



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

**“Caracterización de películas biodegradables activas a  
base de Polilactida/aceite esencial de orégano tratadas  
con plasma frío”**

**TESIS DE POSTGRADO**

**Previo a la obtención del Título de:**

**MAGISTER EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Presentada por:**

**Wilfrido Jimmy Terán Verzola**

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**Año: 2023**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, a mi director de tesis el Dr. Rómulo Salazar, a la Dra. Ximena Yépez, a las personas que colaboraron de una u otra forma para la realización de este trabajo, y especialmente a mi familia por darme la oportunidad de poder continuar mis estudios.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo realizado con  
esfuerzo por varios meses  
está dedicado a mis  
padres, abuelas,  
familiares y amigos.

# TRIBUNAL DE TITULACIÓN

---

**Ana Rivas F., Ph.D.**  
**DECANA DE LA FIMCP**  
**PRESIDENTE**

---

**Rómulo Salazar G., Ph.D.**  
**DIRECTOR DE TESIS**

---

**Ximena Yépez P., Ph.D.**  
**CODIRECTORA DE TESIS**

---

**Jonathan Coronel L., Ph.D.**  
**VOCAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“La responsabilidad del contenido de esta tesis de postgrado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

---

Wilfrido Jimmy Terán Verzola

## RESUMEN

El método de solvent casting fue el usado para elaborar las películas de polilactida (PLA) con diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano 0%, 6.25%, 12.5% y 25%, considerando la masa de PLA. Luego, las películas fueron tratadas con la tecnología de plasma frío de barrera dieléctrica por un tiempo de 15 minutos a 90 kV usando atmósferas de aire y nitrógeno. Se determinó las propiedades mecánicas, térmicas y color, así como también la actividad antioxidante de las películas mediante el ensayo ORAC, fenoles totales y actividad antimicrobiana. En las propiedades térmicas, mecánicas y color, no se observaron cambios significativos entre los tratamientos. Los resultados del ORAC presentaron un incremento del 36% y del 18% en las muestras tratadas con gas nitrógeno y una concentración de AOE de 6.25% y 25%, respectivamente. Además, la actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* presentó una reducción de 2.46 log<sub>10</sub> en las muestras con 25% de AEO tratadas con aire; mientras que, frente a *Escherichia coli* presentaron una reducción de 3.28 log<sub>10</sub> en las películas de 25% de AEO tratadas con gas nitrógeno.

**Palabras claves:** PLA, aceite esencial de orégano, plasma frío, solvent casting

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGÍA.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Justificación.....	1
1.3 Hipótesis.....	2
1.4 Objetivo general.....	2
1.5 Objetivos específicos.....	2
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2. GENERALIDADES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Polilactida en aplicaciones de envases para alimentos.....	3
2.2 Envases activos basados en PLA con aceites esenciales.....	4
1.3 Plasma frío (CP) y su efecto en las propiedades de películas plásticas.....	4
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>7</b>
3.1. Materiales.....	7
3.2. Preparación de películas de Polilactida.....	7
3.3 Preparación de películas para el tratamiento de plasma frío.....	7
3.4. Tratamiento de plasma frío de las películas activas.....	8
3.5. Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC).....	8
3.6. Contenido de fenoles Totales (TPC).....	9
3.7. Propiedades antibacterianas de las películas activas.....	9
3.8. Propiedades mecánicas.....	9
3.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	10

3.10. Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	10
3.11. Medición de color instrumental .....	10
3.12. Análisis Estadístico .....	10

## **CAPÍTULO 4**

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>11</b>
4.1 Propiedades térmicas .....	11
4.2 Propiedades mecánicas .....	12
4.3 Espectroscopía Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR).....	13
4.4 Medición de color instrumental .....	15
4.5 Actividad antioxidante de las películas.....	16
4.6 Actividad Antibacteriana .....	18

## **CAPÍTULO 5**

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>21</b>
5.1. Conclusiones .....	21
5.2. Recomendaciones .....	21

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**



## ABREVIATURAS

PLA	Polilactida
AE	Aceite esencial
AEO	Aceite esencial de orégano
CP	Plasma frío
GRAS	sustancias generalmente reconocidas como seguras
ORAC	capacidad de absorción de radicales de oxígeno
UFC	Unidades formadoras de colonias
DBD	Descarga de barrera dieléctrica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	Análisis gravimétrico
TS	Esfuerzo máximo
DR	Deformación a la ruptura
ME	Módulo elástico

## SIMBOLOGÍA

mm	Milímetros
N	Newton
Mpa	Mili Pascal
Tg	Temperatura vítrea
Tc	Temperatura de cristalización
Tf	Temperatura de fusión
Xc	Porcentaje de cristalinidad
L	Brillo
a	rojo-verdoso
b	Verde-amarillo
$\Delta E$	Diferencia de color total

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 4.1. Espectro de las películas de PLA con aceite esencial de orégano con tratamiento de plasma frío en atmosfera aire y nitrógeno.....	14
Figura 4.2. Espectro del aceite esencial de orégano con tratamiento de plasma frío en atmosfera aire y nitrógeno.....	14
Figura 4.3. Actividad antioxidante de ORAC y Fenoles Totales de películas PLA tratadas con plasma frío.....	17
Figura 4.4. Efecto reductor del tratamiento con plasma frío DBD en la reducción de las cepas de <i>S. aureas</i> y <i>E. coli</i> en películas de PLA con aceite esencial de orégano.....	19
Figura 7.1. Fotografías de las películas de (a) PLA, (b) P-6.25, (c) P-12.5, (d) P-25, (e) P-CP-A, (f) P-6.25CP-A, (g) P-12.5CP-A, (h) P-25CP-A, (i) P-CP-N, (j) P-6.25CP-N, (k) P-12.5CP-N, (l) P-25CP-N .....	30
Figura 7.2. Preparacion de muestras y ensayos de actividad antioxidante de fenoles totales .....	30
Figura 7.3. Ensayo de actividad antimicrobiana por método de difusión en caldo y muestras de inhibición bacteriana de películas con AEO y tratadas con plasma frío.....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades térmicas y mecánicas de películas PLA tratadas con plasma frío.....	11
Tabla 2. Parámetros de color de películas de PLA con aceite esencial de orégano tratadas con plasma frío.....	15

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción del problema

Alrededor de un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia, lo que representa alrededor de 1 300 millones de toneladas al año. Las pérdidas de alimentos en los países industrializados son tan elevadas como en los países en vías desarrollo, pero hay que tener en cuenta que en estos más del 40 % de las pérdidas de alimentos se produce en dos etapas: postcosecha y procesamiento, mientras que en los países industrializados más del 40 % de las pérdidas de alimentos se produce en la venta minorista y el consumo (Benítez, 2011). En América Latina, las pérdidas que se producen durante la distribución de los alimentos luego de su procesamiento ascienden al 12% para frutas y hortalizas, 5% para carnes y 10% para pescados y mariscos (FAO, 2012).

Los empaques plásticos de alimentos tienen un rol fundamental en la preservación de los alimentos; sin embargo, debido a la contaminación producida por estos, cerca de 6300 millones de toneladas se han acumulado en el medioambiente (Geyer et al., 2017). Esto ha llevado a que en los últimos años se haya incrementado la investigación sobre películas biodegradables a base de materiales naturales, con la finalidad de estudiar alternativas sostenibles para reemplazar los plásticos convencionales.

Frente a esta compleja problemática, varias alternativas innovadoras han sido propuestas, entre ellas, el desarrollo de empaques activos biodegradables con aceites esenciales y el uso de plasma frío como nueva tecnología de descontaminación de los alimentos empacados.

### 1.2 Justificación

La potencial aplicación de empaques activos basados en materiales biodegradables con aceites esenciales ha conllevado el incremento de la investigación en este ámbito.

Entre los materiales biodegradables más importantes, se destaca la Polilactida (PLA). Este polímero biodegradable procede del ácido láctico, que puede ser producido a partir de fuentes naturales como el maíz, yuca y papa (Zhang et al., 2020). Posee una serie de ventajas, entre estas, es biodegradable en condiciones de compostaje, tiene alta transparencia, es vítreo a temperatura ambiente, es rígido y fácil de procesar (Baek et al., 2018). Entre las desventajas del PLA puro, se puede mencionar que posee limitadas propiedades mecánicas y de barrera, así como nula actividad antimicrobiana.

Las películas activas contienen aditivos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, que incrementan el tiempo vida útil de los alimentos empacados. Los aceites esenciales (AE) son mezclas de compuestos orgánicos volátiles obtenidos de plantas aromáticas que son bien conocidos por sus propiedades de fragancia, así como

por sus propiedades antibacteriales, antifúngicas y antioxidantes (Zeid et al., 2019). Entre los AE, el aceite de orégano destaca por su denominación GRAS dado por la FDA. El aceite esencial de orégano posee dos compuestos volátiles mayoritarios, el carvacrol y el timol que son usados como agentes antimicrobianos probados frente a una variedad de cepas bacterianas (Muriel-Galet et al., 2015).

El plasma frío, el cuarto estado de la materia, es un gas parcialmente ionizado con carga eléctrica a una temperatura de 30 a 60 °C. El plasma frío produce grupos reactivos ya sea de oxígeno o nitrógeno u otro, dependiendo del tipo de gas que se utilice. Los usos del plasma frío varían desde procesos de esterilización en alimentos empacados hasta procesos de modificación de polímeros. Este tratamiento ha despertado mucho interés para proceso de descontaminación de alimentos empacados, sin embargo, su aplicación para empaques activos no está totalmente desarrollado.

Por tanto, este trabajo se enfoca en analizar el efecto del plasma frío en películas activas de PLA/AEO. Los resultados alcanzados permitirán comprender mejor el desempeño de un polímero biodegradable activo frente a un tratamiento de plasma frío. Este conocimiento podrá ser usado en el diseño específico de tratamientos de plasma frío destinados a la descontaminación de alimentos empacados en materiales biodegradables activos.

### **1.3 Hipótesis**

Las películas de PLA/aceite esencial de orégano mantienen sus propiedades mecánicas y térmicas al ser tratadas con plasma frío.

El tratamiento con plasma frío mejora las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de películas de PLA/aceite esencial de orégano.

### **1.4 Objetivo general**

Evaluar el efecto del tratamiento de plasma frío sobre las propiedades físicas, actividad antioxidante y antimicrobiana de las películas activas de Polilactida.

### **1.5 Objetivos específicos**

Elaborar películas de Polilactida en mezcla con aceite esencial de orégano a diferentes formulaciones tratadas con plasma frío.

Determinar las características físicas (mecánicas, térmicas y estructurales) de las películas obtenidas.

Analizar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las pelíc

# CAPÍTULO 2

## 2. GENERALIDADES

La polilactida o poli(ácido láctico) (PLA) es un biopolímero derivado del ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propanoico) (Auras et al., 2004), obtenido de fuentes naturales y renovables (Jamshidian et al., 2010). La PLA es biodegradable, reciclable y compostable (Abdullah et al., 2018). Además, posee buena rigidez, alta transparencia y una alta capacidad para ser usado en aplicaciones de empaques alimenticios (Baek et al., 2018). Es un polímero aprobado por la FDA como sustancia apta para el contacto con alimentos (Auras et al., 2004).

### 2.1 Polilactida en aplicaciones de envases para alimentos

Las funciones básicas del envasado de alimentos son la contención, protección y conservación, manteniendo su integridad en términos de estructura química y estado físico (Gerometta et al., 2019). Además, los envases protegen el contenido de agentes ambientales como microorganismos, olores, impactos, vibraciones, polvo, por mencionar algunos (Ribeiro-Santos et al., 2017). De aquí la importancia de seleccionar un paquete adecuado para prolongar la vida de los alimentos.

La mayoría de los envases para alimentos necesitan una alta resistencia al agua y al oxígeno para mantener sus propiedades durante el almacenamiento (Rhim, 2007). El PLA en el envasado de alimentos es ideal para productos frescos y para productos que no se dañan por la permeabilidad al oxígeno PLA (Farah et al., 2016). Los envases termoformados de PLA se utilizan en los mercados de frutas, verduras y ensaladas (Madhavan Nampoothiri et al., 2010). El PLA puede verse afectado por la presencia de agua cuando su peso molecular es inferior a 20000 g/mol, esto permite la degradación por microorganismos, produciendo un proceso metabólico que reduce el material en dióxido de carbono, agua y biomasa (Reichert et al., 2020).

Las resinas PLA se pueden hacer a medida para diferentes procesos de fabricación, incluido el moldeo por inyección, la extrusión de láminas, el moldeo por soplado, el termoformado, el conformado de películas o el hilado de fibras. La clave es controlar ciertos parámetros moleculares en el proceso, como la ramificación, el contenido de isómeros D y la distribución del peso molecular (Pang et al., 2010). Una característica única del proceso Cargill Dow es el paso intermedio de purificación de lactida que separa eficazmente los estereoisómeros de L- y meso-Lactida. La separación de bajo costo permite la producción controlada de PLA con composiciones estereoquímicas específicas, críticas para controlar la tasa de cristalización y la cristalinidad final (Kian et al., 2019).

## **2.2 Envases activos basados en PLA con aceites esenciales**

El envase activo es una tendencia actual, en donde el envase interactúa con el producto que cubre, cuyo objetivo principal de extender la vida útil mediante la adición de aditivos antioxidantes y antimicrobianos. Estos empaques también mantienen las propiedades del producto, y el material de envasado utilizado también puede liberar un componente beneficioso para el alimento (Unión Europea, 2011). En tecnología de alimentos, el término vida útil no tiene una definición única y simple, debido a su complejidad (Robertson, 2016). La vida útil se describe como un período de tiempo finito, después de la producción (incluyendo en algunos casos la maduración o el envejecimiento) y el envasado, durante el cual el alimento conserva un nivel requerido de calidad en condiciones de almacenamiento (Calligaris et al., 2007).

Los aceites esenciales (AE) son compuestos volátiles de plantas aromáticas que presentan beneficios en la salud humana y en los alimentos (Brahmi et al., 2016). Se clasifican como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la FDA de los Estados Unidos, así como por la legislación europea (Zeid et al., 2019). Los AE poseen propiedades biológicas como antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, analgésico, insecticida y antiinflamatorio (Periasamy et al., 2016). Los AE se pueden agregar directamente al alimento o usando un material de empaque, liberándose más tarde en el producto (Ribeiro-Santos et al., 2017). Uno de los obstáculos para el uso de AE es su falta de reproducibilidad debido a la acción de diferentes factores como el clima, la humedad, la estación, que pueden afectar la calidad y cantidad del AE y sufrir muchas variaciones (Li & Chemat, 2014). Además, otro factor es su fuerte aroma que puede cambiar la percepción del alimento (Negi, 2012).

El método de fundición por solvente se utilizó como el proceso principal para elaborar películas de PLA con aceites esenciales, debido a su versatilidad y sencillez a nivel de laboratorio (Mohamad et al., 2020). Uno de los problemas de agregar aceites esenciales a las películas de PLA es su evaporación, que se incrementa a altas temperaturas del proceso, lo que causa la presencia de microporos en las películas debido a la pérdida de aceites esenciales y esto permite una mayor transferencia de vapor de agua (Pires et al., 2013). Entre los aceites esenciales mayormente estudiados se encuentra el AEO. El aceite esencial de orégano posee dos compuestos volátiles mayoritarios, el carvacrol y el timol que son usados como agentes antimicrobianos probados frente a una variedad de cepas bacterianas (Muriel-Galet et al., 2015).

## **1.3 Plasma frío (CP) y su efecto en las propiedades de películas plásticas**

El plasma frío es definido como el cuarto estado de la materia. Es un gas parcialmente ionizado, con una corriente eléctrica. En estas condiciones, el gas usado puede ser influido por campos eléctricos y magnéticos, y servir como un conductor eléctrico (Munekata et al., 2020). En este contexto el término "frío" es debatible, este no refiere a temperaturas de refrigeración o bajo cero, sino se refiere a temperatura ambiente y hasta por debajo de los 60°C (Misra et al., 2019). En contraste con el plasma térmico que puede alcanzar temperaturas de 1000 °C o superiores.



La generación de plasma frío puede clasificarse dependiendo de la frecuencia de excitación en: descargas de corona y de baja frecuencia (descargas de corona y descargas de barrera dieléctrica); descargas de radiofrecuencia (chorros de plasma a presión atmosférica-APPJ); y plasma impulsado por microondas (Hoque et al., 2022).

### Efecto del plasma frío en las propiedades de las películas

Uno de los principales cambios físicos posteriores al plasma frío es el aumento de la rugosidad de la superficie del biopolímero, que se produce por el efecto de grabado en las superficies de las películas luego de que sean bombardeadas por grupos reactivos como iones, átomos, moléculas, radicales libres y otras partículas (Bahrami et al., 2022). La energía que se transfiere del plasma a la superficie de las películas origina dos efectos: la eliminación o reagrupación de las pequeñas partículas con un bajo peso molecular y la ruptura de enlaces químicos, cadenas y degradación química, demostrando el efecto de los grupos reactivos del plasma frío (Pankaj et al., 2017). El efecto de grabado pudo ser observado en varios tipos de generadores de plasma (DBD, radio frecuencia y microondas) usando una variedad de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ , argón y aire). Este grabado puede aplicarse en la industria de películas de empaque, por ejemplo, puede controlar la difusión de moléculas a través de la matriz de las películas (Bahrami et al., 2022).

Adicionalmente, el tratamiento con plasma frío mejora la adhesión entre diferentes superficies y permite la producción de películas con múltiples capas. En este sentido, Honarvar et al., (2017) reportaron que el tratamiento con plasma frío mejoró la adhesión de carboximetilcelulosa con películas de polipropileno (Honarvar et al., 2017).

### Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas es un factor crítico en la preservación de los alimentos durante su manipulación, transporte y almacenamiento. Las propiedades más importantes son el módulo de elasticidad, resistencia a la tensión y porcentaje de elongación (Chen et al., 2019). El tratamiento con plasma frío puede inducir fenómenos de reagrupación, degradación y entrelazado que alteran las propiedades mecánicas de las películas (Garavand et al., 2017). La reacción con los grupos reactivos en la superficie de las películas rompe los enlaces C-C y C-H. Los radicales libres generados por el plasma frío pueden participar en reacciones de cadena, mejorando el esfuerzo máximo de las películas (Dong et al., 2020).

### Propiedades térmicas

Los ensayos de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) son los dos ensayos más importantes para determinar y comprender las propiedades térmicas de las películas. Estos estudios térmicos brindan información sobre las propiedades termodinámicas y termo físicas de las películas (Bahrami et al., 2022). Los indicadores más importantes en el DSC son la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la temperatura vítrea ( $T_g$ ) y temperatura de cristalización ( $T_c$ ), al evaluar estos parámetros se puede determinar los cambios estructurales y térmicos que son causados por el plasma frío (Chen et al., 2019).

El CP tiene diversos efectos en el perfil térmico de las películas lo que causa un incremento en su estabilidad en algunos casos. Dong et al., (2018) investigaron el efecto

del CP en películas de zeína, los resultados mostraron que un tiempo de exposición de 60 segundos promueven los valores de  $T_m$  y  $T_c$ , confirmando la degradación térmica pospuesta, en comparación con la película sin tratar. La razón probable del aumento en la estabilidad térmica estuvo asociada al entrelazado en la superficie de la película debido a la formación de nuevos grupos reactivos formados por el uso de los gases oxígeno y nitrógeno después del tratamiento de CP (Dong et al., 2018).

Hu et al., (2018) analizaron los efectos del CP en películas de PLA, donde los valores de  $T_g$  y  $T_m$ ,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  y  $153\text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, no sufrieron cambios significativos porque solo la superficie de las películas sufrió cambios, mejorando la rugosidad y composición y no afectando las propiedades principales (Hu et al., 2018). Varios factores relacionados al CP (tiempo, tipo de gas y la potencia del plasma) pueden afectar las propiedades térmicas de las películas (Chen et al., 2019).

### Propiedades antibacterianas

El uso de plasma frío ha sido investigado por sus propiedades antimicrobianas en frutas, vegetales, carnes frescas y otros alimentos que son sensibles a las altas temperaturas. La generación de especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno permiten reducir la carga microbiana. El tratamiento con plasma frío facilita el recubrimiento de componentes en la superficie de los polímeros y aumenta sus propiedades antibacterianas (Hoque et al., 2022). La tasa de difusión de compuestos antibacterianos desde la matriz de las películas y su tasa de liberación son un factor crítico que influye en las propiedades antibacterianas de empaque activos. El CP aumenta la liberación de componentes antimicrobianos en las películas debido al incremento del coeficiente de difusión, tal como lo reportaron Pankaj et al., (2014). Estos autores señalaron que el tratamiento con DBD aumenta la difusión de timol en una matriz de zeína, debido a que el efecto de grabado aumentó la rugosidad y causó un decrecimiento en el grosor (Pankaj et al., 2014).

## CAPÍTULO 3

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Materiales

En la preparación de las películas de Polilactida (PLA) se usó la resina granular Ingeo™ Biopolymer 2003D (de peso molecular promedio de  $1.80 - 2.23 \times 10^5$  Da) (Kmetty & Litauszki, 2020) adquirido a NatureWorks® CO. LLC, (Blair, NE, USA), y cloroformo grado reactivo (>99%, Merck, Darmstadt, Alemania). El aceite esencial de orégano (*Origanium vulgare*) fue proporcionado por NOW (Bloomington, IL, USA), que fue agregado a las películas de PLA.

Adicionalmente, 2,2-Azobis(2-methyl-propionamidine) dihydrochloride (AAPH, 97%), ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, 97%), sal sódica de fluoresceína ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ), ácido gálico (97.5%), reactivo Folin & Ciocalteu's phenol (2M) y carbonato sódico ( $Na_2CO_3$  anhidro) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El fosfato de hidrógeno disódico dodecahidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ) fue comprado a Merck (Darmstadt, Alemania) y el fosfato de sodio dihidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ), a Lobachemie (Mumbai, India).

Los agares usados para los ensayos microbiológicos, Tryptic Soy Broth (TSB) y Tryptone Soy Agar (TSA), fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania) y a TM Media (Delhi, India), respectivamente. Las cepas bacterianas usadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 12600) y *Escherichia coli* (ATCC No. 25922) de Microbiologist (St. Cloud, MN, USA).

#### 3.2. Preparación de películas de Polilactida

Las películas de PLA fueron elaboradas siguiendo el método de solvent casting (Salazar et al., 2022). Para esto, se elaboraron películas con aceite esencial de orégano en concentraciones de 0, 6.25, 12.5, y 25% (masa de AEO/masa de PLA). Una solución de PLA al 2% (m/v) fue elaborada usando cloroformo como el solvente y se mantuvo en agitación por 2 horas. Luego se adicionó el aceite esencial en las concentraciones en base a la cantidad de PLA usada. Después se vertió las soluciones en cajas Petri para formar una capa uniforme. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, por al menos 24 horas en un ambiente oscuro hasta que el solvente se evapore por completo y luego las películas se retiraron del molde. Las películas obtenidas fueron codificadas como: PLA, P-6.25, P-12.5 y P-25 para denotar sus concentraciones de AEO. El espesor de las películas se midió en cinco puntos diferentes usando un micrómetro digital (Rexbeti, Auburn, WA, USA). Finalmente, las películas fueron colocadas en fundas plásticas de polietileno de baja densidad (LLDPE Ziploc) y se almacenaron en refrigeración hasta su tratamiento.

#### 3.3 Preparación de películas para el tratamiento de plasma frío

Las películas se cortaron en tiras con dimensiones 10 x 50 mm y se colocaron 5 tiras en una caja Petri, la cual a su vez se colocó en una bandeja plástica (290 x 215 x 50 mm) que fue introducida en una funda de nylon coextruida. Las fundas fueron selladas

herméticamente con dos gases en su interior: aire y nitrógeno. El gas nitrógeno se introdujo en la funda con un flujo de 15 pies cúbicos durante 3 minutos y luego se procedió a sellarla herméticamente.

### **3.4. Tratamiento de plasma frío de las películas activas**

La generación de plasma frío (CP) se hizo con un transformador BK-130 (Phenix Technologies, Accident, MD) con una salida de voltaje de 90 kV para todos los experimentos. El tratamiento de plasma frío se realizó mediante el método de descarga de barrera dieléctrica (DBD), donde se utiliza dos láminas de polipropileno de 6 mm en la parte superior e inferior de las muestras para mantener estable el sistema. Las muestras se trataron con plasma frío durante 15 minutos, por duplicado, con dos gases, aire (A) y nitrógeno (N). Las muestras tratadas con plasma frío con aire fueron codificadas como P-CP-A, P-6.25 CP-A, P-12.5 CP-A y P-25 CP-A, mientras que las tratadas con nitrógeno, como P-CP-N, P-6.25CP-N, P-12.5CP-N y P-25CP-N, para indicar el porcentaje de AEO y el gas correspondiente. Luego del tratamiento, las muestras permanecieron dentro de la funda de nylon selladas por 24 horas a temperatura ambiente antes de ser analizadas.

### **3.5. Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC)**

Para la determinación de ORAC, se realizó la extracción en metanol de los componentes presentes en las películas. Para ello, las películas (5 tiras de 1 × 5 cm, 0.35 – 0.38 g) fueron introducidas en un tubo de ensayo de tapa rosca con 10 ml de metanol. El conjunto cerrado fue sometido a agitación constante por 24 horas, utilizando un agitador orbital MaxQ4450 (Thermoscientific, Waltham, MA, USA). Luego, a partir de los extractos obtenidos, se realizaron diluciones 1/200.

En la determinación de ORAC se utilizó un equipo lector multi-modal de microplacas (Synergy™ HTX, Santa Clara, CA, USA), de acuerdo con el método descrito por Borzi et al. con modificaciones (Nand et al., 2013)(Borzi et al., 2019). Este método se basa en el principio de transferencia de átomos de hidrógeno y mide la capacidad de captar y eliminar radicales peroxilo (Yan et al., 2016). Específicamente, la técnica mide la pérdida de la fluorescencia por acción de los compuestos antioxidantes presentes en una muestra y, por su alta sensibilidad, permite límites de detección menores a nanomoles (Litescu et al., 2014). Los compuestos antioxidantes emiten radicales peroxilo que reaccionan con la fluoresceína y conlleva a una pérdida de su fluorescencia que se mide por espectrofotometría (Borzi et al., 2019). Para ello, se preparó una solución de AAPH 153 mM y se la colocó en el dispensador del lector multi-modal. Luego, en una placa negra de 96 micro pocillos se colocaron 150 µl de solución de fluoresceína ( $4 \times 10^{-3}$  nM) por cada pocillo de análisis. En los pocillos destinados a las muestras, se adicionó 25 µl de las diluciones 1/200 preparadas previamente. Para obtener la curva de calibración, se adicionó 25 µl de solución Trolox en diferentes concentraciones (10, 20, 25, 50, 100 y 200 µM). Para los análisis del blanco, se adicionó 25 µl de solución buffer fosfato (75mM, pH 7.4) en los pocillos correspondientes. Las muestras, los patrones y blancos se colocaron en la microplaca por triplicado.

Luego, la microplaca fue introducida en el lector multi-modal. La microplaca se sometió a incubación a 37 °C. A continuación, 25 µl de la solución de AAPH fueron adicionados automáticamente por el equipo a cada pocillo durante el ensayo y se tomaron lecturas

a 485 y 528 nm, durante 120 minutos. Los resultados se reportaron en  $\mu$  moles equivalentes Trolox por gramo ( $\mu$  mol TE/g).

### 3.6. Contenido de fenoles Totales (TPC)

El contenido de fenoles totales fue determinado mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Lukic et al. con ciertas modificaciones (Lukic et al., 2020). Este método se basa en el principio de transferencia de electrones y mide la capacidad de reducción de los antioxidantes de la muestra (Yan et al., 2016).

Las muestras (diluciones 1/200) se prepararon de la misma forma que se describe en el ensayo ORAC. 100  $\mu$ l de cada muestra (n=2) se pusieron en tubos eppendorf de 1 ml y luego se agregó en cada tubo 625  $\mu$ l agua destilada, 250  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5% y 25  $\mu$ l de reactivo de Folin. Luego, las muestras fueron sometidas a agitación en un vortex por 10 segundos y se dejaron reposar por 2 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. A continuación, en una placa de micro pocillos, se pusieron 200  $\mu$ l de cada muestra en tres pocillos. La absorbancia fue medida a 739 nm en un lector multi-modal de microplacas (Synergy™ HTX, Santa Clara, CA, USA). Adicionalmente, se analizaron blancos por triplicado. De forma similar, se analizaron diluciones de ácido gálico (en metanol:agua, 1:1 v/v) para elaborar una curva de calibración (4.5, 9, 22.5, 45, 90  $\mu$ g/ml) que presentó una respuesta lineal ( $R^2 > 0.999$ , n=3). Los resultados se reportaron en miligramos de equivalente de ácido gálico (mg GAE/g) por gramo de película.

### 3.7. Propiedades antibacterianas de las películas activas

Para la evaluación de las propiedades antibacterianas, se usó el método de inmersión en caldo y recuento en placa (Salazar et al., 2022). Inicialmente, las películas fueron cortadas en 5 tiras de 1 x 5 cm para obtener un área de 25 cm<sup>2</sup> por cada tratamiento. Las muestras fueron sumergidas en un tubo de ensayo con 10 ml de TSB y 0.1 mL de una solución del microorganismo ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Luego, los tubos de ensayos se incubaron por 24 horas a 25 °C para *S. aureus* y 37 °C para *E. coli*. Cada tratamiento se analizó por duplicado. A continuación, se realizó la dilución seriada del caldo contenido en los tubos, usando caldo TSB. Luego, 1 ml de la solución diluida se sembró por inmersión en cajas Petri con agar TSA (Tryptone Soy Agar). Las placas Petri fueron incubadas por 24 horas en condiciones de temperatura similares a las descritas previamente y luego se contó las UFC en cada placa. Los resultados se reportaron en unidades de reducción log(UFC/ml) y fueron calculados usando la ecuación:  $R = \log(B/A)$ , donde A es el promedio del número de células viables en las muestras y B es el número promedio de células viables en el control (Ahmed et al., 2018; Mania et al., 2019).

### 3.8. Propiedades mecánicas

La determinación de las propiedades mecánicas de las películas se realizó de acuerdo con la norma ASTM D-882 (ASTM, 2015), utilizando un equipo de prueba universal Shimadzu® UTM-600KN (Shimadzu Co., Kyoto, Japón). Las pruebas de tracción de las películas se realizaron por triplicado a una velocidad de 5 mm/min. Los resultados se registraron para la Carga Máxima, Esfuerzo máximo, Deformación a la ruptura y Módulo Elástico.

### 3.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de las películas fueron determinadas por duplicado en un calorímetro diferencial de barrido DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). Las muestras se analizaron a 10 °C/min de -30 a 200 °C, con doble barrido, en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 40 mL /min.

### 3.10. Espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR de las muestras se llevó a cabo usando un espectrofotómetro PerkinElmer 100 (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA). El ensayo se desarrolló en un rango de 4500 – 450 cm<sup>-1</sup> con 10 scans consecutivos y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### 3.11. Medición de color instrumental

La medición de color se realizó por triplicado usando un colorímetro 3NH® modelo NH310 (3NH®, Shenzhen, China). Los valores de color se expresaron según los parámetros de Hunter, que incluyen brillo (L\*), rojo-verdoso (a\*) y azul-amarillo (b\*). La diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias entre el parámetro de color correspondiente de las muestras y el de una placa blanca estándar ( $L^* = 96.10$ ,  $a^* = 0.04$ ,  $b^* = -1.97$ ).

### 3.12. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, usando el programa Statgraphics Centurion (The Plains, VA, USA). Cuando las diferencias fueron significativas, se usó la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ )

# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las películas elaboradas en el presente estudio por el método de solvent casting presentaron espesores en el rango de  $158 \pm 55.27$  a  $202 \pm 56.99$   $\mu\text{m}$  y no mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos en las diferentes propiedades analizadas.

### 4.1 Propiedades térmicas

Los resultados del análisis térmico de las películas estudiadas se muestran en la Tabla 1 y corresponden a los datos del segundo barrido, pues, el primer barrido permite eliminar cualquier historial térmico por el que el polímero pudo haber pasado durante su síntesis y procesamiento posterior. En el caso de las películas sin tratamiento de plasma frío, se observó la disminución de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) con el incremento del AEO, desde  $60$   $^\circ\text{C}$  para el PLA puro hasta  $29.8^\circ\text{C}$  para P-25. Este decrecimiento se puede atribuir a la interacción del AEO con el PLA, presentando un efecto plastificante, tal como ha sido reportado en la literatura respecto a compuestos aromáticos como el benzaldehído (Salazar et al., 2022). Además, la estructura molecular del aceite esencial cambia la distribución y los enlaces en la matriz polimérica, provocando la aceleración de la cinética de cristalización en las muestras (Lim et al., 2013; Qin et al., 2017).

**Tabla 1.**  
**Propiedades térmicas y mecánicas de películas PLA tratadas con plasma frío.**

Serie	$T_g^*$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_c^*$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_f^*$ ( $^\circ\text{C}$ )	Xc (%)	TS (MPa)	DR (%)	ME (MPa)
PLA	$60 \pm 0.4^a$	$120.6 \pm 1.0^{ab}$	$150.3 \pm 0.3^a$	$3.1 \pm 0.7^{ab}$	$19.3 \pm 1.2^{ab}$	$2.4 \pm 0.2^a$	$1300 \pm 156^a$
P-6.25	$51.1 \pm 0.1^{ab}$	$112.3 \pm 0.6^{bcd}$	$145.6 \pm 0.1^{bc}$	$0.3 \pm 0.3^c$	$17.9 \pm 1.9^f$	$56.8 \pm 9.1^c$	$840 \pm 18^b$
P-12.5	$38.7 \pm 1.5^{cde}$	$99.3 \pm 3.3^{ef}$	$139.5 \pm 3.1^{de}$	$0.4 \pm 0.3^c$	$15.4 \pm 1.8^{bcde}$	$38.3 \pm 5.9^b$	$728 \pm 241^{bc}$
P-25	$29.8 \pm 1.6^e$	$98.1 \pm 1.8^f$	$136.5 \pm 0.5^{ef}$	$0.8 \pm 0.0^c$	$8.9 \pm 1.0^{abc}$	$16.9 \pm 4.7^a$	$266 \pm 48^e$
P-CP-A	$60.6 \pm 0.7^a$	$123.8 \pm 4.4^a$	$151.9 \pm 0.7^a$	$1.1 \pm 0.6^c$	$12.0 \pm 3.9^e$	$2.0 \pm 0.6^a$	$499 \pm 135^{cd}$
P-6.25CP-A	$48.7 \pm 1.7^{bc}$	$106.0 \pm 1.9^{def}$	$142.9 \pm 0.8^{bcd}$	$0.6 \pm 0.1^c$	$20.4 \pm 3.0^a$	$8.6 \pm 4.0^a$	$699 \pm 95^{bc}$
P-12.5CP-A	$44.1 \pm 8.2^{bcd}$	$102.2 \pm 7.4^{def}$	$145.3 \pm 2.8^{bc}$	$1.6 \pm 0.1^{bc}$	$14.6 \pm 4.6^{cde}$	$7.7 \pm 4.6^a$	$588 \pm 47^{cd}$
P-25CP-A	$43.0 \pm 1.9^{bcd}$	$111.9 \pm 6.4^{bcd}$	$142.0 \pm 2.5^{cd}$	$0.5 \pm 0.3^c$	$15.3 \pm 1.2^{bcde}$	$39.2 \pm 13.7^b$	$369 \pm 101^{de}$
P-CP-N	$60.1 \pm 0.5^a$	$117.6 \pm 3.7^{abc}$	$150.4 \pm 0.9^a$	$2.0 \pm 1.3^{abc}$	$13.7 \pm 1.7^{de}$	$2.8 \pm 1.0^a$	$687 \pm 250^{bc}$
P-6.25CP-N	$50.0 \pm 1.8^{ab}$	$109.1 \pm 4.4^{cdef}$	$143.9 \pm 1.2^{bc}$	$3.4 \pm 0.3^a$	$14.1 \pm 5.1^{de}$	$6.8 \pm 4.3^a$	$912 \pm 200^b$
P-12.5CP-N	$48.2 \pm 12.7^{bc}$	$109.9 \pm 11.5^{bcde}$	$146.1 \pm 3.5^b$	$1.1 \pm 1.6^c$	$18.0 \pm 1.2^{abcd}$	$13.8 \pm 3.5^a$	$679 \pm 213^{bc}$
P-25CP-N	$34.9 \pm 1.3^{de}$	$100.2 \pm 0.0^{ef}$	$135.2 \pm 0.9^f$	$0.9 \pm 0.1^c$	$15.6 \pm 1.4^{bcde}$	$37.8 \pm 17.8^b$	$501 \pm 116^{cd}$

$T_g$ : temperatura de transición vítrea;  $T_f$ : temperatura de fusión; Xc: Grado de cristalinidad. Los valores seguidos de letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas en  $p < 0,05$  (Duncan).

Fuente: Autor

Además, la película de PLA puro presentó un pico endotérmico ( $T_c$ ) alrededor de  $120^\circ\text{C}$  y una temperatura de fusión ( $T_f$ ) de  $150^\circ\text{C}$ , los cuales disminuyeron en las películas al incorporar AEO. Esto podría estar relacionado con la estructura molecular de los componentes del AEO que puede modificar la movilidad general de la cadena de la matriz del polímero. Estos resultados son consistentes con lo reportado por (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2016).

Qin et al. (2017) estudiaron películas de PLA con incorporación de diferentes aceites esenciales (incluyendo árbol de té, bergamota, hierba de limón, romero y clavo de olor) con una concentración de 9% (p/p), obteniendo valores similares de  $T_c$  para el PLA puro y para las películas de PLA/AEO en concentraciones de 6.25% - 12.5%. Estos autores reportaron que la incorporación de AEO en la matriz polimérica, provoca una cinética de cristalización más rápida en las mezclas, lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio, en donde se observó una disminución del grado de cristalinidad (Qin et al., 2017).

Por otro lado, la película de PLA sin tratamiento presentó propiedades térmicas similares a las películas P-CP-A y P-CP-N, es decir, no se observó una variación de la  $T_g$  ni  $X_c$  por el tratamiento con plasma frío.

## 4.2 Propiedades mecánicas

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas elaboradas se reportan en la Tabla 1. Las películas de PLA puro presentaron valores de Esfuerzo máximo (TS), elongación a la ruptura (DR) y Módulo de elasticidad (ME) de 19.3 MPa, 2.4% y 1300 MPa, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados en literatura (Arrieta et al., 2013; Qin et al., 2017). En las películas de PLA puro, los tratamientos de plasma frío disminuyeron la TS de las películas en un 30% y un 38%, sin afectar significativamente la deformación a la ruptura, por lo que mantuvieron su comportamiento frágil o rígido.

En las películas de PLA/AEO sin tratamiento de CP, se observó una disminución de TS y el incremento de la DR frente al PLA. La adición de AEO al PLA permitió obtener películas dúctiles. Esto podría explicarse por un efecto plastificante del AEO, el cual dificulta la interacción entre las cadenas del polímero. Estos resultados son similares a los reportados por Qin et al. (2017), que señalan que la adición de compuestos fenólicos en la matriz polimérica tiene un efecto plastificante, pues impide la interacción de las moléculas de PLA (Qin et al., 2017).

En las muestras de P-25CP-A y P-25CP-N hubo un aumento en la TS frente a su control, esto podría ser debido a la cantidad de aceite esencial y su efecto plastificante, junto con la acción del CP que facilita la dispersión del aceite y la interacción de los grupos reactivos oxigenados y nitrogenados en las películas que afectan el entrelazado de las cadenas del PLA.

En las películas de PLA/AEO, los tratamientos de plasma frío no afectan significativamente la TS y disminuyen la DR. Esto se puede explicar debido a que el CP induce fenómenos fisicoquímicos de grabado, degradación y entre cruzado, lo que



resulta en la modificación de las propiedades mecánicas de las películas (Hoque et al., 2022). El bombardeo de grupos reactivos durante el tratamiento con plasma frío resulta en la ruptura de los enlaces C-C y C-H, y genera radicales libres que crean enlaces con los radicales de la superficie o participan en reacciones de cadena, lo que puede cambiar las propiedades mecánicas de las películas (Hoque et al., 2022).

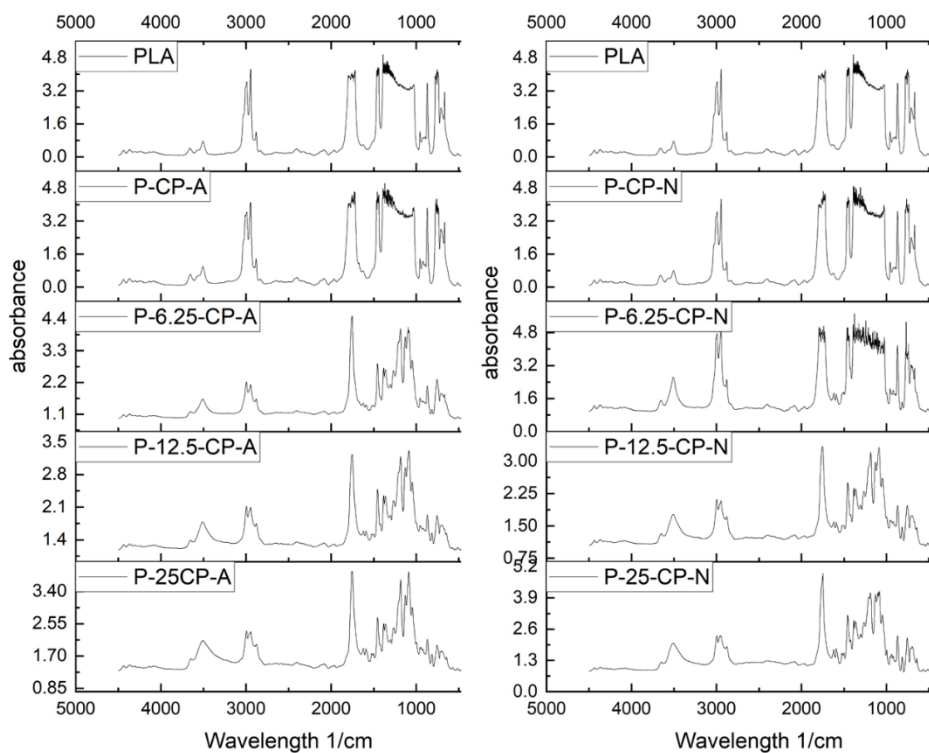
### 4.3 Espectroscopía Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 4.1 y Figura 4.2 se muestra los resultados de FTIR para las muestras analizadas en este estudio. Salazar et al., (2022) estudiaron películas de Polilactida-polietilenglicol-quitosano y reportaron los picos característicos en el PLA. Se observaron el enlace O-H en  $3502\text{ cm}^{-1}$ , el grupo metilo en la estructura del PLA entre  $2995.7 - 2945.2\text{ cm}^{-1}$  (Salazar et al., 2022).

Tanto Fraj et al. (2019) y Fernández-Marín et al. (2020) analizaron el aceite esencial de orégano exhibiendo los picos de  $800-941\text{ cm}^{-1}$  es un enlace O-H, el pico del componente mayoritario carvacrol se encuentra en  $3349\text{ cm}^{-1}$  (a) que corresponde a un enlace O-H, un pico de enlace asimétrico se encontró en  $2869\text{ cm}^{-1}$  y simétrico en  $2960\text{ cm}^{-1}$  (b), entre  $1622-1424\text{ cm}^{-1}$  (c) los enlaces corresponde a enlaces fenólicos, en  $1456\text{ cm}^{-1}$  (d) curvatura  $\text{CH}_2$  y  $1250-1112\text{ cm}^{-1}$  (e) es un enlace C-O-C (Fraj et al., 2019),(Fernández-Marín et al., 2020). Estos picos se pueden observar en la Figura 4.2.

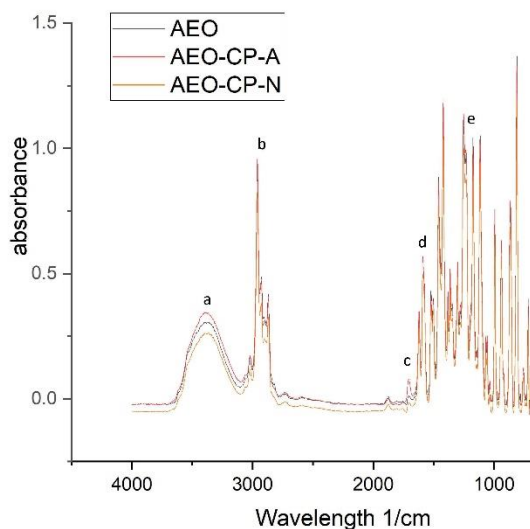
En el ensayo se observa el pico de carvacrol (a) en la longitud  $3349\text{ cm}^{-1}$ , junto con los enlaces asimétrico ( $2872\text{ cm}^{-1}$ ) y simétrico ( $2952\text{ cm}^{-1}$ ) codificado como el pico b en la Figura 2. Además del enlace fenólico en  $1595\text{ cm}^{-1}$ ,  $1423\text{ cm}^{-1}$  presenta la curvatura  $\text{CH}_2$  y el enlace C-O-C para el pico  $1112\text{ cm}^{-1}$ . Se puede observar un incremento del pico (a) para el tratamiento de plasma frío con aire en comparación con las otras muestras, que corresponde a los compuestos del AEO que tienen mayor poder antimicrobiano.

Para las películas de PLA, los picos  $2995 - 2945\text{ cm}^{-1}$  corresponden al grupo metilo y el  $3502\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace O-H. Para las muestras de PLA, los picos en el rango de  $2940$  a  $2970\text{ cm}^{-1}$  disminuyen en las muestras de CP-A y CP-N, esto se puede atribuir a la sustracción de protones desde el átomo de carbono C-O, obteniendo la formación de nuevos polímeros. Esto lo sustentaron Sheikhi et al., (2021) en películas en base de almidón tratadas con plasma frío con (aire y oxígeno) (Sheikhi et al., 2021).



**Figura 4.1.** Espectro de las películas de PLA con aceite esencial de orégano con tratamiento de plasma frío en atmosfera aire y nitrógeno.

Fuente: Autor



**Figura 4.2.** Espectro del aceite esencial de orégano con tratamiento de plasma frío en atmosfera aire y nitrógeno.

Fuente: Autor

Hoque et al (2022) han reportado una serie de reacciones químicas que suceden en la superficie de películas al reaccionar con el plasma, como reordenamientos moleculares, deshidratación e hidrogenación de moléculas (Hoque et al., 2022). Jahromi et al., (2020)

estudiaron los efectos de DBD plasma frío atmosférico en películas de caseinato de sodio, reportando picos en 1637-1645  $\text{cm}^{-1}$  disminuyendo con el tratamiento de plasma frío, en este estudio en el pico de 1750  $\text{cm}^{-1}$  se observa una disminución en las muestras de CP-A y CP-N, que significa la disminución del contenido en la matriz (Jahromi et al., 2020).

Wu et al., (2020) reportaron los efectos del voltaje y el tiempo de tratamiento en películas de Zein y PLA, donde se describe la reacción del enlace hidrógeno en las longitudes de 1533  $\text{cm}^{-1}$  y 1543  $\text{cm}^{-1}$ , y el cambio en sus estructuras secundarias con aire y argón con tiempos de exposición de 10 minutos (Wu et al., 2020). Tales picos se observan en 1457  $\text{cm}^{-1}$  y estos se mantienen en las muestras de CP-A y CP-N con tiempo de exposición de 15 minutos a 90 kV.

#### 4.4 Medición de color instrumental

Los resultados de medición de color de las películas de PLA con aceite esencial y tratadas con plasma frío se observa en la Tabla 2, donde no existe un cambio significativo en las películas, excepto en las de PLA puro donde se ve un pequeño aumento en los valores de L antes del tratamiento (86) y L después del tratamiento con aire y nitrógeno (89), lo que significa un aumento en el 3% en el valor de luminosidad (L).

**Tabla 2.**  
**Parámetros de color de películas de PLA con aceite esencial de orégano tratadas con plasma frío.**

Serie	L*	a*	b*	$\Delta E$
PLA	86.67±3.37 <sup>a</sup>	0.19±0.53 <sup>c</sup>	-2.24±0.07 <sup>de</sup>	8.47±3.37 <sup>b</sup>
P-6.25	90.53±5.19 <sup>ab</sup>	-0.16±0.34 <sup>c</sup>	-2.15±0.46 <sup>cde</sup>	5.81±0.58 <sup>b</sup>
P-12.5	90.13±5.98 <sup>b</sup>	-0.20±0.35 <sup>b</sup>	-1.90±0.50 <sup>cde</sup>	6.01±0.66 <sup>b</sup>
P-25	90.02±0.32 <sup>c</sup>	-0.17±0.05 <sup>a</sup>	-1.55±1.89 <sup>bcd</sup>	6.13±0.49 <sup>a</sup>
P-CP-A	89.61±1.11 <sup>a</sup>	-0.07±0.15 <sup>a</sup>	-2.77±0.22 <sup>a</sup>	6.57±5.54 <sup>b</sup>
P-6.25CP-A	90.42±0.37 <sup>a</sup>	-0.09±0.04 <sup>a</sup>	-2.91±0.25 <sup>a</sup>	5.79±4.60 <sup>b</sup>
P-12.5CP-A	90.22±0.38 <sup>a</sup>	-0.13±0.04 <sup>a</sup>	-2.66±0.27 <sup>a</sup>	5.95±6.56 <sup>b</sup>
P-25CP-A	89.88±0.38 <sup>a</sup>	-0.09±0.04 <sup>a</sup>	-2.27±0.27 <sup>b</sup>	6.26±1.40 <sup>a</sup>
P-CP-N	89.53±2.54 <sup>a</sup>	0.00±0.33 <sup>a</sup>	-2.28±0.16 <sup>a</sup>	6.86±2.18 <sup>a</sup>
P-6.25CP-N	90.48±0.33 <sup>a</sup>	-0.09±0.05 <sup>a</sup>	-2.82±0.31 <sup>a</sup>	5.72±0.13 <sup>a</sup>
P-12.5CP-N	90.37±0.50 <sup>a</sup>	-0.05±0.04 <sup>a</sup>	-2.79±0.26 <sup>a</sup>	5.82±0.57 <sup>a</sup>
P-25CP-N	89.56±0.50 <sup>a</sup>	-0.01±0.10 <sup>a</sup>	-1.92±0.31 <sup>b</sup>	6.57±1.14 <sup>a</sup>

Los valores seguidos de letras diferentes dentro de una columna indican diferencias significativas en  $p < 0,05$  (Duncan).

Fuente: autor

Autores como Zeid et al., (2019) reportaron que las películas de PLA fueron transparentes y sin color excepto aquellas que poseen aceites esenciales, en estas

algunas montaron una ligera coloración amarillenta perteneciente al aceite esencial (Zeid et al., 2019). En este estudio también presentaron un color blanco como se muestra en las imágenes el Anexo 1.

El efecto del color en el plasma frío no se pudo identificar en literatura publicada. Sin embargo, el efecto del plasma frío en el color de frutas si ha sido estudiado previamente. Xiang et al., (2018) estudiaron el efecto del plasma frío en jugo de manzana donde los valores de L no sufren cambios significativos, en donde los datos de a y b disminuyen, debido a las reacciones de oxidación de los pigmentos inducido por las especies reactivas durante el plasma frío (Xiang et al., 2018). En las películas de PLA/AEO no hubo cambios significativos en pigmentos ya que ambos materiales no presentan coloración.

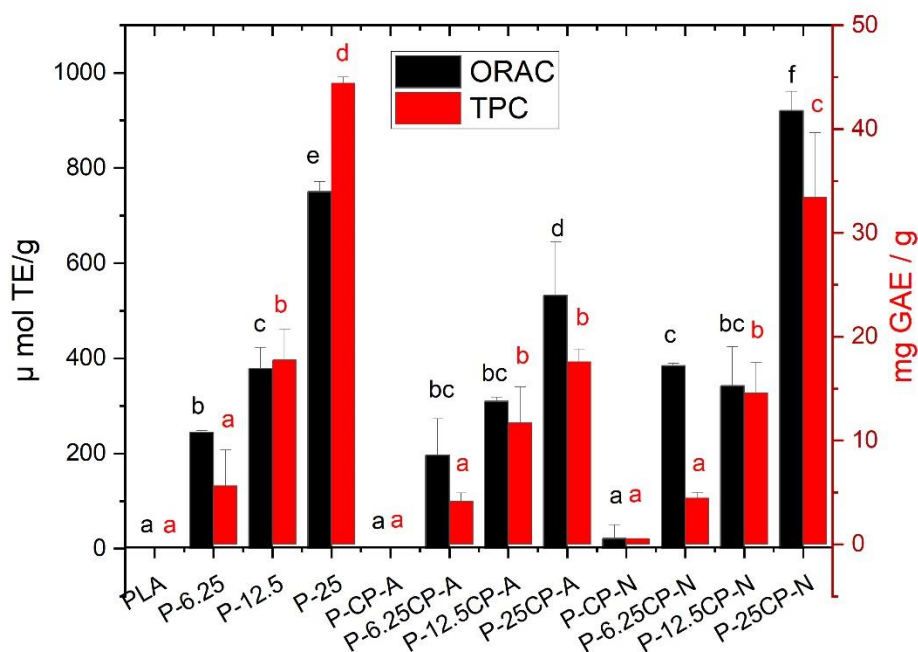
#### **4.5 Actividad antioxidante de las películas**

La Figura 4.3 muestra los resultados de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de las películas de PLA elaboradas y tratadas con plasma frío.

El tratamiento de CP-A causó una ligera disminución de la actividad antioxidante de las películas, que podría explicarse por la presencia de oxígeno. Sin embargo, el tratamiento CP-N no afectó la actividad antioxidante con las concentraciones bajas de AEO, e incluso la incrementó significativamente en el caso de la película con 25% de AEO. El plasma frío genera tanto grupos reactivos oxigenados como nitrogenados, dependiendo del gas utilizado. Las especies reactivas formadas por el CP en aire (presencia de oxígeno) podrían interactuar con los compuestos antioxidantes del AEO, lo que podría ocasionar la disminución del valor de actividad antioxidante determinado por el método ORAC.

Para efectos de comparación, se calculó la variación porcentual de la actividad antioxidante de las muestras tratadas con plasma frío frente a las muestras control. En el caso de las muestras CP-N, se observó un incremento del 36% y del 18% en las muestras P-6.25CP-N (384.45  $\mu\text{mol TE/g}$ ) y P-25CP-N (920.13  $\mu\text{mol TE/g}$ ), respectivamente, frente a las muestras control. La muestra P-12.5CP-N (342.46  $\mu\text{mol TE/g}$ ) no varió significativamente respecto a su control P-12.5 (378.32  $\mu\text{mol TE/g}$ ).

Los autores Wrona et al, (2021) estudiaron la actividad antioxidante en películas de Polietileno de baja densidad (LDPE) con diferentes aceites esenciales y vegetales, entre ellos el aceite de jengibre en concentraciones de 25 y 50%. Estos autores reportaron que las películas más finas, como las utilizadas en este estudio, facilitaron la penetración de los radicales OH y su dispersión (Wrona et al., 2021).



**Figura 4.3.** Actividad antioxidante de ORAC y Fenoles Totales de películas PLA tratadas con plasma frío. Letras diferentes del mismo color indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Fuente: Autor

Dantas et al. (2021) calcularon la actividad antioxidante en pulpa de açai mediante un tratamiento de plasma frío atmosférico mediante un sistema DBD con un voltaje de 20 kV, con un tiempo de exposición de 5, 10 y 15 minutos. Con este tratamiento hubo una reducción significativa de la actividad antioxidante ( $p < 0.05$ ). Los autores atribuyen estos resultados a la oxidación de las antocianinas por la presencia de grupos reactivos  $O_2$  (Dantas et al., 2021).

Para los ensayos de polifenoles totales (TPC), las muestras tratadas con aire P6.25CP-A, P12.5CP-A y P25CP-A presentaron una disminución del 26, 34 y 60% con respecto a los controles sin tratamiento de plasma frío, respectivamente. Mientras que, las muestras tratadas con nitrógeno reportan una disminución del 20% para P-6.25CP-N, 18% para P-12.5CP-N y 25% P-25CP-N frente a sus controles sin tratamiento de plasma frío, respectivamente. Los tratamientos de plasma frío con aire y nitrógeno provocaron una disminución de los valores de polifenoles totales de las películas, que se podría atribuir a la degradación de grupos aromáticos en el AEO por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas durante el tratamiento de CP. Esta disminución es atribuida por la habilidad que poseen los compuestos fenólicos para remover radicales libres producidos durante el proceso, como radicales hidroxilos, radicales peróxidos, oxígeno atómico (Dasan & Boyaci, 2018).

Almeida et al. explicaron que las descargas de plasma frío generan electrones energéticos que disocian las moléculas de oxígeno al impactarse directamente, luego el átomo de oxígeno simple se combina con el oxígeno molecular y forma ozono (Almeida

et al., 2015). Los compuestos fenólicos son particularmente sensibles a los ataques del ozono. De acuerdo con Pérez et al. (2002) el ozono reacciona muy eficientemente con los enlaces aromáticos de los compuestos fenólicos. La reacción del ozono en los compuestos aromáticos favorece la formación de compuestos hidroxilos y quinonas, por la ruptura del anillo aromático (Pérez et al., 2002). Sin embargo, el tratamiento con gas nitrógeno no produce ozono o especies reactivas de oxígeno, y es por esto que existe una menor degradación de los polifenoles con este tipo de tratamiento.

Autores reportaron resultados contradictorios del contenido de fenoles totales con diferentes configuraciones y gases en los tratamientos de plasma frío. Ozen et al. (2020) reportaron que el jugo de manzana tratado con DBD, usando aire como gas con 30, 40 y 50 W por un tiempo de exposición de 30 s, presentó una disminución de la actividad antioxidante de 41.7 a 32.4 GAE mg/100g. Los autores explicaron este fenómeno por la degradación del anillo aromático por los grupos reactivos formados por el plasma (Ozen & Singh, 2020). Por otro lado, usando el método de plasma de chorro atmosférico (AJP) en muestras de jugo de granada con gas argón a 4W se obtuvo un aumento porcentual del 33% en la actividad antioxidante, ya que los grupos fenólicos están atados a las paredes celulares polisacáridas de las plantas y estas, al ser desintegradas durante el proceso, liberan estos grupos (Herceg et al., 2016). Así mismo, Dasan & Boyaci (2018) usaron el mismo método AJP con aire como gas, 650W de poder y un tiempo de exposición de 3 – 5 minutos, obteniendo un aumento porcentual del 14% en el TPC (Dasan & Boyaci, 2018). De esta manera, se puede entender que las condiciones de tratamiento pueden influir en los resultados que se quieran obtener al usar esta tecnología no convencional.

#### 4.6 Actividad Antibacteriana

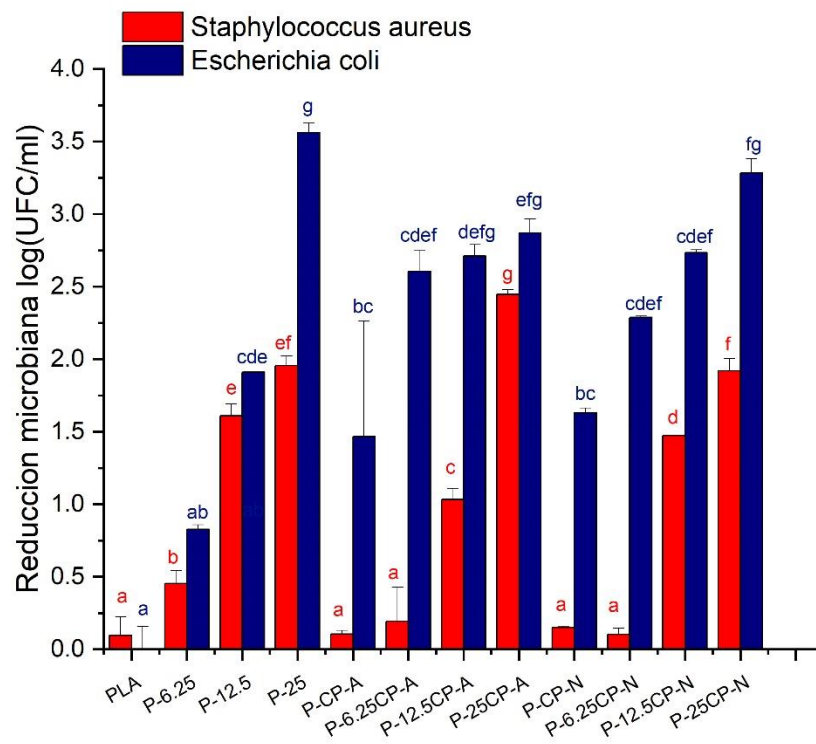
Los resultados de actividad antibacteriana se muestran en la Figura 4.4, para las películas de PLA y AEO tratadas con plasma frío con aire y nitrógeno.

En el caso de la evaluación de las películas frente a *S. aureus*, se observó que las muestras P-25 (25% AEO, sin tratamiento CP) presentaron una reducción de 1.96 log<sub>10</sub> UFC/ml, mientras que la muestra P-25CP-A (25% AEO, tratada con CP-Aire) obtuvo una reducción del 2.45 log<sub>10</sub> UFC/ml y la muestra P-25CP-N (25% AEO, tratada con CP-Nitrógeno) obtuvo una reducción del 1.92 log<sub>10</sub> UFC/ml. Esto quiere decir que, en los tratamientos antes mencionados, se observó un incremento de 0.5 log<sub>10</sub> UFC/ml en la reducción logarítmica en presencia de aire, mientras que no se observó ninguna variación en presencia de nitrógeno. En las películas con menores porcentajes de AEO se observó una disminución de la reducción logarítmica. Por tanto, se observa un efecto mayor del plasma en las películas con mayor concentración de AEO y CP-A.

En el caso de la evaluación de las películas frente a *E. coli*, se observó que las muestras P-25 (25% AEO, sin tratamiento CP) presentaron una reducción de 3.56 log<sub>10</sub> UFC/ml, mientras que la muestra P-25CP-A (25% AEO, tratada con CP-Aire) obtuvo una reducción del 2.87 log<sub>10</sub> UFC/ml y la muestra P-25CP-N (25% AEO, tratada con CP-Nitrógeno) obtuvo una reducción del 3.28 log<sub>10</sub> UFC/ml. Esto quiere decir que, en los tratamientos antes mencionados, se observó una disminución en la reducción logarítmica en presencia de aire y nitrógeno. En las películas con el menor contenido de AEO (6.25%), se observó una reducción de 0.83 log<sub>10</sub> UFC/mL sin tratamiento de plasma frío, frente a una reducción de 2.6 y 2.3 log<sub>10</sub> UFC/mL para los tratamientos con

aire y nitrógeno, respectivamente. Esto significa que se observó un incremento de la reducción logarítmica entre 1.5 y 1.8  $\log_{10}$  UFC/ml. Por tanto, se observa un efecto mayor del plasma en las películas con menor concentración de AEO tratadas tanto con aire o con nitrógeno.

El incremento en el poder antibacteriano se puede explicar por cambios en la adherencia superficial de las películas de PLA o a cambios en la estructura del AEO por las especies reactivas del plasma. El plasma frío produce especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que actúan sobre las bacterias anaeróbicas, causando daños en la membrana citoplasmática en las proteínas y ADN (Bourke et al., 2017). Además, el CP genera la aparición de nano protuberancias en forma de aguja en la superficie de películas de PLA que incrementan su interacción con compuestos antimicrobianos, así como su absorción física y química; estos luego se liberan y ejercen su rol antimicrobiano (Hu et al., 2018).



**Figura 4.4.** Efecto reductor del tratamiento con plasma frío DBD en la reducción de las cepas de *S. aureus* y *E. coli* en películas de PLA con aceite esencial de orégano. Letras diferentes del mismo color indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Fuente: Autor

Qin *et al.* (2017) estudió la actividad antibacteriana de películas de PLA con aceite esencial de bergamota, limoncillo, romero y clavo de olor (al 9% p/p) sin el uso del tratamiento de plasma frío (Qin et al., 2017). Estos autores usaron un método de cultivo en líquido convencional en cepas de *E. coli* y reportaron reducciones de 2  $\log_{10}$  CFU/mL. Estos resultados son mayores a los obtenidos en el presente trabajo con películas sin tratamiento y contenido de AEO de 12.5%.

Bahrami et al. (2022) explicaron que el tratamiento con plasma frío ayuda en el recubrimiento de materiales en la superficie de las películas, mejorando propiedades funcionales como son la hidrofobicidad mediante la incorporación de grupos funcionales y la capacidad de absorción superficial. Esta última puede relacionarse con el efecto observado en las películas de PLA/AEO, debido a una mejor distribución del aceite esencial en la superficie de las películas (Bahrami et al., 2022).

Hu et al. (2018) midieron la actividad antibacteriana de películas de PLA con nisina tratadas con plasma frío con 300 W, a una presión de 100 Pa a  $20\pm 5$  °C con tiempos de exposición de hasta 60s. Para la actividad antibacteriana se usó el método de zona de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* donde las muestras de 60 s obtuvieron una reducción de 3.3 log UFC/mL. El tratamiento con plasma frío permitió modificar superficialmente a las películas de PLA formando micro-protuberancias. Esta modificación junto con la producción de radicales libres, ayudó a la dispersión de la nisina en la superficie de la película, lo que permitió que este compuesto sea disperso lentamente para inhibir el desarrollo bacteriano. Este valor es similar al obtenido por la muestra de P-25CP-A con *S. aureus*, esto se debería a la capacidad que tiene el plasma frío de afectar la capacidad de absorción de las películas de PLA (Hu et al., 2018).

En ambos gases utilizados, los grupos reactivos producidos por el tratamiento de plasma frío tienen una actividad antibacteriana. Sin embargo, los grupos reactivos nitrogenados son los que destacan. Estos grupos reactivos pueden alterar la membrana celular de las bacterias produciendo cambios en su ADN y destruyendo las cadenas proteicas y lipídicas de estas.



# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

1. Las propiedades de películas de PLA con 6.25, 12.5, y 25 % de aceite esencial de orégano tratadas con plasma frío en atmósfera de aire y nitrógeno, fueron caracterizadas en sus propiedades físicas, antioxidantes y antimicrobianas. En lo referente a las propiedades físicas las películas con plasma frío no sufrieron cambios significativos. En ciertos casos hubo cambios ligeros en color y propiedades mecánicas. Con la adición de AEO, se observó cambió del valor de color L\* en las muestras de PLA puro y un aumento en la elongación a la ruptura. Se puede concluir que el tratamiento de plasma frío no altera la estructura química del polímero.
2. El tratamiento con plasma frío por 15 minutos resultó en un aumento en la actividad antioxidante ORAC en la muestra de P-25CP-N (920.13  $\mu$  mol TE/g) frente a su control. Sin embargo, los tratamientos con oxígeno no dieron resultados positivos en la actividad antioxidante ORAC y en los ensayos de polifenoles totales. En ambos ensayos se pudo observar que las especies reactivas de oxígeno afectaron la actividad antioxidante debido a la acción frente a los grupos fenólicos, que consiste en la destrucción de los grupos aromáticos presentes y una reducción de su actividad.
3. Las muestras de películas tratadas con aire y nitrógeno mostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas de estudio. Sobresaliendo la muestra de P-25CP-N con una reducción de 3.28  $\log_{10}$  UFC/mL frente a *Escherichia coli* como el mayor valor de actividad antimicrobiana comparada con las otras muestras tratadas con plasma. Estos resultados muestran que el tratamiento con nitrógeno posee mejores efectos frente al oxígeno en actividad antioxidante y antimicrobiana.

### 5.2. Recomendaciones

1. Este estudio se realizó con dos tipos de gases, aire y nitrógeno, sin embargo, se podría ampliar el estudio con otros gases como el argón para estudiar los cambios químicos que pudieran suceder por el tratamiento de plasma frío. Además, se podría usar el carvacrol como molécula modelo para determinar con mayor precisión el efecto del CP.
2. Los alentadores resultados obtenidos en este trabajo podrían ser utilizados en futuros estudios aplicados en alimentos frescos empacados. Por lo que se recomienda, proseguir con la investigación usando diferentes métodos para la elaboración de películas para simular lo usado por la industria, estudiar las propiedades de estas bajo diferentes parámetros de elaboración y aplicarlo en empaque de alimentos.
3. Finalmente, se sugiere realizar análisis complementarios como la microscopía electrónica de barrido para estudiar los cambios estructurales superficiales de las películas por el efecto de AE y por el tratamiento de plasma frío. Además, también se puede estudiar el efecto del tratamiento CP en la permeabilidad de

4. las películas, para examinar un posible efecto en esta importante propiedad de los empaques plásticos para alimento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, J., Arfat, Y. A., Bher, A., Mulla, M., Jacob, H., & Auras, R. (2018). Active Chicken Meat Packaging Based on Polylactide Films and Bimetallic Ag–Cu Nanoparticles and Essential Oil. *Journal of Food Science*, 83(5), 1299–1310. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14121>
- Almeida, F. D. L., Cavalcante, R. S., Cullen, P. J., Frias, J. M., Bourke, P., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2015). Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 127–135. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2015.09.001>
- Arrieta, M. P., López, J., Ferrándiz, S., & Peltzer, M. A. (2013). Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing*, 32(4), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2013.03.016>
- ASTM. (2015). *ASTM D-882; Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting* (08.01). ASTM International (ASTM). <https://doi.org/10.1520/D0882-18>
- Baek, N., Kim, Y. T., Marcy, J. E., Duncan, S. E., & O'Keefe, S. F. (2018). Physical properties of nanocomposite polylactic acid films prepared with oleic acid modified titanium dioxide. *Food Packaging and Shelf Life*, 17(October 2017), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.05.004>
- Bahrami, R., Zibaei, R., Hashami, Z., Hasanvand, S., Garavand, F., Rouhi, M., Jafari, S. M., & Mohammadi, R. (2022). Modification and improvement of biodegradable packaging films by cold plasma; a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(7), 1936–1950. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1848790>
- Benítez, R. (2011). Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe | FAO. In *Fao*. [https://www.fao.org/ericas/noticias/ver/es/c/239393/](https://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/239393/%0Ahttp://www.fao.org/ericas/noticias/ver/es/c/239393/)
- Borzi, F., Torrieri, E., Wrona, M., & Nerín, C. (2019). Polyamide modified with green tea extract for fresh minced meat active packaging applications. *Food Chemistry*, 300(March), 125242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125242>
- Bourke, P., Ziuzina, D., Han, L., Cullen, P. J., & Gilmore, B. F. (2017). Microbiological interactions with cold plasma. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 308–324. <https://doi.org/10.1111/jam.13429>
- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., Drifa, Y. G., Fahmi, E. M., Khodir, M., & Mohamed, C. (2016). Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.002>
- Calligaris, S., Manzocco, L., Kravina, G., & Nicoli, M. C. (2007). Shelf-life Modeling of Bakery Products by Using Oxidation Indices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 2004–2009. <https://doi.org/10.1021/jf063004h>
- Chen, G., Dong, S., Zhao, S., Li, S., & Chen, Y. (2019). Improving functional properties of zein film via compositing with chitosan and cold plasma treatment. *Industrial Crops and Products*, 129(29), 318–326.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.072>

- Dantas, A. M., Batista, J. D. F., dos Santos Lima, M., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, S., Magnani, M., & Borges, G. da S. C. (2021). Effect of cold plasma on açai pulp: Enzymatic activity, color and bioaccessibility of phenolic compounds. *LWT*, *149*, 111883. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111883>
- Dasan, B. G., & Boyaci, I. H. (2018). Effect of Cold Atmospheric Plasma on Inactivation of Escherichia coli and Physicochemical Properties of Apple, Orange, Tomato Juices, and Sour Cherry Nectar. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(2), 334–343. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2014-0>
- Dong, S., Guo, P., Chen, G. yun, Jin, N., & Chen, Y. (2020). Study on the atmospheric cold plasma (ACP) treatment of zein film: Surface properties and cytocompatibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.268>
- Dong, S., Guo, P., Chen, Y., Chen, G. yun, Ji, H., Ran, Y., Li, S. hong, & Chen, Y. (2018). Surface modification via atmospheric cold plasma (ACP): Improved functional properties and characterization of zein film. *Industrial Crops and Products*, *115*(August 2017), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.080>
- European Union. (2011). Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011. *Official Journal of the European Union*, *L 12*, 1–89.
- FAO. (2012). Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. In *Nucleus* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3738/1982.2278.562>
- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *107*, 367–392. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>
- Fernández-Marín, R., Labidi, J., Andrés, M. Á., & Fernandes, S. C. M. (2020). Using chitin nanocrystals to improve the final properties of poly (vinyl alcohol) films with Origanum vulgare essential oil. *Polymer Degradation and Stability*, *179*, 109227. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2020.109227>
- Fraj, A., Jaâfar, F., Marti, M., Coderch, L., & Ladhari, N. (2019). A comparative study of oregano (Origanum vulgare L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*, *140*, 111669. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.111669>
- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 687–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
- Gerometta, M., Rocca-Smith, J. R., Domenek, S., & Karbowski, T. (2019). Physical and Chemical Stability of PLA in Food Packaging. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22471-2>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made [Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados]. *Science Advances*, *3*(7), e1700782. <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- Herceg, Z., Kovačević, D. B., Kljusurić, J. G., Jambrak, A. R., Zorić, Z., & Dragović-

- Uzelac, V. (2016). Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chemistry*, *190*, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.135>
- Honarvar, Z., Farhoodi, M., Khani, M. R., Mohammadi, A., Shokri, B., Ferdowsi, R., & Shojaee-Aliabadi, S. (2017). Application of cold plasma to develop carboxymethyl cellulose-coated polypropylene films containing essential oil. *Carbohydrate Polymers*, *176*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.054>
- Hoque, M., McDonagh, C., Tiwari, B. K., Kerry, J. P., & Pathania, S. (2022). Effect of Cold Plasma Treatment on the Packaging Properties of Biopolymer-Based Films: A Review. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/app12031346>
- Hu, S., Li, P., Wei, Z., Wang, J., Wang, H., & Wang, Z. (2018). Antimicrobial activity of nisin-coated polylactic acid film facilitated by cold plasma treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, *135*(47), 1–11. <https://doi.org/10.1002/app.46844>
- Jahromi, M., Niakousari, M., Golmakani, M. T., Ajalloueiian, F., & Khalesi, M. (2020). Effect of dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma treatment on structural, thermal and techno-functional characteristics of sodium caseinate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *66*, 102542. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102542>
- Kian, L. K., Saba, N., Jawaid, M., & Sultan, M. T. H. (2019). A review on processing techniques of bast fibers nanocellulose and its polylactic acid (PLA) nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, *121*, 1314–1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.040>
- Kmetty, Á., & Litauszki, K. (2020). Development of poly (lactide acid) foams with thermally expandable microspheres. *Polymers*, *12*(2). <https://doi.org/10.3390/polym12020463>
- Li, Y., & Chemat, F. (2014). *SPRINGER BRIEFS IN MOLECULAR SCIENCE Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*.
- Lim, J. S., Park, K. Il, Chung, G. S., & Kim, J. H. (2013). Effect of composition ratio on the thermal and physical properties of semicrystalline PLA/PHB-HHx composites. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(4), 2131–2137. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2013.01.030>
- Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Tache, A., Vasilescu, I., & Radu, G. L. (2014). The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 245–251.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Bermúdez, J. M., Baños, A., Núñez, C., Guillamón, E., Aucejo, S., & Cameán, A. M. (2016). Development of PLA films containing oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. *virens*) intended for use in food packaging. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *33*(8), 1374–1386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1204666>
- Lukic, I., Vulic, J., & Ivanovic, J. (2020). Antioxidant activity of PLA/PCL films loaded with thymol and/or carvacrol using scCO<sub>2</sub> for active food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *26*(June), 100578. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100578>
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent

- developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101(22), 8493–8501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>
- Mania, S., Partyka, K., Pilch, J., Augustin, E., Cieřlik, M., Ryl, J., Jinn, J. R., Wang, Y. J., Michałowska, A., & Tylingo, R. (2019). Obtaining and characterization of the PLA/chitosan foams with antimicrobial properties achieved by the emulsification combined with the dissolution of chitosan by CO<sub>2</sub> saturation. *Molecules*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244532>
- Misra, N. N., Yopez, X., Xu, L., & Keener, K. (2019). In-package cold plasma technologies. *Journal of Food Engineering*, 244, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.019>
- Mohamad, N., Mazlan, M. M., Tawakkal, I. S. M. A., Talib, R. A., Kian, L. K., Fouad, H., & Jawaid, M. (2020). Development of active agents filled polylactic acid films for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1451–1457. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.209>
- Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2020). *Influence of Plasma Treatment on the Polyphenols of Food Products-A Review*. <https://doi.org/10.3390/foods9070929>
- Muriel-Galet, V., Cran, M. J., Bigger, S. W., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, 149, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.007>
- Nand, A. V., Swift, S., Uy, B., & Kilmartin, P. A. (2013). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of biocompatible low density polyethylene/polyaniline blends. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.11.023>
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
- Ozen, E., & Singh, R. K. (2020). Atmospheric cold plasma treatment of fruit juices: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 144–151. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.07.020>
- Pang, X., Zhuang, X., Tang, Z., & Chen, X. (2010). Polylactic acid (PLA): Research, development and industrialization. In *Biotechnology Journal* (Vol. 5, Issue 11, pp. 1125–1136). <https://doi.org/10.1002/biot.201000135>
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2017). Effects of cold plasma on surface, thermal and antimicrobial release properties of chitosan film. *Journal of Renewable Materials*, 5(1), 14–20. <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634105>
- Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., O'Neill, L., Jiménez, A., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2014). Surface, thermal and antimicrobial release properties of plasma-treated zein films. *Journal of Renewable Materials*, 2(1), 77–84. <https://doi.org/10.7569/JRM.2013.634129>
- Pérez, M., Torrades, F., Domènech, X., & Peral, J. (2002). Treatment of bleaching Kraft mill effluents and polychlorinated phenolic compounds with ozonation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8), 891–897. <https://doi.org/10.1002/jctb.651>

- Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., & Alshatwi, A. A. (2016). Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.035>
- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., & Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.019>
- Qin, Y., Li, W., Liu, D., Yuan, M., & Li, L. (2017). Development of active packaging film made from poly (lactic acid) incorporated essential oil. *Progress in Organic Coatings*, *103*, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.10.017>
- Reichert, C. L., Bugnicourt, E., Coltelli, M. B., Cinelli, P., Lazzeri, A., Canesi, I., Braca, F., Martínez, B. M., Alonso, R., Agostinis, L., Verstichel, S., Six, L., De Mets, S., Gómez, E. C., Ißbrücker, C., Geerinck, R., Nettleton, D. F., Campos, I., Sauter, E., ... Schmid, M. (2020). Bio-based packaging: Materials, modifications, industrial applications and sustainability. In *Polymers* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/polym12071558>
- Rhim, J. W. (2007). Potential use of biopolymer-based nanocomposite films in food packaging applications. In *Food Science and Biotechnology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 691–709). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00003-4>
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Melo, N. R. de, & Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, *61*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
- Robertson, G. L. (2016). Packaging and food and beverage shelf life. In *The Stability and Shelf Life of Food* (pp. 77–106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00003-4>
- Salazar, R., Salas-Gomez, V., Alvarado, A. A., & Baykara, H. (2022). Preparation, Characterization and Evaluation of Antibacterial Properties of Polylactide-Polyethylene Glycol-Chitosan Active Composite Films. *Polymers*, *14*(11), 2266. <https://doi.org/10.3390/POLYM14112266>
- Sheikhi, Z., Hosseini, S. M., Khani, M. R., Farhoodi, M., Abdolmaleki, K., Shokri, B., Shojaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2021). Treatment of starch films with a glow discharge plasma in air and O<sub>2</sub> at low pressure. *Food Science and Technology International*, *27*(3), 276–285. <https://doi.org/10.1177/1082013220948641>
- Wrona, M., Silva, F., Salafranca, J., Nerín, C., Alfonso, M. J., & Caballero, M. Á. (2021). Design of new natural antioxidant active packaging: Screening flowsheet from pure essential oils and vegetable oils to ex vivo testing in meat samples. *Food Control*, *120*.
- Wu, X., Liu, Q., Luo, Y., Murad, M. S., Zhu, L., & Mu, G. (2020). Improved packing performance and structure-stability of casein edible films by dielectric barrier discharges (DBD) cold plasma. *Food Packaging and Shelf Life*, *24*(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.008>
- Xiang, Q., Liu, X., Li, J., Liu, S., Zhang, H., & Bai, Y. (2018). Effects of dielectric barrier discharge plasma on the inactivation of *Zygosaccharomyces rouxii* and quality of apple juice. *Food Chemistry*, *254*, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.008>

- Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., & Honermeier, B. (2016). Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Industrial Crops and Products*, *92*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.07.038>
- Zeid, A., Karabagias, I. K., Nassif, M., & Kontominas, M. G. (2019). Preparation and evaluation of antioxidant packaging films made of polylactic acid containing thyme, rosemary, and oregano essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(10), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14102>
- Zhang, L., Huang, C., Xu, Y., Huang, H., Zhao, H., Wang, J., & Wang, S. (2020). Synthesis and characterization of antibacterial polylactic acid film incorporated with cinnamaldehyde inclusions for fruit packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 4547–4555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.065>



## **ANEXOS**

## ANEXO A

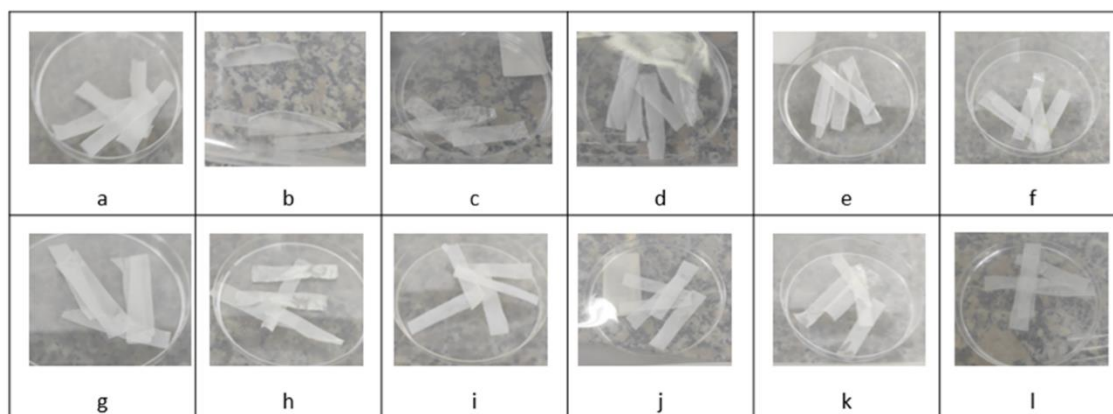


Figura 7.1. Fotografías de las películas de (a) PLA, (b) P-6.25, (c) P-12.5, (d) P-25, (e) P-CP-A, (f) P-6.25CP-A, (g) P-12.5CP-A, (h) P-25CP-A, (i) P-CP-N, (j) P-6.25CP-N, (k) P-12.5CP-N, (l) P-25CP-N

Fuente: Autor

## ANEXO B

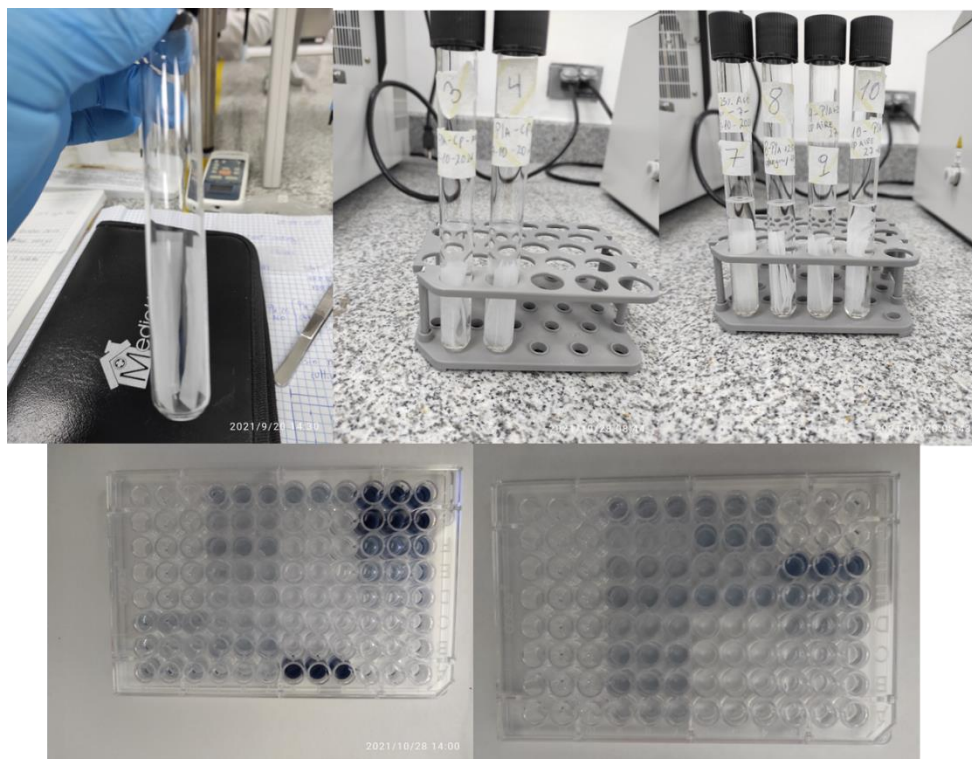


Figura 7.2. Preparación de muestras y ensayos de actividad antioxidante de fenoles totales

Fuente: Autor

## ANEXO C

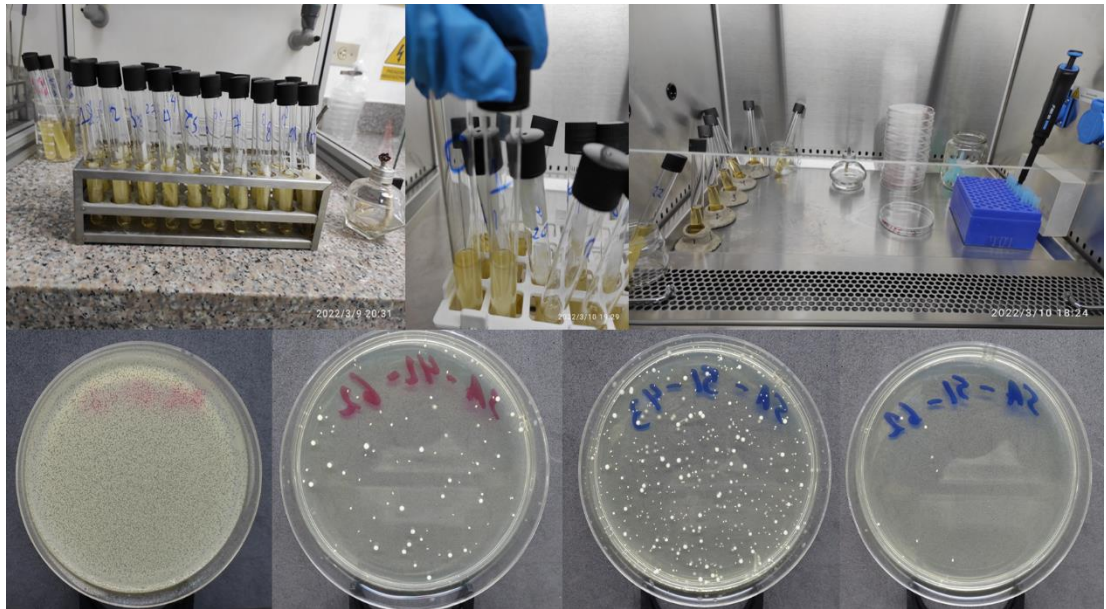


Figura 7.3. Ensayo de actividad antimicrobiana por método de difusión en caldo y muestras de inhibición bacteriana de películas con AEO y tratadas con plasma frío

Fuente: Autor