



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PELÍCULAS DE QUITOSANO CON EUGENOL ENCAPSULADO EN MICROESFERAS DE ALGINATO

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso 2016/2017

Alumna: Sara Cámara Maurí

Tutoras: Lorena María Atarés Huerta

María Vargas Colás

Cotutora experimental: Cristina Encarnación Valencia Sullca

Valencia, 28 de Julio de 2017

PELÍCULAS DE QUITOSANO CON MICROESFERAS DE EUGENOL ENCAPSULADO EN ALGINATO

RESUMEN

Para evitar la acumulación de residuos plásticos y conseguir alargar la vida útil de los alimentos, se están desarrollando en la actualidad envases y películas obtenidas a partir de materiales biodegradables. En este trabajo se pretende obtener películas de quitosano con microesferas de alginato que contienen un compuesto activo (eugenol) que se va liberando a lo largo del tiempo. La liberación del eugenol en diferentes simulantes alimentarios se ha ajustado, a diferentes modelos matemáticos: modelo de Peleg, modelo de Korsmeyer-Peppas y modelo de Fick. La mayor y más rápida liberación se dio en ácido acético debido a su carácter hidrofílico. Coherentemente, la mayor difusividad (modelo de Fick) se dio en ácido acético. En cuanto al modelo de Korsmeyer-Peppas, se observó que el eugenol en el simulante etanol 50% tenía un comportamiento Fickiano. Además, también se evaluó la capacidad antimicrobiana de las películas de quitosano con microesferas de alginato con eugenol, comparando su comportamiento con películas con quitosano únicamente. Se comprobó que la incorporación del eugenol potenció la actividad antimicrobiana de las películas frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua*.

PALABRAS CLAVE

Película, biodegradable, eugenol, liberación, quitosano, alginato, cinética.

RESUM

Per a evitar l'acumulació de residus plàstics i aconseguir allargar la vida útil dels aliments, s'estan desenvolupant en l'actualitat envasos i pel·lícules obtingudes a partir de materials biodegradables. En aquest treball es pretén obtenir pel·lícules de quitosano amb microesferes d'alginat que contenen un compost actiu (eugenol) que es va alliberant al llarg del temps. L'alliberament de l'eugenol en diferents simulants alimentaris s'ha ajustat a diferents models matemàtics: model de Peleg, model de Korsmeyer-Peppas i model de Fick. El major i més ràpid alliberament es va donar en àcid acètic a causa del seu caràcter hidrofílic. Coherentment, la major difusivitat (model de Fick) es va donar en àcid acètic. Quant al model de Korsmeyer-Peppas, es va observar que l'eugenol en el simulant etanol 50% tenia un comportament Fickiano. A més, també es va avaluar la capacitat antimicrobiana de les pel·lícules de quitosano amb microesferes d'alginat amb eugenol, comparant el seu comportament amb pel·lícules de quitosano únicament. Es va comprovar que la incorporació de l'eugenol va potenciar l'activitat antimicrobiana de les pel·lícules enfront de *Escherichia coli* i *Listeria innocua*.

PARAULES CLAU

Pel·lícula, biodegradable, eugenol, alliberació, quitosano, alginato, cinètica.

ABSTRACT

To prevent the accumulation of plastic waste and to extend the shelf- life of food, packaging and films obtained from biodegradable materials are currently being developed. In this work we intend to obtain chitosan films with alginate microspheres containing an active compound (eugenol) that it is released over time. The release of eugenol in different food simulants has been adjusted to different mathematical models: Peleg, Korsmeyer-Peppas and Fick. The highest and most rapid release was found in acetic acid because of its hydrophilic character. Coherently, the highest diffusivity (Fick model) occurred in acetic acid. As for the Korsmeyer-Peppas model, it was observed that eugenol in the 50% ethanol simulant had a Fickian behavior. In addition, the antimicrobial capacity of chitosan films with eugenol-alginate microspheres was also evaluated, as compared to chitosan films. The incorporation of eugenol was shown to potentiate the antimicrobial activity of the films against *Escherichia coli* and *Listeria innocua*.

KEY WORDS

Film, biodegradable, eugenol, release, chitosan, alginate, kinetic.

Alumno/a: Sara Cámara Maurí

Tutoras: Lorena María Atarés Huerta

María Vargas Colás

Cotutor/a experimental: Cristina Encarnación Valencia Sullca

Valencia, 28 de julio de 2017

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	Objetivo general.....	5
2.2	Objetivos específicos.....	5
3	MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1	Materiales	6
3.2	Preparación de las microesferas de alginato-eugenol	6
3.3	Preparación de las películas	6
3.4	Cinética de liberación.....	7
3.5	Análisis microbiológico.....	9
3.6	Análisis estadístico	9
4	RESULTADOS	10
4.1	Cinética de liberación.....	10
4.2	Actividad antimicrobiana	14
5	CONCLUSIONES	16
6	BIBLIOGRAFÍA	17

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están buscando materiales alternativos a los plásticos convencionales, con el fin de reducir la generación de residuos no biodegradables perjudiciales para el medio ambiente. En esta línea de investigación, numerosos estudios se han centrado en el desarrollo de materiales biodegradables para el envasado de productos alimentarios, con el objetivo de la sustitución total o parcial de materiales plásticos convencionales por otros materiales biodegradables con propiedades similares y a bajo coste (Mali et al., 2005; Mariniello et al., 2007; Larotonda et al., 2005).

De entre los polímeros biodegradables más ampliamente investigados para el desarrollo de materiales, el quitosano (CH) parece ser especialmente prometedor. Se trata de un polisacárido catiónico procedente de exoesqueleto de crustáceos y de las paredes celulares de algunos hongos (Chapman, 2004). Su estructura está basada en unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Se obtiene de la desacetilación parcial de la quitina (Yuan et al., 2016), tal como se ilustra en la figura 1, y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. No es tóxico, es biodegradable y presenta elevada compatibilidad con otros biopolímeros. El quitosano es capaz de formar películas comestibles con actividad antimicrobiana y antifúngica, que además se caracterizan por presentar buenas propiedades barrera (baja permeabilidad al O₂ y CO₂), así como buenas propiedades mecánicas (Suyatma et al., 2005). Además, el quitosano ha demostrado ser un material prometedor como sistema de transporte activo de componentes con características antimicrobianas o antioxidantes (Elsabee y Abdou, 2013; Ruiz-Navajas et al., 2013; Perdones et al., 2016).

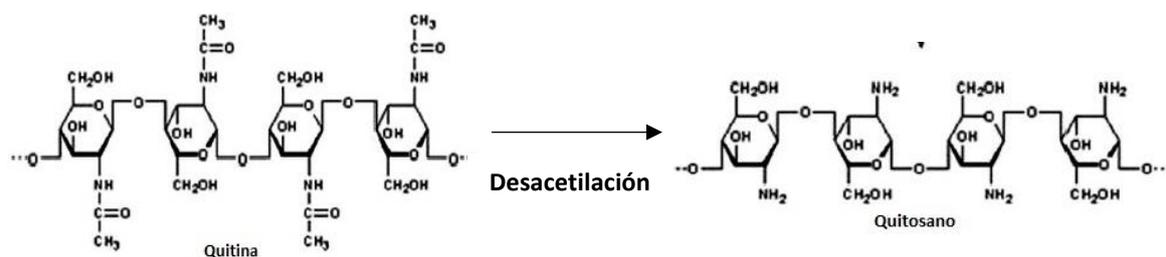


Figura 1. Desacetilación parcial de la quitina.

Entre los agentes bioactivos más investigados para aportar propiedades conservantes a las películas biodegradables, los aceites esenciales han sido ampliamente investigados, de modo que se han utilizado en la formulación de películas desde que se conocen sus capacidades antimicrobianas y antioxidantes (Bakkali et al., 2008). Además, se utilizan por sus propiedades antifúngicas, antivirales e insecticidas (Kordali et al., 2005; Pezo et al., 2006).

Los aceites esenciales son mezclas de numerosos compuestos químicos de mayor y menor volatilidad. En su fracción volátil se encuentran terpenos, terpenoides y compuestos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular. Han sido reconocidos por la FDA (Food and Drug Administration) como compuestos seguros (Generally Recognized as Safe, GRAS). Desde que se conoce la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales, éstos se han empleado para la conservación de alimentos (Viuda-Martos et al., 2010; Hyldgaard et al., 2012; Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Nazzaro et al., 2013). En la formulación de películas comestibles bioactivas, la incorporación de aceites esenciales en la matriz del polímero puede mejorar las propiedades barrera al vapor de agua debido a su carácter hidrofóbico (Tongnuanchan y Benjakul, 2014;

Vergis et al., 2013). Como ventaja adicional, por ser de origen natural los aceites esenciales son bien aceptados por los consumidores, en comparación con los conservantes químicos.

El eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (figura 2), es el principal componente del aceite esencial de canela (Ribeiro-Santos et al., 2017; Ribes et al., 2017). Además, está presente en numerosos aceites esenciales procedentes de otras de plantas. La actividad del eugenol contra bacterias patógenas, hongos y virus está reportada en la bibliografía (Devi et al., 2010; Ali et al., 2005), así como su actividad contra patógenos incluyendo *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sakei* y *Helicobacter pylori* (Gil y Holley, 2006; Devi et al., 2010).

El mecanismo propuesto para esta actividad antimicrobiana es la desestructuración de la membrana citoplasmática. Además, por su naturaleza hidrofóbica el eugenol puede penetrar en los lipopolisácaridos de la membrana de la célula bacteriana y alterar la estructura de la célula, lo que ocasiona la pérdida de constituyentes intracelulares (Hemaiswarya y Doble, 2009).

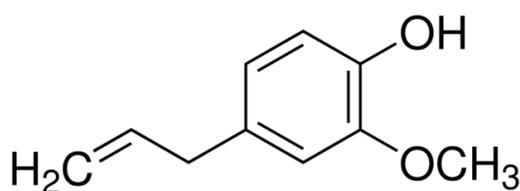


Figura 2. Estructura química del eugenol

Como norma general, los componentes de los aceites esenciales pueden ser fácilmente degradados por oxidación, volatilización, calor o interacción con la luz, y para asegurar su eficiencia es necesario protegerlos (Asbahani et al., 2015). Debido a la elevada volatilidad e inestabilidad química de los aceites esenciales, su actividad antimicrobiana se puede ver seriamente reducida. Con el fin de solucionar este inconveniente, se puede recurrir a la incorporación de los mismos en la estructura de películas biodegradables, obteniéndose así materiales con propiedades bioactivas.

Tradicionalmente, los aceites esenciales se han incorporado en la formulación de películas biodegradables a través de un proceso de homogenización. Este procedimiento puede implicar importantes pérdidas de compuestos volátiles durante la incorporación, el vertido y el proceso de secado. Es sobre todo en esta última etapa cuando las gotas de aceite esencial son susceptibles de sufrir procesos de desestabilización, creciendo por coalescencia y subiendo a la superficie de la película, de modo que ésta ve reducida su eficacia para aumentar la vida útil de los productos alimentarios (Jiménez et al., 2010).

Para reducir las pérdidas de aceite esencial en la formulación de películas comestibles bioactivas se puede recurrir a la encapsulación de los mismos. De este modo, se obtendrían microesferas que contendrían el agente activo, para posteriormente incorporar éstas en la formulación de la película. A través de esta técnica se conseguiría aumentar la estabilidad de los aceites esenciales y prolongar los beneficios de éstos mediante una liberación controlada (Hong and Park, 1999; Asbahani et al., 2015). El método de encapsulación debe ser generalmente simple, reproducible, rápido, efectivo y fácil (Carvalho et al., 2016). El método utilizado depende de diferentes aspectos como son las propiedades físico-químicas del material a encapsular, así como el material encapsulante, la liberación del compuesto encapsulado, la función y el coste (Krishnan et al., 2005; Kanakdande et al., 2007).

Actualmente existen diferentes métodos de encapsulación para la obtención de microesferas. Éstos pueden clasificarse en tres grandes grupos: físico-químicos, químicos y mecánicos. Los procedimientos físico-químicos más empleados son coacervación, emulsión- evaporación y fusión en caliente. Los principales procedimientos químicos son la complejación y la gelificación. Por último, entre los procedimientos mecánicos destacan las técnicas de lecho fluidizado, drying, extrusión, spinning-disk, generación electrostática de gotas y fluidos supercríticos.

Es habitual la combinación de dos técnicas, extrusión y gelificación iónica, para obtener microesferas. La extrusión consiste en hacer pasar por un tornillo extrusor a alta presión una emulsión con el agente activo y el agente encapsulante, preparada previamente. Ejerciendo una cierta frecuencia de vibración sobre el flujo de la emulsión, se consigue provocar la ruptura del flujo en pequeñas gotas que después se solidificarán a través del proceso de gelificación iónica.

La gelificación iónica es un proceso a través del cual gotas de emulsión, conteniendo el agente activo, se solidifican en forma de gel, gracias a la capacidad gelificante de ciertos polímeros. Tal es el caso del alginato, que es capaz de formar geles en condiciones particulares de hidratación. De este modo, haciendo gotear una emulsión de alginato con agente activo sobre una disolución de sal cálcica, se puede lograr la encapsulación de dicho agente.

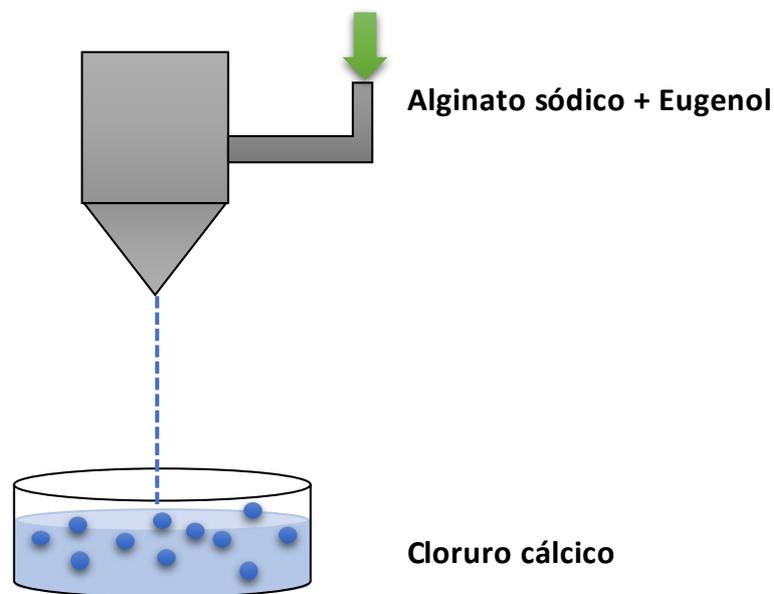


Figura 3. Esquema proceso extrusión-gelificación iónica.

El alginato ha sido ampliamente utilizado como material encapsulante, ya que se trata de un material no tóxico, barato, biodegradable y compatible con muchos sistemas alimentarios (Léonard et al., 2013; Gombotz y Wee, 2012; Lee y Mooney, 2012). Este polisacárido aniónico lineal (figura 1.4) se obtiene generalmente de las algas pardas marinas, y está constituido por dos unidades monoméricas: el ácido β -D manurónico y el ácido α -L gularónico, unidos por enlaces glucosídicos 1-4. En presencia de iones de calcio es capaz de formar una estructura de gel siguiendo el modelo de 'caja de huevos' (figura 4), donde los iones calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido gularónico. El alginato se ha utilizado en

numerosos trabajos de investigación para encapsular diferentes aceites con fines nutricionales, terapéuticos y otros (Abang et al., 2012; Sun-Waterhouse et al., 2011; Wang et al., 2013).

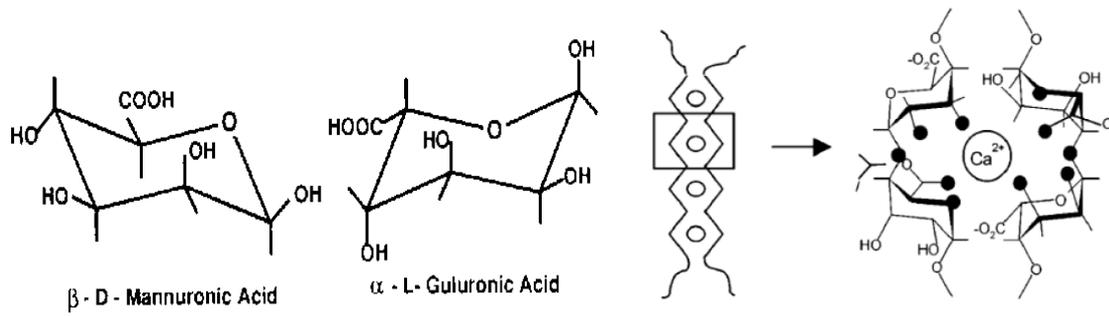


Figura 4. Estructura química del alginato y modelo de caja de huevos (Mendéz et al., 2015)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la eficacia de la encapsulación de un compuesto activo (eugenol) en microesferas de alginato incorporadas en películas de quitosano, a través del estudio de la cinética de liberación del activo y la actividad antimicrobiana de las películas.

2.2 Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general propuesto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener películas de quitosano con incorporación de microesferas de eugenol en alginato.
- Evaluar la cinética de liberación del eugenol en diferentes simulantes alimentarios.
- Modelizar la cinética de liberación a través de diferentes modelos hallados en la bibliografía.
- Analizar el efecto antimicrobiano *in vitro* de las películas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

El quitosano (CH), eugenol (EU) y alginato de sodio fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania), así como los disolventes metanol, etanol, ácido acético glacial e isooctano. Panreac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona) suministró el nitrato de magnesio utilizado para almacenar las películas a humedad relativa controlada, el glicerol para almacenar los cultivos microbiológicos y el pentóxido de fosforo.

Las cepas de *Escherichia coli* (CECT 10) y *Listeria innocua* (CECT 910) procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot). El agua de peptona tamponada y todos los medios empleados se adquirieron de Scharlab S.L. (Mas d'EnCisa, Barcelona).

3.2 Preparación de las microesferas de alginato-eugenol

Se preparó una solución acuosa de alginato de sodio al 2% (w/w). Por otra parte, se preparó una solución de eugenol (2 % w/w) que se homogenizó en rotor-stator (13500 rpm, 4 minutos, Yellow Line DL 25 Basic, IKA, Janke y Kunkel, Germany) y se sonicó a 40 kHz (células Sonicator Vibra 75115, 500 W, Bioblock Scientific Co.) a 40 % de potencia total durante 600 s (30s on / 30s off). Ambas soluciones se mezclaron en una proporción másica 1:1 para la elaboración de las microesferas.

Se utilizó un Encapsulator B-395 Pro (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Switzerland) para obtener las microesferas. Se utilizó una frecuencia de vibración de 1800 Hz, para generar 1800 gotas por segundo. El caudal fue de 12 mL·min⁻¹ y se usó una boquilla de 150 µm. Las gotas generadas se depositaron en una solución de CaCl₂ (5% w/w), formándose así las microsferas de alginato con eugenol (M_{EU}). Éstas se mantuvieron en el baño de gelificación durante 10 minutos, se filtraron, se lavaron con agua destilada y se almacenaron a 4 °C.

3.3 Preparación de las películas

Las películas de quitosano se obtuvieron a través de una técnica en húmedo, tal y como describió Bonilla et al. (2014). Se realizó una dispersión de quitosano (1,0% p/p) en una solución acuosa de ácido acético glacial (1,0% v/p) mediante agitación magnética a 40°C. En esta solución formadora de película, se incorporaron las microesferas de alginato-eugenol (M_{EU}) en una relación másica quitosano:microesferas de 1:1.5, obteniéndose así la formulación CH/M_{EU}. Las películas se obtuvieron por vertido de la solución formadora de película a una densidad superficial constante (5,856 mg sólidos secos/cm²). Paralelamente, se elaboraron películas control de quitosano, sin incorporación de microesferas (CH). Las películas se almacenaron a 25°C y 53% de humedad relativa (HR) durante 7 días. El grosor de las películas se determinó en seis puntos aleatorios, utilizando un micrómetro Palmer (Comecta, Barcelona) con una sensibilidad de 0,005 mm.

3.4 Cinética de liberación

Se estudió la cinética de liberación del eugenol encapsulado en cuatro simulantes alimentarios: etanol (10% v/v), etanol (50% v/v), ácido acético (3% p/v) e iso octano. Se utilizaron fragmentos de las películas CH/M_{EU} (de masa 0,13 g) que se pusieron en contacto con 100 ml de simulante. El test se llevó a cabo durante un máximo de 10 horas, en agitación a temperatura ambiente. A lo largo de este periodo de contacto, se tomaron muestras de simulante y se determinó la absorbancia a 282 nm con el fin de cuantificar el eugenol liberado. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Utilizando las correspondientes curvas patrón, se transformó el dato de absorbancia en masa de eugenol liberado en cada simulante. Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (Helios Zeta UVeVis, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) y el correspondiente simulante como blanco.

Los resultados de masa de eugenol liberado frente al tiempo se modelizaron utilizando diferentes ecuaciones. Por un lado, se utilizó el modelo empírico propuesto por Peleg (1980). Para ello se utilizaron las ecuaciones:

$$m_t = m_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \quad (1)$$

$$\frac{t}{m_t} = k_1 + k_2 t \quad (2)$$

Donde:

m_t : masa de eugenol (g) liberada a un tiempo t

m_0 : masa de eugenol (g) liberada al inicio del ensayo ($m_0=0$)

k_1 : Constante del modelo de Peleg (min/g), inversamente relacionada con la velocidad de liberación

k_2 : Constante de modelo de Peleg (g^{-1}), inversamente relacionada con la masa de activo liberado en el equilibrio (m_∞). $m_\infty=1/k_2$

A través de la aplicación de este modelo a los resultados experimentales de m vs. t , se obtuvieron los valores de los parámetros k_1 y k_2 , así como la masa de eugenol liberada en el equilibrio (m_∞) para cada simulante alimentario.

El modelo de Korsmeyer-Peppas (ecuación 3) se ha utilizado para analizar la liberación de compuestos activos a través de un matriz polimérica (Siepmann and Peppas, 2011; Hosseini et al., 2013; Tavares et al., 2016).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (3)$$

Donde:

$\frac{M_t}{M_\infty}$: Masa de eugenol liberado a tiempo t referido a la liberación asintótica.

k: Constante cinética del modelo

n: exponente de liberación, relacionado con el mecanismo de liberación del principio activo (Tavares et al., 2016). Valores cercanos a 0,5 indican que se está llevando a cabo una difusión Fickiana, mientras que valores más bajos indican un comportamiento de difusión cuasi-Fickiano y valores más altos se relacionan a liberación no-Fickiana.

El proceso de liberación puede describirse también por el modelo difusional. Para modelizar el comportamiento difusional del eugenol en las películas de quitosano a través de los simulantes alimentarios, se aplicó la segunda ley de Fick para una geometría de lámina infinita (ecuación 4; Crank, 1975), de este modo se determinó el coeficiente de difusividad (D) del eugenol en los diferentes solventes, considerando 8 términos del sumatorio.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left\{-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{L^2}\right\} \quad (4)$$

Donde:

D: coeficiente de difusión (m²/s)

M_t: masa de eugenol liberada en un tiempo t (g)

M_∞: masa de eugenol liberada en el equilibrio (g)

L: semiespesor de la película (m)

3.5 Análisis microbiológico

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de las películas CH y CH/M_{EU}, se realizaron ensayos *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua* tanto en medio líquido (TSB) como en medio sólido (TSA).

Las cepas de *E. coli* y *L. innocua*, inicialmente almacenadas a -25°C en TSB con un 30% de glicerol, se revivieron por siembra en 10 ml de TSB y se incubaron a 37 °C durante 24h. A continuación, se transfirió una alícuota de 10 µl a 10 ml de TSB y se incubó de nuevo a 37°C durante 24h, hasta que el microorganismo alcanzó la fase exponencial de crecimiento.

En cuanto a los ensayos en medio líquido, se diluyó el cultivo inicial en agua de peptona tamponada hasta que se obtuvo una concentración de 10⁶ UFC/ml (cultivo de trabajo). Se utilizaron tubos con 9,9 ml de TSB esterilizados previamente, en los que se añadió una alícuota de 100 µl del cultivo de trabajo y un fragmento circular de película (55 mm de diámetro) previamente esterilizado con UV en cabina de flujo laminar. Los tubos se almacenaron a 10°C durante un máximo de 13 días. Como control se emplearon tubos sin fragmento de película.

A diferentes tiempos de almacenamiento (0, 2, 6, 9 y 13 días) se realizaron recuentos mediante la homogenización del contenido de los tubos con 90 ml de agua de peptona en Stomacher durante 2 min. A continuación, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona, y se realizaron, por duplicado, siembras en profundidad en medio TSA.

Para realizar los ensayos en medio sólido, se cortaron círculos de las películas (50 mm de diámetro) que se esterilizaron con UV en cabina de flujo laminar. Se prepararon placas Petri con 10 g de TSA, que después de solidificar se inoculó con 100 µl del cultivo de trabajo. Se dejó secar el inóculo y se cubrió con la película recortada. Las placas se envolvieron con parafina y se almacenaron a 10 °C durante un máximo de 13 días. Como control se utilizaron placas inoculadas sin película. A diferentes tiempos (0, 2, 6, 9 y 13 días) se realizaron recuentos según el mismo método empleado en los ensayos en medio líquido.

3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurion XVI.II. Se utilizó el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD).

4 RESULTADOS

4.1 Cinética de liberación

La figura 5 muestra la evolución temporal del cociente masa de eugenol liberado / masa de eugenol liberado en el equilibrio (m_t/m_∞) para cada simulante alimentario, donde puede observarse que la ecuación de Peleg modeliza adecuadamente los resultados experimentales.

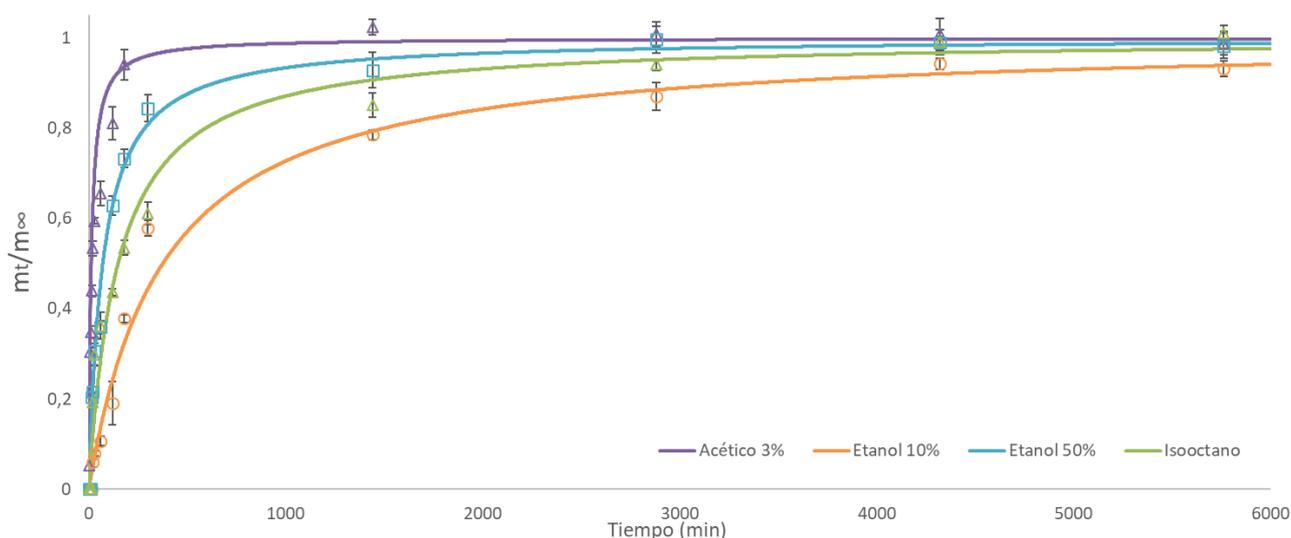


Figura 5. Liberación de eugenol a partir de la película de CH/MEU en los diferentes simulantes alimentarios: ácido acético 3%, etanol 10%, etanol 50%, e isooctano. Los puntos aislados corresponden a datos experimentales, y las curvas a la modelización de Peleg.

La liberación más rápida se dio en contacto con ácido acético, donde se observó un repentino incremento de la ratio m_t/m_∞ seguido de un mantenimiento en valores próximos al asintótico. Este disolvente promueve la hidratación y el hinchamiento de la matriz polimérica de quitosano y de las microesferas de alginato, favoreciéndose así la liberación del eugenol. Por el contrario, la liberación más lenta se dio en etanol 10%, solvente en el que se encontró el patrón de liberación menos abrupto (figura 5).

La tabla 1 presenta los parámetros obtenidos a partir del modelo de Peleg, k_1 (inversamente relacionado con la velocidad de liberación), k_2 (inversa de la asintota) y m_∞ (valor asintótico de la masa de eugenol liberada en cada simulante). Con el fin de comparar la liberación de eugenol que tiene lugar en los diferentes simulantes, se reporta también el cociente $m_\infty/m_{\infty\max}$, donde $m_{\infty\max}$ corresponde a la masa de eugenol liberada en el equilibrio cuando se utiliza ácido acético como simulante. Además, la tabla 1 muestra el coeficiente de partición (CP), definido como el cociente entre la masa de eugenol extraída en cada simulante a tiempo infinito (m_∞) y la masa de eugenol inicialmente incorporada en la formulación de la película.

Tabla 1. Parámetros obtenidos del modelo de Peleg: k_2 (inversa de la asíntota m_∞), k_1 (inversa de la velocidad de liberación), $m_\infty/m_{\infty(\text{máx})}$ (donde el valor máximo de m_∞ corresponde al encontrado para el ácido acético), y coeficiente de partición (CP) definido como el cociente entre la masa de eugenol extraída en cada simulante a tiempo infinito (m_∞) y la masa de eugenol inicialmente incorporada en la formulación de la película. Valores medios \pm desviación estándar.

Simulante	k_2 (g^{-1})	$k_1 \cdot 10^{-4}$ (min/g)	m_∞	$m_\infty/m_{\infty(\text{máx})}$	CP
Etanol 10%	703 \pm 19 ^c	27,7 \pm 1,5 ^d	13,5 \pm 0,3 ^b	0,74	0,56
Etanol 50%	639 \pm 19 ^b	4,5 \pm 0,6 ^b	15,7 \pm 0,5 ^c	0,86	0,65
Á. Acético 3%	530 \pm 11 ^a	0,7 \pm 0,3 ^a	18,2 \pm 0,5 ^d	1,00	0,75
Isooctano	1555 \pm 25 ^d	23 \pm 4 ^c	6,43 \pm 0,10 ^a	0,35	0,27

Superíndices a, b, c y d diferentes en los valores correspondientes a los distintos simulantes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los valores del parámetro k_1 reflejan, de modo inverso, las diferencias en la cinética de liberación del eugenol (tabla 1). Coherentemente con los comentarios anteriores, la liberación más rápida tuvo lugar en contacto con el ácido acético (menor valor de k_1) y la más lenta se observó para el etanol 10%.

A través de la aplicación del modelo de Peleg, se obtuvo el parámetro k_2 y a partir de éste la masa de eugenol liberada en el equilibrio (m_∞ , valor asíntótico de m_t). Como puede observarse en la tabla 1, este valor asíntótico de masa de eugenol extraído es dependiente del simulante alimentario empleado. El simulante más efectivo en este sentido fue el ácido acético. Aparentemente, el mayor grado de hidratación que acontece al poner en contacto las películas con este solvente favorece tanto la cinética de liberación como la mayor extracción del agente activo. Por el contrario, la menor extracción de eugenol tiene lugar en el simulante isooctano (35% en relación a la m_∞ obtenida para el ácido acético), lo que probablemente es debido a su carácter hidrófobo, que dificultaría en gran medida la hidratación de la película y por lo tanto la liberación del eugenol.

Coherentemente con los resultados de m_∞ , el mayor coeficiente de partición se obtuvo en el caso del ácido acético, donde se consiguió extraer el 75% del eugenol inicialmente incorporado en la película. Puesto que en el ensayo de liberación se observó una desestructuración de las películas en el seno de este solvente, las pérdidas de agente activo que tuvieron lugar (25% de la masa inicialmente incorporada) son sobre todo atribuibles a la elevada volatilidad del eugenol, que probablemente pasó a fase vapor en las etapas de elaboración y almacenamiento de la película, sobre todo durante el secado de la misma. En el resto de simulantes, puesto que se consiguió extraer menores masas de eugenol, el coeficiente de partición tiene valores más reducidos.

La tabla 2 presenta los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales a la segunda ley de Fick para cada simulante alimentario: el coeficiente de difusión D y coeficiente R^2 que refleja el buen ajuste de los datos experimentales al modelo.

Tabla 2. Coeficiente de difusión (D) y parámetros del modelo de Korsmeyer-Peppas (constante de velocidad (k) y coeficiente de difusión (n)).

Simulante	$D \times 10^{13} \text{ (m}^2/\text{s)}$	R^2	n	$k \text{ (h}^{-n}\text{)}$	R^2
Etanol 10%	0,082±0,008 ^a	>0,997	0,867±0,005 ^d	0,134±0,002 ^a	>0,986
Etanol 50%	0,37±0,06 ^c	>0,996	0,503±0,013 ^c	0,402±0,012 ^c	>0,998
Á. Acético 3%	1,2±0,30 ^d	>0,996	0,274±0,010 ^a	0,68±0,03 ^d	>0,986
Isooctano	0,25±0,09 ^b	>0,986	0,39±0,03 ^b	0,34±0,02 ^b	>0,984

Superíndices a, b, c y d en los distintos simulantes indican diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$)

El simulante alimentario empleado tuvo un efecto significativo sobre el coeficiente de difusividad D, y coherentemente con los resultados obtenidos en la modelización de Peleg, el mayor valor del se obtuvo para el ácido acético. El valor más reducido se observó para el etanol 10%.

La figura 6 muestra el ajuste del modelo difusional de Fick a los datos experimentales, donde, coherentemente con los resultados del coeficiente D, puede observarse una liberación acelerada en el caso del ácido acético. El comportamiento contrario se observa para el etanol 10%.

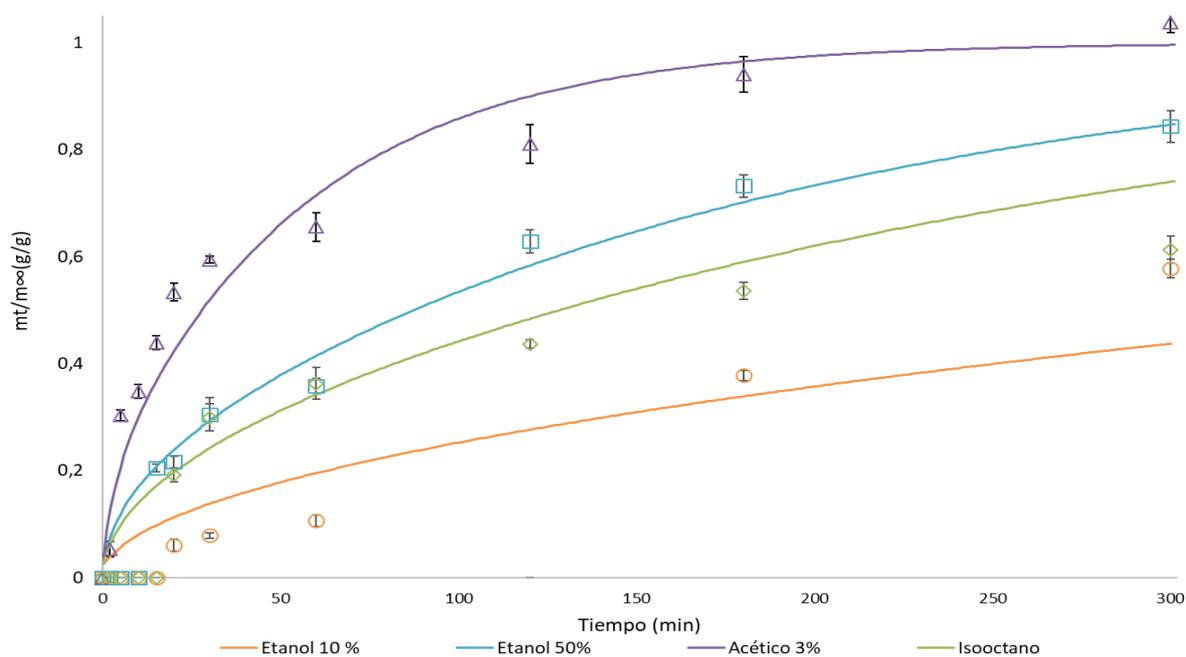


Figura 6. Ajuste del modelo de Fick a los datos experimentales de liberación de eugenol a partir de películas de quitosano en los diferentes simulantes alimentarios: etanol 10%, etanol 50%, ácido acético e isooctano.

En la tabla 2 se muestran los resultados de los parámetros del modelo de Korsmeyer-Peppas: la constante de velocidad (k), el exponente difusional (n) y el coeficiente R² que refleja el buen ajuste de los datos experimentales al modelo.

Según el modelo de Korsmeyer-Peppas, valores cercanos a 0,5 significan que la liberación está relacionada con un mecanismo de difusión de Fick de primer orden. Por el contrario, cuando n es cercano a 1, se produce relajación o degradación del polímero, dando así lugar a una liberación de orden cero. Por tanto, una difusión Fickiana anómala es cuando n se encuentra entre 0,5 y 1 (Mandal, Mann y Kundu, 2009). Observando la tabla 2, el etanol 50% tiene un comportamiento Fickiano en su liberación. Sin embargo, el valor de n obtenido en ácido acético corresponde a una liberación no Fickiana.

Si comparamos con otros estudios realizados (Soler, 2016) donde se prepararon películas de quitosano con eugenol emulsionado (sin encapsular) se puede observar que la difusividad es mucho mayor en todos los casos que cuando el eugenol está encapsulado (Tabla 3), lo cual apunta hacia una liberación más controlada cuando el eugenol está encapsulado, así como más duradera.

Tabla 3. Coeficiente de difusividad para diferentes simulantes obtenidos por Soler (2016)

Simulante	Dx10¹³ (m²/s)
Etanol 10%	5,33±2.08
Etanol 50%	4,77±1.97
Á. Acético 3%	8,50±0.71
Isooctano	3,00±2.00

4.2 Actividad antimicrobiana

La figura 7 muestra el crecimiento de *E. coli* y *L. innocua*, tanto en medio sólido como en medio líquido, en muestras de agar en contacto con las películas de quitosano (CH) y con las películas de quitosano con microesferas de alginato y eugenol (CH/M_{EU}), durante su almacenamiento a 10 °C a lo largo de 13 días. El tratamiento control corresponde al crecimiento del microorganismo sin contacto con las películas.

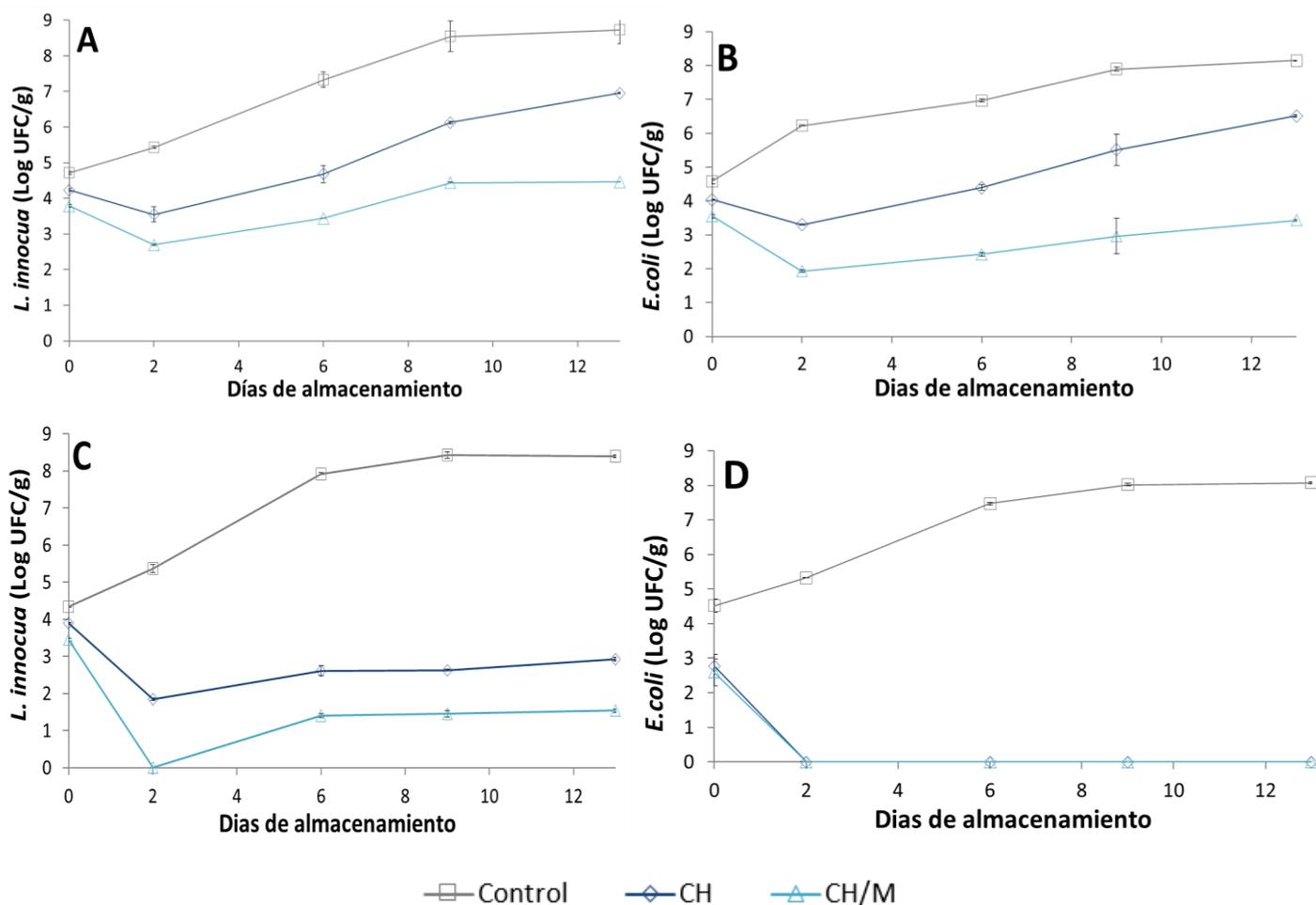


Figura 7. Evolución del crecimiento de *L. innocua* y *E. coli* en ensayos *in vitro* en medio sólido (A y B) y líquido (C y D), a 10°C durante 13 días. CH: película de quitosano, CH/M_{EU}: película de quitosano con microesferas de alginato y eugenol, Control: sin película.

En todos los casos se observó un crecimiento de las bacterias en los tratamientos control, sin contacto con las películas, del orden de 4 log al final del experimento. Las películas CH, sin microesferas, ejercieron un efecto antimicrobiano significativo sobre ambas bacterias, especialmente sobre *E. coli*, coherentemente con la mayor sensibilidad de las bacterias Gram negativas a la actuación del quitosano (Cárdenas et al., 2008; Goy et al., 2016).

La incorporación de microesferas de eugenol potenció la actividad antimicrobiana de las películas, tanto frente a *L. innocua* como frente a *E. coli*. Este hecho puede estar correlacionado con el efecto combinado del quitosano y el eugenol. Según estudios previos, el eugenol contribuye a la desestructuración de la membrana citoplasmática de las bacterias aumentando

su permeabilidad inespecífica (Bennis et al., 2004; Gill and Holley, 2006; Hemaiswarya and Doble, M, 2009; Nazzaro et al., 2013).

En todos los casos, el efecto antimicrobiano de las películas fue más relevante en medio líquido, debido a la mayor difusividad de los agentes antimicrobianos en estas condiciones.

5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron películas de quitosano con microesferas de alginato con eugenol encapsulado estables. La adición de microesferas de alginato con eugenol encapsulado en las películas incrementó la extensibilidad de las películas, así como las propiedades barrera al oxígeno.

Las microesferas fueron visibles en la estructura de la película y su liberación en los simulantes alimentarios se vio incrementada cuando se utilizó ácido acético al 3%, pero disminuyó notablemente en sistemas no polares como el isooctano.

La incorporación de eugenol incrementó la capacidad antimicrobiana intrínseca del quitosano a medida que el eugenol se fue difundiendo en los simulantes alimentarios hidrofílicos.

Además, la encapsulación del eugenol aumentó su eficacia antimicrobiana contra *E. coli* y *L. innocua* en los ensayos realizados en medio sólido.

6 BIBLIOGRAFÍA

ABANG, S., CHAN, E.S., & PONCELET, D. (2012). Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alginate capsules using an inverse gelation technique. *Journal of Microencapsulation, Micro and Nano Carriers*, 29,5.

ALI, S.M, KHAN, A.A., AHMED, I., MUSADDIQ, M., AHMED, K.S., POLASA, H., VENKATESWAR RAO, L., HABIBULLAH, C.M., SECHI, L.A., & AHMED, N. (2005). Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 4, 20.

ALSAMI, H., GHANBARZADEH, B., & ENTEZAMI, A.A. (2010). Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46,1–5.

ASBAHANI, A.E., MILADI, K., BADRI, W., SALA, M., AÏT ADDI, E.H., CASABIANCA, H., MOUSADIK, A.E., HARTMANN, D., JILALE, A., RENAUD, F.N.R., & ELAISSARI, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483,220–243.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, I. (2008). Biological effects of essential oil sea review. *Food and Chemical Toxicology*, 46,446-475.

BENNIS, S., CHAMI, F., CHAMI, N., RHAYOUR, K., TANTAOUI-ELARAKI, A., & REMMAL, A. (2004). Eugenol induces damage of bacterial and fungal envelope. *Moroccan Journal of Biology*, 1, 33-39.

BONILLA, J., ATARÉS, L., VARGAS, M., & CHIRALT, A. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol – chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463 – 470.

CARVALHO, I.T., ESTEVINHO, B.N., & SANTOS, L. (2016). Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. *International Journal of Cosmetic Science*,38, 109– 119.

CÁRDENAS, G., ANAYA, P., VON PLESSING, C., ROJAS, C., & SEPÚLVEDA, J. (2008). Chitosan composite films. Biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med*, 9, 2397–2405.

CRANK, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*: 2d Ed. Clarendon Press. ISBN 0198533446.

CRUZ-ROMERO, M.C., MURPHY, T., MORRIS, M., CUMMINS, E., & KERRY, J.P., 2013. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilizes for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control* 34, 393-397.

DEVI, K.P., NISHA, S.A., SAKTHIVEL, R., & PANDIAN, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130,107–115.

DUTTA, P. K., TRIPATHI, S., MEHROTRA, G. K., & DUTTA, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173–1182.

- ELSABEE, M. Z., & ABDOU, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science & Engineering, C: Materials for Biological Applications*,33(4),1819–1841.
- GILL, A.O., & HOLLEY, R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108,1 – 9.
- GOMBOTZ, W. R., & WEE, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deli. Rev.*, 64,194–205.
- GOY, R.C., MORAIS, S.T.B., & ASSIS, O.B.G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 ,122–127.
- HEMAISWARYA, S., & DOBLE, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine*,16, 997–1005.
- HONG, K., & PARK, S. (1999). Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: synthesis and characterization. *Mater. Chem. Phys.*, 58,128–131.
- HOSSEINI, S.M., HOSSEINI, H., MOHAMMADIFARA, M.A., MORTAZAVIANA, A.M., MOHAMMADIA, A., KHOSRAVI-DARANI, K., SHOJAEE-ALIABADI, S., DEGHANC, S., & KHAKSAR, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*,62, 582– 588.
- HYLDGAARD, M., MYGIND, T., & MEYER, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.
- JIMÉNEZ, M., FABRA, J., TALENS, P., & CHIRALT, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydr Polym.*82, 585–593.
- KANAKDANDE, D., BHOSALE, R. & SINGHAL, R.S. (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydr. Polym.* 67, 536– 541.
- KONG, M., CHEN, X.G., XING, K. & PARK, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 51-63.
- KORDALI, S., KOTAN, R., MAVI, A., ÇAKIR, A., ALA, A., & YILDIRIM, A. (2005). Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculus* and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53(24), 9452–9458.
- KRISHNAN, S., BHOSALE, R. & SINGHAL, R.S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: evaluation of blends of gum arabic, malto-dextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydr. Polym.* 61,95–102.
- LAROTONDA, F.D.S., MATSUI, K.N., SOBRAL, P.J.A., & LAURINDO, J.B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. *J. Food Eng.*, 71,394–402.

- LEE, K.Y., & MOONEY, D.J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.*, 37(1), 106–126.
- LÉONARD, L., GHARSALLAOUI, A., OUAALI, F., DEGRAEVE, P., WACHÉ, Y., SAUREL, R., & OULAHAL, N. (2013). Preferential localization of *Lactococcus lactis* cells entrapped in a caseinate/alginate phase separated system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 266–272.
- MADERUELO, C., ZARZUELO, A., & LANA O, J. M. (2011). Critical factor in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*, 154, 2–19.
- MALI, S., SAKANAKA, L.S., YAMASHITA, F., & GROSSMANN, M.V.E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydr. Polym.*, 60, 283–289.
- MANDAL, B., MANN, J., KUNDU S. (2009). Silk fibroin/gelatin multilayered film as a model system for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 37, 160-171.
- MARINIRELLO, L., GIOSAFATTO, C.V.L., MOSCHETTI, G., APONTE, M, MASI, P., SORRENTINO, A., & PORTA, R. (2007). Fennel Waste-Based Films Suitable for Protecting Cultivations. *Biomacromolecules*, 8, 3008-3014.
- MÉNDEZ, D.A., QUINTERON, J.P., VÁQUIRO, H.A., & SOLANILLA, J.F. (2015). Alginato de sodio en el desarrollo de películas comestibles. Universidad de Tolina, Facultad de Ingeniería Agronómica.
- NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., & DE FEO, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 12.
- PAULA, H. C. B., SOMBRA, F. M., CAVALCANTE, R. D. F., ABREU, F. O. M. S., & DE PAULA, R. C. M. (2011). Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*, 31(2), 173–178.
- PELEG, M. (1988). An empirical model for the description of moisture sorption curves, *J. Food Sci.* 53 (4) (1988) 1216–1217
- PERDONES, A., CHIRALT, A., & VARGAS, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocoll.* 2016, 57, 271–279.
- PEZO, D., SALAFRANCA, J., & NERÍN, C. (2006). Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1241–1246.
- RIBEIRO-SANTOS, R., ANDRADE, M., & SANCHES-SILVA, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 14:78–84.
- RUIZ-NAVAJAS, Y., VIUDA-MARTOS, M., SENDRA, E., PEREZ-ALVAREZ, J.A., & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *thymus moroderi* or *thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30, 386–392.
- SIEPMANN, J., & PEPPAS, N. A. (2011). Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *International journal of pharmaceutics*, 418(1), 6-12.

- SOLER BEATTY, J. (2016). Films activos de quitosano para la conservación de carne. Trabajo final de grado. Universidad Politécnica de Valencia.
- SONI, A., KANDEEPAN, G., MENDIRATTA, S.K., SHUKLA, V., & KUMAR, A. (2016). Development and characterization of essential oils incorporated carrageenan based edible film for packaging of chicken patties. *Nutrition & Food Science*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/nfs-05-2015-0065>.
- SUN-WATERHOUSE, D., ZHOU, J., MISKELLY, G. M., WIBISONO, R., & WADHWA, S. S. (2011). Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 1049-1056.
- TAVARES, J.K., ULSON DE SOUZA, A.A., DE OLIVEIRA, J.B., PRIAMO, W.L., & GUELLI ULSON DE SOUZA, S.M.A. (2016). Modeling of the controlled release of betacarotene into anhydrous ethanol from microcapsules. *OpenNano*, 1, 25–35.
- TONGNUANCHAN, P., & BENJAKUL, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231– R1249.
- VERGIS, J., GOKULAKRISHNAN, P., AGARWAL, R. K., & KUMAR, A. (2013). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1320-1323.
- VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNANDEZ-LOPEZ, J., & PEREZ-ALVAREZ, J. A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, 85(3), 568–576.
- WANG, W., WATERHOUSE, G.I.N., SUN-WATERHOUSE, D. (2013). Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. *Food Research International*, 54, 837–851.
- YUAN, G., CHEN, X., & LI, D. (2016). Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*, 89, 117–128.
- ZHAI, M., ZHAO, L., YOSHII, F & KUME, T. (2004). Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 57, 83-88.