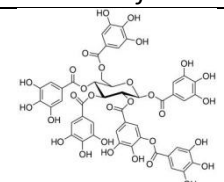
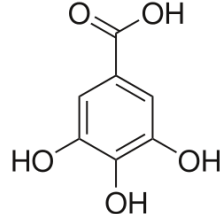
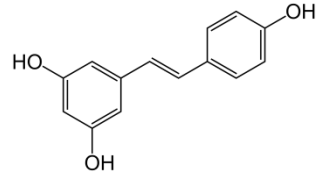


Figura 1-3 Estructura química del fenol.

Los polifenoles según su estructura, se pueden clasificar en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides (Waterhouse, 2002) como podemos ver en la tabla Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Clasificación y estructura de los polifenoles más comunes.

Tipos	Subtipos	Estructura química
FLAVONOIDES		
Flavononas	Naringenina Hesperetina Pinocembrina	 <i>Naringenina</i>
Flavonas	Apigenina Luteolina	 <i>Apigenina</i>
Isoflavonas	Daidzeína Genisteína	 <i>Genisteína</i>
Flavonoles	Kaempferol Quercetina Miricetina	 <i>Quercetina</i>

Flavanoles	-flavan-3-oles -proantocianidinas	 <i>Catequina</i>
Antocianos	Cianidina Delfinidina Malvidina	 <i>Malvidina</i>
NO FLAVONOIDES		
Ácidos hidroxicinámicos	Ácido Cafeico Tartárico Ácido Feruloil Tartárico	 <i>Ácido Cafeico</i>
Taninos hidrolizables	Galotanino Elagitaninos Epigalotanino	 <i>Taninos hidrolizables</i>
Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido Gálico Ácido Vanílico Ácido siríngico	 <i>Ácido Gálico</i>
Estilbenos	Resveratrol Piceido Piceatanol δ -viniferina α -viniferina ϵ -viniferina	 <i>Resveratrol</i>

Todos los polifenoles son ácidos débiles, como el fenol, y son reductores fuertes (salvo la resorcina). Pardean al aire, sobre todo en medio alcalino, porque sus productos de oxidación dan polímeros de color pardo oscuro, por tanto son compuestos inestables. Los polifenoles son solubles en agua, alcohol y éter. La propiedad más interesante de los polifenoles en posición o- y p- es la facilidad de oxidarse para dar quinonas y la formación de un equilibrio de oxidoreducción (redox).

Uno de los grupos más estudiados dentro de los compuestos fenólicos ha sido el de los flavonoides, compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 (Figura 1-4), común en la mayoría de los flavonoides como podemos ver en la tabla Tabla 1-2 (Jiménez et al., 2009). Su elevada capacidad antioxidante se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres. Además, por su bajo potencial re-dox, son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (como iones de oxígenos, radicales libres y peróxidos), altamente reactivas (Garrido et al., 2013). En general los compuestos polifenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos mencionados.

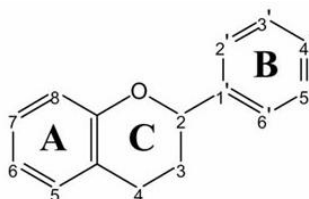


Figura 1-4 Estructura básica de los flavonoides.

Como fuentes de antioxidantes se encuentran numerosas plantas, especias o frutas como las cerezas y uvas, nueces, bayas, té, vino, aceite de oliva, chocolate y vegetales de hoja como por ejemplo el romero (Trojakova et al., 2001), la salvia (Cuvelier, Richard, & Berset, 1996) o el tomillo (Miura & Nakatani, 1989).

Para la extracción de los polifenoles de los tejidos vegetales normalmente se utiliza una extracción acuosa o extracción alcohólica, aunque últimamente la extracción con fluidos supercríticos está siendo ampliamente estudiada.

Las propiedades beneficiosas de estos compuestos activos pueden verse reducidas por la presencia de oxígeno, la humedad o las condiciones inapropiadas de almacenamiento (Fang & Bhandari, 2010). Por ello hay estudios recientes que estudian su encapsulación como método para conservar las propiedades de los compuestos activos. La encapsulación es una técnica por la cual un compuesto activo o microorganismo queda recubierto por un polímero, con lo que puede quedar protegido frente a diversos agentes como la luz, el oxígeno o los tratamientos térmicos o químicos. La encapsulación se puede realizar por métodos químicos (coacervación, polimerización, gelificación iónica, inclusión en liposomas, inclusión molecular), o mecánicos (secado por aspersión, atomización, extrusión). Por ejemplo Trifković et al., (2014) estudió encapsulación de polifenoles del tomillo en microesferas de quitosano, demostrando un fuerte potencial como aditivo alimentario funcional si se sigue mejorando el método.

1.3.1 POLIFENOLES EXTRAIDOS DEL TOMILLO

Thymus vulgaris L. comúnmente denominada tomillo (Figura 1-5) es una planta aromática que pertenece a la familia Lamiaceae, ha sido usada tradicionalmente como planta medicinal o como condimento en alimentos. Muchos experimentos *in vitro* llevados a cabo en las últimas décadas han definido las actividades farmacológicas tanto del aceite esencial del tomillo como del extracto de la planta. Estos estudios son de gran interés tanto para la industria de cosméticos como para la industria alimentaria debido a su uso como ingrediente culinario y/o conservante por su efecto antioxidante (Grigore et al., 2010).



Figura 1-5 Tomillo. Fotografía "Thyme-Bundle" por Evan-Amos - Own work. Licensed under CC0 via Wikimedia Commons.

Se ha demostrado que el tomillo posee diversos efectos beneficiosos; antimicrobiano (Hazzi et al., 2009), antifúngico (Giordani, Hadeif & Kaloustian, 2008), antibacteriano (Essawi & Srour, 2000), carminativo (Baranauskiene et al., 2003) así como sus propiedades antioxidantes (Mkaddem et al., 2011; Safaei-Ghomi et al., 2009). Por ejemplo Roby et al., (2013) evaluó la capacidad antioxidante y la cantidad total de fenoles y compuestos fenólicos en el tomillo, la salvia y el orégano; sus resultados demostraron que el extracto con metanol del tomillo poseía mejor actividad antioxidante respecto a las otras plantas y comparado con el α -tocoferol y el BHA (hidroxianisol butilado). El BHA es un antioxidante sintético usado como aditivo alimentario por su gran efectividad y bajo coste comparado con antioxidantes naturales (Duh and Yen, 1997).

Respecto a la composición química del tomillo que le confiere esas propiedades antioxidantes, se ha demostrado que el aceite volátil de tomillo contiene grandes cantidades de p-cymene y thymol y en menor medida carvacrol, linalo y borneol entre otros (Grigore et al., 2010) (Figura 1-6), mientras que en un extracto con metanol del tomillo se observa la presencia de ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido cinámico, ácido clorogénico y ácido quínico como ejemplos de ácidos fenólicos, además de algunos flavonoides tales como el ácido ferúlico, apigenina, luteolina o la quercetina (Roby et al., 2013).



Figura 1-6 Estructura química de algunos de los compuestos del tomillo.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la adición de extracto liofilizado de tomillo rico en polifenoles sobre las propiedades físicas (propiedades mecánicas, humedad y solubilidad) y propiedades antioxidantes de películas a base de almidón de guisante, quitosano e hidroxipropilmetilcelulosa. Además, se estudia el efecto de la incorporación de ácido tánico en las matrices de quitosano como agente cross-linking.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las propiedades mecánicas de las películas, así como el espesor, su contenido en humedad y su solubilidad en agua.
- Determinar la capacidad antioxidante de las películas.

Para poder conseguir estos objetivos se planteó el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención del extracto acuoso de polifenoles, a partir de la liofilización del mismo.
2. Elaboración de las dispersiones formadoras de películas, con y sin polifenoles.
3. Obtención de las películas y acondicionamiento de las mismas.
4. Determinación de la humedad, solubilidad y espesor de las películas.
5. Determinación de las propiedades mecánicas.
6. Medida de la capacidad antioxidante de las películas.
7. Análisis estadístico y discusión de los resultados.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIALES

Para la elaboración de las películas se utilizó quitosano, de alto peso molecular (lote MKBH57816V), hidroxipropilmetilcelulosa y ácido tánico que fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Madrid, España. Por otra parte el ácido acético glacial y el glicerol fueron suministrados por Panreac mientras que el almidón de guisante lo suministró Roquette (lote W469V).

Para determinar la capacidad antioxidante de las películas por el método DPPH se utilizó: Metanol de Sigma Aldrich y 2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl.

Para llevar las películas a deshidratación total se usó como agente desecante pentóxido de fósforo (P_2O_5) y para el acondicionamiento de las películas se utilizó: Cloruro sódico (NaCl) ambos suministrados por Panreac.

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE POLIFENOLES

El tomillo seco fue adquirido por Serpylli herba (Lote 29660913) y fue preparado por el método convencional de extracción con agua caliente mediante el siguiente procedimiento: se añadieron 40g de tomillo en 800ml de agua destilada a una temperatura de 80-100°C (manteniendo el ratio 10:200 p/v) durante 30 minutos en agitación. Transcurrido el tiempo la disolución sobrenadante se recogió y se realizó una filtración grosera con gasas y posteriormente una filtración a vacío con papel de filtro (Stojanovic et al., 2011). El extracto acuoso obtenido se vertió en bandejas y se congelaron a -40°C para su posterior liofilización, tal y como muestra la Figura 3-1. El extracto fue recogido en un frasco cilíndrico topacio y almacenado en refrigeración hasta su incorporación en las películas.

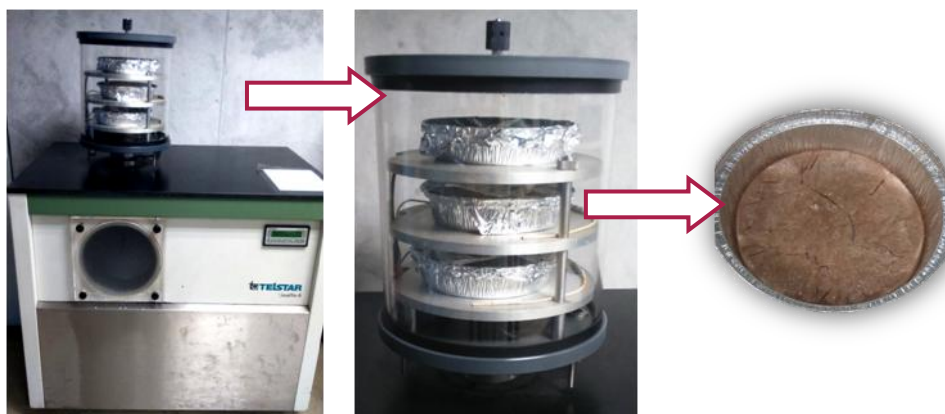


Figura 3-1 Liofilización del extracto acuoso de polifenoles.

3.3 OBTENCIÓN DE LAS DISPERSIONES FORMADORAS DE PELÍCULAS

Para la obtención de las películas se usó el método por casting húmedo, manteniendo constante la relación de polímero por unidad de superficie. Se formularon 6 dispersiones formadoras de películas diferentes a base de biopolímeros puros (CH, St, HPMC) y combinados entre ellos manteniendo un ratio de 1:4 (CH:St). Se adicionó ácido tánico a las formulaciones a base de quitosano, actuando éste como agente cross-linking (Rivero et al., 2010) en un ratio 1:0.04 (polímero:TA) (CH:TA, CH:St:TA). Sobre estas formulaciones base, se diseñaron 6 formulaciones más (Tabla 3-1), adicionando el extracto de tomillo liofilizado (PP) en la proporción 1:0.15 (polímero:PP p/p). El glicerol se añadió a todas las formulaciones en un ratio de 1:0.2 (polímero:glicerol p/p) actuando éste como plastificante.

Tabla 3-1 Nomenclatura y composición de las diferentes formulaciones ensayadas.

Nombre	Almidón de guisante	Quitosano	HPMC	Ácido tánico	Extracto liofilizado de tomillo	Glicerol
St:PP	1	-	-	-	0.15	0.2
CH:PP	-	1	-	-	0.15	0.2
CH:TA:PP	-	1	-	0.04	0.15	0.2
HPMC:PP	-	-	1	-	0.15	0.2
CH:St:PP	0.8	0.2	-	-	0.15	0.2
CH:St:TA:PP	0.8	0.2	-	0.04	0.15	0.2
St	1	-	-	-	-	0.2
CH	-	1	-	-	-	0.2
CH:TA	-	1	-	0.04	-	0.2
HPMC	-	-	1	-	-	0.2
CH:St	0.8	0.2	-	-	-	0.2
CH:St:TA	0.8	0.2	-	0.04	-	0.2

Para la elaboración de las dispersiones formadoras de películas a base de quitosano (CH) se preparó, en primer lugar, una dispersión de CH al 2% (p/p) en agua destilada. Se añadió ácido acético glacial al 2% (v/p) y glicerol en una proporción másica 1:0.20 (polímero: glicerol), y se mantuvo en agitación magnética a 150 rpm durante 24h con una temperatura de 40°C. En las formulaciones en las que se incorpora ácido tánico, éste se pesó y añadió en agitación.

Por otro lado se preparó una disolución de almidón (St) al 2% (p/p) en agua destilada. Primero se llevó la disolución incompleta a calentamiento en baño termostataado a 95°C para gelatinizar el almidón durante media hora, agitando cada 5 minutos para promover una mejor homogenización de la gelatinización. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar 10 minutos en un baño de hielos. A continuación se completó con el glicerol y agua destilada. Para la formulación CH:St se mezclaron las dos disoluciones preparadas en una proporción 0.2:0.8 (quitosano: almidón p/p) y de igual manera para la formulación CH:St:TA, con el quitosano al que se le había añadido el ácido tánico.

Para la formulación HPMC se dispersó este polímero al 2% (p/p) en agua destilada y se dejó en agitación magnética con temperatura hasta que alcanzar los 80°C manteniéndola 10min. Transcurrido el tiempo se añadió el glicerol y se ajustó con agua destilada por las posibles pérdidas por evaporación.

Para obtener los formulados con PP se les añadió a las dispersiones preparadas el extracto liofilizado de tomillo en la proporción 1:0.15 (polímero: PP p/p) Figura 3-2 (a).

Una vez formuladas todas las dispersiones, se homogeneizaron con la ayuda del rotor-estator (Ultraturrax Yellow Line DL 25 Basic, IKA, Janke y Kunjel, Alemania) durante 4 minutos a 13500rpm. A continuación se desgasificaron, primero 10 minutos en el baño de ultrasonidos y por último en un desgasificador a vacío a temperatura ambiente (Figura 3-2 (b)), excepto la formulación de HPMC que se desgasificó en refrigeración.

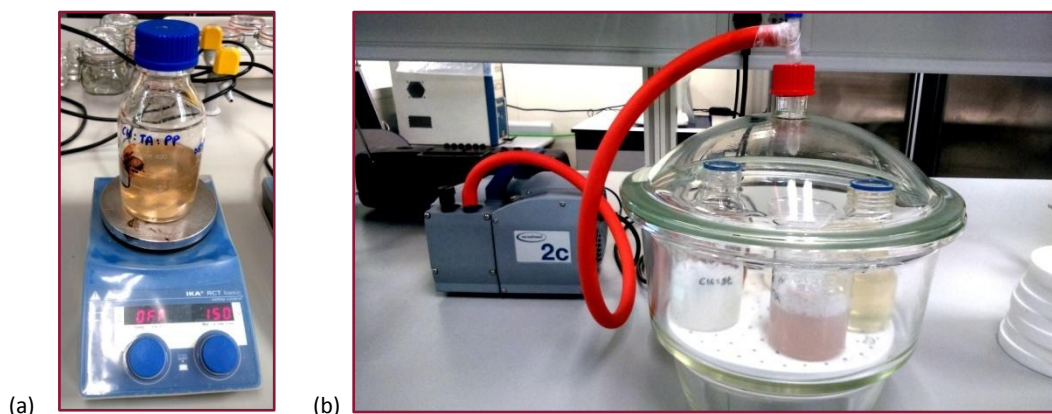


Figura 3-2 Dispersión formadora de películas en agitación con la incorporación de PP (a) desgasificador a vacío (b).

3.4 OBTENCIÓN DE LOS FILMS Y ACONDICIONAMIENTO

Estas dispersiones formadoras de films se vertieron en placas de teflón (con un área de $176,6 \text{ cm}^2$) para los ensayos de mecánicas, humedad y solubilidad. Para medir la capacidad antioxidante se vertieron en placas Petri (con un área de $59,4 \text{ cm}^2$). Se mantuvo siempre constante la cantidad de polímero en cada una de las películas cuya densidad de polímero por unidad de superficie fue siempre de $56.62 \text{ g de polímero/m}^2$. Para ello se pesó la cantidad adecuada de dispersión, evitando la adición de burbujas, y se dejaron en una superficie nivelada a secar durante 48h, controlando las condiciones de humedad relativa y temperatura ($\text{HR}=50\%$ y $T^\circ= 25^\circ\text{C}$), tal y como muestra la Figura 3-3.

Una vez formadas las películas se despegaron con ayuda de una pequeña espátula y se acondicionaron en un desecador con una disolución saturada de cloruro sódico, para así alcanzar una humedad relativa de 75% y a una temperatura de 25°C .



Figura 3-3 Dispersiones formadoras de películas en placas de teflón.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS

3.5.1 HUMEDAD

Una vez acondicionadas las películas a una humedad relativa de 75% y 25°C, llegando éstas a peso constante, se procedió a determinar la humedad. Para ello, se seleccionaron tres películas de cada formulación y se recortaron en pequeños trozos que se introdujeron en pequeñas capsulas de aluminio previamente pesadas. Para acelerar el proceso de deshidratación las muestras estuvieron 48h en la estufa a vacío (Vacío TEM-T) y después se almacenaron en el desecador con pentóxido de fósforo hasta llegar a peso contante. La humedad se obtuvo por la diferencia de peso entre el peso seco inicial y final de las películas.

3.5.2 SOLUBILIDAD

Para el ensayo de solubilidad se utilizaron las películas que se habían llevado a deshidratación total durante el ensayo de humedad. Las películas se cortaron en trozos de aproximadamente 2cm y se registró el peso. Una vez preparados se colocaron en placas Petri pequeñas de peso conocido y se le añadió agua destilada siguiendo el ratio 1:25 (película: agua destilada) (p/v) tal y como muestra la Figura 3-4, y se mantuvo durante 24h a 25°C.



Figura 3-4 Película en placa Petri con agua para el ensayo de solubilidad.

Transcurrido el tiempo se quitó toda el agua y se introdujeron en estufa a 60°C durante 24h. Posteriormente, fueron transferidas a un desecador con pentóxido de fosforo durante dos semanas hasta llegar a peso constante como muestra Figura 3-5. La solubilidad se obtuvo por la diferencia de peso entre el peso seco inicial y final de las películas (Ortega-Toro et al., 2015). El ensayo se realizo por triplicado.



Figura 3-5 Desecador con pentóxido de fósforo con las placas Petri para el ensayo de solubilidad.

3.5.3 ESPESOR

Para la medida del espesor se prepararon 3 películas de todas las formulaciones acondicionadas a 25° y 75% de HR. Se recortó cada película en 4 trozos rectangulares en las dimensiones 25mm x 100mm, ya que son necesarias para el posterior ensayo de propiedades mecánicas. Una vez preparados todos los trozos, se procedió a su medida utilizando un micrómetro electrónico digital con una precisión de 0,001mm (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). De cada rectángulo se midieron 6 puntos aleatorios, tal y como se muestra en la Figura 3-6.



Figura 3-6 Medición de los espesores con el micrómetro electrónico digital.

3.5.4 PROPIEDADES MECÁNICAS

Una vez tomadas las medidas de espesor, los trozos de film recortados en forma rectangular, en las dimensiones 25mm x 100mm (Figura 3-7), se volvieron a acondicionar para asegurar las condiciones de medida (75% HR y 25°C).



Figura 3-7 Preparación de las películas para el ensayo de mecánicas.

Las propiedades mecánicas se determinaron con una prensa de ensayos mecánicas (Figura 3-8) (Stable Micro System, TA. XT plus, Haslemere, Inglaterra) siguiendo el método estándar ASTM D882 (2001). Los films se montaron en pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas fue de 50 mm con una velocidad de elongación de $50 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

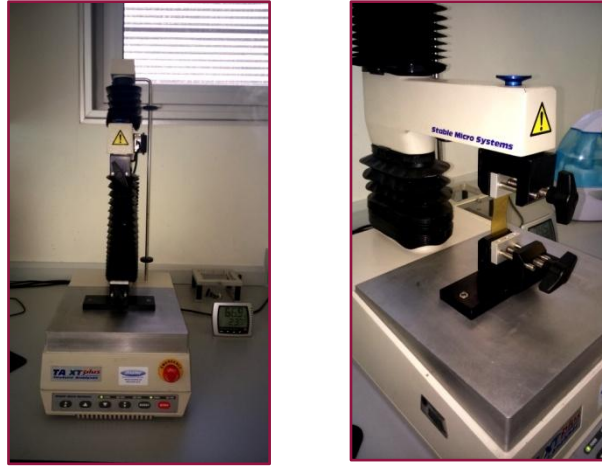


Figura 3-8 Prensa de ensayos mecánicos utilizada para la determinación de las propiedades mecánicas de las películas.

Los datos obtenidos del ensayo mecánico fueron la fuerza (N) y la distancia (mm) hasta la rotura del film. A partir de los datos obtenidos y con las ecuaciones (1) y (2) se obtuvieron las curvas Esfuerzo vs Deformación de Hencky (Peleg, 1979), donde σ es el esfuerzo unitario (N/m^2), F es la fuerza aplicada (N) y A es el área de la película sobre la cual actúa la fuerza (m^2), ϵ es la deformación, L la longitud de la película a cada tiempo (m) y L_0 la longitud original (m). (Rayas, Rodríguez-Vera & Martínez, 2003). A partir de estas curvas, se determinó el esfuerzo (TS) y deformación (%E) en el punto de rotura y el módulo de elasticidad (ME).

$$\epsilon_H = \ln \frac{L}{L_0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\sigma = \frac{F \cdot (L_0 + L)}{A \cdot L_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

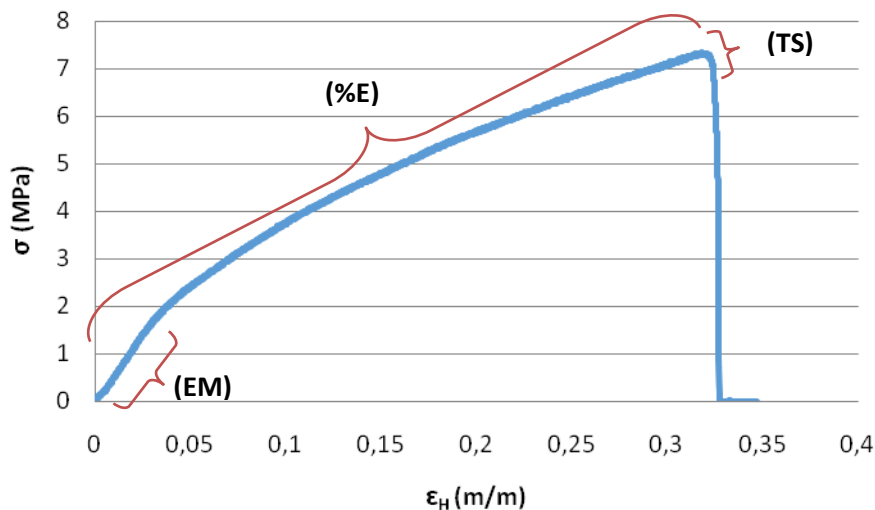


Figura 3-9 Curva típica de esfuerzo vs deformación de Hencky durante el ensayo de tracción.

Como podemos observar en la Figura 3-9 el módulo de Young o módulo de elasticidad, (EM) es la pendiente de la línea esfuerzo- deformación de Hencky. Por otro lado el porcentaje

de elongación (%E) es la deformación hasta el punto de fractura, expresado en % respecto a L_0 y por último la tensión de fractura (TS) es el punto más elevado de la curva.

3.5.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En este ensayo se determinó la capacidad antioxidante de las películas enriquecidas con el extracto polifenólico a través de un método espectrofotométrico descrito por Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995). Este método está basado en la reducción del radical DPPH• en una solución alcohólica por un antioxidante dador de hidrógeno. El DPPH ha sido ampliamente utilizado para evaluar la eficacia de eliminación de radicales libres de diferentes sustancias antioxidantes (Ozcelik et al., 2003). Este radical contiene un electrón desapareado el cual es responsable de la absorbancia a 515nm y también del intenso color morado. Cuando el DPPH acepta el electrón cedido por el compuesto antioxidante, el DPPH se decolora, lo cual puede ser cuantitativamente medido por los cambios en la absorbancia (Hasan et al., 2009), tal y como se muestra en la Figura 3-10.

Los films objeto de estudio fueron los seis formulados con la adición del extracto polifenólico. Además, se midió la actividad antioxidante de las películas de referencia (sin extracto polifenólico adicionado) que incorporaron ácido tánico (CH:TA y CH:St:TA), ya que se trata de un polifenol de origen natural con actividad antioxidante (Lopes et al., 1999; Ferguson, 2001; Wu et al., 2004), y los formulados a base de quitosano (CH y CH:St), pues existen publicaciones que corroboran cierta efectividad antioxidante. Para este ensayo se utilizaron las películas vertidas en placa Petri, donde la cantidad constante de polímero fue de 0.336 g/film Petri. Por tanto, la cantidad de PP incorporada en cada film fue de 0.0504g (relación polímero:PP de 1:0.15). Del mismo modo, manteniendo la misma relación de polímero:TA de 1:0.04, se conoce la cantidad de ácido tánico incorporada a los films es de 0.01344 g/film Petri. Para ello, en primer lugar, las películas obtenidas se cortaron en trozos muy pequeños y se redisolviéron en 150ml de una disolución al 1% de ácido acético, ya que previamente se determinó que era la relación óptima para ser medida en el espectrofotómetro. A continuación se pasaron por el Ultraturrax durante 2 minutos a 8000rpm y se dejaron en agitación no más de 20min tapados, para así evitar su oxidación.



Figura 3-10 Ejemplo de la decoloración del DPPH• al reaccionar con el antioxidante.

Previamente a las mediciones de las muestras, se preparó una curva patrón de DPPH utilizando las siguientes diluciones de radical DPPH: 0.1mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM y 0.08mM. El ensayo se realizó por duplicado y se midió la absorbancia, a una longitud de onda de 515nm, para obtener la recta de calibrado y en consecuencia la ecuación que nos relaciona la absorbancia con la cantidad de DPPH• disuelto. Para determinar el tiempo de reacción total del radical con las muestras, se hizo un estudio más exhaustivo sobre la

capacidad antioxidante del extracto de tomillo liofilizado, midiendo la absorbancia de la reacción cada 15 minutos hasta obtener un valor constante.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras se realizaron mediciones de soluciones con diferentes proporciones muestra: DPPH (Tabla 3-2) con un espectrofotómetro (ThermoScientific, Evolution 201 UV visible Spectrophotometer), a una longitud de onda de 515nm y utilizando metanol como blanco. Se midió su absorbancia a tiempo inicial con metanol en las mismas concentraciones establecidas. Posteriormente, se midieron las muestras transcurridos los 30 minutos de la reacción como se había comentado en el apartado anterior. Las cubetas se taparon para evitar la evaporación del metanol. Estos valores se transformaron en concentración de DPPH, utilizando una curva de patrón calibrado. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La concentración de DPPH remanente se calculó a través de la ecuación 3:

$$[DPPH]_{rem} = \frac{DPPH_{t=0} - DPPH_{t=30}}{DPPH_{t=0}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

A partir de estos valores, se determinó el parámetro EC₅₀. El parámetro EC₅₀ indica la cantidad antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH· hasta el 50% una vez se ha alcanzado la estabilidad de la reacción. El valor EC₅₀ se obtiene del % de DPPH· restante una vez alcanzada la estabilidad de la reacción versus los g de film/g de DPPH. En consecuencia, un valor bajo de EC₅₀ se relaciona con una actividad antioxidante más intensa de la muestra analizada.

Tabla 3-2 Volúmenes de muestra con 0.15g de PP mezclados con diferentes volúmenes de DPPH· (0.022 g/L).

V muestra (ml)	V DPPH· (ml)*
0	4
0.05	3.95
0.10	3.90
0.15	3.85
0.20	3.80
0.25	3.75
0.30	3.70

*Solución de metanol del radical DPPH de 0.022 g/L, cuya absorbancia es de 0.7 ± 0.02.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurión XVI (Manugistics Corp., Rockville, Md.) para un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método LSD (Método de la Mínima Diferencia Significativa) para el análisis de resultados.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS FILMS

4.1.1 HUMEDAD Y SOLUBILIDAD

Humedad

La humedad de equilibrio de las películas almacenadas en las condiciones de humedad relativa y temperatura de 25°C y 75% HR se muestran en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1 Contenido en humedad (g agua/ g película seca) para las películas sin y con polifenoles. Valores medios y (desviaciones estándar).

	PELÍCULAS CONTROL	PELÍCULAS CON PP
	%Xw (bS)	%Xw (bS)
CH	0.246 (0.005) ^d	0.261 (0.005) ^d
CH:TA	0.229 (0.022) ^d	0.232 (0.025) ^d
St	0.181 (0.042) ^c	0.131 (0.009) ^c
CH:St	0.159 (0.003) ^{bc}	0.144 (0.009) ^{ab}
CH:St:TA	0.140 (0.010) ^{ab}	0.182 (0.030) ^{ab}
HPMC	0.142 (0.020) ^{ab}	0.112 (0.020) ^a

^{abcd} letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$)

Como se puede observar, se obtuvieron los valores más altos de humedad de equilibrio en las formulaciones compuestas por quitosano y quitosano con ácido tánico. Esta tendencia podría explicarse por un mayor carácter hidrofílico del quitosano frente al almidón (Bonilla et al., 2013), asociado a una mayor capacidad de unión del agua con las moléculas de quitosano. Sin embargo, las formulaciones que contenían mezclas de almidón y quitosano mostraron los valores más bajos de humedad, debido posiblemente a diferencias en el empaquetamiento entre ambos polímeros.

La incorporación de polifenoles no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la humedad de equilibrio ($p > 0.05$).

Solubilidad

La Tabla 4-2 muestra los valores de solubilidad (g/L) de las diferentes películas. Como se puede observar, los valores de solubilidad fueron muy similares entre sí, excepto para la película de HPMC, que mostró los mayores valores por su completa disolución. La incorporación de polifenoles aumentó de forma significativa la solubilidad de las muestras, en coherencia con el carácter soluble de los mismos.

Tabla 4-2 Solubilidad (g film/L) para películas con y sin PP. Valores medios y (desviación estándar).

	PELÍCULAS CONTROL	PELÍCULAS CON PP
	Solubilidad (g film/L)	Solubilidad (g film/L)
CH	6.2 (0.4) ^{a1}	8.4 (0.4) ^{b2}
CH:TA	6.8 (0.2) ^{a1}	9.1 (0.4) ^{b2}
St	6.4 (0.6) ^{a1}	9.5 (0.5) ^{b2}
CH:St	6.4 (0.6) ^{a1}	7.7 (0.5) ^{a2}
CH:St:TA	6.8 (0.3) ^{a1}	8.1 (0.1) ^{b2}
HPMC	40 (0) ^{b1}	40 (0) ^{c1}

^{abcd} letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).
^{1,2} números diferentes en una misma fila indica diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).

4.1.2 ESPESOR

En la Tabla 4-3 se muestra el espesor de las películas para cada una de las formulaciones con y sin el extracto de polifenoles de tomillo.

Tabla 4-3 Espesores de las películas con y sin polifenoles. Valores medios y (desviaciones estándar).

	PELÍCULAS CONTROL	PELÍCULAS CON PP
	Espesor (mm)	Espesor (mm)
CH	0.090 (0.012) ^{f1}	0.087 (0.004) ^{ef1}
CH:TA	0.091 (0.008) ^{f1}	0.084 (0.003) ^{e1}
St	0.055 (0.003) ^{b1}	0.050 (0.003) ^{a1}
CH:St	0.058 (0.002) ^{b1}	0.072 (0.005) ^{d2}
CH:St:TA	0.064 (0.006) ^{c1}	0.070 (0.002) ^{d2}
HPMC	0.060 (0.007) ^{bc1}	0.070 (0.007) ^{d2}

^{abcd} letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).
^{1,2} números diferentes en una misma fila indica diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).

Como se observa en la tabla 4-3, se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$) en el espesor en función de la formulación, a pesar de que todas las películas se vertieron manteniendo una proporción constante de polímero/superficie (56.62g de polímero/m²). Para una densidad de sólidos constante, el espesor final de éstos va a depender del tipo de organización de las cadenas de polímeros, de las interacciones que éstos desarrollen entre ellas y los polifenoles, y de la humectación de la matriz. Así, las formulaciones de quitosano presentaron los valores más altos, presentando una estructura más abierta, en coherencia con su mayor contenido en humedad. Las formulaciones de almidón y la de HPMC presentaron los valores más bajos, dando como resultado una organización de las cadenas más compacta. Las mezclas de ambos polímeros presentaron valores intermedios. La adición de TA a la película de quitosano no afectó significativamente al espesor de las películas.

En general, se observaron dos tendencias que no dependieron del contenido en humedad de las películas; la incorporación de PP disminuyó el espesor de las películas en el caso de las películas de quitosano puro y aumentó en el caso de las mezclas CH:St y HPMC. Los

polifenoles (ambos, PP y TA) (-) y el quitosano (+) tienen cargas opuestas, y por tanto, su mezcla puede originar interacciones que den lugar a una compactación de las cadenas poliméricas y por tanto, menor espesor. Esto no se observó cuando el CH se mezcla con el almidón, posiblemente por un efecto de apantallamiento en las cargas del CH.

4.1.3 PROPIEDADES MECÁNICAS

La tensión de fractura (TS) es el máximo esfuerzo que puede soportar una película antes de romperse (Gennadios et al., 1997) y el porcentaje de elongación en la rotura (%E) es la máxima elongación de la película antes de su rotura (Krochta and De Mulder-Johnston, 1997). De la pendiente inicial de la gráfica, donde se relaciona la tensión (σ) vs la deformación (ϵ), se obtiene el módulo de elasticidad (EM), parámetro relacionado con la rigidez del material a bajas deformaciones (Rayas, Rodríguez-Vera, & Martínez, 2003). Estos parámetros mecánicos son útiles para describir las propiedades mecánicas de los films, y se relacionan estrechamente con su estructura (Mc Hugh and Krochta, 1994).

La siguiente (Figura 4-1) muestra la curva de esfuerzo de tracción vs deformación de Hencky típicas de cada una de las formulaciones, donde se puede observar el efecto de la adición de PP sobre el comportamiento mecánico de las muestras.

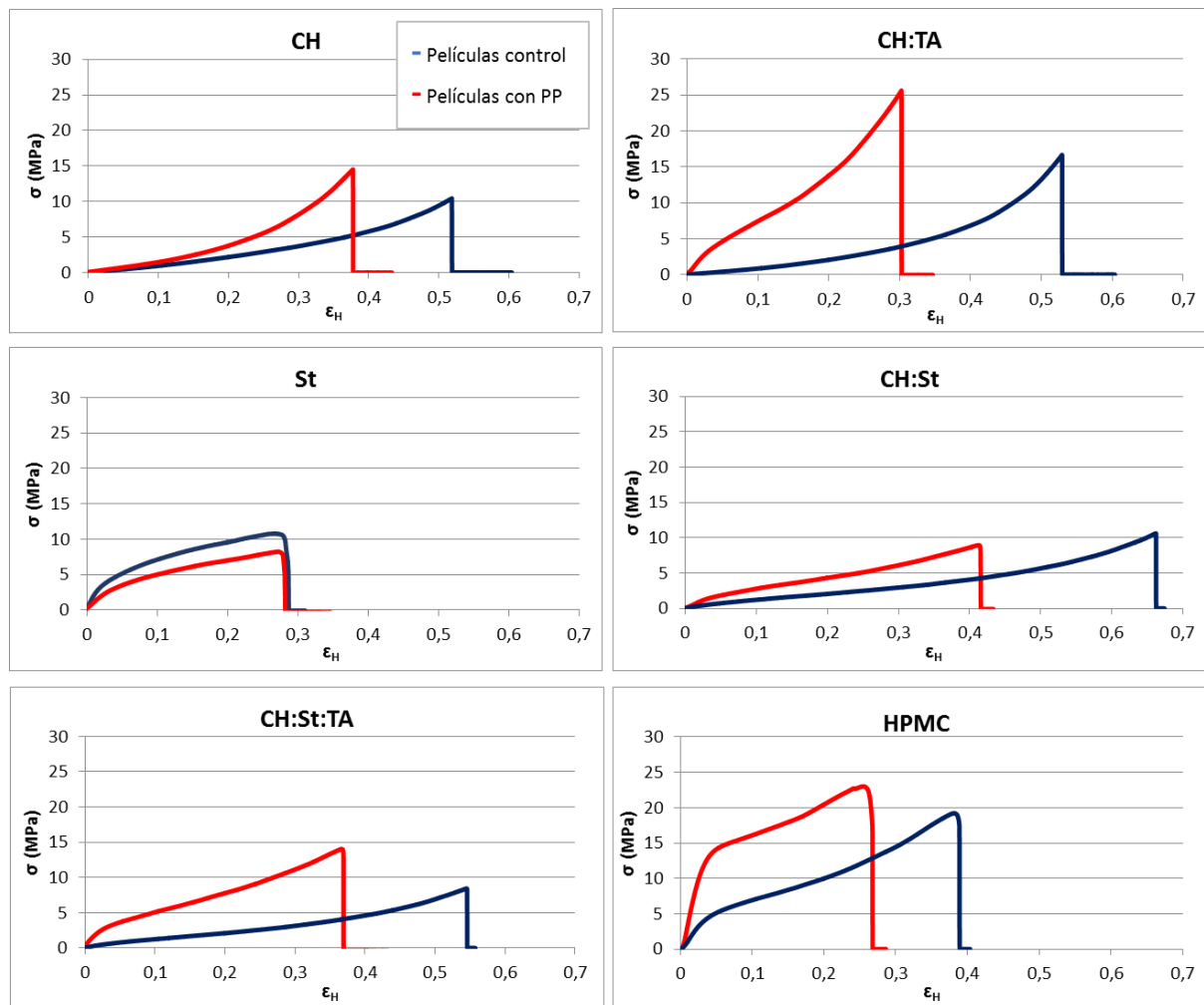


Figura 4-1 Curvas típicas de esfuerzo de tracción vs deformación de Hencky de cada una de las formulaciones con adición de PP en rojo y películas control en azul.

Tabla 4-4 Módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y porcentaje de extensibilidad (E) de las películas control y con PP. Valores medios y (desviación estándar).

	PELÍCULAS CONTROL			PELÍCULAS CON PP		
	EM	TS (MPa)	%E	EM	TS (MPa)	%E
CH	8.1 (0.5) ^{a,1}	11 (3) ^{cd,1}	70 (4) ^{h,2}	14 (3) ^{a,2}	13 (4) ^{de,1}	39 (9) ^{d,1}
CH:TA	8.4 (0.5) ^{a,1}	15 (3) ^{e,1}	64 (4) ^{g,2}	102 (17) ^{c,2}	23 (6) ^{g,2}	35 (4) ^{bcd,1}
St	147 (51) ^{d,1}	9.8 (0.9) ^{abc,1}	29 (4) ^{a,2}	103 (36) ^{c,2}	7.3 (0.9) ^{a,1}	30 (9) ^{ab,1}
CH:St	17 (3) ^{a,1}	9.5 (1.7) ^{abc,1}	90 (11) ^{i,2}	51 (9) ^{b,2}	8.2 (1.2) ^{ab,1}	47 (6) ^{e,1}
CH:St:TA	18 (2) ^{a,1}	10 (2) ^{abc,1}	79 (7) ^{i,2}	82 (31) ^{c,2}	11 (3) ^{bcd,1}	36 (6) ^{cd,1}
HPMC	130 (22) ^{d,1}	19.0 (1.6) ^{f,1}	53 (8) ^{f,2}	424 (67) ^{e,2}	23 (6) ^{g,2}	32 (9) ^{abc,1}

^{abcd} letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$)

^{1,2} números diferentes en una misma fila indica diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$)

La Tabla 4-4 muestra los valores de los parámetros mecánicos obtenidos para cada una de las formulaciones estudiadas. Como se puede observar, las películas a base de HPMC presentaron la mayor rigidez (mayor módulo de elasticidad) y mayor resistencia a la rotura (mayor TS). En cambio, las películas a base de CH (CH, CH:St y CH:St:TA), presentaron la mayor extensibilidad (mayor %E), siendo estas diferencias significativas ($p < 0.05$).

Las películas con PP que incorporan ácido tánico, presentaron un aumento significativo en el módulo de elasticidad (EM) y en la tensión de fractura (TS) debido al efecto cross-linking del ácido tánico en la matriz del biopolímero (Rivero, García and Pinotti, 2010), dando lugar a películas más rígidas y resistentes pero, en consecuencia, ligeramente menos elásticas, con valores del porcentaje de elongación (%E) significativamente menores.

La incorporación de PP dio lugar a un aumento significativo de la rigidez de las películas (EM) y a un descenso de la extensibilidad (%E), produciendo una estructura más frágil que se puede atribuir a una menor movilidad de las cadenas, debido a las interacciones establecidas entre el extracto y la matriz polimérica que causan la agregación de cadenas de polímero (Weis et al. 2013).

El marcado aumento del módulo elástico (EM) de las películas de HPMC con PP es debido a un cambio en el comportamiento a la rotura de las películas, tal y como se refleja en la gráfica de la Figura 4-1, donde se observa la aparición de microrroturas antes del colapso final.

4.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FILMS

Obtención de la curva patrón

A partir de las diluciones 0.1mM, 0.01mM, 0.02mM, 0.04mM, 0.06mM y 0.08mM, se obtuvo la curva patrón de calibrado del DPPH, obteniéndose valores de absorbancia en el intervalo 0.2-0.8, a una longitud de onda de 515nm, tal y como se muestra en las Figura 4-2 y Figura 4-3. En esta última, se adjunta la recta de calibrado obtenida, junto con su coeficiente de correlación.



Figura 4-2 Cubetas para la recta de calibrado del DPPH.

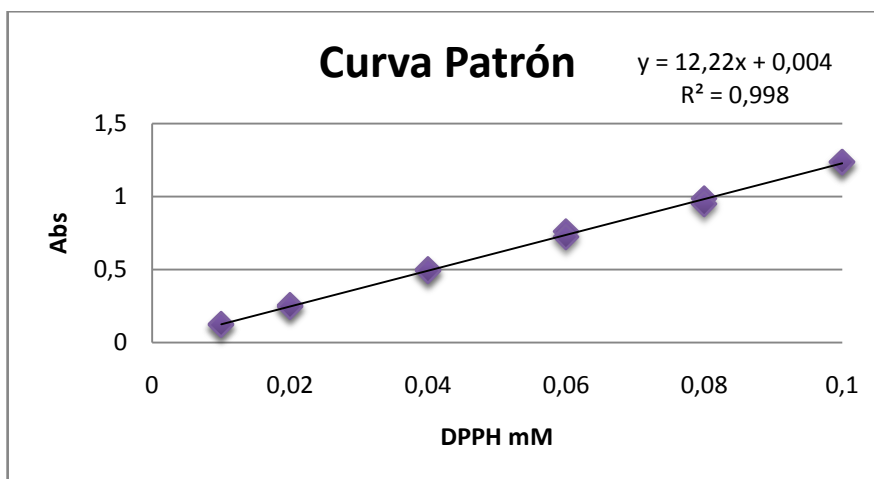


Figura 4-3 Recta de calibrado del DPPH•.

Determinación del tiempo de estabilidad de la reacción

En la Figura 4-4 se muestra la variación típica de la absorbancia para diferentes concentraciones de muestra ensayada en función del tiempo, a modo de ejemplo. Como se puede observar, la reacción se estabiliza transcurridos 30 minutos desde que se le añade el reactivo DPPH a la muestra, ya que los datos de absorbancia se mantienen prácticamente constantes. Esto es importante tenerlo en cuenta en la medida, ya que dependiendo del tipo de antioxidante que se trate, los tiempos pueden fluctuar entre unos pocos minutos a varias horas. Por tanto, para las muestras ensayadas se decidió tomar como tiempo final de reacción del ensayo de actividad antioxidante, 30 min.

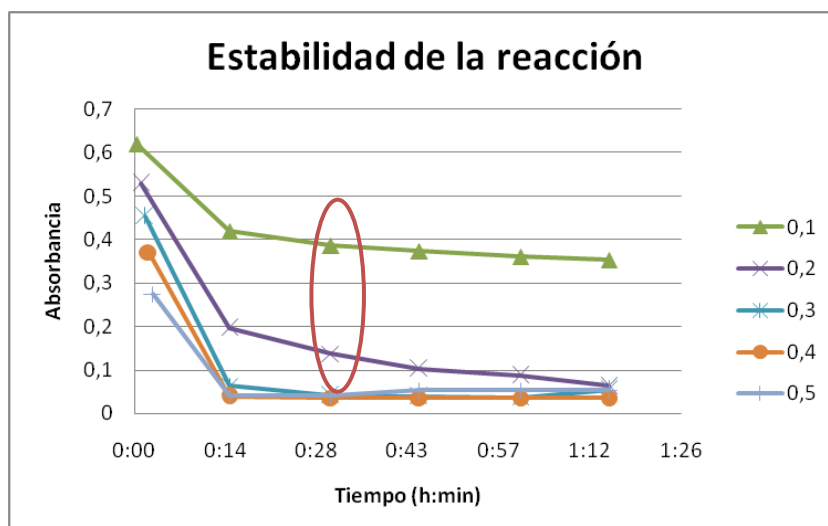


Figura 4-4 Representación de la abs vs t para las diferentes concentraciones de muestra (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) en ml.

Actividad Antioxidante de los films

Cálculo del parámetro EC₅₀

A partir de la curva de calibrado obtenida previamente ($y = 12,21604x + 0,00336$), se calculó la cantidad de DPPH· que queda sin reaccionar con la muestra. En la tabla 4-5 se detallan a modo de ejemplo los resultados obtenidos para una de las formulaciones, (CH:TA:PP).

El DPPH· tiene un color morado intenso y como bien podemos observar en la Figura 4-5 al reaccionar con el antioxidante va perdiendo color hasta llegar a un amarillo muy claro. A la izquierda de la imagen aparece la cubeta con 0.05ml de muestra reaccionando con 3.95ml de DPPH·.

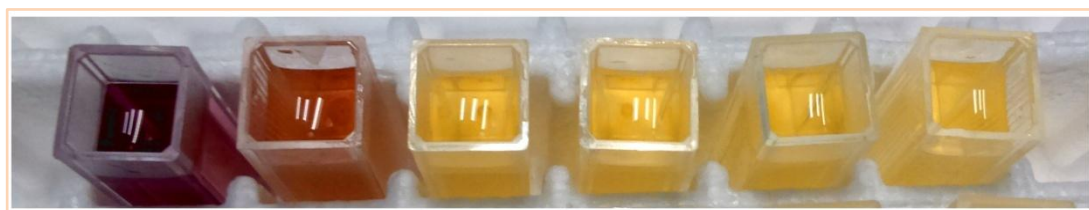


Figura 4-5 Reducción del DPPH transcurridos los 30min.

Tabla 4-5 Valores obtenidos de la absorbancia a tiempo inicial y transcurridos 30min de cada una de las tres repeticiones de la formulación CH:TA:PP. Volúmenes de muestra y DPPH que se hacen reaccionar.

Formulación CH:TA:PP					
V Metanol (mL)	V DPPH (mL)	Abs t=0	Abs t=30 min Film(1)	Abs t=30min Film(2)	Abs t=30min Film(3)
0.00	4.00	0.788			
0.05	3.95	0.785	0.419	0.446	0.460
0.10	3.90	0.775	0.176	0.156	0.171
0.15	3.85	0.765	0.033	0.042	0.034
0.20	3.80	0.760	0.045	0.039	0.031
0.25	3.75	0.746	0.037	0.037	0.061
0.30	3.70	0.742	0.032	0.042	0.032

A partir de los datos de absorbancia a tiempo cero de reacción y tras 30 minutos (Tabla 4-5), se calculó el porcentaje de DPPH que queda sin reaccionar (DPPH remanente, ecuación 3), para cada una de las concentraciones estudiadas, tal y como se muestra en la gráfica de la Figura 4-6. Los puntos de esta gráfica (%DPPH_{rem} vs mg film/mg DPPH), se ajustaron a un polinomio para poder calcular el parámetro EC₅₀, es decir, la relación (mg film/ mg DPPH) necesaria para que el DPPH inicial se haya reducido al 50%.

Por lo tanto para esta formulación, en la ecuación obtenida mostrada en la Figura 4-6 damos el valor Y=50, obtenemos X=1,764mg film/mg DPPH para esta repetición de la formulación CH:TA:PP. De la misma manera se han obtenido todos los datos de la tabla 4-7 para las diferentes películas con y sin polifenoles y también para los compuesto puros (Tabla 4-6).

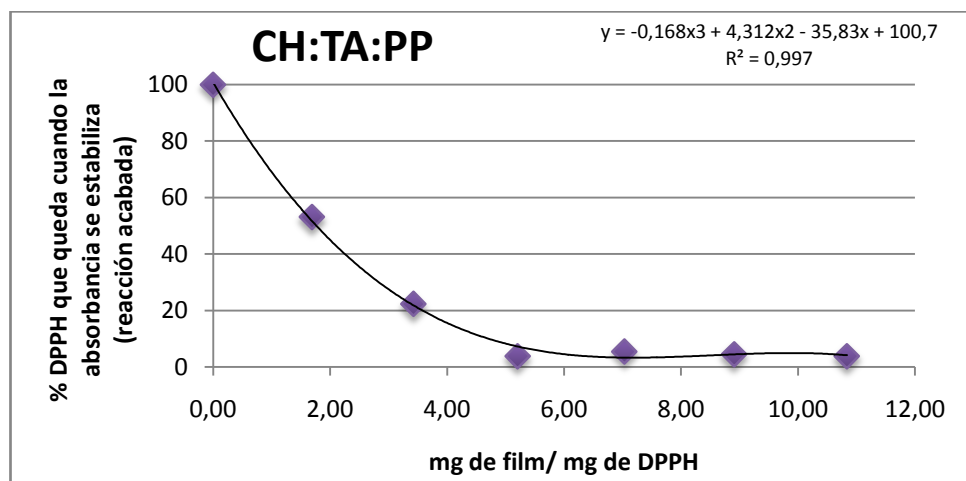


Figura 4-6 Porcentaje de DPPH que queda cuando la reacción es estable frente a los mg de film/mg de DPPH.

EC₅₀ de los compuestos puros

La Tabla 4-6 muestra los valores de EC₅₀ encontrados para el ácido tánico, el quitosano y el extracto de polifenoles de tomillo, medidas que se realizaron para evaluar la contribución de estos componentes a la actividad antioxidante total de las películas.

El ácido tánico posee un valor muy bajo de EC₅₀ lo cual significa que es un antioxidante muy efectivo tal y como se ha descrito previamente en otros estudios (Gülçin et al; 2010). De hecho, presentó la mayor actividad antioxidante, como podemos observar en la Tabla 4-3. Con el CH no se consiguió alcanzar una reducción del 50% de la concentración inicial de DPPH, poniendo de manifiesto su menor actividad como antioxidante, tal y como han observado otros autores (Yen, Yang and Mau, 2008). El extracto liofilizado rico en polifenoles también presentó un bajo valor de EC₅₀ debido a la alta capacidad antioxidante (Rice-Evans, Miller and Paganga, 1997), aunque mayor que el del ácido tánico.

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la capacidad antioxidante del ácido tánico es mayor que la del extracto de polifenoles de tomillo. Por tanto, aunque la cantidad incorporada de ácido tánico en las películas siempre fue menor que la de polifenoles, su contribución a la capacidad antioxidante total de la película puede jugar un papel importante y debe ser tenida en cuenta.

Tabla 4-6 Valores de EC₅₀ (mg compuesto/mg DPPH) del ácido tánico puro, CH puro y del extracto liofilizado obtenido. Valores medio y (desviación estándar).

COMPUESTO ACTIVO	EC ₅₀
Ácido tánico	0.012 (0.005)
CH	*
Extracto polifenoles	0.652 (0.039)

* 0.3364g de CH consiguió reducir al 95.8% el DPPH.

EC₅₀ de las películas

Tabla 4-7 Valores de EC₅₀ (mg Film/ mg DPPH) de las películas sin y con PP. Valores medios y (desviaciones estándar).

	PELÍCULAS CONTROL	PELÍCULAS CON PP
	EC ₅₀	EC ₅₀
CH	-	3.98 (0.07) ^d
CH:TA	3.26 (0.04) ^{cd1}	1.80 (0.04) ^{a2}
St	-	9.04 (1.07) ^f
CH:St	-	5.25 (0.12) ^e
CH:St:TA	2.84 (0.26) ^{bc1}	2.25 (0.09) ^{ab2}
HPMC	-	9.06 (0.50) ^f

^{abcd} letras diferentes en una misma columna denotan diferencias significativas entre muestras (p<0.05)
^{1,2} números diferentes en una misma fila indica diferencias significativas entre muestras (p<0.05)

En la tabla 4-7 podemos observar los resultados obtenidos de EC₅₀ de las películas sin y con polifenoles añadidos. En las películas sin polifenoles y coherentemente con los resultados obtenidos de los compuestos puros, únicamente se obtuvieron reducciones del DPPH en aquellas que contenían ácido tánico, obteniendo valores muy bajos, lo que significa una eficiente capacidad antioxidante. La reducción del radical fue mayor en la formulación con mezcla de quitosano y almidón, seguramente debido a que el ácido tánico está más disponible y contribuye en menor medida al entrecruzamiento de las cadenas de quitosano, que está en

menor proporción, en comparación con la formulación con quitosano. El HPMC y el St no poseen propiedades antioxidantes y el CH, aunque sí que presentó cierta actividad, no fue capaz de reducir hasta el 50% la concentración inicial de DPPH, tal y como se ha comentado anteriormente.

Cuando se incorporó el extracto de polifenoles, todas las películas presentaron actividad antioxidante, aunque como se puede observar en la Tabla 4-7, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las formulaciones. Coherentemente con los datos anteriores, las películas que mostraron un mayor poder antioxidante fueron las que incorporaron ácido tánico y polifenoles (CH:TA:PP y CH:St:TA:PP).

Las matrices como la de St o HPMC con PP incorporados presentan los valores más altos de EC_{50} , por lo que su capacidad antioxidante es menor, posiblemente porque los PP son más susceptibles de oxidarse durante el proceso de obtención de los films, en contacto con el O_2 o la luz, por tratarse de matrices más abiertas. La Figura 4-7 muestra las coloraciones que adquirieron estas películas debido a procesos oxidativos durante el secado y almacenamiento de los films.

En cambio, la matriz de CH puro presentó valores más bajos, seguramente debido a que los PP quedan encapsulados en la matriz de quitosano mediante interacciones electrostáticas (quitosano tiene cargas positivas y polifenoles, cargas negativas) evitando así su previa oxidación, tal y como se muestra en la Figura 4-8. La formulación con mezcla de almidón y quitosano (CH:St:PP) presentó valores intermedios.



Figura 4-7 Películas de St y HPMC durante el proceso de la obtención del film donde se muestra las coloraciones adquiridas.

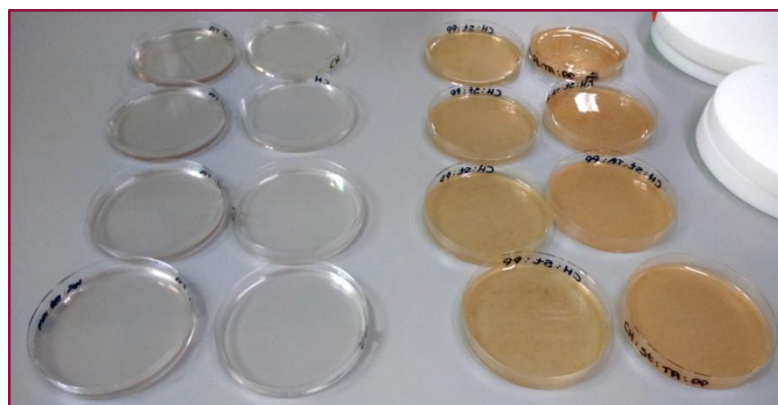


Figura 4-8 Películas de CH:St, CH:St:Ta sin y con PP.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron películas a base de polímeros y polifenoles del tomillo con buenas propiedades mecánicas y elevada actividad antioxidante. Entre ellas, las que presentaron las mejores características fueron las compuestas por quitosano y ácido tánico, por sus buenas propiedades mecánicas y su mayor actividad antioxidante. Esto es debido a la mayor eficiencia de encapsulación de los polifenoles y al efecto cross-linking del ácido tánico, que también contribuyó al poder antioxidante de las películas obtenidas. Estas películas pueden dar lugar a envases biodegradables o recubrimientos comestibles, que podrían minimizar o prevenir procesos oxidativos en alimentos, manteniendo la calidad nutricional y prolongando su vida útil. Futuros estudios se centrarán en la aplicación de estas películas a alimentos que sean sensibles a procesos oxidativos.

6. BIBLIOGRAFIA

- A. M., Rayas, J. A., & Rodríguez-Vera, E. (2003). Medición del modulo de young en el hule latex usando ESPI. *Revista mexicana de física*, 49 (6), 555-564.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), pp.837-842.
- Antunes, M., M Gago, C., M Cavaco, A., & G Miguel, M. (2012). Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 4(2), 114-122.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In standard D882. Annual book of American standard testing methods, (162-170). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Baldwin, E. A., Hagenmaier, R., & Bai, J. (Eds.). (2011). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press.
- Baranauskiene, R., Venskutonis, P. R., Viškelis, P., & Dambrauskiene, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51(26), 7751-7758.
- Bonilla, J., Talón, E., Atarés, L., Vargas, M. and Chiralt, A. (2013). Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 118(3), pp.271-278.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Cuvelier, M., Richard, H., & Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of AOACs*, 73, 645–652.
- Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linszen, J. P., & Venskutonis, R. (2002). Isolation and Structure Elucidation of Radical Scavengers from *Thymus vulgaris* Leaves. *Journal of Natural Products*, 65(6), 892-896.
- de Aquino, A., Blank, A. and de Aquino Santana, L. (2015). Impact of edible chitosan–cassava starch coatings enriched with *Lippia gracilis* Schauer genotype mixtures on the shelf life of guavas (*Psidium guajava* L.) during storage at room temperature. *Food Chemistry*, 171, pp.108-116.
- Duh, P. D., & Yen, G. C. (1997). Antioxidant efficacy of methanolic extracts of peanut hulls in soybean and peanut oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), 745-748.
- Elsabee, M. and Abdou, E. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), pp.1819-1841.
- Essawi, T., & Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 343-349.
- Fadini, A. L., Rocha, F. S., Alvim, I. D., Sadahira, M. S., Queiroz, M. B., Alves, R. M. V., & Silva, L. B. (2013). Mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen–cocoa butter edible films plasticised with sucrose. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 625-631.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.

- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1), 89-111.
- Galus, S., Mathieu, H., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2012). Effect of modified starch or maltodextrin incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity and appearance of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 148-154.
- Garrido, G., Ortiz, M., & Pozo, P. (2013). Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil.[Total phenols and flavonoids and antioxidant activity of *Lampaya medicinalis* F. Phil. leaf extracts].
- Gennadios, A., & Weller, C. L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*. 44 (10), 63_69.
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 30(4), 337-350.
- Giordani, R., Hadeif, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79(3), 199-203.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1133-1143.
- Gonzalez-Aguilar, G. A., Celis, J., Sotelo-Mundo, R. R., De La Rosa, L. A., Rodrigo-Garcia, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2008). Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5° C. *International journal of food science & technology*, 43(1), 91-101.
- González-Martínez, C., Sánchez-González, L., Pastor, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30, 272-280.

- Grigore, A., Paraschiv, I., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., & Ichim, M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5436-5443.
- Guilbert, S., Gontard, N., (1995). Edible and biodegradable food packaging. En Ackermann, P., Jaägerstad, M., Ohlsson, T. (Eds.), *Foods and Packaging Materials—Chemical Interactions. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K* (pp. 159_168).
- Guilbert, S., Gontard, N., Gorris, L.G.M., (1996). Prolongation of the shelf life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm. Wiss. Technol.* 29, 10_17.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Hasan, S. R., Hossain, M. M., Akter, R., Jamila, M., Mazumder, M. E. H., & Rahman, S. (2009). DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(11), 875-79.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food chemistry*, 116(3), 714-721.
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2).
- Jung H. (2014) Edible films and coatings: a review. *Innovations in food packaging. Second Edition.* 9, 213_255.
- Kester, J.J., Fennema, O.R., (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technol.* 48 (12), 47_59.

- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. *Protein-based films and coatings*, 1-41.
- Krochta, J. M., & Mulder-Johnston, D. E. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food technology* 51, 61–74.
- Lopes, G. K., Schulman, H. M., & Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1472(1), 142-152.
- Martelli, S. and Laurindo, J. (2012). Chicken Feather Keratin Films Plasticized with Polyethylene Glycol. *International Journal of Polymeric Materials*, 61(1), pp.17-29.
- Mc Hugh, T. H. y Krochta, J. M. (1994). Water vapour permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.
- Miura, K. and Nakatani, N. (1989). Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(11), pp.3043-3045.
- Mkaddem, M. G., Romdhane, M., Ibrahim, H., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., & Bouajila, J. (2010). Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of medicinal food*, 13(6), 1500-1504.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M. A., González, L. A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M. I. H., ... & Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 139-148.
- Ortega-Toro, R., Contreras, J., Talens, P., & Chiralt, A. (2015). Physical and structural properties and thermal behaviour of starch-poly (ϵ -caprolactone) blend films for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 5, 10-20.

- Ozcelik, B., Lee, J. H., & Min, D. B. (2003). Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2), 487-490.
- Peleg, M. (1979). *Characterization of the Stress Relaxation Curves of Solid Foods*. *J. Food Sci.*, 44, 277.
- Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H., & Mortensen, G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 52-68.
- Peyron, A. (1991). L'enrobage et les produits filmogènes: un nouveau mode d'emballage. *Viandes et produits carnés*, 12(2), 41-46.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 270-276.
- Roby, M., Sarhan, M., Selim, K. and Khalel, K. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, pp.827-831.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z., & Batooli, H. (2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115(4), 1524-1528.

- Shit, S.C., Shah, P.M., (2014). Edible polymers: challenges and opportunities. *J. Polym.* 2014, 13.
- Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458-466.
- Sivakumar, D., & Bautista-Banos, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
- Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685-696.
- Sung, S., Sin, L., Tee, T., Bee, S., Rahmat, A., Rahman, W., Tan, A. and Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), pp.110-123.
- Trifković, K., Milašinović, N., Djordjević, V., Krušić, M., Knežević-Jugović, Z., Nedović, V. and Bugarski, B. (2014). Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 111, pp.901-907.
- Trojáková, L., Réblová, Z. U. Z. A. N. A., NGUYEN, H. T. T., & Pokornya, J. A. N. (2001). Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, 8(1), 1-13.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 21-36.
- Wu, L. T., Chu, C. C., Chung, J. G., Chen, C. H., Hsu, L. S., Liu, J. K., & Chen, S. C. (2004). Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1), 75-82

- Yen, M. T., Yang, J. H., & Mau, J. L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 840-844.
- Zúñiga, R. N., Skurtys, O., Osorio, F., Aguilera, J. M., & Pedreschi, F. (2012). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure. *Carbohydrate polymers*, 90(2), 1147-1158.