

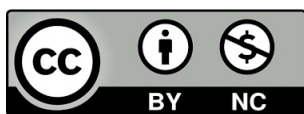
Nicolás Gracia Vallés

Síntesis y aplicación de
nanomateriales para el desarrollo
de envases activos antioxidantes y
antimicrobianos

Director/es

Almeida E Silva, Filomena Augusta
Michel Allal, Ahmed
Nerín De La Puerta, María Consolación Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE NANOMATERIALES
PARA EL DESARROLLO DE ENVASES ACTIVOS
ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANOS**

Autor

Nicolás Gracia Vallés

Director/es

Almeida E Silva, Filomena Augusta
Michel Allal, Ahmed
Nerín De La Puerta, María Consolación Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencia Analítica en Química

2023

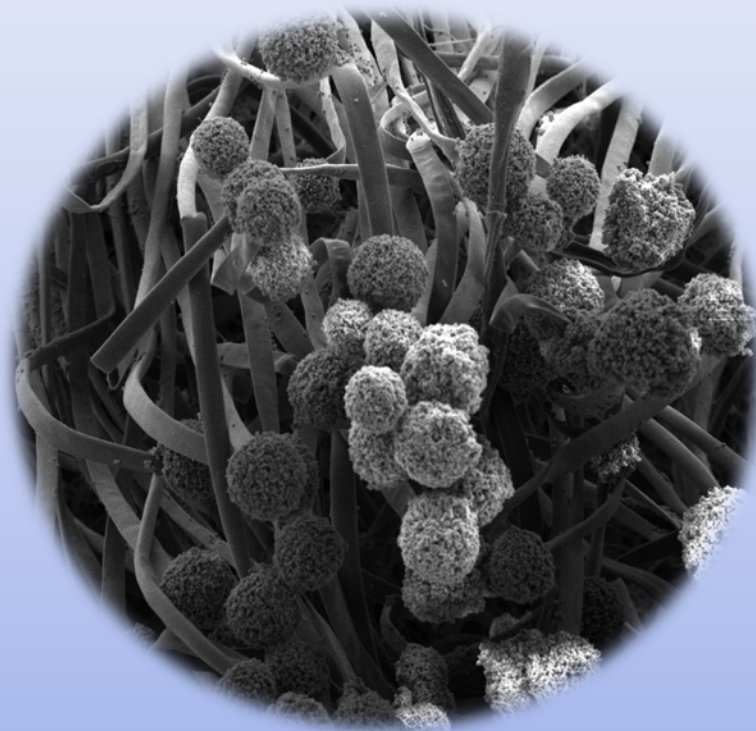


Universidad
Zaragoza



**SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE NANOMATERIALES
PARA EL DESARROLLO DE ENVASES ACTIVOS
ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANOS**

NICOLÁS GRACIA VALLÉS



Tesis Doctoral

Tesis Doctoral

Síntesis y aplicación de
nanomateriales para el desarrollo de
envases activos antioxidantes y
antimicrobianos

Autor

Nicolás Gracia
Vallés

Directores

Cristina Nerín de la Puerta

Ahmed Allal

Filomena Almeida e Silva

Esta tesis en cotutela entre la Universidad de Zaragoza y la Université de Pau et des Pays de l'Adour ha sido financiada por el Vicerrectorado de Política Científica de la Universidad de Zaragoza. A través de una convocatoria (PI-PRD/2019-002) de carácter estratégico dentro del Programa Propio de I+D+i de la Universidad de Zaragoza, por la que se ofertaron tres plazas de investigador predoctoral en formación mediante acuerdo entre la Universidad de Zaragoza y la Université de Pau et des Pays de L'Adour.

Y por el proyecto LMP49_18 "Envases activos para mejorar la seguridad alimentaria utilizando nanomateriales bifuncionales antimicrobianos y antioxidantes" del Gobierno de Aragón y financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea.

La **Dra. Cristina Nerín de La Puerta**, catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza; el **Dr. Ahmed Allal**, catedrático del Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux de la Université de Pau et des Pays de l'Adour y la **Dra. Filomena Almeida e Silva**, investigadora sénior de la Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y Desarrollo (ARAID) en la Facultad de Veterinaria e Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada: **“Síntesis y aplicación de nanomateriales para el desarrollo de envases activos antioxidantes y antimicrobianos”** presentada por **D. Nicolás Gracia Vallés** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra codirección en el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón de la Universidad de Zaragoza y el Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux de la Université de Pau et des Pays de l'Adour, de acuerdo con los objetivos presentados en el Proyecto de Tesis en cotutela aprobado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza. Por tanto, autorizamos su presentación para proseguir con los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

En Zaragoza y Pau, a 18 de septiembre de 2023

Dra. Cristina Nerín de la Puerta

Dr. Ahmed Allal

Dra. Filomena Almeida e Silva

Agradecimientos

Este es el final del camino, pero no ha sido un camino solitario. Quiero agradecerse a todas las personas que me han acompañado estos años.

A Cristina por acoger a un joven alumno de cuarto de biotecnología hace 7 años y guiarle durante su TFG, TFM y Tesis Doctoral. Siempre disponible para compartir su conocimiento y para luchar a mí favor cuando hacía falta. A Ahmed, por recibirme en Pau con los brazos abiertos y permitirme conocer esa maravillosa ciudad de la que me he enamorado.

A Filomena, gracias por todo, jefa. Si voy a ser doctor es gracias a ti, a nuestras charlas, a nuestros enfados, a nuestras risas y a nuestros infinitos correos de ida y vuelta buscando la versión perfecta de cualquier escrito. Bueno, y sin olvidarnos de esa capacidad mágica para entrar en el laboratorio justo cuando metía la pata en algo. La mejor jefa que se puede pedir para hacer el doctorado, y además una amiga.

A mis compis de micro, han sido muchos años y no podría haber pedido mejores compañeros y compañeras para hacer una tesis y, además, pasarlo muy bien durante todo el proceso. No creo que mucha gente pueda decir que haya ido con tantas ganas a trabajar como lo he hecho yo estos años. A pesar de que esta etapa ha acabado, solo me mudo al edificio de al lado, así que os seguiré visitando.

A Raquel, me guiaste en mis primeros pasos en el mundo de la investigación cuando todavía no sabía qué hacer con mi vida. Contigo aprendí a disfrutar de la microbiología alimentaria y que no todo sale a la primera. Nunca pensé que un TFG elegido a última hora sería la semilla que ha hecho todo esto posible, pero gracias a ti he acabado haciendo un doctorado.

A Silvia, el alma del laboratorio, sin ti todo esto no habría sido lo mismo, especialmente a la vuelta del confinamiento cuando sólo estábamos los dos. Siempre disponible para ayudar en lo que fuera y, lo más importante, para hacernos reír. Sin ti el laboratorio no es lo mismo y tu ausencia se notó mucho, como si el laboratorio hubiera perdido su alegría. Sigue llevando tu alegría siempre a donde vayas.

A David, mi amigo del palacio, han sido tres años compartiendo despacho y datos históricos (y quizás demasiado tiempo mirando títulos nobiliarios, o no el suficiente). Hemos vivido juntos los malos momentos de nuestras tesis, en los que nada salía bien y parecía que nos dábamos cabezazos contra un muro de ciclodextrina cristalizada, pero también muchos muy buenos, y hasta sobrevivimos a hacer rafting en Pau. Te echo de menos compartiendo despacho.

A Laura, la química renegada, ambos conocemos las grandes bondades de las tesis en cotutela. El infierno burocrático, las inexistentes ayudas y la desesperación a cada paso. Pero nada que no arregle una partida de Duels una tarde lluviosa en Pau. Me llevo de esta experiencia una amiga y una compañera de juegos de mesa. Seguiré haciendo visitas a micro para hablar.

A Fernando, fueron pocos meses, pero intensos. Las charlas de historia con David en el despacho, las partidas de GeoGuessr y las cervezas de los viernes. Fue una pena que te marcharas, pero valió la pena reencontrarnos después de biotecnología.

A todo el grupo GUIA, Pilar, Marga, Jorge, Celia, Esther, Paula, Jesús, Elena, Magda, Robert y Carlos por ser tan buena compañía todos estos años.

A Scott, por llevarme de la mano en mis primeros pasos en la síntesis química y animarme a aprender a utilizar el SEM. Siempre me gustó trabajar contigo en los inicios de mi tesis y, después, nuestras rápidas conversaciones cuando nos entrábamos por el campus. Ahora me has dado la oportunidad de seguir haciendo lo que me gusta, seguir investigando.

A Alba, mi gran apoyo en mi estancia en Pau. Conocerme fue lo mejor que me pasó allí, no sé cómo habría sobrevivido sin nuestros cafés y nuestras cervezas. Eres la razón por la que siempre me apetece volver a Pau.

A los "químicos", Alberto, Daniel, César, Raquel y Pablo. Porque abandoné química por biotecnología, pero me quedé con vosotros, los amigos que hice allí. Aunque los últimos años nos han separado geográficamente, cada vez que nos reunimos todo sigue igual. Y parece que al final, tras un largo camino, también voy a ser un químico.

A los Jilís, mis compañeros de aventuras. Dani, Carlos B., Alejandro P., Arturo, Alejandro E., Carlos C., Mikel, Borja y Alberto, llevamos juntos casi toda la vida. Durante estos años de mi tesis hemos vivido viajes, festivales, quedadas e infinitas risas y cervezas. ¡Y hasta tres bodas! No podría pedir mejores compañeros de vida y espero que sigamos pasando días enteros jugando a rol todos juntos.

A mi padre, Félix, que me contagió su amor por Francia en nuestros viajes. Fue la primera persona que me llevó a Pau hace muchos años y con el que conocí las calles y carreteras que luego recorrí solo muchos años después durante mi tesis. Gracias por acompañarme en las mudanzas y espero que hagamos muchos más viajes en busca de cassoulet y fromage al otro lado de los Pirineos.

A mi madre, María Pilar, que apoyó mi decisión de romper con la tradición familiar de estudiar derecho y que aguantó mi desastroso paso por química. Afortunadamente, en biotecnología todo mejoró y volvieron los aprobados que me han llevado a acabar siendo químico. Las vueltas que da la vida y siempre apoyándome. Sin ti nada de esto habría sido posible, nada. Habrá que ir a buscar algún béret un día.

A Brisa, llegaste a mi vida antes de empezar la tesis y me has acompañado durante todos estos años. Aguantando mis peores momentos y siempre dispuesta a hacer una broma que me hiciera reír. Tus visitas a Pau siempre fueron un soplo de aire fresco que necesitaba, además, teníamos que ir a ver nuestro château. Ya podemos olvidarnos de la tesis y disfrutar tranquilamente de nuestras series, nuestros juegos y, en definitiva, de nuestra vida.

El nombre que elegí es "El Doctor". El nombre que eliges es como una promesa que haces.

Undécimo Doctor

ÍNDICE

Lista de acrónimos	1
Lista de tablas	4
Lista de figuras	6
RESUMEN	10
SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN	26
INTRODUCCIÓN	28
1. Inseguridad alimentaria: deterioro y patogenicidad.	28
1.1 Microorganismos contaminantes de los alimentos	30
1.2 Oxidación de los alimentos	38
2. Envases activos alimentarios.....	40
2.1 Envases activos antioxidantes	43
2.2 Envases activos antimicrobianos	44
3. Agentes activos.....	46
3.1 Agentes activos antioxidantes	47
3.2 Agentes activos antimicrobianos	49
4. Técnicas de incorporación de los agentes activos al envase	51
5. Nuevas tendencias en el envase alimentario.....	55
5.1 Polímeros biodegradables para envasado alimentario	56
INTRODUCTION	60
1. Insécurité alimentaire : détérioration et pathogénicité.....	60
1.1 Microorganismes contaminant les denrées alimentaires.....	62
1.2 Oxydation des aliments	70
2. Emballage alimentaire actif.....	72
2.1 Emballages actifs antioxydants	75
2.2 Emballages actifs antimicrobiens	76
3. Agents actifs	78
3.1 Agents actifs antioxydants.....	79
3.2 Agents actifs antimicrobiens.....	81
4. Techniques d'incorporation d'agents actifs dans les emballages	83
5. Nouvelles tendances en matière d'emballage alimentaire	87
5.1 Polymères biodégradables pour l'emballage alimentaire	88
INTRODUCTION	92

1. Food insecurity: spoilage and pathogenicity.	92
1.1 Microorganisms contaminating foodstuffs	93
1.2 Oxidation of food	101
2. Active food packaging	103
2.1 Antioxidant active packaging	105
2.2 Antimicrobial active packaging	106
3. Active agents	108
3.1 Antioxidant active agents.....	109
3.2 Antimicrobial active agents.....	111
4. Techniques for incorporation of active agents into packaging.....	113
5. New trends in food packaging.....	117
5.1 Biodegradable polymers for food packaging	118
SECCIÓN II: OBJETIVOS	123
Objetivos	125
SECCIÓN III: DESARROLLO EXPERIMENTAL	127
CAPÍTULO 1	129
1. Introducción.....	130
2. Objetivos	133
3. Materiales y métodos	133
3.1 Materiales	133
3.2 Síntesis y caracterización de $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo)	134
3.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los POM de Mo.....	134
3.4 Preparación y aplicación del recubrimiento	135
3.5 Actividad de eliminación de radicales OH^{\bullet}	136
3.6 Envase antioxidante en melocotón de IV gama.....	138
3.6.1 Envasado del melocotón	138
3.6.2 Medición de color	139
3.6.3 Índice de pardeamiento.....	139
3.6.4 Determinación del pH.....	139
3.6.5 Acidez titulable	140
3.6.6 Sólidos solubles totales.....	140
3.7 Análisis de volátiles por SPME-GC-MS	140
3.8 Análisis estadístico	141
4. Resultados y discusión.....	142

4.1 Síntesis y caracterización de $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo)	142
4.2 Actividad antioxidante	143
4.3 Actividad eliminadora de radicales OH^{\bullet}	144
4.4 Envasado activo de melocotón de IV gama.....	146
4.4.1 Mediciones de color	146
4.4.2 Índice de pardeamiento.....	148
4.4.3 Acidez del melocotón y sólidos solubles totales.....	150
4.5 Volátiles de melocotón.....	153
5. Conclusión.....	155
CAPÍTULO 2	158
1. Introducción.....	159
2. Objetivos	162
3. Materiales y métodos.....	163
3.1 Materiales	163
3.2 Síntesis y caracterización	163
3.2.1 $\text{K}_8[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]$ (POM)	163
3.2.2 $\text{LAE}_7\text{K}[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]$ (POM-LAE).....	164
3.3 Concentración Micelar Crítica.....	164
3.4 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	165
3.5 Ensayos antimicrobianos <i>in vitro</i> del POM LAE.....	165
3.5.1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana POM-LAE	165
3.5.2 Actividad antimicrobiana del POM-LAE tras incubación.....	167
3.5.3 Ensayos de susceptibilidad de biofilms	167
3.6 Análisis del mecanismo de acción del POM-LAE por citometría de flujo	168
3.6.1 Exposición de las bacterias al POM-LAE	168
3.6.2 Protocolo de tinción.....	169
3.6.3 Citometría de flujo	170
3.7 Análisis del daño celular por microscopía electrónica de barrido.....	170
3.8 Caracterización de la granza de PLA	171
3.9 Extrusión de PLA con POM-LAE	171
3.10 Caracterización granza PLA-POM-LAE	172
3.10.1 DSC.....	172
3.10.2 TGA.....	172
3.11 Extrusión de soplado de los films de PLA-POM-LAE.....	172

3.12 Preparación de los films de carboximetilcelulosa (CMC)	173
3.13 Caracterización de los films de PLA-LAE y CMC-LAE.....	174
3.13.1 TGA.....	174
3.13.2 DSC.....	174
3.13.3 FTIR	174
3.13.4 Grosor	175
3.13.5 Grado de hinchamiento y solubilidad en agua	175
3.13.6 Contenido de humedad.....	175
3.14 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los films de PLA	175
3.14.1 Ensayo en medio solido	175
3.14.2 Ensayo en medio líquido	176
3.14.3 Ensayo de susceptibilidad de biofilms.....	177
3.15 Ensayos antimicrobianos <i>in vitro</i> de los films.....	177
3.16 Ensayos antimicrobianos <i>in vivo</i> de los films de CMC	178
3.17 Análisis estadístico.....	178
4. Resultados y discusión	179
4.1 Síntesis y caracterización del POM-LAE	179
4.2 Concentración micelar crítica.....	181
4.3 Actividad antimicrobiana del POM-LAE	182
4.3.1 Efecto de la potencial degradación del POM-LAE con la temperatura y su efecto en la actividad antimicrobiana.....	183
4.3.2 Actividad antibiofilm del POM-LAE	184
4.4 Daño celular por SEM.....	186
4.5 Citometría de flujo.....	187
4.6 Caracterización granza PLA y PLA-POM-LAE.....	189
4.7 Caracterización de los films de PLA-POM-LAE	191
4.8 Caracterización de los films de CMC-POM-LAE.....	193
4.9 Actividad antimicrobiana de films de CMC-POM-LAE contra <i>Listeria monocytogenes</i>	196
4.9.1 Actividad antilisteria <i>in vitro</i>	196
4.9.2 Ensayo de susceptibilidad de biofilms.....	197
4.10 Actividad antimicrobiana de films de CMC-POM-LAE contra <i>Listeria monocytogenes</i>	198
4.10.1 Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	198
4.10.2 Actividad antimicrobiana <i>in vivo</i>	200
5. Conclusión.....	202

CAPÍTULO 3	204
1. Introducción.....	205
2. Objetivos.....	211
3. Materiales y métodos.....	212
3.1 Materiales	212
3.2 Síntesis de nanoesponjas de ciclodextrina (CDNS)	212
3.3 Caracterización de CDNS	213
3.4 Actividad antifúngica de los COV	213
3.4.1 Cepas fúngicas y condiciones de crecimiento.....	213
3.4.2 Actividad antifúngica en fase vapor	213
3.5 Encapsulación de compuestos orgánicos volátiles en CDNS.....	215
3.6 Análisis preliminar de la actividad antifúngica de los encapsulados	216
3.7 Análisis de la encapsulación y liberación de COV en CDNS por GC-FID	217
3.7.1 Cuantificación de la encapsulación de los COV en α - y β -CDNS... ..	217
3.7.2. Análisis de la liberación de los COV encapsulados por GC-FID	218
3.8 Actividad antifúngica de los COV encapsulados en CDNS.....	219
3.8.1 Actividad antifúngica de los encapsulados	219
3.8.2 Actividad antifúngica de los encapsulados incorporados en bolsitas	219
3.9 Análisis del daño estructural por microscopía electrónica de barrido	220
3.10 Análisis estadístico.....	221
4. Resultados y discusión	221
4.1 Caracterización de las CDNS	221
4.2 Actividad antifúngica de los COV en fase vapor	222
4.3 Análisis preliminar de la actividad antifúngica de los encapsulados	224
4.4 Análisis de los encapsulados de COV	224
4.4.1 Extracción de los COV	224
4.4.2 Encapsulación de los COV.....	225
4.5 Análisis de liberación de los COV	228
4.6 Actividad antifúngica de los COV encapsulados.....	231
4.6.1 Actividad antifúngica de los encapsulados	231
4.6.2 Actividad antifúngica de los COV en bolsitas	234
4.7 Observación de daño celular por SEM	235
5. Conclusión.....	239
SECCIÓN IV: CONCLUSIONES.....	242

CONCLUSIONES.....	244
SECCIÓN V: REFERENCIAS	254
REFERENCIAS.....	256

Lista de acrónimos

BHI: brain heart infussion

CD: ciclodextrina

CDI: carbonil diimidazol

CDNS: nanoesponja de ciclodextrina

CMC: carboximetilcelulosa

COV: compuesto orgánico volátil

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DSC: calorimetría de barrido diferencial

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

F&V: frutas y verduras

FDA: Food and Drug Administration

FTIR-ATR: espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier - reflectancia total atenuada

GC-FID: cromatografía de gases acoplada a detector

GRAS: generalmente reconocido como seguro

AAI: índice de actividad antioxidante

IC₅₀: concentración que provoca un 50% de inhibición

IP: índice de pardeamiento

LAE: etil lauroil arginato

LDPE: polietileno de baja densidad

MBC: concentración mínima bactericida

MHA: Muller-Hinton Agar

MHB: Muller-Hinton Broth

MH-F: Muller Hinton líquido con ajuste de cationes suplementado con sangre de caballo lisada al 5%

MIC: concentración mínima inhibitoria

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: tampón fosfato salino

PET: polietileno de tereftalato

PLA: ácido poliláctico

POM: polioxometalato

POM-LAE: $\text{LAe}_7\text{KSiW}_{11}\text{O}_{39}$

POMo: $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)]_2\}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

PP: polipropileno

PVA: polivinil alcohol

ROS: especies reactivas de oxígeno

RTE: listo para el consumo

SDA: Saboraoud dextrose agar

SEM: microscopía electrónica de barrido

SPME-GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con microextracción en fase sólida

TGA: análisis termogravimétrico

UE: Unión Europea

UFC: unidades formadoras de colonias

XTT: 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro

Lista de tablas

- 31..... **Tabla 1.** Algunos microorganismos patógenos y toxinas alimentarias que provocan enfermedades alimentarias. Estimación del número de infecciones y muertes causadas.
- 32..... **Tabla 2.** Mohos contaminantes de frutas y verduras y las infecciones resultantes.
- 37..... **Tabla 3.** Principales microorganismos contaminantes de alimentos RTE y los brotes, enfermedades y muertes que causaron en la Unión Europea en 2021.
- 39..... **Tabla 4.** Principales compuestos que provocan la maduración y senescencia de F&V.
- 42..... **Tabla 5.** Ejemplos de envases activos alimentarios frente al etileno y la humedad.
- 44..... **Tabla 6.** Agentes activos antioxidantes en diferentes tipos de films para envases activos alimentarios.
- 45..... **Tabla 7.** Ejemplos de agentes antimicrobianos incorporados a diferentes polímeros para envase activo alimentario.
- 48..... **Tabla 8.** Categorías en las que se dividen los agentes activos antioxidantes. Se nombran varios ejemplos de agentes activos y su mecanismo.
- 50..... **Tabla 9.** Categorías en las que se dividen los agentes activos antimicrobianos. Se nombran varios ejemplos de agentes activos, algunos de los microorganismos susceptibles.
- 52..... **Tabla 10.** Ejemplos de films extruidos con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes para envase activo alimentario.
- 53..... **Tabla 11.** Ejemplos de films realizados por *casting* para envase activo alimentario con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes.
- 54..... **Tabla 12.** Ejemplos de materiales con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes realizados por recubrimiento para envase activo alimentario.
- 55..... **Tabla 13.** Ejemplos de agentes activos antimicrobianos y antioxidantes introducidos en bolsitas para envase activo alimentario.
- 56..... **Tabla 14.** Varios tipos de bioplásticos en los que se indica si son biobasados y si son biodegradables.
- 58..... **Tabla 15.** Ejemplos de envases activos antimicrobianos y antioxidantes utilizando films fabricados a partir de CMC.
- 144..... **Tabla 1.1.** Índice de Actividad Antioxidante (AAI) e IC₅₀ de POMo, Mo132 y Mo 154 frente a tres concentraciones diferentes de DPPH* (0,08, 0,12 y 0,20 mM).
- 160..... **Tabla 2.1.** Ejemplos de utilización del LAE como agente activo antimicrobiano en films de distintos materiales para envase activo alimentario.
- 183..... **Tabla 2.2.** MIC y MBC del LAE_{7K}[SiW₁₁O₃₉] (POM-LAE) y LAE, frente a *L. monocytogenes* CECT 911, *B. cereus* CECT 131, *E. coli* CECT 5947 y *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 expresado en µg/mL.
- 184..... **Tabla 2.3.** Actividad antimicrobiana, expresada como la MIC, del POM-LAE frente a *L. monocytogenes* a diferentes tiempos de incubación a 165 °C.
- 188..... **Tabla 2.4.** Porcentaje de células de *L. monocytogenes* CECT 911 y *E. coli* CECT 5947 tratadas con POM-LAE y teñidas con fluorocromos.

196..... **Tabla 2.5.** Propiedades físicas de los films control de CMC y de los films de CMC con un 5 % de POM-LAE.

201..... **Tabla 2.6.** Actividad antimicrobiana de los films de CMC con POM-LAE comparado con el film control de CMC, expresado como (log (UFC/g)).

211..... **Tabla 3.1.** Agentes activos antimicrobianos encapsulados en CDNS frente a distintos microorganismos patógenos.

223..... **Tabla 3.2.** Actividad antifúngica del diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, 2-nonanona y acetofenona frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*.

225..... **Tabla 3.3.** Áreas de las extracciones de los encapsulados de diacetilo y benzaldehído a distintos tiempos.

227..... **Tabla 3.4.** Resultados de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído tras los análisis realizados por GC-FID.

231..... **Tabla 3.5.** Actividad antifúngica de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*.

234..... **Tabla 3.6.** Cantidad de diacetilo y de benzaldehído (mg) libre y liberado de los encapsulados en las α - y β -CDNS que produjeron el 100% de inhibición

234..... **Tabla 3.7.** Actividad antifúngica de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído en bolsitas de PP frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*.

Lista de figuras

- 29..... **Figura 1.** Inseguridad alimentaria global en 2021.
- 47..... **Figura 2.** Algunos tipos de agentes activos clasificados en cuatro categorías en las que se pueden dividir los envases activos alimentarios.
- 132..... **Figura 1.1.** Representación del dímero $[\text{Na}\{(\text{Mo}_2\text{O}_4)_3(\text{O})_3(\text{SO}_3)_4\}_2]^{15-}$ base de la estructura del POMo. Mo: rombos marrones, S: bolas amarillas, O: bolas rojas, Na: bola blanca.
- 133..... **Figura 1.2.** Proceso de síntesis del recubrimiento de PVA-POMo y su aplicación en films de PLA como envase activo antioxidante para melocotón de IV gama.
- 136..... **Figura 1.3.** Bolsa termosellada de PLA con un recubrimiento de PVA-POMo en el interior. Las puntas de pipeta permiten el paso del flujo de radicales OH^\bullet por su interior.
- 137..... **Figura 1.4.** Reacción que tiene lugar durante el ensayo. La luz UV crea radicales OH^\bullet a partir de H_2O_2 , y estos reaccionan con el ácido salicílico creando 2,5-dihidroxibenzoico.
- 138..... **Figura 1.5.** Esquema del ensayo de la actividad de eliminación de OH^\bullet utilizando el recubrimiento de PVA-POMo en bolsas de PLA.
- 142..... **Figura 1.6.** FTIR-ATR del POMo indicando con flechas las principales vibraciones específicas del compuesto.
- 143..... **Figura 1.7.** TGA del POMo mostrando la pérdida de peso (%) y su derivada (%/°C) entre 20-800 °C.
- 146..... **Figura 1.8.** Porcentaje de hidroxilación de ácido salicílico tras 24 h de exposición de las bolas con recubrimiento de PVA-POMo a un flujo constante de radicales OH^\bullet .
- 148..... **Figura 1.9.** Evolución del color desde el día 0 al 12, expresado como ángulo de tonalidad, del envase de PVA-POMo para rodajas de melocotón sin lavar (A) y lavadas (B).
- 149..... **Figura 1.10.** Imágenes de las rodajas de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (C), y la evolución del índice de pardeamientos de las rodajas de melocotón, sin lavar (B) y lavadas (D), con el envase antioxidante de PVA-POMo 4 y 10 % y el control sin POMo, desde el día 0 al 12.
- 151..... **Figura 1.11.** Determinación del pH de las muestras de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo y el control de PVA.
- 152..... **Figura 1.12** Determinación de la acidez de las muestras de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo y el control de PVA.
- 154..... **Figura 1.13.** Determinación por GC-MS de los principales volátiles de las muestras de melocotón, lavadas (A) y sin lavar (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo.
- 161..... **Figura 2.1.** Estructura catiónica del etil lauroil arginato (LAE) que le puede permitir formar complejos con compuestos aniónicos.
- 163..... **Figura 2.2.** Proceso de síntesis de los films de CMC con POM-LAE, desde la síntesis inicial del complejo antimicrobiano hasta su incorporación al film de CMC.
- 171..... **Figura 2.3.** Perfil de temperatura de las diez secciones de la extrusora durante el proceso de extrusión de la granza de PLA junto al POM-LAE.

173..... **Figura 2.4.** Perfil de temperatura de las cuatro secciones de la extrusora donde se llevó a cabo el proceso de extrusión por soplado para obtener films de PLA-POM-LAE 5%.

174..... **Figura 2.5.** Film de CMC-POM-LAE 5 %.

180..... **Figura 2.6.** Comparación de los espectros de FTIR-ATR del LAE, POM y POM-LAE.

181..... **Figura 2.7.** TGA del POM-LAE mostrando la pérdida de masa entre 20-800 °C.

182..... **Figura 2.8.** Determinación de la concentración micelar crítica del LAE y del POM-LAE.

185..... **Figura 2.9.** Actividad antibiofilm del POM-LAE

187..... **Figura 2.10.** Imágenes de SEM de bacterias incubadas con POM-LAE: *L. monocytogenes* CECT 911 con 32 µg/mL (A) de POM-LAE y *E. coli* CECT 5947 con 64 µg/mL (B) de POM-LAE.

190..... **Figura 2.11.** Gráfica que representa el flujo de calor del PLA y PLA-POM-LAE

191..... **Figura 2.12.** A) TGA de la granza de PLA (PLE 005-A) B) TGA de la granza de PLA con un 5,5 % de POM-LAE.

192..... **Figura 2.13.** Proceso de extrusión por soplado de los films de PLA-POM-LAE 5

193..... **Figura 2.14.** TGA del film control de CMC (A) y del film de CMC con un 5 % de POM-LAE (B).

194..... **Figura 2.15.** Comparación de los espectros de FTIR-ATR del POM-LAE, films de CMC y films de CMC-POM-LAE 5 %.

197..... **Figura 2.16.** Actividad antimicrobiana de los films de PLA con POM-LAE 5 % frente a *L. monocytogenes* CECT 911 comparado con controles con (Film PLA) y sin film de PLA (Control).

198..... **Figura 2.17.** Actividad antibiofilm de los films de PLA con POM-LAE 5 % y films de PLA (Film control) frente a la formación de biofilm de *L. monocytogenes* CECT 911.

199..... **Figura 2.18.** Actividad antimicrobiana de los films de POM-LAE-CMC films con diferentes concentraciones de POM-LAE (0,1-10 %, m/m) frente a *L. monocytogenes*

201..... **Figura 2.19.** A) Proceso de preparación de la muestra para el ensayo in vivo. B) Actividad antimicrobiana de los films de CMC con POM-LAE (5 y 10 %) en jamón curado inoculado con *L. monocytogenes*

207..... **Figura 3.1.** Estructura del diacetilo (A), benzaldehído (B) y 2-etil-1-hexanol (C).

210..... **Figura 3.2.** Síntesis mecanoquímica de β-CDNS.

212..... **Figura 3.3.** Proceso de síntesis de la encapsulación de diacetilo en β-CDNS y desarrollo del prototipo del envase activo en una bolsita de polipropileno (PP).

215..... **Figura 3.4.** Ejemplo del ensayo de fase vapor del diacetilo frente *A. niger* antes de incubarlo a 25 °C durante 4 días.

220..... **Figura 3.5.** Ejemplo del ensayo de la actividad antifúngica de los encapsulados incorporados en bolsitas de PP.

222..... **Figura 3.6.** Comparación de los espectros de FTIR-ATR de α- y β-CDNS. Las flechas señalan el pico característico del enlace carbonilo descrito en el texto.

226..... **Figura 3.7.** A) Recta de calibración del diacetilo en disolución de metanol. B) Recta de calibración del benzaldehído en disolución de metanol.

229..... **Figura 3.8.** A) Recta de calibración del diacetilo en el espacio de cabeza del vial. B) Recta de calibración del benzaldehído en el espacio de cabeza del vial.

232..... **Figura 3.9.** Ensayo de actividad antifúngica de β -CDNS-diacetilo frente a *A. niger*.

236..... **Figura 3.10.** A y B) Imágenes de los controles de *A. niger*. C y D) Imágenes de *A. niger* bajo los efectos de 10 mg de β -CDNS-diacetilo.

237..... **Figura 3.11.** A y B) Imágenes de los controles de *P. expansum*. C) Imagen de *P. expansum* bajo los efectos de 5 mg de β -CDNS-diacetilo. D) Imagen de *P. expansum* bajo los efectos de 10 mg de β -CDNS-benzaldehído.

238..... **Figura 3.12.** A) Imagen del control de *B. cinerea*. B) Imagen de la muestra de *B. cinerea* expuesta a los 10 mg de β -CDNS-benzaldehído.

RESUMEN

La seguridad alimentaria es necesaria para que la población tenga acceso a alimentos seguros y en cantidad suficiente para cubrir sus necesidades nutricionales. Por ello, es necesario reducir las pérdidas y el deterioro de los alimentos producido por microorganismos y procesos de oxidación, así como las enfermedades alimentarias ocasionadas por microorganismos patógenos contaminantes y sus metabolitos. El envasado tradicional no es capaz de dar respuesta estos problemas, por ello es necesario el desarrollo de envases activos alimentarios. Éstos permiten alargar la vida útil de los alimentos gracias al uso de agentes activos, entre los cuales se destacan los antimicrobianos y los antioxidantes cuyos objetivos son reducir el crecimiento bacteriano y los procesos de oxidación, respectivamente. El desarrollo de estos nuevos envases, a día de hoy, debe partir de un principio de sostenibilidad que reduzca los niveles de contaminación ambiental producidos a nivel global por los envases de plástico. Por ello, se debe primar la utilización de materiales de envase compostables y/o biodegradables y respetuosos con el medio ambiente.

Con el objetivo de buscar nuevas soluciones de envase activo para reducir la pérdida y desperdicio de alimentos, a lo largo de esta tesis doctoral se ha explorado el uso de nuevos agentes activos antimicrobianos y antioxidantes basados en nanomateriales o moléculas nanoestructuradas para el desarrollo de nuevos envases activos alimentarios. Se ha investigado, por primera vez, el uso de polioxometalatos (POM) y nanoesponjas de ciclodextrina (CDNS) en la encapsulación de compuestos orgánicos volátiles (COV) para el desarrollo de envases activos utilizando, siempre que ha sido posible, materiales biodegradables y/o compostables, como el ácido poliláctico (PLA), el polivinil alcohol (PVA), la carboximetil celulosa (CMC) y las CDNS. Estos polímeros han sido la base para los envases antioxidantes que se han desarrollado a partir de POM de Mo para la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los antimicrobianos a partir de POM de W y las encapsulaciones de COV en CDNS para combatir los mohos contaminantes de alimentos.

Los procesos de oxidación ocasionados por las ROS en F&V provocan pardeamiento y ablandamiento frutas, permitiendo que sean fácilmente

infectadas por microorganismos, por lo que es necesario evitar estos procesos de oxidación, principalmente en frutas de IV gama, debido a las heridas mecánicas que sufren durante su procesado. Para intentar solucionar este problema derivado de la rápida oxidación de fruta de IV gama envasada, se estudió la utilización de POM de Mo reducidos como agente activo en el desarrollo de un envase activo antioxidante. En primer lugar, se sintetizó el POM reducido $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)]_2\}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo) que se utilizó para el desarrollo de un envase activo antioxidante para frutas de IV gama. El POMo obtuvo un índice de actividad antioxidante (AAI) muy fuerte en el ensayo de eliminación de radicales DPPH^{*} (AAI = 3,15). Posteriormente, se estudió su capacidad para captar radicales libres hidroxilo *in situ*, preparando un recubrimiento de PVA y POMo (4 y 10 %) que se extendió en films de PLA con los que se hicieron bolsas, a través de las cuales se hizo pasar un flujo de OH^{*} que reaccionaba, al salir de la bolsa, con una disolución de ácido salicílico formando 2,5-dihidroxibenzoico. El recubrimiento de PVA-POMo fue capaz de reducir la hidroxilación del ácido salicílico en un 39,1 % para PVA-POMo 4 % y en un 51,1 % para PVA-POMo 10 %. A continuación, se prepararon los envases antioxidantes pegando con un adhesivo un film de PLA (12x17 cm) recubierto con PVA-POMo 4 % y 10 % en bandejas compostables de caña de azúcar. En el interior de las bandejas se colocaron las rodajas de melocotón, con o sin tratamiento en un baño antioxidante. El envase antioxidante PVA-POMo 4 % fue el que mejor se comportó ya que fue capaz de mantener el color y retrasar el pardeamiento del melocotón sin baño antioxidante previo, sin afectar al proceso de maduración del melocotón. También se evaluó la producción de volátiles característicos del aroma del melocotón como la γ -dodecalactona, δ -decalactona o benzaldehído, que son críticos para la aceptación del consumidor y se observó que el PVA-POMo 4 % mantenía o mitigaba su disminución respecto al control y al PVA-POMo 10 %.

Otra de las categorías de alimentos envasados cuya seguridad alimentaria tiene especial relevancia son los alimentos listos para el consumo (RTE), ya que microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli* que se encuentran comúnmente en estos alimentos, son responsables de causar graves enfermedades en el caso de ingesta de alimentos contaminados. En este

caso, se desarrolló un envase activo con propiedades antimicrobianas, explorando la utilización de un complejo antimicrobiano entre un POM de W ($K_8[SiW_{11}O_{39}]$). y el conservante alimentario etil lauroil arginato (LAE). Este complejo se denominó POM-LAE y se utilizó para desarrollar un film activo antimicrobiano, para alimentos RTE, que mantuviese la actividad antimicrobiana en el tiempo ya que la formación de este complejo permitía superar la limitación del uso del LAE derivada de su pérdida brusca de actividad derivada de su rápida solubilidad acuosa, ya que el complejo POM-LAE es insoluble en agua. El POM-LAE demostró tener actividad antimicrobiana frente distintas bacterias patógenas alimentarias, especialmente frente a *L. monocytogenes*, con valores de MIC de 32 $\mu\text{g/mL}$ y de MBC de 128 $\mu\text{g/mL}$, mientras que frente a *E. coli* se obtuvieron valores de MIC de 64 $\mu\text{g/mL}$ y una MBC de 128 $\mu\text{g/mL}$. Estos ensayos de susceptibilidad antimicrobiana demostraron que las concentraciones de LAE necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano eran hasta dos veces menores en el complejo POM-LAE, en comparación con el LAE libre. El complejo POM-LAE presenta un mecanismo de acción en las células bacterianas similar al del LAE, afectando la membrana celular, como se comprobó por citometría de flujo y SEM. El POM-LAE también demostró actividad antibiofilm, tanto para inhibir la formación de biofilm como para eliminar el biofilm formado de *L. monocytogenes* y de *E. coli* a concentraciones de 32 $\mu\text{g/mL}$. Habiendo verificado que el complejo POM-LAE era más efectivo frente a *L. monocytogenes*, se desarrollaron films de CMC por *casting* y de PLA por extrusión con POM-LAE. Los films de PLA-POM-LAE 5 % no tuvieron actividad antimicrobiana *in vitro*, mientras que los films de CMC-POM-LAE 5 y 10 % consiguieron reducir la concentración bacteriana de *L. monocytogenes* 7 y 8 $\log(\text{UFC/mL})$, respectivamente. Finalmente, los films de CMC-POM-LAE 5 y 10 % fueron utilizados para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* como film separador entre lonchas de jamón curado. Ambos films de CMC-POM-LAE consiguieron evitar el crecimiento bacteriano durante los primeros días y mantener la población bacteriana por debajo de la del control durante el ensayo.

Además de las contaminaciones bacteriana, también las contaminaciones de alimentos por mohos causa graves pérdidas de alimentos debido a su ubiquidad y también el desarrollo de enfermedades resultantes de la ingesta de

micotoxinas. Así, es necesario el desarrollo de nuevos envases activos antifúngicos capaces de inhibir el crecimiento de los mohos en distintos tipos de alimentos. Para ello se encapsularon varios COV en CDNS para obtener una forma fácil y sencilla de incorporar compuesto líquidos volátiles en envase activo antimicrobiano y que permitiera una actividad sostenida en el tiempo. En primer lugar, se comprobó la actividad antifúngica de cinco COV: diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, acetofenona y 2-nonanona frente a varios mohos causantes de deterioro en alimentos. Se hicieron ensayos en fase vapor usando los COV frente a *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, siendo el diacetilo, el benzaldehído y el 2-etilhexanol los que fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de los tres mohos. A continuación, se procedió a encapsular estos tres COV en nanoesponjas de α -ciclodextrina (α -CDNS) y β -ciclodextrina (β -CDNS) para disminuir la volatilización de estos compuestos y generar un agente activo susceptible de ser más fácilmente incorporado a un envase. Los encapsulados de diacetilo (α - y β -CDNS-diacetilo) y benzaldehído (α - y β -CDNS-benzaldehído) fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de los mohos estudiados, a excepción de α -CDNS-benzaldehído frente a *A. niger*. Los COV encapsulados en β -CDNS demostraron ser más efectivos que los de α -CDNS, siendo el más eficaz el de diacetilo, ya que β -CDNS-diacetilo inhibió el crecimiento de los mohos con 10 mg (*P. expansum*) o 25 mg (*A. niger* y *B. cinerea*), mientras que β -CDNS-benzaldehído inhibió el crecimiento a 25 mg (*P. expansum* y *B. cinerea*) y 50 mg (*A. niger*). El SEM permitió observar que el daño estructural producido por los encapsulados de diacetilo y benzaldehído fue similar al descrito para otros compuestos volátiles como los aceites esenciales y se comprobó que tanto *A. niger* y *B. cinerea* eran susceptibles a cantidades subinhibitorias de encapsulados de β -CDNS-diacetilo y β -CDNS-benzaldehído, respectivamente. La mayor actividad de los encapsulados en β -CDNS se observa en la diferencia de liberación del diacetilo (36,2 mg/g α -CDNS y 42,2 mg/g β -CDNS) y del benzaldehído (40,9 mg/g α -CDNS y de 50,5 mg/g β -CDNS). Además, la eficiencia de encapsulación del diacetilo en β -CDNS fue del 13,9 % (137,9 mg/g) frente a la de α -CDNS que fue del 9,7 % (96,1 mg/g), mientras que la del benzaldehído en β -CDNS fue del 18,5% (192 mg/g) frente a la de α -CDNS que fue del 14,2 % (148 mg/g). Por último, se desarrolló un prototipo de bolsitas de polipropileno con los

encapsulados de diacetilo y benzaldehído en α - y β -CDNS en su interior para permitir la versatilidad y compatibilidad de estas formulaciones con distintos tipos de envases. La incorporación de los encapsulados en las bolsitas de PP no afectó la actividad antifúngica de estos, consiguiendo mantener la actividad antifúngica de los encapsulados frente a los tres mohos.

En conclusión, en esta tesis se evalúa la actividad antioxidante y antimicrobiana de nuevos compuestos para su utilización como agentes activos en envase activo alimentario, siendo capaces de ofrecer nuevas alternativas a la problemática del deterioro y pérdidas alimentarias. Para esta razón, se desarrollaron varios prototipos de envase activo que se probaron con éxito en alimentos susceptibles al deterioro oxidativo (melocotón) y a la contaminación por bacterias patógenas (jamón curado), junto con un nuevo antifúngico basado en la encapsulación de compuestos orgánicos volátiles que demostró gran eficacia frente a mohos y contaminantes de los alimentos que causan su deterioro.

RÉSUMÉ

La sécurité alimentaire est nécessaire pour garantir que les gens ont accès à des aliments sains en quantités suffisantes pour répondre à leurs besoins nutritionnels. Il est donc nécessaire de réduire les pertes et la détérioration des aliments causées par les microorganismes et les processus d'oxydation, ainsi que les maladies d'origine alimentaire causées par des microorganismes pathogènes contaminants et leurs métabolites. Les emballages traditionnels ne sont pas en mesure de résoudre ces problèmes, d'où la nécessité de développer des emballages alimentaires actifs. Ceux-ci permettent de prolonger la durée de conservation des aliments grâce à l'utilisation d'agents actifs, notamment des antimicrobiens ou des antioxydants qui réduisent respectivement la croissance bactérienne et les processus d'oxydation. Le développement de ce nouvel emballage doit être basé sur le principe de durabilité afin de réduire les niveaux de pollution causés au niveau mondial par les plastiques à usage unique. Par conséquent, l'utilisation de matériaux d'emballage biodégradables et respectueux de l'environnement doit être privilégiée.

Dans le but de rechercher de nouvelles solutions d'emballage pour réduire les pertes et les déchets alimentaires, l'utilisation de nouveaux agents actifs antimicrobiens et antioxydants basés sur des nanomatériaux ou des molécules nanostructurées a été explorée tout au long de cette thèse de doctorat pour le développement de nouveaux emballages alimentaires actifs. Pour la première fois, l'utilisation de polyoxométalates (POM) et de nanosponges de cyclodextrine (CDNS) dans l'encapsulation de composés organiques volatils (COV) a été étudiée pour le développement d'emballages actifs utilisant, dans la mesure du possible, des matériaux biodégradables et/ou compostables, tels que l'acide polylactique (PLA), l'alcool polyvinylique (PVA), la carboxyméthylcellulose (CMC) et les CDNS. Ces polymères ont été à la base d'emballages antioxydants développés à partir de Mo POM pour piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'emballages antimicrobiens à partir de W POM et d'encapsulations de COV dans des CDNS pour lutter contre les moisissures et les bactéries contaminant les aliments.

Les processus d'oxydation causés par les ROS dans les fruits et légumes provoquent le brunissement et le ramollissement des fruits, ce qui leur permet d'être facilement infectés par des microorganismes. Pour résoudre ce problème, l'utilisation de POM à teneur réduite en Mo a été étudiée. Tout d'abord, le POM réduit $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)]_2\}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo) a été synthétisé et utilisé pour le développement d'un emballage antioxydant actif pour les fruits fraîchement coupés. Le POMo a obtenu un indice d'activité antioxydante (AAI) très élevé dans l'essai de piégeage du radical DPPH^{*} (AAI = 3,15). Par la suite, sa capacité à piéger les radicaux libres hydroxyles *in situ* a été étudiée en préparant un revêtement de PVA et de POMo (4 et 10 %) qui a été étalé sur des films PLA et transformé en sacs, à travers lesquels un flux de OH^{*} est passé, réagissant avec une solution d'acide salicylique pour former de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque à la sortie du sac. Le revêtement PVA-POMo a permis de réduire l'hydroxylation de l'acide salicylique de 39,1 % pour le PVA-POMo 4 % et de 51,1 % pour le PVA-POMo 10 %. Un emballage antioxydant a ensuite été préparé en collant un film PLA (12x17 cm) recouvert de PVA-POMo 4 % et 10 % sur des plateaux de canne à sucre compostables à l'aide d'un adhésif. Des tranches de pêche, traitées ou non dans un bain antioxydant, ont été placées à

l'intérieur des barquettes. L'emballage PVA-POMo 4 % antioxydant s'est avéré le plus performant, car il a permis de conserver la couleur et de retarder le brunissement des pêches sans bain antioxydant préalable, sans affecter le processus de maturation des pêches. La production de composés volatils caractéristiques de l'arôme de la pêche, tels que la γ -dodécalactone, la δ -décalactone ou le benzaldéhyde, qui sont essentiels à l'acceptation par le consommateur, a également été évaluée et il a été observé que le PVA-POMo 4 % maintenait ou atténuait leur diminution par rapport au témoin et au PVA-POMo 10 %.

Les microorganismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* ou *Escherichia coli* sont responsables de maladies graves en cas de consommation d'aliments contaminés, ce qui constitue un problème majeur dans les aliments prêts à consommer. C'est pourquoi l'utilisation d'un complexe antimicrobien entre un POM W et l'arginate d'éthyle lauroyl LAE a été étudiée. Le POM utilisé pour synthétiser le complexe avec le LAE était $K_8[SiW_{11}O_{39}]$. Ce complexe a été baptisé POM-LAE et a été utilisé pour développer un film actif antimicrobien pour les aliments prêts à consommer, qui maintiendrait l'activité antimicrobienne au fil du temps, car il surmontait la limite de l'insolubilité du LAE. Le POM-LAE a montré une activité antimicrobienne contre différentes bactéries pathogènes alimentaires, en particulier contre *L. monocytogenes*, avec des valeurs MIC de 32 $\mu\text{g/mL}$ et MBC de 128 $\mu\text{g/mL}$, tandis que des valeurs MIC de 64 $\mu\text{g/mL}$ et MBC de 128 $\mu\text{g/mL}$ ont été obtenues contre *E. coli*. Ces tests de sensibilité antimicrobienne ont montré que les concentrations de LAE nécessaires pour inhiber la croissance bactérienne étaient jusqu'à deux fois plus faibles dans le complexe POM-LAE que dans le LAE libre. En outre, le mécanisme d'action affecte la membrane cellulaire de la même manière que les LAE, comme l'ont vérifié la cytométrie de flux et le MEB. Les POM-LAE ont également démontré leur capacité à inhiber la formation de biofilms et à éliminer les biofilms formés par *L. monocytogenes* et *E. coli* à des concentrations de 32 $\mu\text{g/mL}$. Par la suite, des films de CMC ont été développés par *coulée* et des films de PLA par extrusion avec du POM-LAE. Les films PLA-POM-LAE à 5 % n'avaient aucune activité antimicrobienne *in vitro*, tandis que les films CMC-POM-LAE à 5 et 10 % étaient capables de réduire la concentration bactérienne de *L. monocytogenes* de 7 et 8

log(CFU/mL), respectivement. Enfin, les films CMC-POM-LAE à 5 et 10 % ont été utilisés pour contrôler la croissance de *L. monocytogenes* en tant que film de séparation entre les tranches de jambon séché. Les deux films CMC-POM-LAE ont réussi à empêcher la croissance bactérienne pendant les premiers jours et à maintenir la population bactérienne en dessous de celle du contrôle pendant l'essai.

Les moisissures causent de graves pertes alimentaires en raison de leur omniprésence. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux emballages actifs antifongiques capables d'inhiber la croissance des moisissures. À cette fin, plusieurs COV ont été encapsulés dans des CDNS afin d'obtenir des composés antifongiques ayant une activité soutenue dans le temps. Tout d'abord, l'activité antifongique de cinq COV: diacétyle, benzaldéhyde, 2-éthylhexanol, acétophénone et 2-nonanone a été testée contre les moisissures de détérioration des aliments. Des tests en phase vapeur ont été réalisés avec les COV contre *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*, le diacétyle, le benzaldéhyde et le 2-éthylhexanol étant capables d'inhiber complètement la croissance de ces trois moisissures. Les COV ont ensuite été encapsulés dans des nano-éponges d' α -cyclodextrine (α -CDNS) et de β -cyclodextrine (β -CDNS) afin de réduire la volatilisation de ces composés et de générer un agent actif qui pourrait être plus facilement incorporé dans un contenant. Les encapsulations de diacétyle (α - et β -CDNS-diacétyle) et de benzaldéhyde (α - et β -CDNS-benzaldéhyde) ont permis d'inhiber complètement la croissance des moisissures étudiées, à l'exception de l' α -CDNS-benzaldéhyde contre *A. niger*. Les COV encapsulés dans les β -CDNS se sont révélés plus efficaces que ceux contenus dans les α -CDNS, le diacétyle étant le plus efficace, puisque le β -CDNS-diacétyle a inhibé la croissance des moisissures à 10 mg (*P. expansum*) ou 25 mg (*A. niger* et *B. cinerea*), tandis que le β -CDNS-benzaldéhyde a inhibé la croissance à 25 mg (*P. expansum* et *B. cinerea*) et à 50 mg (*A. niger*). Le MEB a montré que les dommages structurels produits par les encapsulés de diacétyle et de benzaldéhyde étaient similaires à ceux des huiles essentielles et que *A. niger* et *B. cinerea* étaient sensibles à des quantités sub-inhibitrices de β -CDNS-diacétyle et de β -CDNS-benzaldéhyde, respectivement. L'activité supérieure des encapsulés de β -CDNS est observée dans la différence de libération de diacétyle

(36,2 mg/g α -CDNS et 42,2 mg/g β -CDNS) et de benzaldéhyde (40,9 mg/g α -CDNS et 50,5 mg/g β -CDNS). De plus, l'efficacité d'encapsulation du diacétyle dans le β -CDNS était de 13,9 % (137,9 mg/g) par rapport à celle de l' α -CDNS qui était de 9,7 % (96,1 mg/g), alors que celle du benzaldéhyde dans le β -CDNS était de 18,5 % (192 mg/g) par rapport à celle de l' α -CDNS qui était de 14,2 % (148 mg/g). Enfin, un prototype de sachets en polypropylène a été développé avec le diacétyle et le benzaldéhyde encapsulés dans l' α - et le β -CDNS à l'intérieur, maintenant l'activité antifongique contre les trois moisissures.

En conclusion, cette thèse évalue l'activité antioxydante et antimicrobienne de nouveaux composés destinés à être utilisés comme agents actifs dans les emballages alimentaires. Plusieurs prototypes d'emballages actifs ont été développés et testés sur des aliments (pêche et jambon cru) et contre des moisissures et des bactéries contaminant les aliments qui causent des altérations alimentaires ou des maladies chez les consommateurs.

SUMMARY

Food safety is necessary to ensure that people have access to safe food in sufficient quantities to meet their nutritional needs. Therefore, it is necessary to reduce food losses and spoilage caused by microorganisms and oxidation processes, as well as foodborne diseases caused by contaminating pathogenic microorganisms and their metabolites. Traditional packaging is not able to address these problems, therefore the development of active food packaging is necessary. These allow the shelf life of food to be extended thanks to the use of active agents, among which antimicrobials and antioxidants whose objectives are to reduce bacterial growth and oxidation processes, respectively, stand out. The development of this new packaging must be based on the principle of sustainability to reduce the levels of environmental pollution produced globally by plastic packaging. Therefore, priority should be given to the use of compostable and/or biodegradable and environmentally friendly packaging materials.

With the aim of searching for new active packaging solutions to reduce food loss and waste, the use of new antimicrobial and antioxidant active agents based on

nanomaterials or nanostructured molecules for the development of new active food packaging has been explored throughout this PhD thesis. For the first time, the use of polyoxometalates (POM) and cyclodextrin nanosponges (CDNS) in the encapsulation of volatile organic compounds (VOCs) has been investigated for the development of active packaging using, whenever possible, biodegradable and/or compostable materials, such as polylactic acid (PLA), polyvinyl alcohol (PVA), carboxymethyl cellulose (CMC) and CDNS. These polymers have been the basis for antioxidant packaging developed from Mo POM for reactive oxygen species (ROS) scavenging and antimicrobial packaging from W POM and VOC encapsulations in CDNS to combat food contaminating moulds.

The oxidation processes caused by ROS in F&V cause browning and softening of fruits, allowing them to be easily infected by microorganisms, so it is necessary to avoid these oxidation processes, mainly in fresh-cut fruits, due to the mechanical injuries they suffer during processing. In order to try to solve this problem derived from the rapid oxidation of packaged fresh-cut fruit, the use of reduced Mo POM as an active agent in the development of an antioxidant active packaging was studied. First, reduced POM $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo) was synthesised and used for the development of an antioxidant active packaging for fresh-cut fruits. POMo obtained a very strong antioxidant activity index (AAI) in the DPPH^{*} radical scavenging assay (AAI = 3.15). Subsequently, its ability to scavenge hydroxyl free radicals *in situ* was studied by preparing a coating of PVA and POMo (4 and 10 %) which was spread on PLA films and made into bags, through which a flow of OH^{*} was passed, reacting with a solution of salicylic acid to form 2,5-dihydroxybenzoic acid on leaving the bag. The PVA-POMo coating was able to reduce the hydroxylation of salicylic acid by 39.1 % for PVA-POMo 4 % and 51.1 % for PVA-POMo 10 %. Antioxidant packaging was then prepared by gluing a PLA film (12x17 cm) coated with 4 % and 10 % PVA-POMo to compostable sugar cane trays with an adhesive. Peach slices, with or without treatment in an antioxidant bath, were placed inside the trays. The PVA-POMo 4 % antioxidant package was the best performer as it was able to maintain the colour and delay the browning of the peach without prior antioxidant bath, without affecting the peach ripening process. The production of volatile compounds characteristic of peach aroma such as γ -dodecalactone, δ -

decalactone or benzaldehyde, which are critical for consumer acceptance, was also evaluated, and it was observed that PVA-POMo 4 % maintained or mitigated their decrease with respect to the control and PVA-POMo 10 %.

Another category of packaged foods whose food safety is of particular relevance are ready-to-eat (RTE) foods, as pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* or *Escherichia coli* commonly found in these foods are responsible for causing serious illnesses in the case of ingestion of contaminated food. In this case, an active packaging with antimicrobial properties was developed by exploring the use of an antimicrobial complex between a W POM ($K_8[SiW_{11}O_{39}]$) and the food preservative ethyl lauroyl arginate (LAE). This complex was named POM-LAE and was used to develop an antimicrobial active film, for RTE foods, that would maintain antimicrobial activity over time as the formation of this complex overcame the limitation of LAE use arising from its abrupt loss of activity due to its rapid aqueous solubility, as the POM-LAE complex is insoluble in water. POM-LAE showed antimicrobial activity against different food pathogenic bacteria, especially against *L. monocytogenes*, with MIC values of 32 $\mu\text{g/mL}$ and MBC of 128 $\mu\text{g/mL}$, while MIC values of 64 $\mu\text{g/mL}$ and MBC of 128 $\mu\text{g/mL}$ were obtained against *E. coli*. These antimicrobial susceptibility tests showed that the concentrations of LAE required to inhibit bacterial growth were up to two times lower in the POM-LAE complex compared to free LAE. The POM-LAE complex exhibits a mechanism of action on bacterial cells similar to that of LAE, affecting the cell membrane, as demonstrated by flow cytometry and SEM. POM-LAE also demonstrated antibiofilm activity, both to inhibit biofilm formation and to eliminate biofilm formed by *L. monocytogenes* and *E. coli* at concentrations of 32 $\mu\text{g/mL}$. Having verified that the POM-LAE complex was more effective against *L. monocytogenes*, CMC films were developed by *casting* and PLA films by extrusion with POM-LAE. The 5% PLA-POM-LAE films had no *in vitro* antimicrobial activity, while the 5% and 10% CMC-POM-LAE films were able to reduce the bacterial concentration of *L. monocytogenes* by 7 and 8 log(CFU/mL), respectively. Finally, CMC-POM-LAE 5 and 10 % films were used to control the growth of *L. monocytogenes* as a separating film between slices of cured ham. Both CMC-POM-LAE films managed to prevent bacterial growth

during the first days and to keep the bacterial population below that of the control during the trial.

In addition to bacterial contaminations, also food contaminations by moulds cause serious food losses due to their ubiquity and also the development of diseases resulting from the ingestion of mycotoxins. Thus, the development of new antifungal active packages capable of inhibiting the growth of moulds in different types of foodstuffs is necessary. To this end, several VOCs were encapsulated in CDNS to obtain an easy and simple way to incorporate volatile liquid compounds into antimicrobial active packaging and to allow sustained activity over time. First, the antifungal activity of five VOCs: diacetyl, benzaldehyde, 2-ethylhexanol, acetophenone and 2-nonanone was tested against various food spoilage moulds. Vapour phase tests were performed using the VOCs against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*, with diacetyl, benzaldehyde and 2-ethylhexanol being able to completely inhibit the growth of all three moulds. These three VOCs were then encapsulated in α -cyclodextrin (α -CDNS) and β -cyclodextrin (β -CDNS) nanosponges to decrease the volatilisation of these compounds and generate an active agent that could be more easily incorporated into a container. The diacetyl (α - and β -CDNS-diacetyl) and benzaldehyde (α - and β -CDNS-benzaldehyde) encapsulations were able to completely inhibit the growth of the moulds studied, with the exception of α -CDNS-benzaldehyde against *A. niger*. The VOCs encapsulated in β -CDNS proved to be more effective than those in α -CDNS, with diacetyl being the most effective, as β -CDNS-diacetyl inhibited mould growth at 10 mg (*P. expansum*) or 25 mg (*A. niger* and *B. cinerea*), while β -CDNS-benzaldehyde inhibited growth at 25 mg (*P. expansum* and *B. cinerea*) and 50 mg (*A. niger*). SEM showed that the structural damage produced by diacetyl and benzaldehyde encapsulates was similar to that described for other volatile compounds such as essential oils and both *A. niger* and *B. cinerea* were found to be susceptible to sub-inhibitory amounts of β -CDNS-diacetyl and β -CDNS-benzaldehyde encapsulates, respectively. The higher activity of β -CDNS encapsulates is observed in the difference of release of diacetyl (36.2 mg/g $_{\alpha$ -CDNS and 42.2 mg/g $_{\beta$ -CDNS) and benzaldehyde (40.9 mg/g $_{\alpha$ -CDNS and 50.5 mg/g $_{\beta$ -CDNS). Furthermore, the encapsulation efficiency of diacetyl in β -CDNS was 13.9 % (137.9 mg/g)

compared to that of α -CDNS which was 9.7 % (96.1 mg/g), while that of benzaldehyde in β -CDNS was 18.5 % (192 mg/g) compared to that of α -CDNS which was 14.2 % (148 mg/g). Finally, a prototype polypropylene sachet was developed with the α - and β -CDNS encapsulations of diacetyl and benzaldehyde inside to allow for versatility and compatibility of these formulations with different types of packaging. The incorporation of the encapsulates in the PP sachets did not affect the antifungal activity of the encapsulates, maintaining the antifungal activity of the encapsulates against the three moulds.

In conclusion, this thesis evaluates the antioxidant and antimicrobial activity of new compounds for their use as active agents in active food packaging, being able to offer new alternatives to the problem of food spoilage and losses. For this reason, several active packaging prototypes were developed and successfully tested in foods susceptible to oxidative spoilage (peach) and contamination by pathogenic bacteria (cured ham), together with a new antifungal based on the encapsulation of volatile organic compounds that showed great efficacy against moulds and food contaminants that cause food spoilage.

Estructura general de la Tesis Doctoral

SECCIÓN I: Introducción

SECCIÓN II: Objetivos

SECCIÓN III: Desarrollo experimental

Envase Activo
Antioxidante

Envase Activo
Antimicrobiano

Capítulo 1:
Desarrollo de un envase activo
antioxidante para fruta de IV
gama basado en un
polioxomolibdato

Capítulo 2:
Síntesis de un complejo
antimicrobiano de etil lauroil
arginato y desarrollo de films
antimicrobianos para jamón curado

Capítulo 3:
Encapsulación de compuestos
orgánicos volátiles en nanoesponjas
de ciclodextrina para combatir
mohos alimentarios contaminantes

SECCIÓN IV: Conclusiones

SECCIÓN V: Bibliografía

SECCIÓN I: INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN (español)

1. Inseguridad alimentaria: deterioro y patogenicidad	28
2. Envases activos alimentarios	40
3. Agentes activos	46
4. Técnicas de incorporación de los agentes activos al envase	51
5. Nuevas tendencias en el envase alimentario	55

INTRODUCTION (français)

1. Insécurité alimentaire : détérioration et pathogénicité	60
2. Emballage alimentaire actif	72
3. Agents actifs	78
4. Techniques d'incorporation d'agents actifs dans les emballages	83
5. Nouvelles tendances en matière d'emballage alimentaire	87

INTRODUCTION (english)

1. Food insecurity: spoilage and pathogenicity	92
2. Active food packaging	103
3. Active agents	108
4. Techniques for incorporation of active agents into packaging	113
5. New trends in food packaging	117

INTRODUCCIÓN

1. Inseguridad alimentaria: deterioro y patogenicidad.

Los alimentos están expuestos a sufrir deterioro por causas físicas, químicas y biológicas, lo que afecta a su calidad y a la seguridad alimentaria de la población. Por ello, garantizar la seguridad alimentaria es un objetivo vital para asegurar que todas las personas tienen acceso físico y económico a alimentos seguros y nutritivos (FAO, 2019). Si esto no se cumple, se produce la inseguridad alimentaria que ocasiona, entre otras cosas, grandes pérdidas y desperdicio de alimentos. Por ello, es necesario diferenciar entre pérdida y desperdicio de alimentos, pues ocurren en etapas distintas. La pérdida de alimentos que, en la actualidad, supone un 14 % de todos los alimentos producidos a nivel global (FAO, 2019) tiene lugar en la postcosecha o mataderos, así como durante el procesado y almacenamiento hasta su venta al consumidor. Por otro lado, el desperdicio de alimentos ocurre en los hogares, servicios de comida y venta minorista, y se estima en 100 kg/persona/año, lo que corresponde a un 17% de la producción alimentaria mundial (UNEP, 2021). Esto provoca que millones de personas sufran enfermedades, desnutrición o hambrunas que pueden causar una muerte prematura. Por ejemplo, según los últimos datos disponibles de la FAO, en 2021, alrededor de 2300 millones de personas en el mundo padecían inseguridad alimentaria moderada o grave (Figura 1). África es el continente con mayor inseguridad alimentaria, donde el 58 % de su población sufre inseguridad alimentaria moderada o severa. En el otro extremo, se encuentran Europa y Norteamérica, donde la inseguridad alimentaria afecta sólo al 8 % de la población (FAO, 2022).

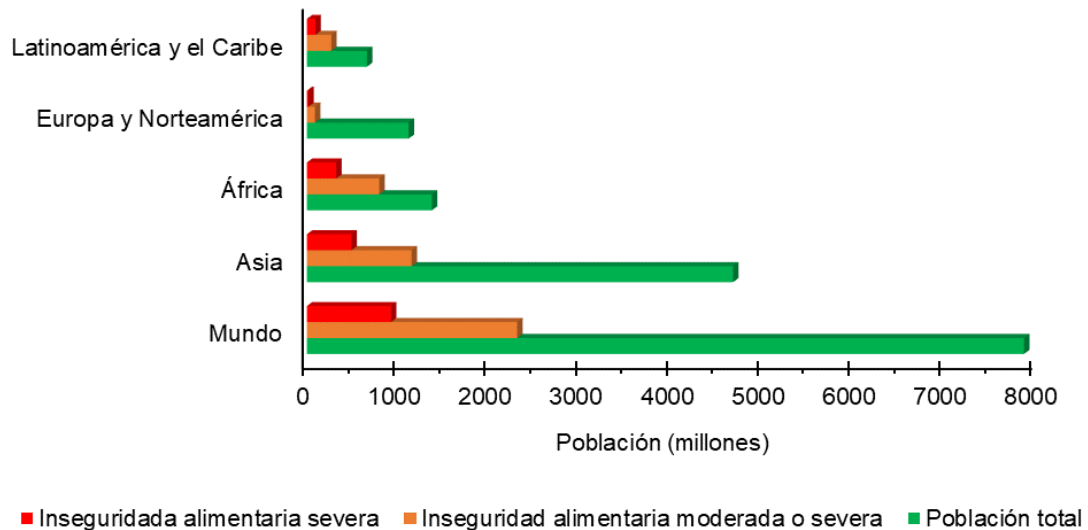


Figura 1. Inseguridad alimentaria global en 2021 (FAO, 2022).

Un factor importante dentro de la seguridad alimentaria es el consumo de frutas y verduras (F&V), ya que son una importante fuente de nutrientes. Según la FAO, un consumo de F&V de 400 g/día podría evitar hasta 4 millones de muertes prematuras en el mundo asociadas, a día de hoy, a su falta de consumo (FAO, 2021). Para solucionar esta situación, es necesario reducir las pérdidas y el desperdicio de F&V ampliando su vida útil, ya que son altamente perecederas debido a tres causas principales: la maduración precoz (Pech et al., 2012), la presencia de mohos y bacterias contaminantes (Giannakourou & Tsironi, 2021; Moss, 2008) y las heridas mecánicas causadas durante el procesado (Yousuf et al., 2017). Se estima que aproximadamente un tercio de las F&V se pierde antes de llegar a los consumidores (Ahmad & Siddiqui, 2015). Esto implica que la reducción de las pérdidas postcosecha y el desperdicio de F&V ayudaría a aumentar su consumo y contribuir para una posible reducción de los problemas de salud asociados a su falta de consumo.

Otro factor importante dentro de la seguridad alimentaria son los microorganismos causantes de enfermedades alimentarias, ya que según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la carga mundial anual de enfermedades transmitidas por los alimentos supera los 600 millones de casos, con casi 420.000 muertes y 33 millones de años de vida perdidos (WHO, 2015). Estos microorganismos patogénicos son especialmente peligrosos

en los alimentos listos para el consumo (RTE, del inglés *ready to eat*), ya que este tipo de alimentos no recibe ningún tratamiento térmico previo al consumo que pueda eliminar los microorganismos contaminantes patógenos como bacterias, mohos, parásitos o las toxinas producidas por éstos. La ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o sus toxinas es la principal causa del alto número de muertes antes mencionado (WHO, 2015). Es por esta razón que la inocuidad de los alimentos es un asunto de máxima relevancia en la salud pública, garantizando que los alimentos que se consuman sean seguros en un mundo cuya población sigue creciendo.

1.1 Microorganismos contaminantes de los alimentos

Como se ha mencionado anteriormente, las contaminaciones por microorganismos, como mohos y bacterias, juegan un papel muy importante en la seguridad alimentaria, especialmente en el caso de F&V y alimentos RTE, ya que suponen un gran riesgo para la salud humana, en el caso de microorganismo patógenos y productores de toxinas (Tabla 1), y ocasionan grandes pérdidas y desperdicio de alimentos, en el caso de microorganismos causantes de deterioro (Sperber & Doyle, 2009). Estas contaminaciones se pueden producir en cualquier momento de la cosecha o postcosecha, como la producción, almacenamiento o distribución del alimento, siendo muy difíciles de eliminar una vez producidas.

Tabla 1. Algunos microorganismos patógenos y toxinas alimentarias que provocan enfermedades alimentarias. Estimación del número de infecciones y muertes causadas en 2010 según la OMS. Adaptado de WHO, 2015.

Peligro	Enfermedad	Nº infecciones alimentarias	Nº muertes
Virus			
Hepatitis A (VHA)	Hepatitis	13 709 836	27 731
Norovirus	Gastroenteritis	124 803 946	34 929
Bacterias			
<i>Campylobacter</i> spp	Gastroenteritis	95 613 970	21 374
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	Gastroenteritis	86 502 735	26 170
<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica	Gastroenteritis/Síndrome hemolítico urémico	1 176 854	128
<i>Salmonella enterica</i> no tifoidea	Salmonelosis	78 707 591	59 153
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	763 451	24 649
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	14 169	3 175
Protozoos			
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	10 280 089	684
Cestodos			
<i>Taenia solium</i>	Teniasis	370 710	28 114
Toxinas			
Aflatoxina	Aflatoxicosis	21 757	19 455

1.1.1 Mohos

En las F&V, los mohos son los microorganismos que más intervienen en su deterioro (Tabla 2). Los mohos crecen en la superficie de F&V, ya que estas son ricas en carbohidratos y otros nutrientes que las convierten en un perfecto medio de cultivo para su crecimiento, siendo algunos de los más comunes *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Botrytis* spp. La contaminación de las F&V con mohos ocasiona grandes pérdidas, tanto precosecha como postcosecha, provocando la pérdida y el desperdicio de estos alimentos en hogares y comercios (Alegbeleye et al., 2022). Además, el consumo de alimentos contaminados con mohos puede derivar en intoxicaciones alimentarias graves ya que algunos de ellos producen toxinas peligrosas para el ser humano o para las F&V, designadas micotoxinas, como en los casos de los géneros *Aspergillus* spp. (ocratoxina A) o *Penicillium* spp. (patulina) (Moss, 2008).

Tabla 2. Mohos contaminantes de frutas y verduras y las infecciones resultantes. Adaptado de Alegbeleye et al., 2022.

Moho	Infección	Frutas o verduras afectadas
<i>Botrytis cinerea</i>	Podredumbre gris	Fresa, kiwi, uvas, pera, melocotón, cereza, ciruela, otras frutas ricas en pectina, lechuga, legumbres, espárrago, calabaza, crucíferas de hoja
<i>Aspergillus niger</i>	Moho negro	Uva, albaricoque, cebolla, cacahuete, cítricos, manzana, pera, fresa
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Podredumbre negra	Cebolla y ajo
<i>Penicillium expansum</i>	Moho azul	Pera, manzana y frutas ricas en pectina
<i>Penicillium italicum</i>	Podredumbre azul	Cítricos
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Podredumbre blanda	Frambuesas, moras, patata, repollo
<i>Alternaria tenuis</i>	Podredumbre de Alternaria	Cucurbitáceas, tomate, pimiento
<i>Fusarium</i> spp.	Podredumbre parda	Patata, cítricos, piña

De entre las especies de *Aspergillus*, *A. niger* es con diferencia la mayor responsable del deterioro y pérdida de alimentos, ya que puede contaminar las F&V en diferentes estadios incluyendo la precosecha, cosecha, procesado o manipulación (Perrone et al., 2007). *A. niger* se caracteriza por ser el causante del moho negro que aparece en la superficie de F&V y contamina principalmente fruta fresca, incluyendo melocotones, manzanas y tomates, pero también cereales y algunos vegetales. Este moho tiene una distribución global siendo más habitual encontrarlo en climas templados, tanto en la superficie de los cultivos como en alimentos almacenados (Plascencia-Jatomea et al., 2014). En cuanto a la producción de micotoxinas, la mayoría de las cepas de *A. niger* no las produce, siendo sólo un 10 % de las cepas capaces de producir ocratoxina A en las condiciones idóneas de temperatura y humedad (Pitt & Hocking, 2009). Esta toxina tiene propiedades nefrotóxicas y carcinogénicas, pudiendo permanecer hasta 18 días en el cuerpo humano (Moss, 2008). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece un límite de ingesta tolerable semanal de esta micotoxina de 120 ng/kg de peso corporal (EFSA, 2006) y la UE establece un límite máximo de 2 µg/kg en frutas procesadas y zumos (Comisión Europea, 2006). La ocratoxina A es estable hasta 200 °C (Vidal et al., 2015) lo que dificulta su destrucción en los tratamientos térmicos habituales que sufren los alimentos, y que no suelen darse en F&V, por lo que es muy importante evitar su producción por *Aspergillus* spp., ya que después de producida es muy difícil de eliminar

De entre las especies de *Penicillium*, *Penicillium expansum* es la especie más importante dentro del género. Esta especie es la responsable del moho azul que contamina un amplio rango de frutas como manzanas, peras, melocotones, aguacates o fresas. Los síntomas de la enfermedad en la fruta aparecen al principio como lesiones blandas y acuosas de color marrón claro y, a medida que la lesión envejece, los conidios se vuelven de color verde azulado (Errampalli, 2014). *P. expansum* es el principal productor de patulina (Moss 2008), una micotoxina que se encuentra habitualmente en productos procesados de manzanas como zumos o compotas (Patriarca, 2019). La exposición humana a la patulina puede provocar problemas gastrointestinales como vómitos o úlceras

(Salomão, 2018) y también se relaciona su ingesta con daños en el hígado y riñones y con efectos inmunosupresores (Saleh & Goktepe, 2019). La OMS establece un límite de ingesta tolerable semanal de patulina de 0,4 µg/kg de peso corporal (WHO, 1995) y la UE establece un límite máximo entre 50 y 10 µg/kg en frutas procesadas y zumos (Comisión Europea, 2006). Esta micotoxina es estable hasta 120 °C haciendo con que, de forma similar a la ocratoxina A, también sea de difícil eliminación (Diao et al., 2021) en F&V.

Otro de los principales mohos causantes de contaminación fúngica en F&V es *Botrytis cinerea*, el moho causante de la podredumbre gris en los alimentos. *B. cinerea* tiene la capacidad de infectar a más de 200 especies de plantas y es considerado uno de los mohos que más pérdidas económicas causa a nivel mundial, siendo invertidos en su control más de mil millones de euros al año (Dean et al., 2012). Este moho tiene la capacidad de contaminar a una gran variedad de F&V, con elevada incidencia en fresas y uvas, cuyos síntomas de la contaminación se pueden observar durante cualquier momento de la vida útil del alimento desde la precosecha hasta la postcosecha (Hua et al., 2018; Moss, 2008). La infección comienza a partir de aberturas naturales o heridas mecánicas que se producen en la fruta. Al comienzo de las infecciones se observa un área circular más oscura donde los tejidos del fruto son más blandos y a partir de la cual se puede desarrollar una abundante esporulación (Romanazzi & Feliziani, 2014). Uno de los sectores en los que *B. cinerea* tiene un mayor impacto es en la producción de vino, afectando a sus propiedades organolépticas debido a la acumulación de metabolitos indeseables con malos olores en la uva y que afectan a la calidad aromática del vino. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de infección controladas, se produce la denominada podredumbre noble dando lugar a vinos de gran calidad (Lovato et al., 2019).

1.1.2 Bacterias

En el caso de las bacterias patógenas y/o sus toxinas, éstas suelen provocar brotes de enfermedades de transmisión alimentaria debido a la contaminación de los alimentos por patógenos humanos y zoonóticos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* o *Escherichia coli* verotoxigénica (cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga) (Gurtler et al., 2014). Estas contaminaciones son especialmente peligrosas en aquellos alimentos listos para

el consumo (RTE), es decir, aquellos alimentos que no van a sufrir ningún tratamiento esterilizante previo a su consumo como, por ejemplo, embutidos, ensaladas de cuarta gama o jamón curado.

Una de las bacterias contaminantes más peligrosas que se puede encontrar en estos alimentos RTE es *L. monocytogenes*, un bacilo Gram positivo, anaeróbico facultativo, psicotrofo, con flagelos peritricos y con la habilidad de formar biofilms (FAO/WHO, 2004). Uno de los serotipos de *L. monocytogenes* más peligrosos es el 1/2c que se suele encontrar frecuentemente en la industria de procesamiento de carne (Alía et al., 2020a). Esta bacteria es la responsable de causar una de las infecciones bacterianas más peligrosas, la listeriosis, que tiene una alta tasa de mortalidad (13,7 % en 2021) en comparación con otros patógenos alimentarios, especialmente en mujeres embarazadas, personas de la tercera edad y personas inmunodeprimidas (EFSA, 2022). Entre los síntomas de esta enfermedad se encuentran la fiebre, los dolores musculares, la septicemia y la meningitis. Adicionalmente, en embarazadas, puede incluso causar abortos y en los recién nacidos bajo peso, septicemia o meningitis (WHO, 2018b). La contaminación microbiológica cruzada es el principal problema cuando se trata de contaminación por *L. monocytogenes*, ya que puede ocurrir por contacto directo con el personal, aerosoles, utensilios y equipos contaminados, especialmente durante las etapas de deshuesado, prensado y corte de alimentos como el jamón curado o ensaladas de IV gama (AECOSAN, 2015; Alía et al., 2020b). De acuerdo con los datos proporcionados por la EFSA (Tabla 3), en el 2021, la prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos RTE provenientes de pescados fue del 4,7 %, de F&V fue del 3 %, de carne de cerdo fue del 2,7 % y de leche o productos lácteos fue del 0,54 % (EFSA, 2022). Además, ese mismo año, se produjeron 23 brotes alimentarios asociados a productos cárnicos y de pescado contaminados con *L. monocytogenes* que causaron 12 fallecidos en la UE.

Otra de las bacterias patógenas relevante a nivel alimentario es *E. coli*, una bacteria Gram negativa con forma de bacilo de la familia de las enterobacterias, que se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Esta bacteria es anaerobia facultativa, móvil por flagelos peritricos y no forma esporas. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, pero las

cepas verotoxigénicas producen toxinas Shiga, siendo *E. coli* O157:H7 uno de los principales serotipos productores de esta toxina (WHO, 2018a). El ganado rumiante, especialmente el bovino, es el reservorio natural de *E. coli* verotoxigénica y la infección puede darse por ingerir la carne mal cocinada o por contaminaciones cruzadas (Bryan et al., 2015) como en el caso de *L. monocytogenes*. La infección en humanos por *E. coli* verotoxigénica puede causar síndrome urémico hemolítico (SUH), que se caracteriza por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Gyles, 2007). La mortalidad producida por *E. coli* verotoxigénica en los casos reportados en la Unión Europea es del 0,4% (EFSA, 2022).

La prevalencia de *E. coli* verotoxigénica en alimentos RTE es del 1,6 % en productos cárnicos, 1,7 % en leche y productos lácteos y 0,5 % en las F&V (EFSA, 2022) (Tabla 3). Según los datos de EFSA, en 2021, se produjeron 31 brotes alimentarios de esta bacteria en la UE asociados a la ingesta de carne de vacuno, leche y vegetales.

Uno de los géneros de patógenos alimentarios más habituales es *Salmonella* spp., bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos que presentan movilidad debido a la presencia de flagelos (FAO/WHO, 2002). De entre las subespecies y serotipos de *Salmonella*, *S. enterica* subsp *enterica* serotipo Typhimurium es uno de los principales causantes de infecciones alimentarias en humanos, denominadas generalmente salmonelosis (EFSA, 2022). La infección provocada por *Salmonella* spp. se caracteriza por provocar fiebre, dolor abdominal, diarrea y vómitos. En la mayoría de los casos, los síntomas son relativamente leves. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños y ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro su vida (WHO, 2018c). Su mortalidad en la Unión Europea es del 0,18 % (EFSA, 2022) en los casos reportados. *Salmonella* spp. es responsable de la gran parte de los brotes alimentarios en la UE, solamente en el 2021 (Tabla 3) se produjeron 773 brotes alimentarios, principalmente asociados al consumo de huevos o productos derivados, que causaron 1123 hospitalizaciones y una muerte. Por lo general, las contaminaciones cruzadas de *Salmonella* se producen durante la producción de los alimentos o por contacto con aguas fecales, también por consumición de alimentos insuficientemente cocinados (Carrasco et al., 2012).

La prevalencia de *Salmonella* en alimentos RTE es del 0,82 % en carne de cerdo y derivados, un 0,72 % en especias y hierbas, un 0,39 % en pescado y derivados y un 0,32 % en otras carnes (EFSA, 2022).

Tabla 3. Principales microorganismos contaminantes de alimentos RTE y los brotes, enfermedades y muertes que causaron en la Unión Europea en 2021 según los datos recogidos por la EFSA (EFSA, 2022).

Género/ especie	Brotes	Nº enfermedades	Muertes	Prevalencia en alimentos RTE
<i>Campylobacter</i>	249	127 840	26	Carne y derivados (0,24 %), leche y derivados (0,11 %), ensaladas (0,27 %), otros procesados (1,3 %)
<i>Salmonella</i>	773	60 050	71	Carne y derivados (0,44 %), leche y derivados (0,1 %), pescado y derivados (0,39 %), especias (0,72), ensaladas (0,05 %), otros procesados (0,18 %)
<i>L. monocytogenes</i>	23	2 183	196	Carne y derivados (2,3 %), leche y derivados (0,51 %), pescado y derivados (4,7 %), frutas, vegetales y zumos (3 %).
<i>E. coli</i> verotoxigénica	31	6 084	18	Carne y derivados (1,6 %), leche y derivados (1,7 %), productos de panadería (6,3 %), frutas, vegetales y zumos (0,52 %), especias (0,34 %).
<i>Yersinia</i>	21	508	0	Carne y derivados (1,3 %)
<i>B. cereus</i>	87	679	1	-

Por último, se encuentra *Bacillus cereus*, un bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio y móvil que produce dos tipos de toxiinfecciones alimentarias en humanos, la forma emética y la forma diarreica (ANSES, 2021). La infección emética está causada por la toxina cereulida que causa vómitos tras su ingesta, mientras que la infección diarreica está causada por una enterotoxina que provoca dolor abdominal y diarrea (EFSA, 2016b; Granum & Lund, 1997). En la

UE, en el 2021, se produjeron 87 brotes alimentarios causados por las toxinas de *B. cereus* principalmente asociados al consumo de carne de cerdo, pescado, cereales y sus derivados. Esta bacteria está muy difundida en el medio ambiente y como resultado, diversos alimentos como vegetales, leche cruda, especias y alimentos RTE se encuentran contaminados con esporas de *B. cereus* con alguna frecuencia, ya que sus esporas causan contaminaciones cruzadas con gran facilidad (Stenfors Arnesen et al., 2008).

1.2 Oxidación de los alimentos

La presencia de una atmósfera rica en oxígeno o de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del envase es uno de los factores más importantes en el deterioro de un alimento, ya que puede llevarse a cabo un proceso de oxidación del alimento que ocasione un rápido deterioro. Este proceso tiene consecuencias negativas para el alimento, tanto nutricionales como organolépticas. Se producen cambios nutricionales por la destrucción de ácidos grasos, proteínas y vitaminas liposolubles (A, D, E y K), entre otros (F. Tian et al., 2013). En cuanto a las alteraciones organolépticas, la oxidación ocasiona malos sabores y olores, cambios de color y pérdida de sabor que provocan rechazo en el consumidor. Además, la oxidación puede producir compuestos peligrosos para el ser humano que se han relacionado con procesos inflamatorios y cancerígenos (Silva et al., 2019a). En definitiva, la oxidación reduce la vida útil de los alimentos (Nerín et al., 2008), incrementando la inseguridad alimentaria.

En el caso específico de las F&V, dentro de sus procesos de maduración y deterioro se encuentran fitohormonas como el etileno, las enzimas oxidantes y las ROS (Tabla 4). Estas últimas juegan un papel muy importante en la maduración y aceleran el proceso químico del deterioro de F&V, ya que su producción descontrolada provoca estrés oxidativo en las células de F&V, llevando a la oxidación de lípidos y proteínas y a un ablandamiento de las F&V (Hossain et al., 2020). Las ROS son un conjunto de moléculas compuestas por el oxígeno singlete (1O_2), el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^\bullet) (Meitha et al., 2020). La producción de ROS ocurre de forma natural en las mitocondrias y cloroplastos de F&V (Muñoz & Munné-Bosch, 2018), aunque suele ser contrarrestada por las propias enzimas

antioxidantes de la fruta, a no ser que se produzca un estrés oxidativo, como puede ser un golpe o un corte, y la consiguiente sobreproducción de ROS (Wu et al., 2019).

Tabla 4. Principales compuestos que provocan la maduración y senescencia de F&V. Adaptado de Hossain et al., 2020 y Peng et al., 2022.

Compuestos	Efecto en F&V
Etileno	Maduración, ablandamiento
Ácido abscísico	Regulador de etileno
ROS	Ablandamiento, oxidación de lípidos y proteínas
Polifenol oxidasa	Pardeamiento, oxidación de fenoles
Peroxidasa	Pardeamiento, oxidación de fenoles, producción de ROS

Los radicales OH^\bullet son la ROS más importante en la oxidación de F&V, ya que es la especie más reactiva de todas, pues puede reaccionar con casi cualquier compuesto de su entorno y generar nuevos radicales (Richards et al., 2015). Adicionalmente, esta ROS tiene un par de electrones desapareados que pueden reaccionar con el oxígeno en estado fundamental. Además, los radicales OH^\bullet también pueden interactuar con todas las moléculas biológicas y causar daño celular en lípidos, proteínas y membranas (Meitha et al., 2020).

La producción de ROS aumenta especialmente en el caso de la fruta recién cortada debido a las heridas producidas por el corte mecánico que conducen a un aumento en la tasa de respiración mitocondrial y, posteriormente, a un aumento de ROS (Rojas-Graü et al., 2009). Estas ROS pueden llevar a la oxidación de lípidos y proteínas causando graves daños en la mitocondria (S. Tian et al., 2013) y provocando cambios significativos en el sabor, aroma, color, textura y superficie de las frutas permitiendo que sean fácilmente infectadas por mohos (Huan et al., 2016). Dentro de un envase cerrado, las ROS se concentran

y sus efectos perjudiciales sobre la calidad de la fruta se desarrollan más rápidamente, acelerando así su deterioro y disminuyendo la aceptación por parte del consumidor (Montero-Prado et al., 2011).

En definitiva, tanto el crecimiento de microorganismos patógenos o causantes de deterioro como los procesos de oxidación en los alimentos envasados son causantes de inseguridad alimentaria y desperdicio alimentario por lo que es necesario controlar estos dos parámetros para conseguir aumentar la seguridad alimentaria y también alargar la vida útil de los alimentos. Este control de los procesos se puede lograr mediante la adición de agentes activos antioxidantes y/o antimicrobianos al propio envase, denominándose estos envases por envases activos.

2. Envases activos alimentarios

El envase es necesario para conservar la calidad del alimento durante el almacenaje, transporte y venta antes de su consumo, siendo una parte muy importante de la seguridad alimentaria. Asimismo, el desarrollo de nuevos envases alimentarios capaces de interactuar con el alimento podría reducir la inseguridad alimentaria, por ejemplo, eliminando los microorganismos patógenos o causantes de deterioro o disminuyendo los daños oxidativos del producto envasado y así aumentar la vida útil del alimento. A estos nuevos envases (C. Nerin et al., 2017) se les denomina envases activos, y se centran en el control de los procesos de deterioro químico y biológico de los alimentos envasados. En la UE, los envases activos deben ser aceptados por la EFSA y cumplir varios requisitos presentes en la legislación europea (Comisión Europea, 2009). El envase activo debe ser adecuado y eficaz para el uso previsto; no debe liberar en los alimentos ningún componente en cantidad suficiente como para poner en peligro la salud humana o provocar un cambio inaceptable en la composición, el sabor o el olor de los alimentos y tampoco debe inducir a error a los consumidores mediante su etiquetado, presentación o material publicitario.

Se puede definir a los envases activos como envases que contienen sustancias añadidas, designadas agentes activos, que pueden desempeñar funciones como antimicrobianos, antioxidantes, absorbentes de etileno o eliminadores de humedad, y que interactúan activamente con la atmósfera del envasado o con el

alimento para evitar la oxidación, crecimiento microbiano u otros procesos responsables del deterioro de los alimentos envasados, permitiendo prolongar su vida útil y calidad (C. Nerín, 2010). Para conseguir este objetivo, se deben añadir al material de envase agentes activos que sean capaces de controlar en la atmósfera del envase o en el alimento envasado las sustancias no deseadas (de Abreu et al., 2012). Por ejemplo, en el caso del etileno o de la humedad (Tabla 5) se añaden al envase agentes activos absorbentes capaces de retirar estos compuestos de la atmósfera del envase y que permiten prolongar la vida útil del alimento. En el caso de los absorbentes de etileno, una fitohormona que provoca la maduración de F&V y su consecuente deterioro, se utilizan agentes activos capaces de absorber o reaccionar con este gas y que se suelen añadir en bolsitas en el interior del envase para reducir o eliminar el etileno de la atmósfera del envase (Wyrwa & Barska, 2017). Para controlar el etileno se usan principalmente envases activos absorbentes o “scavengers” basados en permanganato de potasio o paladio. En el caso de la humedad, esta ocasiona cambios en la textura del alimento y promueve el crecimiento de microorganismos (Luís et al., 2021), por lo que es necesario eliminarla. Para ello, uno de los envases activos más usados es la incorporación de almohadillas con elevada capacidad absorbente para eliminar líquidos, o agentes activos higroscópicos como la sílica gel que se añade en bolsitas al interior del envase (de Abreu et al., 2012).

Tabla 5. Ejemplos de envases activos alimentarios frente al etileno y la humedad. Adaptado de Gaikwad et al., 2019, 2020.

Tipo de envase	Agente activo	Referencia o Nombre comercial
Etileno		
Bolsita	Permanganato de potasio	Air Repair™
Bolsita	Arcillas naturales impregnadas con permanganato de potasio	BEfresh™
Bolsita	Sepiolita mezclada con permanganato de potasio y carbón activo	KEEPCOOL™
Film quitosano	TiO ₂	(Kaewklin et al., 2018)
Film LDPE	Nanotubo de haloisita	(Tas et al., 2017)
Humedad		
Bolsita	Sílica gel	(Murmu & Mishra, 2018)
Film Agar	Carbonato de sodio/glicinato de sodio	(H. J. Wang et al., 2015)
Bandeja LDPE	Sal de sodio higroscópica	(Rux et al., 2016)

A pesar de las diversas funcionalidades del envase activo alimentario, a día de hoy las que más interés suscitan en la industria y en la investigación son la antioxidante y antimicrobiana, ya que se enfocan en evitar los procesos de oxidación y el crecimiento de microorganismos perjudiciales, respectivamente, y que son responsables por una gran inseguridad alimentaria a nivel mundial.

2.1 Envases activos antioxidantes

Los envases antioxidantes se basan en la incorporación de agentes activos antioxidantes en el envase como forma de mejorar la estabilidad de los alimentos envasados susceptibles a la oxidación (Gómez-Estaca et al., 2014). Esto se debe a que un alto nivel de oxígeno o ROS reduce el valor nutricional de los alimentos, altera sus propiedades organolépticas y, por consiguiente, su vida útil, ya que acelera el deterioro de muchos alimentos, la degradación de vitaminas y ácidos grasos o favorece el crecimiento microbiano (Soltani Firouz et al., 2021). La función de los envases antioxidantes está enfocada de dos formas diferentes: la eliminación de sustancias oxidantes de la atmósfera del envase (ROS, oxígeno, radicales libres) o la liberación de sustancias antioxidantes desde el envase (C. Nerín, 2010).

Los envases activos antioxidantes tienen agentes activos que pueden estar inmovilizados en el material de envase y reaccionar con la atmósfera del envase o ser liberados al interior y actuar directamente sobre el alimento (Tabla 6), como *scavengers* de radicales libres en el caso de los aceites esenciales (Azevedo et al., 2022). Los antioxidantes pueden añadirse al material de envase de diversas formas: en el adhesivo entre los films que forman una multicapa, como el caso de las nanopartículas de selenio (Vera et al., 2016); directamente en el material de envase por extrusión, en el caso de flavonoides (López-de-Dicastillo et al., 2012); o como recubrimiento (*coating*) sobre el material del envase, como en el caso de las oleorresinas de romero (X. C. Song et al., 2020). Uno de los envases activos antioxidantes más comercializados a nivel mundial son las bolsitas absorbentes de oxígeno basadas en el uso de sales de Fe (II) como agentes activos para eliminar el oxígeno presente en la atmósfera del envase (Aishee Dey & Neogi, 2019).

Tabla 6. Agentes activos antioxidantes en diferentes tipos de films para envases activos alimentarios.

Agente activo	Material	Alimento	Referencia
BHT	Polietileno de baja densidad (LDPE) (extrusión)	Pescado	(Torres-Arreola et al., 2007)
α -Tocopherol	Ácido poliláctico (PLA) (extrusión)	Aceite de soja	(Manzanarez-López et al., 2011)
Timol	LDPE/zein (recubrimiento)	Carne de vacuno	(Park et al., 2012)
Extracto de té verde	Quitosano (casting)	Salchichas de cerdo	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Extracto de orégano	Polipropileno (PP) (extrusión)	Carne de vacuno	(Cristina Nerín et al., 2006)
Nanopartículas de selenio	Tereftalato de polietileno (PET)/LDPE (recubrimiento)	-	(Vera et al., 2016)
Oleoresina de romero	PET (recubrimiento)	Carne de cerdo	(X. C. Song et al., 2020)
Flavonoides	Etilenvinil alcohol (EVOH) (extrusión)	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012)

2.2 Envases activos antimicrobianos

Los envases activos antimicrobianos son aquellos envases que liberan agentes antibacterianos o antifúngicos, por ejemplo, para inhibir o controlar el crecimiento de microorganismos contaminantes causantes del deterioro de los alimentos, previniendo o retrasando el deterioro resultante, y por ello, aumentando la vida útil del alimento envasado (Vermeiren et al., 1999; Wyrwa & Barska, 2017). Este tipo de envases también contribuyen a controlar o eliminar microorganismos patógenos que podrían suponer un riesgo para la salud para los consumidores.

La acción protectora de la mayoría de estos materiales se basa en la liberación de sustancias antimicrobianas volátiles o no volátiles del material de envase al alimento, por contacto directo entre el alimento y el envase o por la liberación del antimicrobiano a la atmósfera que rodea al alimento (Gherardi et al., 2016).

Los sistemas de envase activo antimicrobiano utilizan en general: aceites esenciales (orégano), enzimas (lisozima), bacteriocinas (nisina), polímeros antimicrobianos (quitosano) o ácidos orgánicos (ácido láctico) (Becerril et al., 2020) (Tabla 7), entre otros. Estas sustancias pueden ser de origen natural, como las anteriormente mencionadas, o de origen sintético, como el etil lauroil arginato (LAE) (Becerril et al., 2013) o nanopartículas de plata (AgNP) (dos Santos et al., 2020).

Tabla 7. Ejemplos de agentes antimicrobianos incorporados a diferentes polímeros para envase activo alimentario.

Agente activo	Material	Alimento	Referencia
Nanofibras de lisozima	Films de pululano (<i>casting</i>)	-	(Silva et al., 2018)
Nisina	Films de polihidroxibutirato (PHB)/ policaprolactona (PCL) (<i>moldeo por compresión</i>)	Jamón	(Correa et al., 2017)
Aceite esencial de clavo	Films de proteínas de soja (<i>casting</i>)	Filete de atún	(Echeverría et al., 2018)
Lactoferrina	Films celulosa bacteriana (<i>casting</i>)	Salchichas frescas	(Padrão et al., 2016)
LAE	Films EVOH (<i>casting</i>)	-	(Muriel-Galet et al., 2012)
LAE	Films de nanocelulosa (<i>casting</i>)	-	(Silva, 2019c)
Pinosilvina	Almohadillas de PP/celulosa (<i>recubrimiento</i>)	Pollo	(F. Silva et al., 2018)

3. Agentes activos

Cómo se ha podido observar anteriormente, los agentes activos son el componente fundamental de un envase activo, ya que son los compuestos que van a ser responsables por la funcionalidad del envase sobre el alimento. Para poder ser utilizados en envases alimentarios, los agentes activos deben estar aprobados como aditivos alimentarios o garantizar que no migran del envase al alimento por las instituciones competentes de cada país o región, como la EFSA en la UE (Comisión Europea, 2008a) o la Food and Drug Administration (FDA) en EE. UU., que establecen las bases legales para su uso, seguridad y comercialización (Restuccia et al., 2010). Su uso todavía es escaso en la UE y en EE.UU., limitándose principalmente a agentes activos que absorban la humedad, como la sílica gel, y eliminen O₂, como el Fe, (Cichello, 2015; Werner et al., 2017). Las razones de que su uso sea limitado se deben, principalmente, a los todavía altos costes de producción y a su baja aceptación por parte de los consumidores en el mercado europeo y norteamericano, en contraste con Japón, donde la popularidad de los envases activos es alta donde se llevan utilizando desde la década de 1970 (Vilela et al., 2018). A pesar de los impedimentos y dificultades que existen para su uso en envase alimentario, los agentes activos son capaces de mejorar los envases tradicionales y realizar una amplia variedad de funciones para alargar la vida útil y la seguridad de los alimentos. Las funciones que llevan a cabo los agentes activos, permiten dividirlos en cuatro categorías (Figura 2) principales: antimicrobianos, antioxidantes, absorbedores de humedad y eliminadores de etileno (Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021).

En el caso de la problemática del deterioro oxidativo y fúngico de F&V y del crecimiento de bacterias patógenas en alimentos RTE, es necesario el desarrollo de envases con agentes activos que tengan funciones antioxidantes, para eliminar las ROS, y antimicrobianas para inhibir el crecimiento de los microorganismos contaminantes, como bacterias y mohos.

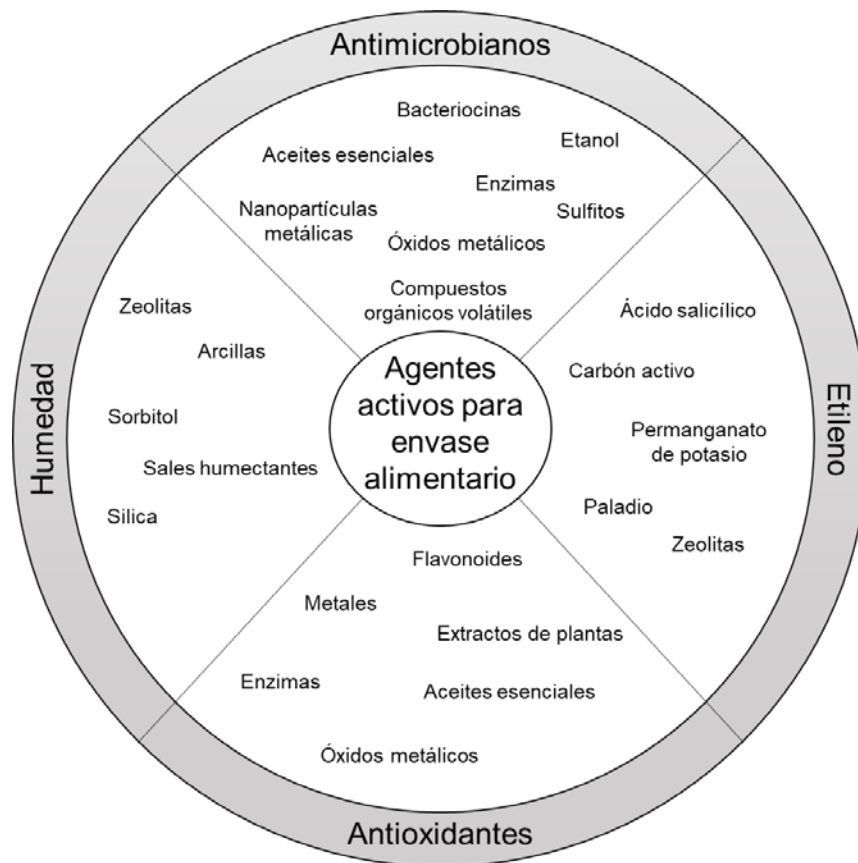


Figura 2. Algunos tipos de agentes activos clasificados en cuatro categorías en las que se pueden dividir los envases activos alimentarios. (Fuente: Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021).

3.1 Agentes activos antioxidantes

Los procesos de oxidación de los alimentos pueden ser impedidos o retrasados utilizando compuestos antioxidantes capaces de eliminar, reaccionar o inhibir las rutas de producción de compuestos que oxidan a los alimentos. Los agentes activos antioxidantes están clasificados en seis categorías basadas en las establecidas por Nerín y Vilela (C. Nerín, 2010; Vilela et al., 2018), según su mecanismo de acción (Tabla 8). En primer lugar, aquellos que eliminan radicales libres reactivos, como los aceites esenciales; compuestos que reaccionan con el O_2 , como el Fe o el Pd, los capaces de descomponer peróxidos, como la metionina o glutatión peroxidasa; los que reaccionan con metales de transición, como los ácidos cítrico y ascórbico; aquellos que inactivan el singlete de oxígeno, como el tocoferol o los carotenoides, y, por último, aquellos que impiden la oxidación enzimática, como los flavonoides o los ácidos fenólicos.

Tabla 8. Categorías en las que se dividen los agentes activos antioxidantes. Se nombran varios ejemplos de agentes activos y su mecanismo. (Fuente: C. Nerín, 2010; F. Tian et al., 2013).

Categoría	Agentes	Mecanismo
Eliminadores de radicales libres	Aceites esenciales, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno	Donan hidrógeno a radicales libres reactivos y forman radicales estables incapaces de reacciones de iniciación o propagación
Eliminadores de O ₂	Hierro, paladio, glucosa oxidasa/catalasa	Oxidación del Fe y el Pd para reducir el O ₂ . Conversión enzimática del O ₂ en agua.
Descomponedores de peróxidos	Tioéteres, metionina, glutatión peroxidasa	Descomponen los peróxidos, produciendo sustancias estables que son incapaces de producir radicales libres
Quelantes de metales	EDTA, ácido cítrico, lactoferrina	Reaccionan con metales de transición para evitar su efecto catalítico en los procesos de oxidación
Inactivadores del singlete de oxígeno (¹ O ₂)	Carotenoides, tocoferoles, polifenoles	Agotan el exceso de energía del oxígeno singlete para controlar la oxidación
Oxidación enzimática	Flavonoides, ácidos fenólicos, galatos	Inactivan enzimas para prevenir la actividad oxidativa

El tipo de agente activo antioxidante más utilizado comercialmente está basado en la oxidación del Fe, que se suelen encontrar en bolsitas permeables al O₂ dentro del envase (C. Nerín et al., 2008; Wyrwa & Barska, 2017). También existen envases antioxidantes basados en Pd que producen agua a partir del O₂, pero

necesitan hidrógeno en la atmósfera del envase (Yildirim et al., 2018). Ambos agentes se utilizan para reaccionar con el O₂ presente en la atmósfera del envase y evitar la rápida oxidación que produce este gas en los lípidos o vitaminas de los alimentos (Aishee Dey & Neogi, 2019). En cambio, en el entorno de la investigación científica, los antioxidantes que más interés suscitan y que más se estudian son los eliminadores de radicales libres (Vilela et al., 2018).

3.2 Agentes activos antimicrobianos

Existe una gran variedad de agentes activos antimicrobianos que se han utilizado para la investigación de envases activos alimentarios. Dentro de ellos se pueden encontrar tanto de origen natural (aceites esenciales o bacteriocinas) como sintético (nanopartículas metálicas). Algunos antimicrobianos, como es el caso de los compuestos orgánicos volátiles que suelen formar parte de los aceites esenciales o ser producidos por bacterias o el del CO₂ que se forma en la respiración celular, pueden clasificarse como naturales, pero se producen de forma sintética en la industria debido a su alta demanda.

Los agentes activos antimicrobianos (Tabla 9), se pueden clasificar en distintas categorías según Becerril (Becerril et al., 2020). Brevemente, los ácidos orgánicos y sus sales, como el ácido láctico o el acetato de sodio; las bacteriocinas que son producidas principalmente por bacterias Gram positivas como la nisina; las enzimas, como la lisozima; los biopolímeros con actividad antimicrobiana intrínseca, como el quitosano y la pectina; los extractos naturales de plantas, como flavonoides o fenoles, que también pueden tener actividad antioxidante; los aceites esenciales que son una mezcla de compuestos orgánicos volátiles extraídos de plantas y especias, como la canela o el orégano; nanopartículas metálicas (plata u óxido de zinc), y, por último, los bacteriófagos que son virus que solo afectan a una bacteria específica causando su muerte.

Tabla 9. Categorías en las que se dividen los agentes activos antimicrobianos. Se nombran varios ejemplos de agentes activos, algunos de los microorganismos susceptibles. (Fuente: Becerril et al., 2020; Comisión Europea, 2008b; Luís et al., 2021).

Categoría	Agentes	Microorganismos
Ácidos orgánicos y sus sales	Ácido láctico, acetato de sodio, sorbato de potasio, ácido cítrico	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> .
Bacteriocinas	Nisina, Sakacina A, Lacticina 3147A	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>
Enzimas	Lisozima, lactoferrina, glucosa oxidasa, lactoperoxidasa	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Biopolímeros	Quitosano, pectina	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
Extractos naturales	Pinosilvina, ácido gálico, extracto de té verde, extracto de propóleo	Lactic acid bacteria, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i>
Aceites esenciales	Canela, orégano, romero, tomillo, carvacrol, orégano	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cinerea</i> , lactic acid bacteria, <i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
Nanopartículas metálicas	Óxido de zinc, plata, óxido de titanio	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Bacteriófagos	IBB-PF7A, vB_EcoMH2W, LISTEX P100	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>

Fuera de las categorías anteriores de agentes activos antimicrobianos, el agente antimicrobiano más habitual a nivel comercial es el CO₂, que se utiliza para preservar el alimento e impedir el crecimiento bacteriano inicial, gracias a su solubilidad en el agua y grasa del alimento (Hansen et al., 2016). Estos envases activos liberadores de CO₂ están basados en la utilización de bicarbonato de sodio y ácido cítrico en almohadillas absorbentes o bolsitas (Vilela et al., 2018) para la producción *in situ* de CO₂. También se utiliza comercialmente el etanol como agente antimicrobiano a bajas concentraciones (4-12%) para prevenir el crecimiento de microorganismos, como las bacterias y mohos. Cuando los alimentos se envasan con un agente liberador de etanol, el etanol se libera en la atmósfera del envase al absorber la humedad (de Abreu et al., 2012).

Las clasificaciones mencionadas engloban a la mayoría de los agentes activos antimicrobianos y antioxidantes que se utilizan o se investigan para envase activo alimentario, pero no son los únicos, ya que es necesario seguir buscando nuevas alternativas más eficaces a la hora de alargar la vida útil de los alimentos y explorar nuevos agentes activos que todavía no se han utilizado para envase activo alimentario.

4. Técnicas de incorporación de los agentes activos al envase

La incorporación de agentes activos, antioxidantes o antimicrobianos, al envase es un proceso delicado, ya que debe realizarse de una forma en la que la sustancia mantenga su actividad. Por ello hay que evitar que se degrade o que no pueda interactuar directamente con el alimento o con la atmósfera del envase. Existen distintos métodos para añadir los agentes activos al material de envase, siendo los más comunes la extrusión, el *casting*, los recubrimientos, la inclusión en adhesivos en materiales multicapas o en bolsitas.

La extrusión es la tecnología preferida de la industria, ya que normalmente los envases alimentarios se fabrican total o parcialmente utilizando esta tecnología (Gómez-Estaca et al., 2014). En esta técnica, el agente activo es incorporado junto al polímero fundido, a alta temperatura, formándose el material activo (Bastarrachea et al., 2015). Esta técnica presenta un grave problema para la incorporación de muchos de los agentes activos usados, ya que, al utilizar altas temperaturas para fundir los polímeros existe un gran riesgo de degradar parcial

o totalmente el agente activo, provocando que pierda su actividad antioxidante o antimicrobiana (Cristina Nerin, 2016). Por ello, los agentes activos utilizados deben ser térmicamente estables a las temperaturas utilizadas en la extrusión (Kuai et al., 2021) y compatibles con el polímero a extruir.

Aunque es una técnica que se utiliza normalmente con polímeros de origen fósil, también ha sido utilizada para añadir agentes antioxidantes y antimicrobianos por extrusión a polímeros biodegradables y/o compostables (Tabla 10) (Da Silva et al., 2019; Del Nobile et al., 2009).

Tabla 10. Ejemplos de films extruidos con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes para envase activo alimentario.

Agente activo	Material	Función	Alimento	Referencia
BHT	LDPE	Antioxidante	Pescado	(Torres-Arreola et al., 2007)
α -Tocopherol	PLA	Antioxidante	Aceite de soja	(Manzanarez-López et al., 2011)
Flavonoides	EVOH	Antioxidante	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012)
Nisina	PLA	Antimicrobiano	Clara de huevo	(Jin & Zhang, 2008)
Lisozima	PCL	Antimicrobiano	-	(Del Nobile et al., 2009)
Extracto de Kuntze	PBAT/TPS	Antimicrobiano	-	(Da Silva et al., 2019)

Otro de los métodos, el *casting*, consiste en disolver el polímero destinado al envasado en un disolvente adecuado y, al mismo tiempo, incorporar el compuesto activo de interés. Para la formación del film activo, se deposita la solución con el polímero y el agente activo sobre una superficie para que el disolvente se evapore, lo que da como resultado la formación de un film activo (Suhag et al., 2020). La ventaja de este método sobre la extrusión es que no hay riesgo de que el compuesto activo se degrade por acción de las altas temperaturas, ya que no es necesario fundir el polímero; mientras que la

desventaja, es la necesidad de que el polímero y el agente activo sean solubles en el mismo disolvente. Para envasado activo alimentario (Tabla 11), esta es la técnica más utilizada con polímeros biodegradables como metil celulosa, polivinil alcohol o derivados del almidón, ya que son solubles en agua (Siemann, 2005).

Tabla 11. Ejemplos de films realizados por *casting* para envase activo alimentario con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes.

Agente activo	Material	Función	Alimento	Referencia
Timol	LDPE/zein	Antioxidante	Carne de vacuno	(Park et al., 2012)
Extracto de té verde	Quitosano	Antioxidante	Salchichas de cerdo	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Nanofibras de lisozima	Pululano	Antimicrobiano/ Antioxidante	-	(Silva et al., 2018)
LAE	Nanocelulosa	Antimicrobiano	-	(Silva et al., 2019c)
Aceite esencial de clavo	Proteínas de soja	Antimicrobiano	Atún	(Echeverría et al., 2018)

A través del método de recubrimiento se incorporan aquellos agentes activos que no toleran las altas temperaturas que tienen lugar durante la extrusión, o que tienen incompatibilidad con el polímero o disolvente usado para su disolución (Appendini & Hotchkiss, 2002). En este método de incorporación, el agente activo se disuelve en una disolución polimérica compatible que se extiende sobre el material de envase. Posteriormente, se evapora el solvente y se forma un film que contiene el agente activo (Baldev et al., 2011). Esta técnica permite la liberación controlada del agente activo o su inmovilización en el material polimérico de envase (Tabla 12).

Tabla 12. Ejemplos de materiales con agentes activos antimicrobianos y antioxidantes realizados por recubrimiento para envase activo alimentario.

Agente activo	Material	Función	Alimento	Referencia
Oleoresina de romero	Film PET	Antioxidante	Carne de cerdo	(Song et al., 2020)
Extracto de orégano	Film PP	Antioxidante	Carne de vacuno	(Nerín et al., 2006)
Nanopartículas de selenio	Multicapa PET/LDPE	Antioxidante	-	(Vera et al., 2016)
Pinosilvina	Almohadilla celulosa/PP	Antimicrobiano	Pollo	(F. Silva et al., 2018)
Aceite esencial de canela	Multicapa PET/Aluminio/PE	Antimicrobiano	Salsa de tomate	(Gherardi et al., 2016)

En el caso de las bolsitas, el agente activo se coloca en su interior y, posteriormente, la bolsita activa se introduce dentro del envase junto al alimento. Su gran ventaja es que no necesita ser incorporado de ninguna forma al material de envase y puede interaccionar fácilmente con la atmósfera del envase. A nivel comercial, estas bolsitas se utilizan normalmente como absorbedores de etileno (permanganato potásico o zeolitas) (Soltani Firouz et al., 2021) o de oxígeno (óxido de hierro II) (Cichello, 2015). Recientemente se ha ampliado el uso de las bolsitas a otras funciones, como la antimicrobiana, mediante la incorporación y posterior liberación de compuestos volátiles con conocidas actividades antimicrobianas, como el etanol y los aceites esenciales (Tabla 13), frente a microorganismos alimentarios, tanto causantes de deterioro como patógenos (Otoni et al., 2016).

Tabla 13. Ejemplos de agentes activos antimicrobianos y antioxidantes introducidos en bolsitas para envase activo alimentario.

Agente activo	Función	Alimento	Referencia
Aceite esencial de ajo	Antimicrobiana	Tomate	(Ayala-Zavala & González-Aguilar, 2010)
Aceite esencial de oréganos	Antimicrobiana	Pan de molde	(Passarinho et al., 2014)
Anetol	Antimicrobiana/ antioxidante	Lechuga	(Wieczyńska & Cavoski, 2018)
Aceite esencial de romero	Antimicrobiano	Queso	(J. H. Han et al., 2014)
Etanol	Antimicrobiano	Pan de molde	(Latou et al., 2010)

5. Nuevas tendencias en el envase alimentario

Ante la cada vez más preocupante contaminación provocada por los plásticos, en los envases activos alimentarios, hay una tendencia en priorizar la utilización de polímeros biodegradables que reduzcan la actual dependencia del plástico, ya que es un grave problema de contaminación global especialmente en los océanos donde su impacto es mayor. Se estima que la cantidad de plástico en los océanos oscila entre 75 y 199 millones de toneladas y se prevé que se duplique en el 2030, lo que afectará en gran medida a las costas y a la fauna marina (UNEP, 2021b). Por lo tanto, el desarrollo de envases biodegradables y/o compostables es una prioridad para reducir este problema ambiental, ya que los envases producen alrededor del 60 % de los residuos plásticos en la UE, principalmente a través de plásticos de un solo uso (Comisión Europea, 2018). Estos nuevos materiales plásticos (Tabla 14) biodegradables pueden ser biobasados, es decir, provenientes de biomasa como el ácido poliláctico (PLA) o la carboximetil celulosa (CMC), o provenir de recursos fósiles como el polivinilalcohol (PVA) (FAO, 2021).

Tabla 14. Varios tipos de bioplásticos en los que se indica si son biobasados y si son biodegradables. (Fuente: Singh et al., 2022)

Bioplástico	Biobasado	Biodegradable
PLA	Sí	Sí
Polihidroxi alcanoato (PHA)	Sí	Sí
Polihidroxi butirato (PHB)	Sí	Sí
CMC y derivados de celulosa	Sí	Sí
PVA	No	Sí
Biopolipropileno (Bio-PP)	Sí	No
Polibutileno succinato (PBS)	No	Sí
Policaprolactona (PCL)	No	Sí
Bioplietileno de tereftalato (Bio-PET)	Sí	No

5.1 Polímeros biodegradables para envasado alimentario

Los polímeros biodegradables son aquellos que, al final de su vida útil, se degradan completamente en CO₂ y agua. Esta degradación es provocada principalmente por la actividad biológica, por lo que el material debe ser capaz de ser asimilado por los microorganismos (principalmente bacterias y hongos) (Hann et al., 2020). Ésta es una característica fundamental de los plásticos, ya que determina si persistirán y se acumularán en el medio ambiente o no. Además, la escala de tiempo en la que ocurre la degradación debe ser lo suficientemente corta para no dañar a los ecosistemas ni a la fauna (Comisión Europea, 2022).

Dentro de los polímeros biodegradables se encuentran los compostables que también se pueden degradar, pero sólo bajo ciertas condiciones de temperatura

y alta humedad, por lo que este proceso se suele llevar a cabo de forma industrial donde es más fácil controlar y alcanzar las condiciones necesarias. En algunos casos, este proceso también se puede realizar en los hogares, obteniéndose el compost, que puede ser utilizado como fertilizante para agricultura (FAO, 2021). Algunos polímeros biodegradables o compostables que se utilizan actualmente en sustitución de los plásticos habituales en los materiales de envase alimentario son el PLA, la CMC o el PVA.

En primer lugar, la carboximetil celulosa (CMC) es un polisacárido lineal aniónico derivado de la celulosa y soluble en agua. La celulosa es el polímero renovable y biodegradable más abundante en la tierra y tiene varias ventajas como su bajo coste, baja densidad, versatilidad e inocuidad (K. Huang & Wang, 2022), lo que hace que la CMC sea un excelente producto sostenible y una opción barata para desarrollar films biodegradables para envase alimentario. A pesar de sus bajas propiedades barrera frente al vapor de agua como consecuencia de su hidrofilia (He et al., 2021), la CMC es actualmente uno de los derivados más comunes de la celulosa utilizados en la preparación de films, ya que cuando se entrecruza con ácido cítrico aumenta su resistencia al agua y disminuye su capacidad de hinchamiento (*swelling* en inglés) (Dashipour et al., 2015; Kanatt & Makwana, 2020; Tongdeesoontorn et al., 2011). La CMC se ha utilizado para desarrollar envase activo alimentario antimicrobiano y/o antioxidante por *casting*, tanto en solitario como en combinación con otros polímeros (Tabla 15).

Tabla 15. Ejemplos de envases activos antimicrobianos y antioxidantes utilizando films fabricados a partir de CMC.

Agente activo	Material	Función	Referencia
Extracto de hojas de tomillo	CMC/alginato de sodio	Antimicrobiano/antioxidante	(Abdin et al., 2023)
Nanopartículas de ZnO	CMC/PVA	Antimicrobiano	(Helmiyati et al., 2021)
Aceite esencial de <i>Zataria multiflora</i>	CMC	Antimicrobiano/antioxidante	(Dashipour et al., 2015)
Aceite esencial de eucalipto	CMC	Antimicrobiano	(Simsek et al., 2020)
Aceite esencial de ajedrea	CMC/agar	Antimicrobiano	(Abdollahi et al., 2019)

En cuanto al polivinil alcohol (PVA), este es un polímero sintético, producido por la hidrólisis del polivinil acetato, soluble en agua que tiene excelentes propiedades físicas como su viscosidad, su capacidad para formación de films y emulsiones, y su adhesividad y flexibilidad (Nagarkar & Patel, 2019). Es un polímero ampliamente utilizado en la industria, lo que ha provocado que grandes cantidades de PVA se viertan cada año a los sistemas de aguas, especialmente desde fábricas de papel y textiles. El PVA no es tóxico para los organismos, aunque pueda llevar a la producción de espuma e impedir la recuperación de oxígeno en el agua (Kawai & Hu, 2009), si no es degradado por bacterias (Kanatt & Makwana, 2020). Se ha investigado su uso para envase activo antimicrobiano con aceites esenciales (C. Han et al., 2014) y con LAE (Haghighi et al., 2020). Aunque el PVA en solitario no tiene buenas propiedades barrera frente a la humedad debido a su solubilidad (Nguyen & Lee, 2022), los recubrimientos basados en PVA sirven para mejorar las propiedades barrera contra la humedad en films plásticos (Chandio et al., 2021) o de papel (Shen et al., 2021).

Por último, el ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero que se obtiene a partir de la fermentación de carbohidratos del almidón, pudiendo obtenerse de los

monómeros de ácido L-láctico o D-láctico que posteriormente polimerizan formando P(L)LA o P(D)LA, respectivamente. La proporción de unidades de monómero L o D afecta a algunas de las propiedades macromoleculares clave como el grado de cristalinidad, la temperatura de fusión y la facilidad de procesamiento, siendo el P(L)LA es el más utilizado comercialmente (Gan & Chow, 2018; Gumienna & Górna, 2021). Las propiedades del PLA incluyen la alta resistencia mecánica, excelente capacidad de termoformado, su biocompatibilidad y compostabilidad, aunque sólo en condiciones controladas de temperatura y humedad en planta industrial. Sin embargo, tiene malas propiedades de barrera frente el vapor de agua y al oxígeno (Mohan & Panneerselvam, 2022)). El PLA se suele utilizar en envase activo alimentario, en films con recubrimientos donde se incorporan los agentes activos (Benbettaieb et al., 2023; Munteanu et al., 2018) o añadiendo directamente al polímero los agentes activos (Jin & Zhang, 2008; Videira-Quintela et al., 2022) para la formación de films activos por extrusión o *casting*.

INTRODUCTION

1. Insécurité alimentaire : détérioration et pathogénicité.

Les aliments sont soumis à une détérioration physique, chimique et biologique qui affecte leur qualité et la sécurité alimentaire de la population. Assurer la sécurité alimentaire est donc un objectif vital pour garantir à tous l'accès physique et économique à une alimentation saine et nutritive (FAO, 2019). Si ce n'est pas le cas, cela conduit à l'insécurité alimentaire, qui se traduit, entre autres, par des pertes et des gaspillages alimentaires importants. Il est donc nécessaire de faire la distinction entre les pertes et les déchets alimentaires, car ils se produisent à des stades différents. Les pertes alimentaires, qui représentent actuellement 14 % de tous les aliments produits dans le monde, sont une cause majeure d'insécurité alimentaire (FAO, 2019). La perte de nourriture a lieu après la récolte ou dans les abattoirs, ainsi que pendant la transformation et le stockage jusqu'à la vente au consommateur. D'autre part, le gaspillage alimentaire se produit dans les ménages, les services alimentaires et la vente au détail, et est estimé à 100 kg/personne/an, ce qui correspond à 17 % de la production alimentaire mondiale (UNEP, 2021). Des millions de personnes souffrent ainsi de maladies, de malnutrition ou de famine, ce qui peut entraîner une mort prématurée. Par exemple, selon les dernières données disponibles de la FAO, en 2021, environ 2,3 milliards de personnes dans le monde étaient en situation d'insécurité alimentaire modérée ou grave (figure 1). L'Afrique est le continent le plus touché par l'insécurité alimentaire, avec 58 % de sa population souffrant d'une insécurité alimentaire modérée ou grave. À l'autre extrême, on trouve l'Europe et l'Amérique du Nord, où l'insécurité alimentaire ne touche que 8 % de la population (FAO, 2022).

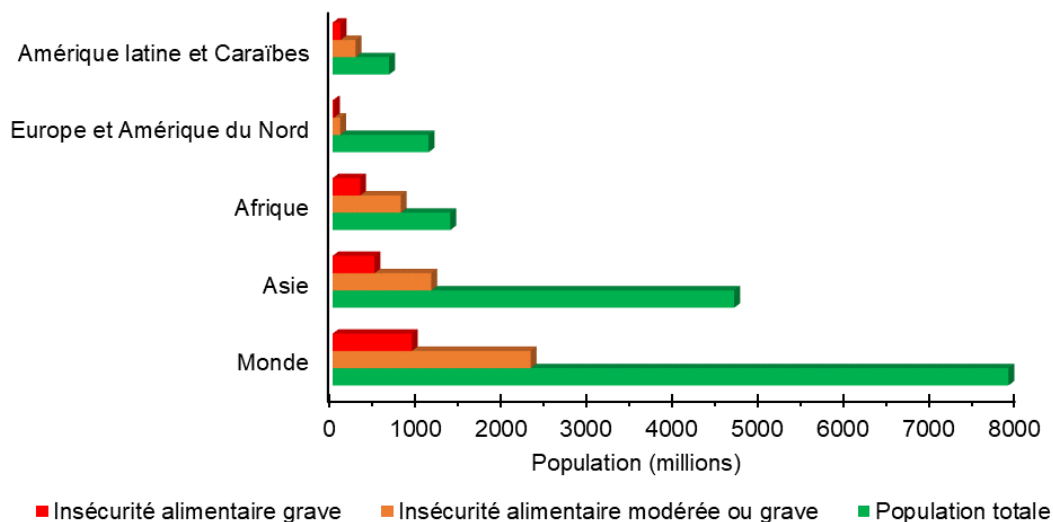


Figure 1. L'insécurité alimentaire mondiale en 2021 (FAO, 2022).

La consommation de fruits et légumes (F&L) est un facteur important de la sécurité alimentaire, car ils constituent une source importante de nutriments. Selon la FAO, une consommation de 400 g/jour de F&L pourrait éviter jusqu'à 4 millions de décès prématurés dans le monde actuel, liés à un manque de consommation de F&L (FAO, 2021). Pour remédier à cette situation, il est nécessaire de réduire les pertes et le gaspillage de F&L en prolongeant leur durée de conservation, car ils sont hautement périssables en raison de trois causes principales : la maturation précoce (Pech et al., 2012) la présence de moisissures et de bactéries contaminantes (Giannakourou et al., 2012). (Giannakourou & Tsironi, 2021; Moss, 2008) et les blessures mécaniques causées lors de la transformation (Yousuf et al., 2017). On estime qu'environ un tiers des F&L sont perdus avant d'atteindre les consommateurs (Ahmad & Siddiqui, 2015). Cela implique que la réduction des pertes post-récolte et du gaspillage des F&L aiderait à augmenter leur consommation et contribuerait à une réduction possible des problèmes de santé associés à leur non-consommation.

Les microorganismes responsables de maladies d'origine alimentaire constituent un autre facteur important de la sécurité alimentaire, car selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la charge annuelle mondiale des maladies d'origine alimentaire dépasse les 600 millions de cas, avec près de 420 000 décès et 33 millions d'années de vie perdues (OMS, 2015). Ces

microorganismes pathogènes sont particulièrement dangereux dans les aliments prêts à consommer, car ces aliments ne subissent pas de traitement thermique avant leur consommation, ce qui permet d'éliminer les microorganismes pathogènes contaminants tels que les bactéries, les moisissures, les parasites ou les toxines qu'ils produisent. L'ingestion d'aliments contaminés par des microorganismes pathogènes ou leurs toxines est la principale cause du nombre élevé de décès mentionnés ci-dessus (OMS, 2015). C'est pour cette raison que la sécurité alimentaire est une question de la plus haute importance en matière de santé publique, garantissant que les aliments consommés sont sûrs dans un monde dont la population continue de croître.

1.1 Microorganismes contaminant les denrées alimentaires

Comme indiqué ci-dessus, les contaminations par des microorganismes, tels que les moisissures et les bactéries, jouent un rôle très important dans la sécurité alimentaire, en particulier dans le cas des fruits et légumes et des aliments prêts à consommer, car elles présentent un risque important pour la santé humaine, dans le cas des microorganismes pathogènes et producteurs de toxines (tableau 1), et causent des pertes et des déchets alimentaires importants, dans le cas des microorganismes responsables de la détérioration des aliments (Sperber & Doyle, 2009). Ces contaminations peuvent survenir à n'importe quel moment de la récolte ou de la post-récolte, comme la production, le stockage ou la distribution des denrées alimentaires, et sont très difficiles à éliminer une fois qu'elles se sont produites.

Tableau 1. Quelques microorganismes pathogènes et toxines alimentaires à l'origine de maladies d'origine alimentaire. Estimation du nombre d'infections et de décès causés en 2010 selon l'OMS. Adapté de OMS, 2015.

Danger	Maladie	Nombre d'infections	Nombre de décès
Virus			
Hépatite A (HAV)	Hépatite	13 709 836	27 731
Norovirus	Gastro-entérite	124 803 946	34 929
Bactéries			
<i>Campylobacter</i> spp	Gastro-entérite	95 613 970	21 374
<i>Escherichia coli</i> entérotoxique	Gastro-entérite	86 502 735	26 170
<i>Escherichia coli</i> vérotoxique	Gastro-entérite/syndrome urémique hémolytique	1 176 854	
<i>Salmonella enterica</i> non typhoïdique	Salmonellose	78 707 591	59 153
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra	763 451	24 649
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listériose	14 169	3 175
Protozoaires			
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose	10 280 089	684
Cestodes			
<i>Taenia solium</i>	Téniase	370 710	28 114
Toxines			
Aflatoxine	Aflatoxicose	21 757	19 455

1.1.1 Moules

Les moisissures sont les principaux microorganismes impliqués dans la détérioration des fruits et légumes (tableau 2). Les moisissures se développent à la surface des fruits et légumes, car ceux-ci sont riches en hydrates de carbone et autres nutriments qui en font un milieu de culture parfait pour leur croissance, certaines des plus courantes étant *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp et *Botrytis* spp. La contamination des fruits et légumes par des moisissures entraîne des pertes importantes, à la fois avant et après la récolte, ce qui se traduit par la perte et le gaspillage de ces aliments dans les ménages et les magasins (Alegbeleye et al., 2022). En outre, la consommation d'aliments contaminés par des moisissures peut entraîner de graves intoxications alimentaires, car certaines d'entre elles produisent des toxines dangereuses pour l'homme ou les fruits et légumes, appelées mycotoxines, comme *Aspergillus* spp. (ochratoxine A) et *Penicillium* spp. (patuline) (Moss, 2008).

Tableau 2. Moisissures contaminantes sur les fruits et légumes et infections qui en résultent. Adapté de Alegbeleye et al, 2022.

Moule	Infection	Exemples de fruits et légumes concernés
<i>Botrytis cinerea</i>	Pourriture grise	Fraise, kiwi, raisin, poire, pêche, cerise, prune, autres fruits riches en pectine, laitue, légumes secs, asperges, citrouille, légumes crucifères à feuilles.
<i>Aspergillus niger</i>	Moisissure noire	Raisin, abricot, oignon, arachide, agrumes, pomme, poire, fraise
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Pourriture noire	Oignon et ail
<i>Penicillium expansum</i>	Moule bleu	Poire, pomme et fruits riches en pectine
<i>Penicillium italicum</i>	Pourriture bleue	Agrumes
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Pourriture molle	Framboises, mûres, pommes de terre, choux
<i>Alternaria tenuis</i>	Pourriture alternarienne	Cucurbitacées, tomates, poivrons
<i>Fusarium</i> spp.	Pourriture brune	Pommes de terre, agrumes, ananas

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *A. niger* est de loin la plus responsable de la détérioration et de la perte de denrées alimentaires, car elle peut contaminer les fruits et légumes à différents stades, notamment avant la récolte, à la récolte, lors de la transformation ou de la manipulation (Perrone et al., 2007). (Perrone et al., 2007). *A. niger* est la cause de la moisissure noire qui apparaît à la surface des fruits et légumes et qui contamine principalement les fruits frais, notamment les pêches, les pommes et les tomates, mais aussi les céréales et certains légumes. Cette moisissure a une distribution mondiale et se trouve le plus souvent dans les climats tempérés, à la fois à la surface des cultures et dans les aliments stockés (Plascencia-Jatomea et al., 2014). En termes de production de mycotoxines, la plupart des souches d'*A. niger* ne produisent pas de mycotoxines, et seulement 10 % des souches sont capables de produire de l'ochratoxine A dans des conditions idéales de température et d'humidité (Pitt & Hocking, 2009). Cette toxine a des propriétés néphrotoxiques et cancérigènes et peut rester dans le corps humain jusqu'à 18 jours (Moss, 2008).. L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fixe une limite d'ingestion hebdomadaire tolérable de 120 ng/kg de poids corporel pour cette mycotoxine (EFSA, 2006) et l'UE fixe une limite supérieure de 2 µg/kg dans les fruits et jus transformés (Comisión Europea, 2006). L'ochratoxine A est stable jusqu'à 200 °C (Vidal et al., 2015) Il est donc très important d'éviter sa production par *Aspergillus* spp. car il est très difficile de l'éliminer une fois qu'elle est produite.

Parmi les espèces de *Penicillium*, *Penicillium expansum* est l'espèce la plus importante du genre. Cette espèce est responsable de la moisissure bleue qui contamine un large éventail de fruits tels que les pommes, les poires, les pêches, les avocats ou les fraises. Les symptômes de la maladie sur les fruits apparaissent d'abord sous la forme de lésions molles, aqueuses et brun clair et, à mesure que la lésion vieillit, les conidies deviennent bleu-vert (Errampalli, 2014). *P. expansum* est le principal producteur de patuline (Moss 2008), une mycotoxine que l'on trouve couramment dans les produits transformés à base de pommes tels que les jus ou les compotes (Patriarca, 2019). L'exposition humaine à la patuline peut provoquer des problèmes gastro-intestinaux tels que des vomissements ou des ulcères (Salomão, 2018) et son ingestion est également

associée à des lésions hépatiques et rénales et à des effets immunosuppresseurs (Saleh & Goktepepe, 2019). L'OMS fixe une limite d'ingestion hebdomadaire tolérable pour la patuline à 0,4 µg/kg de poids corporel (WHO, 1995) et l'UE fixe une limite supérieure entre 50 et 10 µg/kg dans les fruits et jus transformés (Comisión Europea, 2006). Cette mycotoxine est stable jusqu'à 120 °C, ce qui la rend, comme l'ochratoxine A, difficile à éliminer (Diao et al., 2021). dans les fruits et légumes.

Une autre des principales moisissures à l'origine de la contamination fongique dans les fruits et légumes est *Botrytis cinerea*, la moisissure qui provoque la pourriture grise dans les denrées alimentaires. *B. cinerea* a la capacité d'infecter plus de 200 espèces végétales et est considéré comme l'une des moisissures les plus nuisibles économiquement dans le monde, avec plus d'un milliard d'euros dépensés pour son contrôle chaque année (Dean et al., 2012). Cette moisissure a la capacité de contaminer une grande variété de fruits et légumes, avec une incidence élevée dans les fraises et les raisins, dont les symptômes de contamination peuvent être observés à tout moment pendant la durée de conservation de l'aliment, de la pré-récolte à la post-récolte (Hua et al., 2018; Moss, 2008). L'infection commence par des ouvertures naturelles ou des blessures mécaniques qui se produisent dans le fruit. Au début des infections, on observe une zone circulaire plus sombre où les tissus du fruit sont plus mous et à partir de laquelle une sporulation abondante peut se développer (Romanazzi & Feliziani, 2014). L'un des secteurs où *B. cinerea* a un impact majeur est la production de vin, affectant ses propriétés organoleptiques en raison de l'accumulation de métabolites indésirables avec de mauvaises odeurs dans les raisins et affectant la qualité aromatique du vin. Cependant, dans certaines conditions d'infection contrôlées, la pourriture noble est produite, ce qui donne des vins de haute qualité. (Lovato et al., 2019).

1.1.2 Bactéries

Les bactéries pathogènes et/ou leurs toxines sont souvent à l'origine d'épidémies d'origine alimentaire dues à la contamination des aliments par des agents pathogènes humains et zoonotiques, tels que *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ou *Escherichia coli* vérotoxino-gène (souches d'*E. coli* productrices de toxine de Shiga). (Gurtler et al., 2014). Ces

contaminations sont particulièrement dangereuses dans les aliments prêts à consommer, c'est-à-dire les aliments qui ne subissent aucun traitement de stérilisation avant leur consommation, comme les saucisses, les salades préparées ou le jambon cru.

L'une des bactéries contaminantes les plus dangereuses que l'on peut trouver dans ces aliments prêts à consommer est *L. monocytogenes*, un bacille Gram positif, anaérobie facultatif, psychrotrophe, doté de flagelles péritriches et capable de former des biofilms (FAO/WHO, 2004). L'un des sérotypes les plus dangereux de *L. monocytogenes* est le 1/2c, que l'on trouve fréquemment dans l'industrie de transformation de la viande (Alía et al., 2020a). Cette bactérie est responsable de l'une des infections bactériennes les plus dangereuses, la listériose, qui présente un taux de mortalité élevé (13,7 % en 2021) par rapport à d'autres agents pathogènes d'origine alimentaire, en particulier chez les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (EFSA, 2022). Les symptômes de la maladie comprennent la fièvre, les douleurs musculaires, la septicémie et la méningite. En outre, chez les femmes enceintes, elle peut même provoquer des fausses couches et chez les nourrissons de faible poids à la naissance, une septicémie ou une méningite. (OMS, 2018b). La contamination microbiologique croisée est le principal problème en matière de contamination par *L. monocytogenes*, car elle peut se produire par contact direct avec du personnel, des aérosols, des ustensiles et du matériel contaminés, en particulier pendant les étapes de désossage, de pressage et de découpe d'aliments tels que le jambon cru ou les salades fraîchement coupées (AECOSAN, 2015 ; Alía et al., 2020b). Selon les données fournies par l'EFSA (tableau 3), en 2021, la prévalence de *L. monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer provenant de poisson était de 4,7 %, de F&L de 3 %, de porc de 2,7 % et de lait ou de produits laitiers de 0,54 % (EFSA, 2022). En outre, la même année, 23 foyers d'origine alimentaire associés à des produits à base de viande et de poisson contaminés par *L. monocytogenes* ont été recensés dans l'UE, entraînant 12 décès.

Une autre bactérie pathogène d'origine alimentaire est *E. coli*, une bactérie à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae, que l'on trouve couramment dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. Cette bactérie est

anaérobie facultative, mobile grâce à des flagelles péritriches et ne forme pas de spores. La plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives, mais les souches vérotoxigènes produisent des toxines de Shiga, *E. coli* O157:H7 étant l'un des principaux sérotypes produisant cette toxine (WHO, 2018a). Les ruminants, en particulier les bovins, sont le réservoir naturel d'*E. coli* vérotoxigène et l'infection peut se produire par ingestion de viande insuffisamment cuite ou par contamination croisée (Bryan et al., 2015) comme dans le cas de *L. monocytogenes*. L'infection humaine par *E. coli* vérotoxigène peut provoquer le syndrome hémolytique et urémique (SHU), qui se caractérise par une insuffisance rénale aiguë, une anémie hémolytique microangiopathique et une thrombocytopénie (Gyles, 2007). La mortalité causée par *E. coli* vérotoxique dans les cas signalés dans l'Union européenne est de 0,4 % (EFSA, 2022).

La prévalence d'*E. coli* vérotoxique dans les aliments prêts à consommer est de 1,6 % dans les produits carnés, de 1,7 % dans le lait et les produits laitiers et de 0,5 % dans les fruits et légumes. (EFSA, 2022) (tableau 3). Selon les données de l'EFSA, en 2021, 31 foyers de toxi-infection alimentaire liés à cette bactérie se sont produits dans l'UE et ont été associés à l'ingestion de viande de bœuf, de lait et de légumes.

L'un des genres les plus courants de pathogènes alimentaires est *Salmonella* spp, des bacilles Gram négatifs et anaérobies facultatifs qui sont mobiles en raison de la présence de flagelles. (FAO/WHO, 2002). Parmi les sous-espèces et les sérotypes de *Salmonella*, *S. enterica* subsp *enterica* sérotype Typhimurium est l'une des principales causes d'infections d'origine alimentaire chez l'homme, généralement désignées sous le nom de salmonellose (EFSA, 2022). L'infection causée par *Salmonella* spp. se caractérise par de la fièvre, des douleurs abdominales, des diarrhées et des vomissements. Dans la plupart des cas, les symptômes sont relativement bénins. Cependant, dans certains cas, en particulier chez les enfants et les personnes âgées, la déshydratation causée par la maladie peut être grave et mettre la vie en danger. (WHO, 2018c). La mortalité dans l'Union européenne est de 0,18 % (EFSA, 2022) dans les cas signalés. *Salmonella* spp. est responsable d'une grande partie des foyers alimentaires dans l'UE, rien qu'en 2021 (tableau 3), 773 foyers alimentaires ont été recensés, principalement associés à la consommation d'œufs ou d'ovoproduits, entraînant

1123 hospitalisations et un décès. En général, les contaminations croisées par *Salmonella* se produisent au cours de la production des aliments ou par contact avec des eaux fécales, ainsi que par la consommation d'aliments insuffisamment cuits (Carrasco et al., 2012).. La prévalence de *Salmonella* dans les aliments prêts à consommer est de 0,82 % dans le porc et les produits à base de porc, de 0,72 % dans les épices et les herbes, de 0,39 % dans le poisson et les produits à base de poisson et de 0,32 % dans les autres viandes (EFSA, 2022).

Tableau 3. Principaux microorganismes TEN contaminant les denrées alimentaires et foyers, maladies et décès qu'ils ont provoqués dans l'Union européenne en 2021, d'après les données recueillies par l'EFSA (EFSA, 2022).

Genre/espèce	Foyers	Pas de maladies	Décès	Prévalence dans les aliments RTE
<i>Campylobacter</i>	249	127 840	26	Viande et produits à base de viande (0,24 %), lait et produits laitiers (0,11 %), salades (0,27 %), autres produits transformés (1,3 %)
<i>Salmonelle</i>	773	60 050	71	Viande et produits à base de viande (0,44 %), lait et produits laitiers (0,1 %), poisson et produits à base de poisson (0,39 %), épices (0,72 %), salades (0,05 %), autres produits transformés (0,18 %).
<i>L. monocytogenes</i>	23	2 183		Viande et produits à base de viande (2,3%), lait et produits laitiers (0,51%), poisson et produits à base de poisson (4,7%), fruits, légumes et jus (3%).
<i>E. coli</i> vérotoxique	31	6 084		Viande et produits carnés (1,6 %), lait et produits laitiers (1,7 %), produits de boulangerie (6,3 %), fruits, légumes et jus (0,52 %), épices (0,34 %).
<i>Yersinia</i>	21	508	0	Viande et produits à base de viande (1,3 %)
<i>B. cereus</i>	87	679	1	-

Enfin, il y a le *Bacillus cereus*, un bacille à Gram positif, sporulant, aérobic et mobile, qui produit deux types de toxicoses alimentaires chez l'homme, la forme émétique et la forme diarrhéique (ANSES, 2021). L'infection émétique est causée par la toxine céréulide qui provoque des vomissements après ingestion, tandis que l'infection diarrhéique est causée par une entérotoxine qui provoque des douleurs abdominales et des diarrhées (EFSA, 2016b; Granum & Lund, 1997). Dans l'UE, 87 foyers d'origine alimentaire causés par des toxines de *B. cereus*, principalement associés à la consommation de porc, de poisson, de céréales et de leurs dérivés, sont apparus en 2021. Cette bactérie est largement répandue dans l'environnement et, par conséquent, divers aliments tels que les légumes, le lait cru, les épices et les aliments prêts à consommer sont contaminés par les spores de *B. cereus* avec une certaine fréquence, car ses spores provoquent très facilement une contamination croisée (Stenfors Arnesen et al., 2008).

1.2 Oxydation des aliments

La présence d'une atmosphère riche en oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'intérieur de l'emballage est l'un des facteurs les plus importants dans la détérioration d'un aliment, car un processus d'oxydation de l'aliment peut se produire, entraînant une détérioration rapide de l'aliment. Ce processus a des conséquences négatives pour l'aliment, tant sur le plan nutritionnel qu'organoleptique. Les changements nutritionnels sont dus à la destruction des acides gras, des protéines et des vitamines liposolubles (A, D, E et K), entre autres. (Tian et al., 2013). En termes d'altérations organoleptiques, l'oxydation provoque des goûts et des odeurs désagréables, des changements de couleur et une perte de saveur qui entraînent le rejet du produit par le consommateur. En outre, l'oxydation peut produire des composés dangereux pour l'homme et a été associée à des processus inflammatoires et cancérogènes (Silva et al., 2019a). En fin de compte, l'oxydation réduit la durée de conservation des denrées alimentaires (C. Nerín et al., 2008) augmentant ainsi l'insécurité alimentaire.

Dans le cas spécifique des fruits et légumes, les processus de maturation et de détérioration comprennent phytohormones telles que l'éthylène, les enzymes oxydatives et les ROS (tableau 4). Ces derniers jouent un rôle très important

dans la maturation et accélèrent le processus chimique de détérioration des fruits et légumes, car leur production incontrôlée provoque un stress oxydatif dans les cellules des fruits et légumes, conduisant à l'oxydation des lipides et des protéines et au ramollissement des fruits et légumes. (Hossain et al., 2020). Les ROS sont un ensemble de molécules composées d'oxygène singulet (O^1_2), superoxyde (O_2^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radicaux hydroxyles (OH^\bullet). (Meitha et al., 2020). La production de ROS se produit naturellement dans les mitochondries et les chloroplastes des F&V (Muñoz & Munné-Bosch, 2018) mais elle est généralement contrecarrée par les propres enzymes antioxydantes du fruit, à moins qu'un stress oxydatif, tel qu'une meurtrissure ou une coupure, ne se produise et que la surproduction de ROS qui en découle ne se produise. (Wu et al., 2019).

Tableau 4. Principaux composés responsables de la maturation et de la sénescence des fruits et légumes. Adapté de Hossain et al, 2020 et Peng et al, 2022.

Composés	Effet sur les fruits et légumes
Éthylène	Maturation, adoucissement
Acide abscissique	Régulateur d'éthylène
ROS	Ramollissement, oxydation des lipides et des protéines
Polyphénol oxydase	Brunissement, oxydation des phénols
Peroxydase	Brunissement, oxydation des phénols, production de ROS

Radicaux OH^\bullet sont les ROS les plus importants dans l'oxydation des fruits et légumes, car il s'agit de l'espèce la plus réactive de toutes, qui peut réagir avec presque n'importe quel composé dans son environnement et générer de nouveaux radicaux (Richards et al., 2015). En outre, ce ROS possède une paire d'électrons non appariés qui peut réagir avec l'oxygène à l'état fondamental. En outre, les radicaux OH^\bullet peuvent également interagir avec toutes les molécules

biologiques et causer des dommages cellulaires dans les lipides, les protéines et les membranes (Meitha et al., 2020).

La production de ROS augmente particulièrement dans les fruits fraîchement coupés en raison des blessures causées par la coupe mécanique, ce qui entraîne une augmentation du taux de respiration mitochondriale et, par la suite, une augmentation des ROS (Rojas-Graü et al., 2009). Ces ROS peuvent conduire à l'oxydation des lipides et des protéines causant de graves dommages aux mitochondries (Tian et al., 2013) et provoquer des changements significatifs dans le goût, l'arôme, la couleur, la texture et la surface des fruits, ce qui leur permet d'être facilement infectés par des moisissures (Huan et al., 2016). À l'intérieur d'un récipient fermé, les ROS sont concentrés et leurs effets néfastes sur la qualité des fruits se développent plus rapidement, accélérant ainsi la détérioration et diminuant l'acceptabilité par le consommateur (Montero-Prado et al., 2011).

En résumé, la croissance des microorganismes pathogènes ou responsables de la détérioration des aliments et les processus d'oxydation dans les aliments emballés sont responsables de l'insécurité alimentaire et du gaspillage alimentaire. Ce contrôle du processus peut être réalisé en ajoutant des agents actifs antioxydants et/ou antimicrobiens à l'emballage lui-même, ce que l'on appelle l'emballage actif.

2. Emballage alimentaire actif

L'emballage est nécessaire pour préserver la qualité des aliments pendant le stockage, le transport et la vente avant consommation, et constitue un élément très important de la sécurité alimentaire. En outre, le développement de nouveaux emballages alimentaires capables d'interagir avec les aliments pourrait réduire l'insécurité alimentaire, par exemple en éliminant les microorganismes pathogènes ou responsables de la détérioration des aliments ou en réduisant les dommages oxydatifs subis par le produit emballé et en augmentant ainsi la durée de conservation des aliments. Pour ces nouveaux emballages (Nerin et al., 2017) sont appelés emballages actifs et se concentrent sur le contrôle des processus d'altération chimique et biologique des aliments emballés. Dans l'UE, les emballages actifs doivent être acceptés par l'EFSA et répondre à un certain

nombre d'exigences de la législation européenne (Commission européenne, 2009). L'emballage actif doit être adapté et efficace pour l'usage auquel il est destiné ; il ne doit libérer aucun composant dans l'aliment en quantité suffisante pour mettre en danger la santé humaine ou provoquer une modification inacceptable de la composition, du goût ou de l'odeur de l'aliment ; et il ne doit pas induire les consommateurs en erreur par son étiquetage, sa présentation ou son matériel publicitaire.

L'emballage actif peut être défini comme un emballage contenant des substances ajoutées, appelées agents actifs, qui peuvent avoir des fonctions antimicrobiennes, antioxydantes, d'absorption de l'éthylène ou d'élimination de l'humidité, et qui interagissent activement avec l'atmosphère de l'emballage ou l'aliment pour empêcher l'oxydation, la croissance microbienne ou d'autres processus responsables de l'altération de l'aliment emballé, prolongeant ainsi sa durée de conservation et sa qualité. (Nerín, 2010). Pour atteindre cet objectif, des agents actifs capables de contrôler les substances indésirables dans l'atmosphère de l'emballage ou dans l'aliment emballé doivent être ajoutés au matériau d'emballage (de Abreu et al., 2012). Par exemple, dans le cas de l'éthylène ou de l'humidité (tableau 5), des agents actifs absorbants sont ajoutés à l'emballage, capables d'éliminer ces composés de l'atmosphère de l'emballage et de prolonger la durée de conservation de l'aliment. Dans le cas des absorbeurs d'éthylène, une phytohormone qui provoque le mûrissement des fruits et légumes et leur détérioration, des agents actifs capables d'absorber ce gaz ou de réagir avec lui sont utilisés (Wyrwa & Barska, 2017). Pour lutter contre l'éthylène, on utilise principalement des emballages actifs absorbants ou des piègeurs à base de permanganate de potassium ou de palladium. Dans le cas de l'humidité, elle provoque des changements dans la texture des aliments et favorise la croissance des microorganismes (Luís et al., 2021) et doit donc être éliminée. À cette fin, l'un des emballages actifs les plus couramment utilisés est l'incorporation de tampons à forte capacité d'absorption pour éliminer les liquides, ou d'agents actifs hygroscopiques tels que le gel de silice qui est ajouté dans des sachets à l'intérieur de l'emballage (de Abreu et al., 2012).

Tableau 5. Exemples d'emballages alimentaires actifs contre l'éthylène et l'humidité.
Adapté de Gaikwad et al, 2019, 2020.

Type d'emballage	Agent actif	Référence ou nom commercial
ÉTHYLÈNE		
Sachet	Permanganate de potassium	Réparation de l'air™
Sachet	Argiles naturelles imprégnées de permanganate de potassium	BEfresh™
Sachet	Sépiolite mélangée à du permanganate de potassium et à du charbon actif	KEEPCOOL™
Film de chitosane	TiO ₂	(Kaewklin et al., 2018)
Film LDPE	Nanotube d'halosite	(Tas et al., 2017)
HUMIDITÉ		
Sachet	Gel de silice	(Murmu & Mishra, 2018)
Film d'agar	Carbonate de sodium/glycinate de sodium	(Wang et al., 2015).
Plateau en LDPE	Sel de sodium hygroscopique	(Rux et al., 2016)

Malgré les diverses fonctionnalités des emballages alimentaires actifs, les plus intéressantes pour l'industrie et la recherche sont actuellement les fonctions antioxydantes et antimicrobiennes, car elles visent respectivement à prévenir les processus d'oxydation et la croissance des microorganismes nuisibles, qui sont responsables d'une grande partie de l'insécurité alimentaire dans le monde.

2.1 Emballages actifs antioxydants

L'emballage antioxydant est basé sur l'incorporation d'agents actifs antioxydants dans l'emballage afin d'améliorer la stabilité des aliments emballés susceptibles d'être oxydés (Gómez-Estaca et al., 2014). En effet, un niveau élevé d'oxygène ou de ROS réduit la valeur nutritionnelle des aliments, altère leurs propriétés organoleptiques et, par conséquent, leur durée de conservation, car il accélère l'altération de nombreux aliments, la dégradation des vitamines et des acides gras ou favorise la croissance microbienne (Soltani Firouz et al., 2021). La fonction de l'emballage antioxydant est abordée de deux manières différentes : l'élimination des substances oxydantes de l'atmosphère de l'emballage, telles que les ROS ou l'oxygène, ou la libération de substances antioxydantes de l'emballage (Nerín, 2010).

Les emballages antioxydants contiennent des agents actifs qui peuvent être immobilisés dans le matériau d'emballage et réagir avec l'atmosphère de l'emballage ou être libérés à l'intérieur et agir directement sur l'aliment (tableau 6), comme dans le cas des huiles essentielles (Azevedo et al., 2022). Les antioxydants peuvent être ajoutés au matériau d'emballage de plusieurs manières : dans l'adhésif entre les films formant une couche multiple, comme dans le cas des nanoparticules de sélénium (Vera et al., 2016) directement dans le matériau d'emballage par extrusion, dans le cas des flavonoïdes (López-de-Dicastillo et al., 2012) ou sous forme de *revêtement sur le matériau d'emballage*, comme dans le cas des oléorésines de romarin (Song et al., 2020). L'un des emballages actifs antioxydants les plus commercialisés dans le monde est constitué par les sachets absorbeurs d'oxygène basés sur l'utilisation de sels de Fe(II) comme agents actifs pour éliminer l'oxygène présent dans l'atmosphère de l'emballage (Aishee Dey & Neogi, 2019).

Tableau 6. Agents antioxydants actifs dans différents types de films pour l'emballage d'aliments actifs.

Agent actif	Matériau	Alimentation	Référence
BHT	Polyéthylène basse densité (LDPE) (extrusion)	Poisson	(Torres-Arreola et al., 2007).
α -Tocophérol	Acide polylactique (PLA) (extrusion)	Huile de soja	(Manzanarez-López et al., 2011).
Thymol	LDPE/zéine (liner)	Viande bovine	(Park et al., 2012)
Extrait de thé vert	Chitosan (coulée)	Saucisses de porc	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Extrait d'origan	Polypropylène (PP) (extrusion)	Viande bovine	(Nerín et al., 2006).
Nanoparticules de sélénium	Polyéthylène téréphtalate (PET)/LDPE (liner)	-	(Vera et al., 2016)
Oléorésine de romarin	PET (revêtement)	Porc	(Song et al., 2020)
Flavonoïdes	Alcool éthylène vinyle (EVOH) (extrusion)	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012).

2.2 Emballages actifs antimicrobiens

Les emballages actifs antimicrobiens sont des emballages qui libèrent des agents antibactériens ou antifongiques, par exemple pour inhiber ou contrôler la croissance des microorganismes contaminants à l'origine de l'altération des aliments, prévenir ou retarder l'altération qui en résulte et augmenter ainsi la durée de conservation de l'aliment emballé. (Vermeiren et al., 1999; Wyrwa & Barska, 2017). Ce type d'emballage permet également de contrôler ou d'éliminer les microorganismes pathogènes qui pourraient présenter un risque pour la santé

des consommateurs. L'action protectrice de la plupart de ces matériaux repose sur la libération de substances antimicrobiennes volatiles ou non volatiles du matériau d'emballage vers l'aliment, par contact direct entre l'aliment et l'emballage ou par la libération de l'antimicrobien dans l'atmosphère entourant l'aliment (Gherardi et al., 2016).

Les systèmes d'emballage actifs antimicrobiens utilisent généralement : des huiles essentielles (origan), des enzymes (lysozyme), des bactériocines (nisine), des polymères antimicrobiens (chitosan) ou des acides organiques (acide lactique). Ces substances peuvent être d'origine naturelle, comme celles mentionnées ci-dessus, ou d'origine synthétique, comme l'arginate d'éthyle lauroyl (LAE) (Becerril et al., 2013) ou les nanoparticules d'argent (AgNP) (dos Santos et al., 2020).

Tableau 7. Exemples d'agents antimicrobiens incorporés dans différents polymères pour les emballages alimentaires actifs.

Agent actif	Matériau	Alimentation	Référence
Nanofibres de lysozyme	Films Pululan (casting)	-	(Silva et al., 2018)
Nisina	Films en polyhydroxybutyrate (PHB)/polycaprolactone (PCL) (moulage par compression)	Jambon	(Correa et al., 2017)
Huile essentielle de girofle	Films à base de protéines de soja (<i>coulée</i>)	Filet de thon	(Echeverría et al., 2018).
Lactoferrine	Films de cellulose bactérienne (<i>coulée</i>)	Saucisses fraîches	(Padrão et al., 2016).
LAE	EVOH Films (<i>moulage</i>)	-	(Muriel-Galet et al., 2012).
LAE	Films de nanocellulose (<i>coulée</i>)	-	(Silva, 2019c)
Pinosilvina	Tampons en PP/cellulose (revêtement)	Poulet	(F. Silva et al., 2018)

3. Agents actifs

Comme nous l'avons vu plus haut, les agents actifs sont le composant fondamental d'un emballage actif, car ce sont les composés qui seront responsables de la fonctionnalité de l'emballage sur l'aliment. Pour être utilisés dans les emballages alimentaires, les agents actifs doivent être approuvés en tant qu'additifs alimentaires ou être garantis comme ne migrant pas de l'emballage vers l'aliment par les institutions compétentes de chaque pays ou région, comme l'EFSA dans l'UE (Comisión Europea, 2008a) ou la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis, qui établissent la base juridique de leur utilisation, de leur sécurité et de leur commercialisation (Restuccia et al., 2010). Leur utilisation est encore rare dans l'UE et aux États-Unis, principalement limitée aux agents actifs qui absorbent l'humidité, comme le gel de silice, et éliminent l'O₂, comme le Fe, (Cichello, 2015; Werner et al., 2017). Les raisons de leur utilisation limitée sont principalement dues aux coûts de production encore élevés et à leur faible acceptation par les consommateurs sur le marché européen et nord-américain, contrairement au Japon, où la popularité des emballages actifs est élevée et où ils sont utilisés depuis les années 1970 (Vilela et al., 2018). Malgré les obstacles et les difficultés liés à leur utilisation dans les emballages alimentaires, les agents actifs sont capables d'améliorer les emballages traditionnels et de remplir une grande variété de fonctions pour prolonger la durée de conservation et la sécurité des aliments. Les fonctions exercées par les agents actifs peuvent être divisées en quatre catégories principales (figure 2): antimicrobien, antioxydant, absorbeur d'humidité et piègeur d'éthylène (Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021)..

En ce qui concerne le problème de l'altération oxydative et fongique des fruits et légumes et le développement de bactéries pathogènes dans les aliments prêts à consommer, il est nécessaire de développer des emballages contenant des agents actifs qui ont des fonctions antioxydantes pour éliminer les ROS et des fonctions antimicrobiennes pour inhiber le développement de microorganismes contaminants tels que les bactéries et les moisissures.

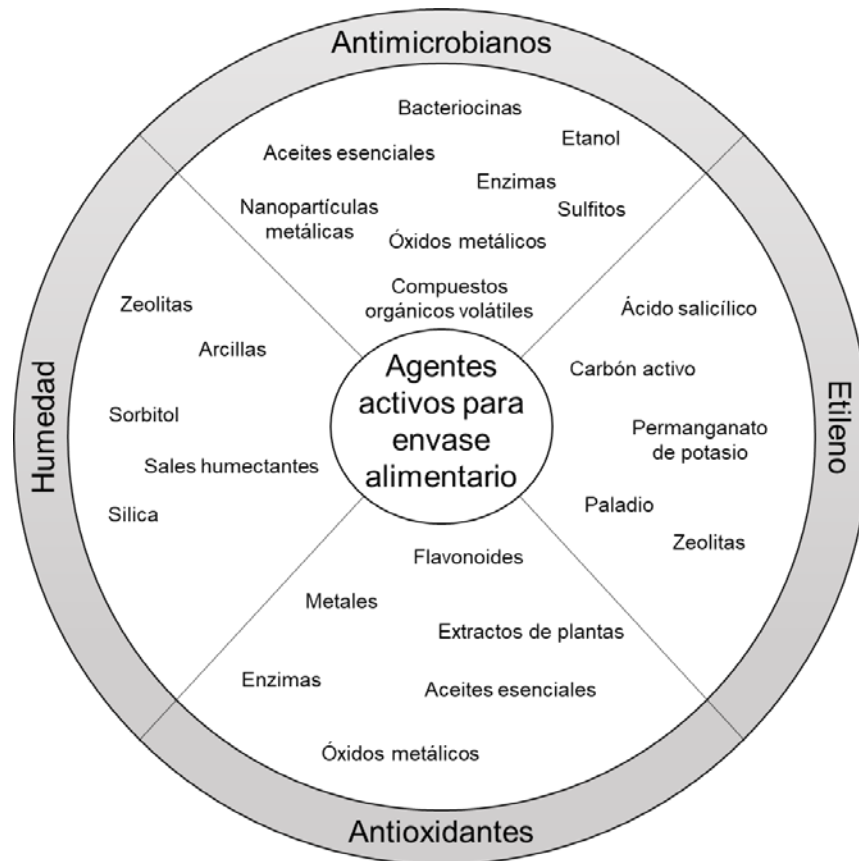


Figure 2. Quelques types d'agents actifs classés en quatre catégories dans lesquelles les emballages alimentaires actifs peuvent être divisés (Source : Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021).

3.1 Agents actifs antioxydants

Les processus d'oxydation des aliments peuvent être évités ou retardés par l'utilisation de composés antioxydants capables d'éliminer, de réagir ou d'inhiber les voies de production des composés oxydants des aliments. Les agents actifs antioxydants sont classés en six catégories sur la base de celles établies par Nerín et Vilela (C. Nerín, 2010 ; Vilela et al., 2018) en fonction de leur mécanisme d'action (tableau 8). Tout d'abord, ceux qui éliminent les radicaux libres réactifs, comme les huiles essentielles ; les composés qui réagissent avec O₂, comme le Fe ou le Pd, ceux capables de décomposer les peroxydes, comme la méthionine ou la glutathion peroxydase; ceux qui réagissent avec les métaux de transition, comme les acides citrique et ascorbique; ceux qui inactivent le singulet d'oxygène, comme le tocophérol ou les caroténoïdes; et enfin, ceux qui

empêchent l'oxydation enzymatique, comme les flavonoïdes ou les acides phénoliques.

Tableau 8. Catégories dans lesquelles les agents actifs antioxydants sont classés. Plusieurs exemples d'agents actifs *et leur* mécanisme sont cités (Source : Nerin, 2010; Tian et al., 2013).

Catégorie	Agents	Mécanisme
Piégeurs de radicaux libres	Huiles essentielles, hydroxyanisole butylé, hydroxytoluène butylé	Ils donnent de l'hydrogène aux radicaux libres réactifs et forment des radicaux stables incapables d'initier ou de propager des réactions.
Éliminateurs de O ₂	Fer, palladium, glucose oxydase/catalase	Oxydation du Fe et du Pd pour réduire l'O ₂ . Conversion enzymatique de l'O ₂ en eau.
Décomposeurs de peroxyde	Thioéthers, méthionine, glutathion peroxydase	Ils décomposent les peroxydes, produisant des substances stables incapables de produire des radicaux libres.
Chélateurs de métaux	EDTA, acide citrique, lactoferrine	Réagissent avec les métaux de transition pour éviter leur effet catalytique dans les processus d'oxydation
Inactivateurs de singulets d'oxygène (O) ¹ ₂	Caroténoïdes, tocophérols, polyphénols	Épuiser l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour contrôler l'oxydation
Oxydation enzymatique	Flavonoïdes, acides phénoliques, gallates	Inactivation des enzymes pour prévenir l'activité oxydative

Le type d'agent actif antioxydant le plus utilisé dans le commerce est basé sur l'oxydation du Fe, que l'on trouve généralement dans des sachets perméables à l'O₂ à l'intérieur de l'emballage. (Nerín et al., 2008; Wyrwa & Barska, 2017).. Il existe également des emballages antioxydants à base de Pd qui produisent de l'eau à partir de l'O₂, mais qui nécessitent de l'hydrogène dans l'atmosphère de l'emballage (Yildirim et al., 2018). Les deux agents sont utilisés pour réagir avec l'O₂ présent dans l'atmosphère de l'emballage et empêcher l'oxydation rapide que ce gaz produit dans les lipides ou les vitamines des denrées alimentaires (Aishee Dey & Neogi, 2019). En revanche, dans le milieu de la recherche scientifique, les antioxydants les plus intéressants et les plus étudiés sont les piègeurs de radicaux libres (Vilela et al., 2018).

3.2 Agents actifs antimicrobiens

Il existe une grande variété d'agents actifs antimicrobiens qui ont été utilisés pour la recherche sur les emballages alimentaires actifs. Ils peuvent être d'origine naturelle (huiles essentielles ou bactériocines) ou synthétique (nanoparticules métalliques). Certains antimicrobiens, tels que les composés organiques volatils, qui font souvent partie des huiles essentielles ou sont produits par les bactéries, ou le CO₂, qui se forme lors de la respiration cellulaire, peuvent être classés comme naturels, mais sont produits synthétiquement dans l'industrie en raison de leur forte demande.

Les agents actifs antimicrobiens (tableau 9) peuvent être classés en différentes catégories selon Becerril (Becerril et al., 2020). En bref, les acides organiques et leurs sels, tels que l'acide lactique ou l'acétate de sodium ; les bactériocines qui sont principalement produites par les bactéries Gram-positives, telles que la nisine; les enzymes, telles que le lysozyme; les biopolymères ayant une activité antimicrobienne intrinsèque, tels que le chitosane et la pectine; les extraits naturels de plantes, tels que les flavonoïdes ou les phénols, qui peuvent également avoir une activité antioxydante; les huiles essentielles, qui sont un mélange de composés organiques volatils extraits de plantes et d'épices, comme la cannelle ou l'origan; les nanoparticules métalliques (argent ou oxyde de zinc); et enfin, les bactériophages, qui sont des virus qui n'affectent qu'une bactérie spécifique et provoquent sa mort.

Tableau 9. Catégories dans lesquelles les agents actifs antimicrobiens sont divisés. Plusieurs exemples d'agents actifs, certains des microorganismes sensibles, sont nommés (Source: Becerril et al., 2020; Comisión Europea, 2008b; Luís et al., 2021)..

Catégorie	Agents	Microorganismes
Acides organiques et leurs sels	Acide lactique, acétate de sodium, sorbate de potassium, acide citrique	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> .
Bactériocines	Nisine, Sakacine A, Lacticine 3147A	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>
Enzymes	Lysozyme, lactoferrine, glucose oxydase, lactoperoxydase	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Biopolymères	Chitosan, pectine	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
Extraits naturels	Pinosylvine, acide gallique, extrait de thé vert, extrait de propolis	Bactéries lactiques, <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i>
Huiles essentielles	Cannelle, organ, romarin, thym, carvacrol, organ	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cinerea</i> , bactéries lactiques, <i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.
Nanoparticules métalliques	Oxyde de zinc, argent, oxyde de titane	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Bactériophages	IBB-PF7A, vB_EcoMH2W, LISTEX P100	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>

En dehors des catégories d'agents actifs antimicrobiens susmentionnées, l'agent antimicrobien le plus communément disponible dans le commerce est le CO₂, qui est utilisé pour conserver les aliments et empêcher la croissance bactérienne initiale, en raison de sa solubilité dans l'eau et la graisse de l'aliment. (Hansen et al., 2016). Ces contenants actifs libérant du CO₂ sont basés sur l'utilisation de bicarbonate de sodium et d'acide citrique dans des tampons ou des sachets absorbants (Vilela et al., 2018) pour la production de CO₂ sur site. L'éthanol est également utilisé commercialement comme agent antimicrobien à de faibles concentrations (4-12 %) pour empêcher la croissance de microorganismes, tels que les bactéries et les moisissures. Lorsque les aliments sont emballés avec un agent libérant de l'éthanol, l'éthanol est libéré dans l'atmosphère de l'emballage en absorbant l'humidité (de Abreu et al., 2012)..

Les classifications ci-dessus couvrent la plupart des agents actifs antimicrobiens et antioxydants utilisés ou étudiés pour les emballages alimentaires actifs, mais ce ne sont pas les seuls, car il est nécessaire de poursuivre la recherche d'alternatives nouvelles et plus efficaces pour prolonger la durée de conservation des aliments et d'explorer de nouveaux agents actifs qui n'ont pas encore été utilisés pour les emballages alimentaires actifs.

4. Techniques d'incorporation d'agents actifs dans les emballages

L'incorporation d'agents actifs, d'antioxydants ou d'antimicrobiens, dans l'emballage est un processus délicat, car il doit être réalisé de manière à ce que la substance conserve son activité. Il faut donc éviter la dégradation ou l'interaction directe avec l'aliment ou l'atmosphère de l'emballage. Il existe différentes méthodes pour ajouter les agents actifs au matériau d'emballage, les plus courantes étant l'extrusion, le *casting*, l'enrobage, l'inclusion dans des adhésifs, dans des matériaux multicouches ou dans des sachets.

L'extrusion est la technologie préférée de l'industrie, car les emballages alimentaires sont généralement fabriqués en totalité ou en partie à l'aide de cette technologie (Gómez-Estaca et al., 2014). Dans cette technique, l'agent actif est incorporé au polymère fondu à haute température, formant ainsi la matière active

(Bastarrachea et al., 2015). Cette technique présente un sérieux problème pour l'incorporation de nombreux agents actifs utilisés, car, en utilisant des températures élevées pour faire fondre les polymères, il y a un grand risque de dégradation partielle ou totale de l'agent actif, lui faisant perdre son activité antioxydante ou antimicrobienne (Cristina Nerin, 2016). Par conséquent, les agents actifs utilisés doivent être thermiquement stables aux températures utilisées dans le processus d'extrusion (Kuai et al., 2021) et compatibles avec le polymère à extruder.

Bien que cette technique soit généralement utilisée avec des polymères d'origine fossile, elle a également été utilisée pour ajouter des agents antioxydants et antimicrobiens par extrusion à des polymères biodégradables et/ou compostables (tableau 10) (Da Silva et al., 2019; Del Nobile et al., 2009)..

Tableau 10. Exemples de films extrudés contenant des agents antimicrobiens et antioxydants pour l'emballage de produits alimentaires actifs.

Agent actif	Matériau	Fonction	Alimentation	Référence
BHT	LDPE	Antioxydant	Poisson	(Torres-Arreola et al., 2007).
α -Tocophérol	PLA	Antioxydant	Huile de soja	(Manzanarez-López et al., 2011).
Flavonoïdes	EVOH	Antioxydant	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012).
Nisina	PLA	Antimicrobien	Blanc d'œuf	(Jin & Zhang, 2008)
Lysozyme	PCL	Antimicrobien	-	(Del Nobile et al., 2009).
Extrait de Kuntze	PBAT/TPS	Antimicrobien	-	(Da Silva et al., 2019)

Une autre méthode, le *coulage*, consiste à dissoudre le polymère destiné à l'emballage dans un solvant approprié et, en même temps, à incorporer le composé actif d'intérêt. Pour la formation du film actif, la solution avec le

polymère et l'agent actif est déposée sur une surface de manière à ce que le solvant s'évapore, ce qui entraîne la formation d'un film actif. (Suhag et al., 2020). L'avantage de cette méthode par rapport à l'extrusion est qu'il n'y a pas de risque de dégradation du composé actif sous l'action des hautes températures, puisqu'il n'est pas nécessaire de faire fondre le polymère, tandis que l'inconvénient est la nécessité que le polymère et l'agent actif soient solubles dans le même solvant. Pour les emballages alimentaires actifs (tableau 11), il s'agit de la technique la plus couramment utilisée avec des polymères biodégradables tels que la méthylcellulose, l'alcool polyvinylique ou les dérivés de l'amidon, car ils sont solubles dans l'eau (Siemann, 2005).

Tableau 11. Exemples de films *coulés* pour l'emballage d'aliments actifs avec des agents actifs antimicrobiens et antioxydants.

Agent actif	Matériau	Fonction	Alimentation	Référence
Thymol	LDPE/zéine	Antioxydant	Viande bovine	(Park et al., 2012)
Extrait de thé vert	Chitosan	Antioxydant	Saucisses de porc	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Nanofibres de lysozyme	Pululano	Antimicrobien/ Antioxydant	-	(Silva et al., 2018)
LAE	Nanocellulose	Antimicrobien	-	(Silva et al., 2019c)
Huile essentielle de girofle	Protéines de soja	Antimicrobien	Thon	(Echeverría et al., 2018)

La méthode d'enrobage incorpore les agents actifs qui ne tolèrent pas les températures élevées qui se produisent pendant l'extrusion, ou qui sont incompatibles avec le polymère ou le solvant utilisé pour leur dissolution. (Appendini & Hotchkiss, 2002).. Dans cette méthode d'incorporation, l'agent actif est dissous dans une solution de polymère compatible qui est étalée sur le matériau d'emballage. Le solvant est ensuite évaporé et un film contenant l'agent actif est formé (Baldev et al., 2011). Cette technique permet une libération

contrôlée de l'agent actif ou son immobilisation dans le matériau d'emballage polymère (tableau 12).

Tableau 12. Exemples de matériaux contenant des agents actifs antimicrobiens et antioxydants fabriqués par enduction pour l'emballage d'aliments actifs.

Agent actif	Matériau	Fonction	Alimentation	Référence
Oléorésine de romarin	Film PET	Antioxydant	Porc	(Song et al., 2020)
Extrait d'origan	Film PP	Antioxydant	Viande bovine	(Cristina Nerin et al., 2006).
Nanoparticules de sélénium	PET/LDPE multicouche	Antioxydant	-	(Vera et al., 2016)
Pinosilvina	Coussin en cellulose/PP	Antimicrobien	Poulet	(F. Silva et al., 2018)
Huile essentielle de cannelle	Multicouche PET/Aluminium/PE	Antimicrobien	Sauce tomate	(Gherardi et al., 2016).

Dans le cas des sachets, l'agent actif est placé à l'intérieur du sachet, puis le sachet actif est placé à l'intérieur de l'emballage avec l'aliment. Leur grand avantage est qu'ils n'ont pas besoin d'être incorporés de quelque manière que ce soit dans le matériau d'emballage et qu'ils peuvent facilement interagir avec l'atmosphère de l'emballage. Au niveau commercial, ces sachets sont couramment utilisés comme absorbeurs d'éthylène (permanganate de potassium ou zéolithes) (Soltani Firouz et al., 2021) ou d'adsorbants d'oxygène (oxyde de fer II) (Cichello, 2015). Récemment, l'utilisation des sachets a été étendue à d'autres fonctions, notamment antimicrobiennes, grâce à l'incorporation et à la libération ultérieure de composés volatils aux activités antimicrobiennes connues, tels que l'éthanol et les huiles essentielles (tableau 13), contre les microorganismes alimentaires, qu'ils soient responsables de l'altération ou pathogènes (Otoni et al., 2016).

Tableau 13. Exemples d'agents actifs antimicrobiens et antioxydants dans les sachets destinés à l'emballage d'aliments actifs.

Agent actif	Fonction	Alimentation	Référence
Huile essentielle d'ail	Antimicrobien	Tomate	(Ayala-Zavala & González-Aguilar, 2010)
Huile essentielle d'origan	Antimicrobien	Pain en tranches	(Passarinho et al., 2014).
Anetol	Antimicrobien/ antioxydant	Laitue	(Wieczysłowska & Cavoski, 2018)
Huile essentielle de romarin	Antimicrobien	Fromage	(Han et al., 2014).
Éthanol	Antimicrobien	Pain en tranches	(Latou et al., 2010)

5. Nouvelles tendances en matière d'emballage alimentaire

Face à la pollution plastique de plus en plus préoccupante dans les emballages alimentaires actifs, la tendance est de privilégier l'utilisation de polymères biodégradables afin de réduire la dépendance actuelle à l'égard du plastique, car il s'agit d'un grave problème de pollution mondiale, en particulier dans les océans, où son impact est le plus important. La quantité de plastique dans les océans est estimée entre 75 et 199 millions de tonnes et devrait doubler d'ici 2030, ce qui affectera grandement les côtes et la faune marine (UNEP, 2021b). Par conséquent, le développement d'emballages biodégradables et/ou compostables est une priorité pour réduire ce problème environnemental, car les emballages produisent environ 60 % des déchets plastiques dans l'UE, principalement par le biais de plastiques à usage unique (Comisión Europea, 2018). Ces nouveaux matériaux plastiques biodégradables (tableau 14) peuvent être biosourcés, c'est-à-dire issus de la biomasse comme l'acide polylactique (PLA) ou la carboxyméthylcellulose (CMC), ou issus de ressources fossiles comme le polyvinylalcool (PVA) (FAO, 2021).

Tableau 14. Différents types de bioplastiques indiquant s'ils sont biosourcés et biodégradables (Source: Singh et al., 2022)

Bioplastique	Biologique	Biodégradable
PLA	Oui	Oui
Polyhydroxyalcanoate (PHA)	Oui	Oui
Polyhydroxybutyrate (PHB)	Oui	Oui
CMC et dérivés de la cellulose	Oui	Oui
PVA	Non	Oui
Biopolypropylène (Bio-PP)	Oui	Non
Succinate de polybutylène (PBS)	Non	Oui
Polycaprolactone (PCL)	Non	Oui
Téréphtalate de biopliéthylène (Bio-PET)	Oui	Non

5.1 Polymères biodégradables pour l'emballage alimentaire

Les polymères biodégradables sont des polymères qui, à la fin de leur vie utile, se dégradent complètement en CO₂ et en eau. Cette dégradation est principalement déclenchée par l'activité biologique, de sorte que le matériau doit pouvoir être assimilé par des microorganismes (principalement des bactéries et des champignons) (Hann et al., 2020). Il s'agit d'une caractéristique fondamentale des plastiques, car elle détermine s'ils persisteront et s'accumuleront dans l'environnement ou non. En outre, l'échelle de temps sur laquelle la dégradation se produit doit être suffisamment courte pour ne pas nuire aux écosystèmes et à la faune (Comisión Europea, 2022).

Les polymères biodégradables comprennent des polymères compostables qui peuvent également se dégrader, mais uniquement dans certaines conditions de température et d'humidité élevées. Ce processus est donc généralement réalisé au niveau industriel, où il est plus facile de contrôler et d'obtenir les conditions nécessaires. Dans certains cas, ce processus peut également être réalisé dans les ménages, ce qui permet d'obtenir du compost, qui peut être utilisé comme engrais pour l'agriculture. (FAO, 2021). Certains polymères biodégradables ou compostables actuellement utilisés pour remplacer les plastiques habituels dans les matériaux d'emballage alimentaire sont le PLA, le CMC ou le PVA.

Tout d'abord, la carboxyméthylcellulose (CMC) est un polysaccharide linéaire anionique dérivé de la cellulose et soluble dans l'eau. La cellulose est le polymère renouvelable et biodégradable le plus abondant sur terre et présente plusieurs avantages tels que son faible coût, sa faible densité, sa polyvalence et sa sécurité. (K. Huang & Wang, 2022). ce qui fait de la CMC un excellent produit durable et une option peu coûteuse pour le développement de films biodégradables pour l'emballage alimentaire. Malgré ses faibles propriétés de barrière à la vapeur d'eau en raison de son hydrophilie (He et al. (He et al., 2021) La CMC est actuellement l'un des dérivés de la cellulose les plus couramment utilisés dans la préparation des films, car lorsqu'elle est réticulée avec de l'acide citrique, elle augmente sa résistance à l'eau et diminue sa capacité de gonflement (Dashipour et al., 2015 ; Kanatt & Makwana, 2020 ; Tongdeesoontorn et al., 2011). La CMC a été utilisée pour développer des emballages alimentaires antimicrobiens et/ou antioxydants actifs par *casting*, à la fois seule et en combinaison avec d'autres polymères (tableau 15).

Tableau 15. Exemples d'emballages antimicrobiens et antioxydants utilisant des films à base de CMC.

Agent actif	Matériau	Fonction	Référence
Extrait de feuille de thym	CMC/alginat de sodium	Antimicrobien/antioxydant	(Abdin et al., 2023)
Nanoparticules de ZnO	CMC/PVA	Antimicrobien	(Helmiyati et al., 2021).
<i>Zataria multiflora</i> huile essentielle	CMC	Antimicrobien/antioxydant	(Dashipour et al., 2015)
Huile essentielle d'eucalyptus	CMC	Antimicrobien	(Simsek et al., 2020)
Huile essentielle de sarriette	CMC/agar	Antimicrobien	(Abdollahi et al., 2019)

L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère synthétique, produit par l'hydrolyse de l'acétate de polyvinyle soluble dans l'eau, qui possède d'excellentes propriétés physiques telles que la viscosité, la capacité de formation de films et d'émulsions, l'adhésivité et la flexibilité (Nagarkar & Patel, 2019). Il s'agit d'un polymère largement utilisé dans l'industrie, ce qui a entraîné le rejet de grandes quantités de PVA dans les systèmes d'eau chaque année, en particulier dans les usines de papier et de textile. Le PVA n'est pas toxique pour les organismes, bien qu'il puisse entraîner la formation de mousse et empêcher la récupération de l'oxygène dans l'eau (Kawai & Hu, 2009) s'il n'est pas dégradé par les bactéries (Kanatt & Makwana, 2020). Son utilisation pour des emballages actifs antimicrobiens a été étudiée avec des huiles essentielles (C. Han et al., 2014) et avec des LAE (Haghighi et al., 2020). Bien que le PVA seul n'ait pas de bonnes propriétés de barrière à l'humidité en raison de sa solubilité (Nguyen & Lee, 2022) Les revêtements à base de PVA peuvent être utilisés pour améliorer les propriétés de barrière à l'humidité des films plastiques (Chandio et al., 2021) ou du papier (Shen et al., 2021).

Enfin, l'acide polylactique (PLA) est un biopolymère obtenu par fermentation des hydrates de carbone de l'amidon et peut être obtenu à partir de monomères d'acide L-lactique ou D-lactique qui se polymérisent ensuite pour former respectivement le P(L)LA ou le P(D)LA. Le ratio des unités monomères L ou D affecte certaines des propriétés macromoléculaires clés telles que le degré de cristallinité, la température de fusion et la facilité de transformation, le P(L)LA étant le plus utilisé commercialement (Gan & Chow, 2018; Gumienna & Górna, 2021).. Les propriétés du PLA comprennent une résistance mécanique élevée, une excellente thermoformabilité, sa biocompatibilité et sa compostabilité. Cependant, ses propriétés de barrière à la vapeur d'eau et à l'oxygène sont médiocres (Mohan & Panneerselvam, 2022). Le PLA est souvent utilisé dans les emballages alimentaires actifs, dans des films avec des revêtements où les agents actifs sont incorporés (Benbettaieb et al., 2023; Munteanu et al., 2018) ou en ajoutant les agents actifs directement au polymère (Jin & Zhang, 2008; Videira-Quintela et al., 2022) pour la formation de films actifs par extrusion ou par coulée.

INTRODUCTION

1. Food insecurity: spoilage and pathogenicity.

Food is subject to physical, chemical and biological deterioration, which affects its quality and the food security of the population. Ensuring food security is therefore a vital objective to ensure that all people have physical and economic access to safe and nutritious food (FAO, 2019). Failure to do so leads to food insecurity, which results, among other things, in high food losses and food waste. It is therefore necessary to differentiate between food loss and food waste, as they occur at different stages. Food loss, which currently accounts for 14% of all food produced globally, is a major cause of food insecurity (FAO, 2019) that takes place in post-harvest or slaughterhouses, as well as during processing and storage until it is sold to the consumer. On the other hand, food waste occurs in households, food services and retail, and is estimated at 100 kg/person/year, which corresponds to 17% of the global food production (UNEP, 2021).. This causes millions of people to suffer from disease, malnutrition or famine, which can lead to premature death. For example, according to the latest available FAO data, in 2021, around 2.3 billion people in the world were moderately or severely food insecure (Figure 1). Africa is the most food insecure continent, with 58% of its population suffering from moderate or severe food insecurity. At the other extreme are Europe and North America, where food insecurity affects only 8 percent of the population (FAO, 2022).

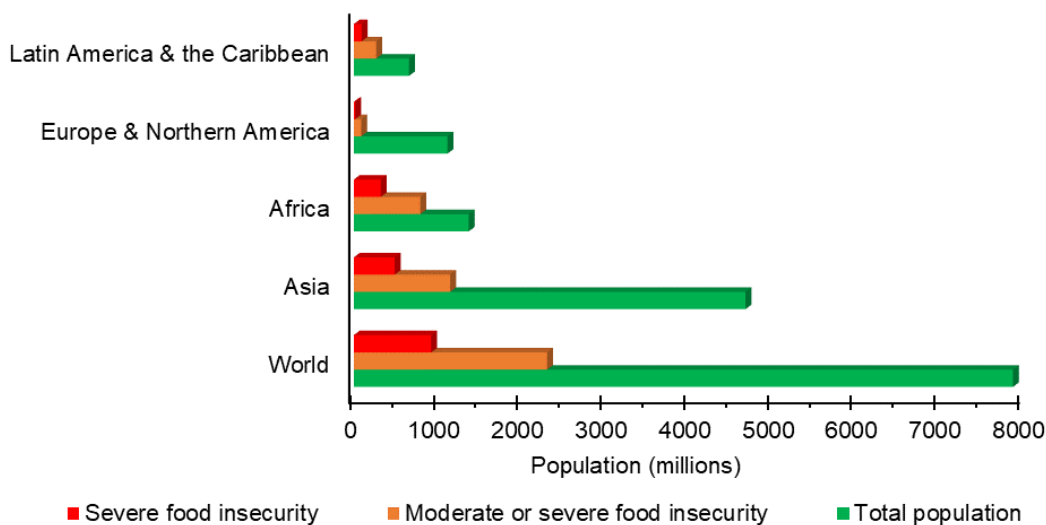


Figure 1. Global food insecurity in 2021 (FAO, 2022).

An important factor in food security is the consumption of fruit and vegetables (F&V), as they are an important source of nutrients. According to the FAO, an F&V consumption of 400 g/day could prevent up to 4 million premature deaths in the world today associated with lack of F&V consumption (FAO, 2021). To address this situation, it is necessary to reduce losses and wastage of F&V by extending their shelf life, as they are highly perishable due to three main causes: early maturing (Pech et al., 2012), the presence of moulds and contaminating bacteria (Giannakourou & Tsironi, 2021; Moss, 2008) and mechanical wounds caused during processing (Yousuf et al., 2017). It is estimated that approximately one-third of F&V is lost before it reaches consumers (Ahmad & Siddiqui, 2015). This implies that reducing post-harvest losses and wastage of F&V would help increase their consumption and contribute to a possible reduction of health problems associated with their non-consumption.

Another important factor in food safety is foodborne disease-causing microorganisms, as the World Health Organization (WHO) estimates that the annual global burden of foodborne diseases exceeds 600 million cases, with nearly 420,000 deaths and 33 million years of life lost (WHO, 2015). These pathogenic microorganisms are particularly dangerous in *ready-to-eat* (RTE) foods, as these foods do not receive any heat treatment prior to consumption that can eliminate pathogenic contaminating microorganisms such as bacteria, moulds, parasites or the toxins produced by them. The ingestion of food contaminated with pathogenic microorganisms or their toxins is the main cause of the high number of deaths mentioned above (WHO, 2015). It is for this reason that food safety is an issue of utmost importance in public health, ensuring that the food consumed is safe in a world whose population continues to grow.

1.1 Microorganisms contaminating foodstuffs

As mentioned above, contaminations by microorganisms, such as moulds and bacteria, play a very important role in food safety, especially in the case of F&V and RTE foods, as they pose a great risk to human health, in the case of pathogenic and toxin-producing microorganisms, and cause high food losses and food waste, in the case of spoilage-causing microorganisms (Sperber & Doyle, 2009). These contaminations can occur at any time during harvest or post-

harvest, such as production, storage or distribution of the food, and are very difficult to eliminate once they have occurred.

Table 1. Some pathogenic microorganisms and food toxins causing foodborne diseases. Estimated number of infections and deaths caused in 2010 according to WHO. Adapted from WHO, 2015.

Danger	Disease	Food-borne infections	No. of deaths
Virus			
Hepatitis A (HAV)	Hepatitis	13 709 836	27 731
Norovirus	Gastroenteritis	124 803 946	34 929
Bacteria			
<i>Campylobacter</i> spp	Gastroenteritis	95 613 970	21 374
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis	86 502 735	26 170
Verotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis/haemolytic uraemic syndrome	1 176 854	128
Non-typhoidal <i>Salmonella enterica</i>	Salmonellosis	78 707 591	59 153
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera	763 451	24 649
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	14 169	3 175
Protozoa			
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	10 280 089	684
Cestodes			
<i>Taenia solium</i>	Taeniasis	370 710	28 114
Toxins			
Aflatoxin	Aflatoxicosis	21 757	19 455

1.1.1 Moulds

On F&V, moulds are the most important microorganisms involved in their deterioration (Table 2). Moulds grow on the surface of F&V, as these are rich in carbohydrates and other nutrients that make them a perfect culture medium for their growth, some of the most common being *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Botrytis* spp. Contamination of F&V with moulds causes large losses, both pre-harvest and post-harvest, resulting in the loss and waste of these foods in households and shops (Alegbeleye et al., 2022). Furthermore, the consumption of food contaminated with moulds can lead to serious food poisoning as some of them produce toxins dangerous to humans or F&V, designated mycotoxins, such as *Aspergillus* spp. (ochratoxin A) and *Penicillium* spp. (Moss, 2008).

Table 2. Contaminating moulds on fruit and vegetables and resulting infections. (Source: Alegbeleye et al., 2022.)

Mould	Infection	Affected fruits or vegetables
<i>Botrytis cinerea</i>	Grey rot	Strawberry, kiwi, grapes, pear, peach, cherry, plum, other pectin-rich fruits, lettuce, pulses, asparagus, pumpkin, leafy cruciferous vegetables
<i>Aspergillus niger</i>	Black mould	Grape, apricot, onion, onion, peanut, citrus, apple, pear, strawberry
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Black rot	Onion and garlic
<i>Penicillium expansum</i>	Blue mould	Pear, apple and pectin-rich fruits
<i>Penicillium italicum</i>	Blue rot	Citrus fruit
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Soft rot	Raspberries, blackberries, potato, cabbage
<i>Alternaria tenuis</i>	Alternaria rot	Cucurbitaceae, tomato, pepper
<i>Fusarium</i> spp.	Brown rot	Potato, citrus, pineapple

Among the *Aspergillus* species, *A. niger* is by far the most responsible for food spoilage and food loss, as it can contaminate F&V at different stages including pre-harvest, harvest, processing or handling (Perrone et al., 2007). *A. niger* is characterised as the cause of the black mould that appears on the surface of F&V and contaminates mainly fresh fruit, including peaches, apples and tomatoes, but also cereals and some vegetables. This mould has a global distribution and is most commonly found in temperate climates, both on the surface of crops and in stored foods (Plascencia-Jatomea et al., 2014). In terms of mycotoxin production, most *A. niger* strains do not produce mycotoxins, with only 10 % of strains capable of producing ochratoxin A under ideal conditions of temperature and humidity (Pitt & Hocking, 2009). This toxin has nephrotoxic and carcinogenic properties and can remain in the human body for up to 18 days (Moss, 2008).. The European Food Safety Authority (EFSA) establishes a tolerable weekly intake limit for this mycotoxin of 120 ng/kg body weight (EFSA, 2006)) and the EU sets an upper limit of 2 µg/kg in processed fruits and juices (Comisión Europea, 2006). Ochratoxin A is stable up to 200 °C (Vidal et al., 2015) which makes it difficult to destroy it in the usual heat treatments that foodstuffs undergo, and which do not usually occur in F&V, so it is very important to avoid its production by *Aspergillus* spp. since it is very difficult to eliminate once it is produced.

Among the *Penicillium* species, *Penicillium expansum* is the most important species within the genus. This species is responsible for the blue mould that contaminates a wide range of fruits such as apples, pears, peaches, avocados or strawberries. Symptoms of the disease on fruit initially appear as soft, watery, light brown lesions and, as the lesion ages, the conidia turn blue-green (Errampalli, 2014). *P. expansum* is the main producer of patulin (Moss 2008), a mycotoxin commonly found in processed apple products such as juices or compotes (Patriarca, 2019). Human exposure to patulin can cause gastrointestinal problems such as vomiting or ulcers (Salomão, 2018). (Salomão, 2018) and its ingestion is also associated with liver and kidney damage and immunosuppressive effects (Saleh & Goktepe, 2019). The WHO sets a tolerable weekly intake limit for patulin at 0.4 µg/kg body weight (WHO, 1995) and the EU sets an upper limit between 50 and 10 µg/kg in processed fruits and juices

(Comisión Europea, 2006). This mycotoxin is stable up to 120 °C making it, similarly to ochratoxin A, also difficult to eliminate (Diao et al., 2021) in F&V.

Another of the main moulds causing fungal contamination in F&V is *Botrytis cinerea*, the mould that causes grey rot in foodstuffs. *B. cinerea* has the ability to infect more than 200 plant species and is considered to be one of the most economically damaging moulds worldwide, with more than one billion euros spent on its control every year (Dean et al., 2012).. This mould has the ability to contaminate a wide variety of F&V, with high incidence in strawberries and grapes, whose contamination symptoms can be observed at any time during the shelf life of the food from pre-harvest to post-harvest (Hua et al., 2018; Moss, 2008). Infection starts from natural openings or mechanical wounds that occur in the fruit. At the beginning of infections, a darker circular area is observed where fruit tissues are softer and from which abundant sporulation can develop (Romanazzi & Feliziani, 2014). One of the sectors where *B. cinerea* has a major impact is in wine production, affecting its organoleptic properties due to the accumulation of undesirable metabolites with bad odours in grapes and affecting the aromatic quality of the wine. However, under certain controlled infection conditions, the so-called noble rot is produced, resulting in high quality wines. (Lovato et al., 2019).

1.1.2 Bacteria

In the case of pathogenic bacteria and/or their toxins, these often cause foodborne disease outbreaks due to contamination of food by human and zoonotic pathogens, such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* or verotoxigenic *Escherichia coli* (Shiga toxin-producing strains of *E. coli*). (Gurtler et al., 2014). These contaminations are particularly dangerous in ready-to-eat (RTE) foods, i.e. foods that will not undergo any sterilisation treatment prior to consumption, such as sausages, pre-prepared convenience salads or cured ham.

One of the most dangerous contaminating bacteria that can be found in these RTE foods is *L. monocytogenes*, a Gram-positive, facultative anaerobic, psychrotrophic bacillus with peritrichous flagella and the ability to form biofilms (FAO/WHO, 2004). One of the most dangerous serotypes of *L. monocytogenes*

is 1/2c which is frequently found in the meat processing industry (Alía et al., 2020a). This bacterium is responsible for causing one of the most dangerous bacterial infections, listeriosis, which has a high mortality rate (13.7% in 2021) compared to other food-borne pathogens, especially in pregnant women, elderly and immunocompromised people (EFSA, 2022). Symptoms of the disease include fever, muscle aches, septicaemia and meningitis. Additionally, in pregnant women, it can even cause miscarriages and in low birth weight infants, septicaemia or meningitis. (WHO, 2018b). Microbiological cross-contamination is the main problem when it comes to *L. monocytogenes* contamination, as it can occur through direct contact with contaminated staff, aerosols, utensils and equipment, especially during the deboning, pressing and cutting stages of foods such as cured ham or fresh-cut salads (AECOSAN, 2015; Alía et al., 2020b). According to data provided by EFSA (Table 3), in 2021, the prevalence of *L. monocytogenes* in RTE foods from fish was 4.7%, from F&V was 3%, from pork was 2.7% and from milk or milk products was 0.54% (EFSA, 2022). In addition, in the same year, there were 23 foodborne outbreaks associated with meat and fish products contaminated with *L. monocytogenes* resulting in 12 deaths in the EU.

Another relevant food-borne pathogenic bacterium is *E. coli*, a Gram-negative bacillus-like bacterium of the Enterobacteriaceae family, commonly found in the gastrointestinal tract of humans and animals. This bacterium is facultatively anaerobic, motile by peritrichous flagella and does not form spores. Most strains of *E. coli* are harmless, but verotoxigenic strains produce Shiga toxins, with *E. coli* O157:H7 being one of the major serotypes producing this toxin (WHO, 2018a). Ruminant livestock, especially cattle, are the natural reservoir of verotoxigenic *E. coli* and infection can occur through ingestion of undercooked meat or through cross-contamination (Bryan et al., 2015) as in the case of *L. monocytogenes*. Human infection with verotoxigenic *E. coli* can cause haemolytic uraemic syndrome (HUS), which is characterised by acute renal failure, microangiopathic haemolytic anaemia and thrombocytopenia (Gyles, 2007). The mortality caused by verotoxigenic *E. coli* in reported cases in the European Union is 0.4% (EFSA, 2022).

The prevalence of verotoxigenic *E. coli* in RTE foods is 1.6 % in meat products, 1.7 % in milk and milk products and 0.5 % in F&V (EFSA, 2022) (Table 3). According to EFSA data, in 2021, 31 foodborne outbreaks of this bacterium occurred in the EU associated with the ingestion of beef, milk and vegetables.

One of the most common genera of food pathogens is *Salmonella* spp., Gram-negative and facultative anaerobic bacilli that are motile due to the presence of flagella. (FAO/WHO, 2002). Among the *Salmonella* subspecies and serotypes, *S. enterica* subsp *enterica* serotype Typhimurium is one of the main causes of foodborne infections in humans, generally referred to as Salmonellosis (EFSA, 2022). Infection caused by *Salmonella* spp. is characterised by fever, abdominal pain, diarrhoea and vomiting. In most cases, the symptoms are relatively mild. However, in some cases, particularly in children and the elderly, dehydration caused by the disease can be severe and life-threatening (WHO, 2018c). Mortality in the European Union is 0.18% (EFSA, 2022) in reported cases. *Salmonella* spp. is responsible for the bulk of food outbreaks in the EU, in 2021 alone (Table 3) there were 773 food outbreaks, mainly associated with the consumption of eggs or egg products, resulting in 1123 hospitalisations and one death. *Salmonella* cross-contaminations usually occur during food production or through contact with faecal water, also through consumption of insufficiently cooked foods (Carrasco et al., 2012). The prevalence of *Salmonella* in RTE foods is 0.82% in pork and pork products, 0.72% in spices and herbs, 0.39% in fish and fish products and 0.32% in other meats (EFSA, 2022).

Table 1. Main TEN food contaminating microorganisms and the outbreaks, illnesses and deaths they caused in the European Union in 2021 according to data collected by EFSA (EFSA, 2022).

Genus/species	Outbreaks	No. diseases	Deaths	Prevalence in RTE food
<i>Campylobacter</i>	249	127 840	26	Meat and meat products (0,24 %), milk and milk products (0,11 %), salads (0,27 %), other processed (1,3 %)
<i>Salmonella</i>	773	60 050	71	Meat and meat products (0,44 %), milk and milk products (0,1 %), fish and fish products (0,39 %), spices (0,72 %), salads (0,05 %), other processed (0,18 %)
<i>L. monocytogenes</i>	23	2 183	196	Meat and meat products (2.3%), milk and milk products (0.51%), fish and fish products (4.7%), fruits, vegetables and juices (3%).
Verotoxigenic <i>E. coli</i>	31	6 084	18	Meat and meat products (1.6 %), milk and milk products (1.7 %), bakery products (6.3 %), fruits, vegetables and juices (0.52 %), spices (0.34 %).
<i>Yersinia</i>	21	508	0	Meat and meat products (1,3 %)
<i>B. cereus</i>	87	679	1	-

Finally, there is *Bacillus cereus*, a Gram-positive, sporulating, aerobic and motile bacillus that produces two types of food-borne toxicosis in humans, the emetic form and the diarrhoeal form (ANSES, 2021). The emetic infection is caused by the cereulide toxin which causes vomiting after ingestion, while the diarrhoeal infection is caused by an enterotoxin which causes abdominal pain and diarrhoea (EFSA, 2016b; Granum & Lund, 1997). In the EU, 87 foodborne outbreaks caused by *B. cereus* toxins mainly associated with the consumption of pork, fish, cereals and their derivatives occurred in 2021. This bacterium is widespread in the environment and as a result, various foods such as vegetables, raw milk,

spices and RTE foods are contaminated with *B. cereus* spores with some frequency, as its spores cause cross-contamination very easily (Stenfors Arnesen et al., 2008).

1.2 Oxidation of food

The presence of an oxygen-rich atmosphere or reactive oxygen species (ROS) inside the packaging is one of the most important factors in the spoilage of a food, as an oxidation process of the food can take place, leading to a rapid deterioration of the food. This process has negative consequences for the food, both nutritionally and organoleptically. Nutritional changes occur due to the destruction of fatty acids, proteins and fat-soluble vitamins (A, D, E and K), among others (Tian et al., 2013). In terms of organoleptic alterations, oxidation causes bad tastes and odours, colour changes and loss of flavour that cause consumer rejection. In addition, oxidation can produce compounds that are dangerous for humans and have been linked to inflammatory and carcinogenic processes (Silva et al., 2019a). Ultimately, oxidation reduces the shelf life of foodstuffs (Nerín et al., 2008) increasing food insecurity.

In the specific case of F&V, the ripening and deterioration processes include phytohormones such as ethylene, oxidative enzymes and ROS (Table 4). The latter play a very important role in ripening and accelerate the chemical process of F&V deterioration, as their uncontrolled production causes oxidative stress in F&V cells, leading to oxidation of lipids and proteins and to a softening of F&V (Hossain et al., 2020). ROS are a set of molecules composed of singlet oxygen (O^1_2), superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^\bullet) (Meitha et al., 2020). ROS production occurs naturally in the mitochondria and chloroplasts of F&V (Muñoz & Munné-Bosch, 2018) but it is usually counteracted by the fruit's own antioxidant enzymes, unless an oxidative stress, such as a bruise or a cut, occurs, and the consequent overproduction of ROS (Wu et al., 2019).

Table 2. Main compounds causing F&V ripening and senescence. Adapted from Hossain et al., 2020 and Peng et al., 2022.

Compounds	Effect on F&V
Ethylene	Maturation, softening
Absciscic acid	Ethylene regulator
ROS	Softening, oxidation of lipids and proteins
Polyphenol oxidase	Browning, oxidation of phenols
Peroxidase	Browning, phenol oxidation, production of ROS

OH radicals* are the most important ROS in F&V oxidation, as it is the most reactive species of all, as it can react with almost any compound in its environment and generate new radicals (Richards et al., 2015). Additionally, this ROS has an unpaired pair of electrons that can react with oxygen in the ground state. Furthermore, OH radicals* can also interact with all biological molecules and cause cellular damage in lipids, proteins and membranes (Meitha et al., 2020).

ROS production increases especially in fresh-cut fruit due to the injuries caused by mechanical cutting leading to an increase in the rate of mitochondrial respiration and subsequently to an increase in ROS (Rojas-Graü et al., 2009). These ROS can lead to the oxidation of lipids and proteins causing severe damage to mitochondria (Tian et al., 2013) and causing significant changes in the taste, aroma, colour, texture and surface of fruits allowing them to be easily infected by moulds (Huan et al., 2016). Inside a closed container, ROS are concentrated and their detrimental effects on fruit quality develop more rapidly, thus accelerating spoilage and decreasing consumer acceptability (Montero-Prado et al., 2011).

In short, both the growth of pathogenic or spoilage-causing microorganisms and oxidation processes in packaged foods are responsible for food insecurity and

food waste, so it is necessary to control these two parameters in order to increase food safety and also to extend the shelf life of foodstuffs. This process control can be achieved by adding antioxidant and/or antimicrobial active agents to the packaging itself, which is called active packaging.

2. Active food packaging

Packaging is necessary to preserve the quality of food during storage, transport and sale before consumption, and is a very important part of food safety. Furthermore, the development of new food packaging capable of interacting with the food could reduce food insecurity, for example by eliminating pathogenic or spoilage-causing microorganisms or by reducing oxidative damage to the packaged product and thus increasing the shelf life of the food. To these new packaging (Nerin et al., 2017) are referred to as active packaging, and focus on the control of chemical and biological spoilage processes of packaged food. In the EU, active packaging must be accepted by EFSA and meet a number of requirements in the European legislation (Comisión Europea, 2009). The active packaging must be suitable and effective for its intended use; it must not release any component into the food in sufficient quantity to endanger human health or cause an unacceptable change in the composition, taste or odour of the food; and it must not mislead consumers through its labelling, presentation or advertising material.

Active packaging can be defined as packaging containing added substances, designated as active agents, which may perform functions such as antimicrobial, antioxidant, ethylene absorbing or moisture removing, and which actively interact with the packaging atmosphere or the food to prevent oxidation, microbial growth or other processes responsible for spoilage of the packaged food, thus prolonging its shelf life and quality (Nerín, 2010). To achieve this objective, active agents capable of controlling undesirable substances in the atmosphere of the packaging or in the packaged food must be added to the packaging material (de (de Abreu et al., 2012). For example, in the case of ethylene or moisture (Table 5), absorbent active agents are added to the packaging that are able to remove these compounds from the packaging atmosphere and extend the shelf life of the food. In the case of ethylene absorbers, a phytohormone that causes the ripening

of F&V and its consequent deterioration, active agents capable of absorbing or reacting with this gas are used. (Wyrwa & Barska, 2017). To control ethylene, mainly absorbent active packaging or scavengers based on potassium permanganate or palladium are used. In the case of moisture, it causes changes in the texture of the food and promotes the growth of microorganisms (Luís et al., 2021) and therefore needs to be removed. For this purpose, one of the most commonly used active packaging is the incorporation of pads with high absorbent capacity to remove liquids, or hygroscopic active agents such as silica gel that is added in sachets to the inside of the package (de Abreu et al., 2012).

Table 3. Examples of food packaging active against ethylene and moisture. Adapted from Gaikwad et al., 2019, 2020.

Type of packaging	Active agent	Reference or trade name
ETHYLENE	Sachet	Potassium permanganate Air Repair™
	Sachet	Potassium permanganate impregnated natural clays BEfresh™
	Sachet	Sepiolite mixed with potassium permanganate and activated carbon KEEPCOOL™
	Chitosan film	TiO ₂ (Kaewklin et al., 2018)
	LDPE film	Haloisite nanotube (Tas et al., 2017)
HUMIDITY	Sachet	Silica gel (Murmu & Mishra, 2018)
	Agar film	Sodium carbonate/sodium glycinate (Wang et al., 2015)
	LDPE tray	Hygroscopic sodium salt (Rux et al., 2016)

Despite the various functionalities of active food packaging, currently the most interesting ones in industry and research are antioxidant and antimicrobial, as they focus on preventing oxidation processes and the growth of harmful microorganisms, respectively, which are responsible for a great deal of food insecurity worldwide.

2.1 Antioxidant active packaging

Antioxidant packaging is based on the incorporation of antioxidant active agents in the packaging as a way to improve the stability of packaged foods susceptible to oxidation (Gómez-Estaca et al., 2014). This is because a high level of oxygen or ROS reduces the nutritional value of foods, alters their organoleptic properties and, consequently, their shelf life, as it accelerates the spoilage of many foods, the degradation of vitamins and fatty acids or favours microbial growth (Soltani Firouz et al., 2021). The function of antioxidant packaging is approached in two different ways: the removal of oxidising substances from the packaging atmosphere, such as ROS or oxygen or the release of antioxidant substances from the packaging (Nerín, 2010).

Antioxidant active packaging has active agents that may be immobilised in the packaging material and react with the packaging atmosphere or be released inside and act directly on the food (Table 6), as in the case of essential oils (Azevedo et al., 2022). Antioxidants can be added to the packaging material in several ways: in the adhesive between films forming a multilayer, as in the case of selenium nanoparticles (Vera et al., 2016) directly into the packaging material by extrusion, in the case of flavonoids (López-de-Dicastillo et al., 2012) or as a *coating on the packaging* material, as in the case of rosemary oleoresins (Song et al., 2020). One of the most commercialised antioxidant active packaging worldwide are oxygen absorbing sachets based on the use of Fe(II) salts as active agents to remove oxygen present in the packaging atmosphere (Aishee Dey & Neogi, 2019).

Table 4. Antioxidant active agents in different types of films for active food packaging.

Active agent	Material	Food	Reference
BHT	Low density polyethylene (LDPE) (extrusion)	Fish	(Torres-Arreola et al., 2007).
α -Tocopherol	Polylactic acid (PLA) (extrusion)	Soybean oil	(Manzanarez-López et al., 2011)
Thymol	LDPE/zein (liner)	Beef and veal	(Park et al., 2012)
Green tea extract	Chitosan (casting)	Pork sausages	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Oregano extract	Polypropylene (PP) (extrusion)	Beef and veal	(Nerín et al., 2006)
Selenium nanoparticles	Polyethylene terephthalate (PET)/LDPE (liner)	-	(Vera et al., 2016)
Rosemary oleoresin	PET (coating)	Pork	(Song et al., 2020)
Flavonoids	Ethylene vinyl alcohol (EVOH) (extrusion)	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012).

2.2 Antimicrobial active packaging

Antimicrobial active packaging is packaging that releases antibacterial or antifungal agents, e.g. to inhibit or control the growth of contaminating microorganisms causing food spoilage, preventing or delaying the resulting spoilage, and thereby increasing the shelf life of the packaged food (Vermeiren et al., 1999; Wyrwa & Barska, 2017). This type of packaging also helps to control or eliminate pathogenic microorganisms that could pose a health risk to consumers. The protective action of most of these materials is based on the release of volatile or non-volatile antimicrobial substances from the packaging material to the food, by direct contact between the food and the packaging or by

the release of the antimicrobial to the atmosphere surrounding the food (Gherardi et al., 2016).

Antimicrobial active packaging systems generally use: essential oils (oregano), enzymes (lysozyme), bacteriocins (nisin), antimicrobial polymers (chitosan) or organic acids (lactic acid) (Becerril et al., 2020) (Table 7), among others. These substances can be of natural origin, such as those mentioned above, or of synthetic origin, such as ethyl lauroyl arginate (LAE) (Becerril et al., 2013) or silver nanoparticles (AgNP) (dos Santos et al., 2020).

Table 5. Examples of antimicrobial agents incorporated into different polymers for active food packaging.

Active agent	Material	Food	Reference
Lysozyme nanofibres	Pululan films (<i>casting</i>)	-	(Silva et al., 2018)
Nisina	Polyhydroxybutyrate (PHB)/polycaprolactone (PCL) films (<i>compression moulding</i>)	Ham	(Correa et al., 2017)
Clove essential oil	Soy protein films (<i>casting</i>)	Tuna fillet	(Echeverría et al., 2018).
Lactoferrin	Bacterial cellulose films (<i>casting</i>)	Fresh sausages	(Padrão et al., 2016)
LAE	EVOH Films (<i>casting</i>)	-	(Muriel-Galet et al., 2012)
LAE	Nanocellulose films (<i>casting</i>)	-	(Silva, 2019c)
Pinosilvyn	PP/cellulose pads (<i>coating</i>)	Chicken	(F. Silva et al., 2018)

3. Active agents

As has been observed above, active agents are the fundamental component of an active packaging, as they are the compounds that will be responsible for the functionality of the packaging on the food. In order to be used in food packaging, active agents must be approved as food additives or be guaranteed not to migrate from the packaging to the food by the competent institutions in each country or region, such as EFSA in the EU (Comisión Europea, 2008a) or the Food and Drug Administration (FDA) in the USA, which establish the legal basis for their use, safety and marketing (Restuccia et al., 2010). Their use is still scarce in the EU and the US, mainly limited to active agents that absorb moisture, such as silica gel, and remove O₂, such as Fe, (Cichello, 2015; Werner et al., 2017). The reasons for their limited use are mainly due to the still high production costs and their low consumer acceptance in the European and North American market, in contrast to Japan, where the popularity of active packaging is high and where they have been used since the 1970s (Vilela et al., 2018). Despite the impediments and difficulties that exist for their use in food packaging, active agents are able to improve traditional packaging and perform a wide variety of functions to extend the shelf life and safety of food. The functions performed by active agents can be divided into four main categories (Figure 2): antimicrobial, antioxidant, moisture absorbing and ethylene scavenger (Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021).

In the case of the problem of oxidative and fungal spoilage of F&V and the growth of pathogenic bacteria in RTE foods, it is necessary to develop packaging with active agents that have antioxidant functions to eliminate ROS and antimicrobial functions to inhibit the growth of contaminating microorganisms such as bacteria and moulds.

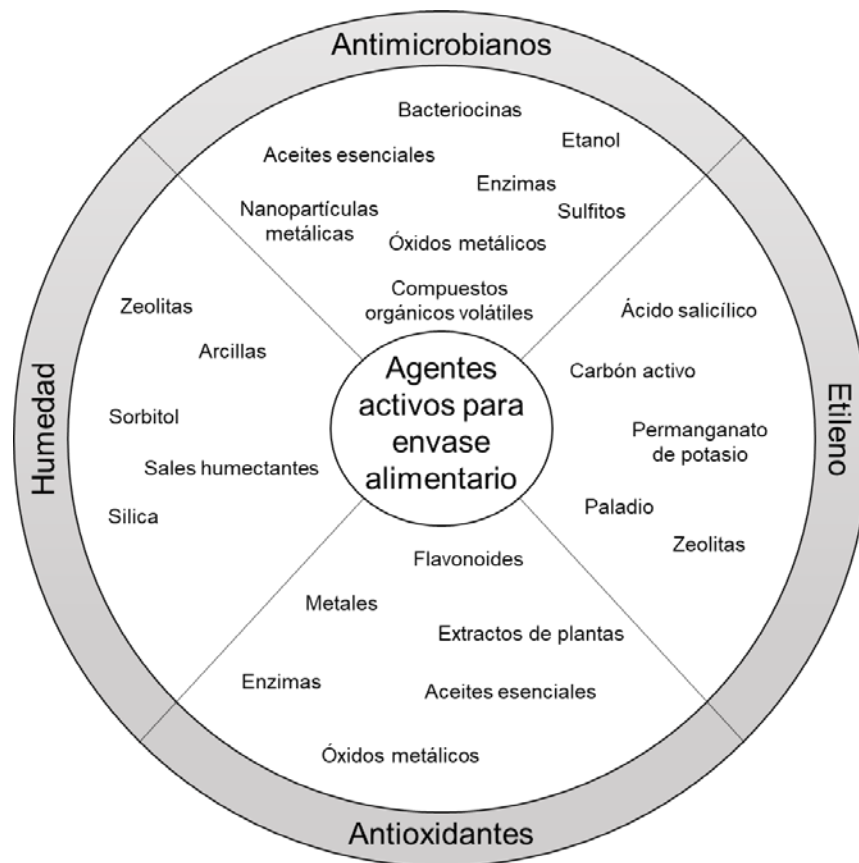


Figure 1. Some types of active agents classified into four categories into which active food packaging can be divided (Source: Luís et al., 2021; Soltani Firouz et al., 2021).

3.1 Antioxidant active agents

Food oxidation processes can be prevented or delayed by using antioxidant compounds capable of eliminating, reacting or inhibiting the production pathways of food oxidising compounds. Antioxidant active agents are classified into six categories based on those established by Nerín and Vilela (Nerín, 2010; Vilela et al., 2018) according to their mechanism of action (Table 8). Firstly, those that remove reactive free radicals, such as essential oils; compounds that react with O_2 , such as Fe or Pd, those capable of decomposing peroxides, such as methionine or glutathione peroxidase; those that react with transition metals, such as citric and ascorbic acids; those that inactivate the oxygen singlet, such as tocopherol or carotenoids; and finally, those that prevent enzymatic oxidation, such as flavonoids or phenolic acids.

Table 6. Categories into which antioxidant active agents are divided. Several examples of active agents *and* their mechanism are named (Source: Nerín, 2010; Tian et al., 2013).

Category	Agents	Mechanism
Free radical scavengers	Essential oils, Butylated hydroxyanisole, Butylated hydroxytoluene	They donate hydrogen to reactive free radicals and form stable radicals incapable of initiation or propagation reactions.
O ₂ eliminators	Iron, palladium, glucose oxidase/catalase	Oxidation of Fe and Pd to reduce O ₂ . Enzymatic conversion of O ₂ to water.
Peroxide decomposers	Thioethers, methionine, glutathione peroxidase	They break down peroxides, producing stable substances that are incapable of producing free radicals.
Metal chelators	EDTA, citric acid, lactoferrin	react with transition metals to avoid their catalytic effect in oxidation processes
Oxygen singlet inactivators (O ₂ ¹)	Carotenoids, tocopherols, polyphenols	Deplete excess energy from singlet oxygen to control oxidation
Enzymatic oxidation	Flavonoids, phenolic acids, gallates	Inactivating enzymes to prevent oxidative activity

The most commercially used type of antioxidant active agent is based on Fe oxidation, which are usually found in O-permeable sachets₂ inside the packaging. (Nerín et al., 2008; Wyrwa & Barska, 2017). There are also Pd-based antioxidant packages that produce water from O₂, but require hydrogen in the package atmosphere (Yildirim et al., 2018). Both agents are used to react with the O₂ present in the packaging atmosphere and prevent the rapid oxidation that this gas produces in the lipids or vitamins in foodstuffs (Aishee Dey & Neogi, 2019).

In contrast, in the scientific research environment, the antioxidants of greatest interest and most studied are the free radical scavengers (Vilela et al., 2018).

3.2 Antimicrobial active agents

There is a wide variety of antimicrobial active agents that have been used for active food packaging research. They can be of both natural origin (essential oils or bacteriocins) and synthetic origin (metal nanoparticles). Some antimicrobials, such as volatile organic compounds, which are often part of essential oils or produced by bacteria, or CO₂, which is formed in cellular respiration, can be classified as natural, but are produced synthetically in industry due to their high demand.

Antimicrobial active agents (Table 9), can be classified into different categories according to Becerril (Becerril et al., 2020). Briefly, organic acids and their salts, such as lactic acid or sodium acetate; bacteriocins that are mainly produced by Gram-positive bacteria such as nisin; enzymes, such as lysozyme; biopolymers with intrinsic antimicrobial activity, such as chitosan and pectin; natural plant extracts, such as flavonoids or phenols, which may also have antioxidant activity; essential oils which are a mixture of volatile organic compounds extracted from plants and spices, such as cinnamon or oregano; metal nanoparticles (silver or zinc oxide); and finally, bacteriophages which are viruses that only affect a specific bacterium causing its death.

Table 7. Categories into which antimicrobial active agents are divided. Several examples of active agents, some of the susceptible microorganisms, are named (Source: Becerril et al., 2020; Comisión Europea, 2008b; Luís et al., 2021).

Category	Agents	Microorganisms
Organic acids and their salts	Lactic acid, sodium acetate, potassium sorbate, citric acid	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida albicans</i> .
Bacteriocins	Nisin, Sakacin A, Lactacin 3147A	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>
Enzymes	Lysozyme, lactoferrin, glucose oxidase, lactoperoxidase	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Biopolymers	Chitosan, pectin	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
Natural extracts	Pinosylvin, gallic acid, green tea extract, propolis extract	Lactic acid bacteria, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. cereus</i>
Essential oils	Cinnamon, oregano, rosemary, thyme, carvacrol, oregano	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cinerea</i> , lactic acid bacteria, <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
Metal nanoparticles	Zinc oxide, silver, titanium oxide	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Bacteriophages	IBB-PF7A, vB_EcoMH2W, LISTEX P100	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i>

Outside the above categories of antimicrobial active agents, the most common commercially available antimicrobial agent is CO₂, which is used to preserve food and prevent initial bacterial growth, due to its solubility in the water and fat of the food (Hansen et al., 2016). These active CO₂ releasing containers are based on the use of sodium bicarbonate and citric acid in absorbent pads or sachets (Vilela et al., 2018) for on-site CO₂ production. Ethanol is also used commercially as an antimicrobial agent at low concentrations (4-12%) to prevent the growth of microorganisms, such as bacteria and moulds. When foods are packaged with an ethanol-releasing agent, ethanol is released into the atmosphere of the package by absorbing moisture (de Abreu et al., 2012)..

The above classifications cover most of the antimicrobial and antioxidant active agents used or investigated for active food packaging, but they are not the only ones, as there is a need to continue the search for new and more effective alternatives to extend the shelf life of food and to explore new active agents that have not yet been used for active food packaging.

4. Techniques for incorporation of active agents into packaging

The incorporation of active agents, antioxidants or antimicrobials, into the packaging is a delicate process, as it must be carried out in a way that the substance maintains its activity. Therefore, degradation or direct interaction with the food or the packaging atmosphere must be avoided. There are different methods to add the active agents to the packaging material, the most common being extrusion, casting, coating, inclusion in adhesives in multilayer materials or in sachets.

Extrusion is the industry's preferred technology, as food packaging is typically manufactured in whole or in part using this technology (Gómez-Estaca et al., 2014). In this technique, the active agent is incorporated together with the molten polymer at high temperature, forming the active material (Bastarrachea et al., 2015). This technique presents a serious problem for the incorporation of many of the active agents used, since, by using high temperatures to melt the polymers, there is a great risk of partially or totally degrading the active agent, causing it to lose its antioxidant or antimicrobial activity (Nerin, 2016). Therefore, the active

agents used must be thermally stable at the temperatures used in the extrusion process (Kuai et al., 2021) and compatible with the polymer to be extruded.

Although this technique is typically used with fossil-based polymers, it has also been used to add antioxidant and antimicrobial agents by extrusion to biodegradable and/or compostable polymers (Table 10) (Da Silva et al., 2019; Del Nobile et al., 2009).

Table 8. Examples of extruded films with antimicrobial and antioxidant active agents for active food packaging.

Active agent	Material	Function	Food	Reference
BHT	LDPE	Antioxidant	Fish	(Torres-Arreola et al., 2007)
α -Tocopherol	PLA	Antioxidant	Soybean oil	(Manzanarez-López et al., 2011)
Flavonoids	EVOH	Antioxidant	-	(López-de-Dicastillo et al., 2012)
Nisina	PLA	Antimicrobial	Egg white	(Jin & Zhang, 2008)
Lysozyme	PCL	Antimicrobial	-	(Del Nobile et al., 2009)
Extract from Kuntze	PBAT/TPS	Antimicrobial	-	(Da Silva et al., 2019)

Another method, casting, involves dissolving the polymer intended for packaging in a suitable solvent and, at the same time, incorporating the active compound of interest. For the formation of the active film, the solution with the polymer and the active agent is deposited on a surface so that the solvent evaporates, resulting in the formation of an active film. (Suhag et al., 2020). The advantage of this method over extrusion is that there is no risk of the active compound degrading under the action of high temperatures, as there is no need to melt the polymer; while the disadvantage is the need for the polymer and active agent to be soluble in the same solvent. For active food packaging (Table 11), this is the most commonly

used technique with biodegradable polymers such as methyl cellulose, polyvinyl alcohol or starch derivatives, as they are soluble in water (Siemann, 2005).

Table 9. Examples of cast films for active food packaging with antimicrobial and antioxidant active agents.

Active agent	Material	Function	Food	Reference
Thymol	LDPE/zein	Antioxidant	Beef and veal	(Park et al., 2012)
Green tea extract	Chitosan	Antioxidant	Pork sausages	(Siripatrawan & Noipha, 2012)
Lysozyme nanofibres	Pululano	Antimicrobial/ Antioxidant	-	(Silva et al., 2018)
LAE	Nanocellulose	Antimicrobial	-	(Silva et al., 2019c)
Clove essential oil	Soy proteins	Antimicrobial	Tuna	(Echeverría et al., 2018).

The coating method incorporates those active agents that do not tolerate the high temperatures that occur during extrusion, or that are incompatible with the polymer or solvent used for their dissolution (Appendini & Hotchkiss, 2002). In this method of incorporation, the active agent is dissolved in a compatible polymer solution that is spread on the packaging material. Subsequently, the solvent is evaporated and a film containing the active agent is formed (Baldev et al., 2011). This technique allows controlled release of the active agent or its immobilisation in the polymeric packaging material (Table 12).

Table 10. Examples of materials with antimicrobial and antioxidant active agents made by coating for active food packaging.

Active agent	Material	Function	Food	Reference
Rosemary oleoresin	PET film	Antioxidant	Pork	(Song et al., 2020)
Oregano extract	PP film	Antioxidant	Beef and veal	(Nerín et al., 2006).
Selenium nanoparticles	Multilayer PET/LDPE	Antioxidant	-	(Vera et al., 2016)
Pinosilvina	Cellulose/PP pad	Antimicrobial	Chicken	(F. Silva et al., 2018)
Cinnamon essential oil	Multilayer PET/Aluminium/PE	Antimicrobial	Tomato sauce	(Gherardi et al., 2016).

In the case of sachets, the active agent is placed inside the sachet and then the active sachet is placed inside the packaging together with the food. Their great advantage is that they do not need to be incorporated in any way into the packaging material and can easily interact with the packaging atmosphere. On a commercial level, these sachets are commonly used as ethylene absorbers (potassium permanganate or zeolites) (Soltani Firouz et al., 2021) or oxygen adsorbers (iron oxide II) (Cichello, 2015). Recently, the use of sachets has been extended to other functions, such as antimicrobial, through the incorporation and subsequent release of volatile compounds with known antimicrobial activities, such as ethanol and essential oils (Table 13), against food microorganisms, both spoilage-causing and pathogenic (Otoni et al., 2016).

Table 11. Examples of antimicrobial and antioxidant active agents in sachets for active food packaging.

Active agent	Function	Food	Reference
Garlic essential oil	Antimicrobial	Tomato	(Ayala-Zavala & González-Aguilar, 2010)
Oregano essential oil	Antimicrobial	Sliced bread	(Passarinho et al., 2014).
Anetol	Antimicrobial/ antioxidant	Lettuce	(Wieczyńska & Cavoski, 2018)
Rosemary essential oil	Antimicrobial	Cheese	(J. H. Han et al., 2014).
Ethanol	Antimicrobial	Sliced bread	(Latou et al., 2010)

5. New trends in food packaging

In the face of increasingly worrying plastic pollution in active food packaging, there is a trend to prioritise the use of biodegradable polymers to reduce the current dependence on plastic, as it is a serious global pollution problem especially in the oceans where its impact is greatest. The amount of plastic in the oceans is estimated to be between 75 and 199 million tonnes and is expected to double by 2030, which will greatly affect coastlines and marine wildlife (UNEP, 2021b). Therefore, the development of biodegradable and/or compostable packaging is a priority to reduce this environmental problem, as packaging produces around 60 % of plastic waste in the EU, mainly through single-use plastics (Comisión Europea, 2018). These new biodegradable plastic materials (Table 14) can be bio-based, i.e. from biomass such as polylactic acid (PLA) or carboxymethyl cellulose (CMC), or from fossil resources such as polyvinylalcohol (PVA) (FAO, 2021).

Table 12. Various types of bioplastics indicating whether they are bio-based and whether they are biodegradable (Source: Singh et al., 2022)

Bioplastic	Bio-based	Biodegradable
PLA	Yes	Yes
Polyhydroxyalkanoate (PHA)	Yes	Yes
Polyhydroxy butyrate (PHB)	Yes	Yes
CMC and cellulose derivatives	Yes	Yes
PVA	No	Yes
Biopolypropylene (Bio-PP)	Yes	No
Polybutylene succinate (PBS)	No	Yes
Polycaprolactone (PCL)	No	Yes
Biopliethylene terephthalate (Bio-PET)	Yes	No

5.1 Biodegradable polymers for food packaging

Biodegradable polymers are polymers that, at the end of their useful life, completely degrade into CO₂ and water. This degradation is mainly triggered by biological activity, so the material must be able to be assimilated by microorganisms (mainly bacteria and fungi) (Hann et al., 2020). This is a fundamental characteristic of plastics, as it determines whether they will persist and accumulate in the environment or not. In addition, the time scale over which degradation occurs must be short enough not to harm ecosystems and wildlife (Comisión Europea, 2022).

Biodegradable polymers include compostable polymers that can also degrade, but only under certain conditions of temperature and high humidity, so this process is usually carried out industrially where it is easier to control and achieve the necessary conditions. In some cases, this process can also be carried out in households, resulting in compost, which can be used as fertiliser for agriculture. (FAO, 2021). Some biodegradable or compostable polymers that are currently being used to replace the usual plastics in food packaging materials are PLA, CMC or PVA.

Firstly, carboxymethyl cellulose (CMC) is an anionic linear polysaccharide derived from cellulose and soluble in water. Cellulose is the most abundant renewable and biodegradable polymer on earth and has several advantages such as low cost, low density, versatility and safety. (Huang & Wang, 2022) which makes CMC an excellent sustainable product and an inexpensive option for developing biodegradable films for food packaging. Despite its low water vapour barrier properties as a result of its hydrophilicity (He et al., 2021) CMC is currently one of the most common cellulose derivatives used in film preparation, as when cross-linked with citric acid it increases its water resistance and decreases its *swelling* capacity (Dashipour et al., 2015; Kanatt & Makwana, 2020; Tongdeesoontorn et al., 2011). CMC has been used to develop antimicrobial and/or antioxidant active food packaging by *casting*, both alone and in combination with other polymers (Table 15).

Table 13. Examples of antimicrobial and antioxidant active packaging using films made from CMC.

Active agent	Material	Function	Reference
Thyme leaf extract	CMC/sodium alginate	Antimicrobial/ antioxidant	(Abdin et al., 2023).
ZnO nanoparticles	CMC/PVA	Antimicrobial	(Helmiyati et al., 2021)
<i>Zataria multiflora</i> essential oil	CMC	Antimicrobial/ antioxidant	(Dashipour et al., 2015)
Eucalyptus essential oil	CMC	Antimicrobial	(Simsek et al., 2020)
Savory essential oil	CMC/agar	Antimicrobial	(Abdollahi et al., 2019)

Polyvinyl alcohol (PVA) is a synthetic polymer, produced by the hydrolysis of water-soluble polyvinyl acetate, which has excellent physical properties such as viscosity, film and emulsion forming ability, adhesiveness and flexibility (Nagarkar & Patel, 2019). It is a widely used polymer in industry, which has resulted in large quantities of PVA being discharged into water systems every year, especially from paper and textile mills. PVA is non-toxic to organisms, although it can lead to foaming and prevent oxygen recovery in the water (Kawai & Hu, 2009) if it is not degraded by bacteria (Kanatt & Makwana, 2020). Its use has been investigated for antimicrobial active packaging with essential oils (C. Han et al., 2014) and with LAE (Haghighi et al., 2020). Although PVA alone does not have good moisture barrier properties due to its solubility (Nguyen & Lee, 2022). PVA-based coatings can be used to improve the moisture barrier properties of plastic films (Chandio et al., 2021) or paper (Shen et al., 2021).

Finally, polylactic acid (PLA) is a biopolymer obtained from the fermentation of starch carbohydrates and can be obtained from L-lactic or D-lactic acid monomers that subsequently polymerise to form P(L)LA or P(D)LA, respectively. The ratio of L or D monomer units affects some of the key macromolecular

properties such as degree of crystallinity, melting temperature, and ease of processing, with P(L)LA being the most commercially used (Gan & Chow, 2018; Gumienna & Górna, 2021). PLA properties include high mechanical strength, excellent thermoformability, its biocompatibility and compostability. However, it has poor water vapour and oxygen barrier properties (Mohan & Panneerselvam, 2022). PLA is often used in active food packaging, in films with coatings where the active agents are incorporated (Benbettaieb et al., 2023; Munteanu et al., 2018) or by adding the active agents directly to the polymer (Jin & Zhang, 2008; Videira-Quintela et al., 2022) for the formation of active films by extrusion or casting.

SECCIÓN II: OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el estudio y desarrollo de envases activos antioxidantes y antimicrobianos basados en la incorporación de nanomateriales en el material de envase. Para ello, el desarrollo experimental se ha llevado a cabo para abarcar los siguientes objetivos generales:

1. Síntesis y caracterización de un POM de molibdeno reducido, $((\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)]_2\}\cdot 5\text{H}_2\text{O})$ (POMo), para la evaluación de su actividad antioxidante y el desarrollo un recubrimiento en films de ácido poliláctico (PLA) basado en polivinil alcohol (PVA-POMo) para la eliminación de radicales hidroxilo.
2. Desarrollo de un envase activo antioxidante para melocotón de Calanda DOP de IV gama utilizando films de PLA con un recubrimiento de PVA-POMo y la evaluación del impacto del envase activo en la maduración, color, pardeamiento y volátiles del melocotón de IV gama envasado.
3. Síntesis y caracterización de un complejo de POM de wolframio ($\text{K}_8[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]$) con el conservante alimentario etil lauroil arginato (LAE) y el estudio de la actividad antimicrobiana del complejo (POM-LAE) frente a bacterias patógenas alimentarias y su mecanismo de acción.
4. Desarrollo de films de carboximetil celulosa y PLA con el complejo POM-LAE antimicrobiano y evaluación de su actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* utilizando un alimento listo para el consumo, en este caso jamón curado.
5. Encapsulación de compuestos orgánicos volátiles (diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, 2-nonanona y acetofenona) en nanoesponjas de ciclodextrina, estudio de la eficiencia de encapsulación y su capacidad de liberación y la evaluación de su actividad antifúngica frente a mohos contaminantes de alimentos.

SECCIÓN III: DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1

Desarrollo de un envase activo antioxidante para fruta de IV gama basado en un polioxomolibdato

Índice:

1. Introducción.....	130
2. Objetivos.....	133
3. Materiales y métodos.....	133
4. Resultados y discusión.....	142
5. Conclusión.....	155

1. Introducción

El consumo deficitario de F&V provoca hasta 4 millones de muertes prematuras en el mundo que se podría evitar con un consumo diario de F&V de 400 g (FAO, 2021). Una forma de incentivar el consumo de F&V en la población es a través del consumo de fruta de IV gama, debido a que se comercializa ya cortada y lista para su consumo, convirtiéndose en un alimento RTE (Castro-Ibáñez et al., 2017). A pesar del descenso general en el consumo de F&V en la UE, en los últimos años el consumo de frutas de IV gama ha aumentado, con un crecimiento del 19 % entre 2009 y 2014 (Baselice et al., 2017). Los consumidores buscan en la fruta de IV gama alimentos preparados frescos, saludables y que sean fáciles de consumir, ya que normalmente se consumen fuera del hogar (Testa et al., 2021). Sin embargo, el mayor problema de la fruta de IV gama es su rápido deterioro microbiológico y el pardeamiento ocasionado por la oxidación derivada de su procesado (Oms-Oliu et al., 2010) debido a las heridas mecánicas que sufre la fruta (Yousuf et al., 2017).

El deterioro ocasionado por la oxidación en frutas de IV gama provoca el pardeamiento y ablandamiento de su superficie. Esto puede estar causado por enzimas o por las ROS (Hossain et al., 2020). Estas últimas juegan un papel muy importante, ya que su producción descontrolada provoca estrés oxidativo en las células de las frutas, causando su oxidación y acelerando el proceso químico de deterioro (Meitha et al., 2020). Los radicales libres hidroxilo (OH^{\bullet}) son la ROS más importante, al ser la especie más reactiva de todas, ya que tiene la capacidad para reaccionar con casi cualquier compuesto de su entorno causando daño celular en lípidos, proteínas y membranas (Richards et al., 2015) que derivan en cambios significativos en el sabor, aroma, color, textura y superficie de las frutas permitiendo que sean fácilmente infectadas por microorganismos (Huan et al., 2016). La producción de ROS aumenta en el caso de la fruta de IV gama debido a las heridas producidas por el corte mecánico (Rojas-Graü et al., 2009). Por lo que, al estar un envase cerrado, las ROS se concentran y aceleran el deterioro de la fruta, provocando una disminución de la aceptación del alimento por parte del consumidor (Montero-Prado et al., 2011). Por ello, existe la necesidad de eliminar las ROS de la fruta envasada, lo que se puede lograr mediante la utilización de compuestos antioxidantes, como puede

ser el caso de los polioxometalatos (POM), ya que sus propiedades redox los convierten en potenciales antioxidantes.

Los POM son una clase única de óxidos de metales de transición aniónicos (V, Mo, W) que forman agregados cargados negativamente con una gran variedad de estructuras (Pope & Müller, 1991) y que suelen contener heteroátomos, como P, Si o S (Ueda, 2021). Se ha investigado su utilización en diferentes áreas como catálisis, medicina, medio ambiente, conservación del patrimonio, baterías o antimicrobianos (Bijelic et al., 2018; Franco-Castillo et al., 2019; Ueda, 2018; Rajkowska et al., 2020), pero su utilización como agentes activos para envase activo alimentario es un campo que todavía no ha sido explorado. Los POM están caracterizados por una amplia y versátil gama de propiedades fisicoquímicas, especialmente sus características redox que les permiten ser utilizados en las diferentes áreas antes mencionadas. Además, la naturaleza aniónica de los POM es útil para crear complejos con compuestos catiónicos (Song & Tsunashima, 2012).

La principal característica fisicoquímica de los POM es su actividad redox, ya que al controlar el pH durante su síntesis o agregar diferentes metales u organometales se puede lograr una amplia gama de estructuras, lo que les otorga una excelente actividad redox (Zhang et al., 2019). El potencial redox de los POM de Mo es mayor que el de los POM de W, mientras que el potencial redox de los heteroátomos que se incluyen en los POM se relaciona de la siguiente manera: $X = S > P, As > Si, Ge$ (Ueda, 2021). Los POM poseen la capacidad de sufrir la transferencia reversible de múltiples electrones, lo que les permite ganar y perder electrones y actuar como depósitos de electrones (Lang et al., 2020) sin alterar su estructura molecular. Estas propiedades químicas únicas incluyen la capacidad de sufrir reducciones/oxidaciones reversibles de valencia múltiple que conducen a la formación de especies de valencia mixta (Ueda, 2018), que pueden actuar como antioxidantes.

La actividad redox de los polioxomolibdatos con Mo reducido (Tanaka et al., 2018) y con heteroátomos S, As o P (Ueda, 2021) los convierte en candidatos adecuados como antioxidantes (Liu et al., 2022), lo que permitiría su uso en envases activos antioxidantes para frutas de IV gama. El polioxomolibdato tipo Kabanos: $(NH_4)_{15}\{Na[(Mo_2^V O_4)_6(\mu_2-SO_3)_3(\mu_6-SO_3)_2]\cdot 5H_2O$ (POMo) cumple estas

condiciones, ya que se forma a partir de 12 Mo(V) reducidos y posee heteroátomos S (Figura 1.1). Es importante destacar que las pruebas de citotoxicidad de este polioxomolibdato en células eucariotas de mamíferos indican baja toxicidad, incluso a altas concentraciones. Además, los ensayos de citotoxicidad en células eucariotas de mamífero Vero (células epiteliales renales del mono verde africano) y B16 (células de melanoma de piel aisladas de ratón), indican baja toxicidad y únicamente a concentraciones superiores a 2,3 mg/mL con un porcentaje de viabilidad del 85 y 81 %, respectivamente (Gabas et al., 2016).

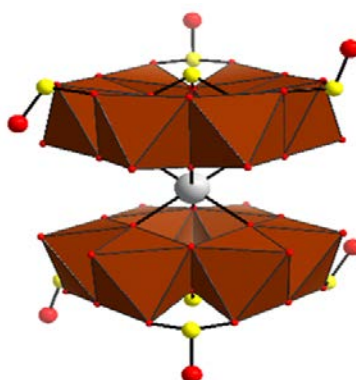


Figura 1.1. Representación del dímico $[\text{Na}\{(\text{Mo}_2\text{O}_4)_3(\text{O})_3(\text{SO}_3)_4\}_2]^{15-}$ base de la estructura del POMo. Mo: rombos marrones, S: bolas amarillas, O: bolas rojas, Na: bola blanca.

Asimismo, una importante característica de los POM es que han demostrado ser compatibles con diferentes polímeros, como el PLA (Duvanova et al., 2022), el quitosano (Menon et al., 2011) o el poli(metacrilato de metilo) (Enderle et al., 2022) abriendo así las puertas para su uso en el área del envase activo alimentario como agentes activos antioxidantes o antimicrobianos. De esta forma, se podrían añadir al alcohol polivinílico (PVA), un polímero sintético hidrofílico y biodegradable ampliamente utilizado (Kanatt & Makwana, 2020), que se puede utilizar como agente de recubrimiento con aditivos debido a sus propiedades barrera contra la humedad en films plásticos o papel, (Chandio et al., 2021; Shen et al., 2021) lo que permitiría su utilización con POM.

2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es determinar la actividad antioxidante del polioxomolibdato de tipo Kabanos $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo), así como su actividad eliminadora de ROS cuando se agrega al PVA como un recubrimiento en films de ácido poliláctico (PLA) (Figura 1.2). Además, con este estudio se pretende demostrar cómo el recubrimiento de POMo-PVA se puede utilizar como un envase activo antioxidante, como prueba de concepto, para melocotón (*Prunus persica*, Calanda D.O.P.) de IV gama, sin afectar a su calidad aromática.

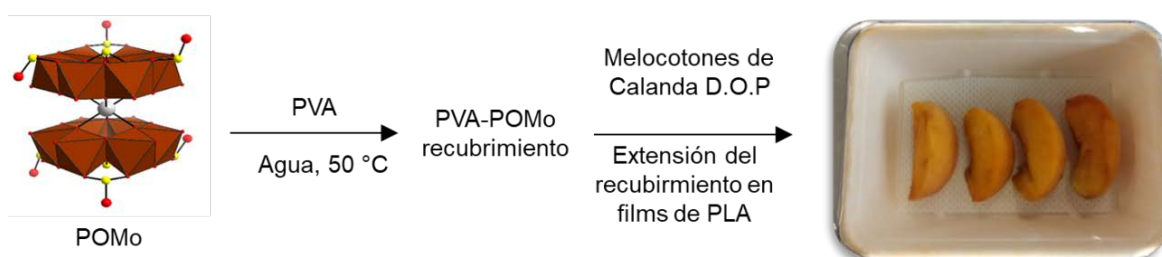


Figura 1.2. Proceso de síntesis del recubrimiento de PVA-POMo y su aplicación en films de PLA como envase activo antioxidante para melocotón de IV gama.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

El ácido clorhídrico al 37% (HCl) se adquirió de Scharlab, España. El monohidrato de hidrazina al 98 % ($\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), el molibdato de sodio dihidrato >99 % ($\text{Na}_2\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y el sulfito de amonio monohidrato al 92 % ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$) se adquirieron de Sigma-Aldrich, Alemania. El polivinil alcohol 87-89 % (PVA) ($M_w = 146.000\text{-}186.000$) se adquirió a Sigma-Aldrich, Alemania. Los films de ácido poliláctico (PLA) "Sorebio" (40 μm de grosor) se compraron a Soretrac, España. Los POM de Mo $(\text{NH}_4)_{72}[\text{Mo}^{\text{VI}}_{72}\text{Mo}^{\text{V}}_{60}\text{O}_{372}(\text{CH}_3\text{COO})_{30}(\text{H}_2\text{O})_{72}]$ (Mo132) y $\text{Na}_{14}[\text{Mo}^{\text{VI}}_{126}\text{Mo}^{\text{V}}_{28}\text{O}_{462}\text{H}_{14}(\text{H}_2\text{O})_{70}]$ (Mo154) fueron cedidos por Scott G. Mitchell del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón.

3.2 Síntesis y caracterización de $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo)

La síntesis fue una modificación del procedimiento de la literatura (Manos et al., 2002). Brevemente, se añadieron 1,28 g de $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ a una disolución en agitación de 12 g de $\text{Na}_2\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:4 v/v, 100 mL), haciendo que el color amarillo claro de la disolución cambiase a azul oscuro. A continuación, se agregaron 45,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ a la disolución anterior. Al agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, el color azul oscuro de la disolución se volvió verde oscuro, con un valor de pH de 5, 7. Para la cristalización del POMo, la disolución se mantuvo en un vaso de precipitados abierto durante 3 días a temperatura ambiente. Después, los cristales rojos precipitados se lavaron con H_2O , se filtraron y secaron al aire (rendimiento: 9,01 g, 81 % basado en Mo). Toda el agua utilizada para el proceso de síntesis ha sido agua ultrapura.

Para la caracterización se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) en un analizador térmico Q5000SA (TA Instruments, EE.UU.) en atmósfera de aire con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta $800\text{ }^\circ\text{C}$. También se ha caracterizado el producto de síntesis por espectroscopia FTIR-ATR de las muestras en polvo, sin preparación previa, en un FT-IR 4100 (Jasco, Japón) con 32 escaneos/muestra a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de número de onda de 500 a 4000 cm^{-1} .

3.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los POM de Mo

La actividad antioxidante de los POM de Mo (Mo132, Mo154 y POMo) se determinó mediante la actividad de eliminación de radicales basada en el método que usa el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH $^\bullet$) (TCI, Bélgica) (Scherer & Godoy, 2009; Wong et al., 2006). Brevemente, se probaron tres disoluciones de DPPH $^\bullet$ de distintas concentraciones (0,20; 0,12 y 0,08 mM) que se prepararon disolviendo 9,5; 5,9 y 3,8 mg en 120 mL de metanol, respectivamente. Luego, se preparó una disolución madre de los POM de Mo en agua con una concentración de 10 mg/mL y se realizaron diluciones seriadas para obtener diferentes rangos de concentraciones para POMo (1-0,1 mg/mL), Mo132 (2-0,2 mg/mL) y Mo154 (4-0,4 mg/mL). Se añadió un volumen de 0,1 mL de cada disolución de los POM de Mo a 3,9 mL de una disolución metanólica de DPPH $^\bullet$. Las concentraciones finales de los POM de Mo utilizadas fueron 25-2,5 $\mu\text{g/mL}$ para POMo, 50-5 $\mu\text{g/mL}$

para Mo132 y 100-10 µg/mL para Mo154. El control positivo se preparó usando ácido ascórbico (Mishra et al., 2012) a las mismas concentraciones de la muestra. El control negativo se preparó agregando 0,1 mL de H₂O a 3,9 mL de disoluciones de DPPH*. Después de 90 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se midió la absorbancia a 517 nm. La actividad de eliminación de radicales se calculó de la siguiente manera (Ec.1):

$$\text{Ec.1: } I (\%) = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100,$$

donde Abs₀ es la absorbancia del control y Abs₁ es la absorbancia en presencia de la muestra a diferentes concentraciones. La IC₅₀ (concentración que provoca un 50% de inhibición) se calculó gráficamente usando una curva de calibración representando la concentración de los POM de Mo frente al efecto de eliminación de DPPH* en su rango lineal. La actividad antioxidante se expresó como el índice de actividad antioxidante (AAI), calculado de la siguiente forma (Ec. 2):

$$\text{Ec. 2: } AAI = \frac{\text{Concentración final de DPPH} \cdot \text{en el control } (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}{IC_{50} (\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})}$$

Así, el AAI se calculó considerando la concentración de DPPH* en la muestra control evaluada en la reacción y el IC₅₀ de las muestras para la concentración de DPPH* utilizada, obteniendo, de esta forma, una constante para cada concentración de DPPH*. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Todas las disoluciones de DPPH* se prepararon diariamente.

3.4 Preparación y aplicación del recubrimiento

El desarrollo de los films antioxidantes de PLA se llevó a cabo preparando un recubrimiento de PVA con el POMo. En primer lugar, para preparar el recubrimiento se realizó una disolución de PVA al 10% en agua a 80 °C, en agitación continua, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió el POMo a la disolución de PVA en concentraciones de 4 % y 10 % (m_{PVA10%}/m_{POMo}) y se agitó a 50 °C para su homogeneización. El recubrimiento líquido se aplicó a los films de PLA (12x24 cm para los films *in vitro* y 12x17 cm para los films *in vivo*) usando una extensora de barra (K202 Control Coater, RK Print Coat Instruments, Reino Unido) capaz de depositar un recubrimiento con un espesor de 40 µm. Los films de PLA recubiertos con PVA-POMo se dejaron

secar a temperatura ambiente. El gramaje final del revestimiento de PVA-POMo 4 % fue de 0,55 mg/cm² (POMo masa: 31 %) en los films de PLA, mientras que para PVA-POMo 10 % fue de 0,87 mg/cm² (POMo masa: 53 %). Todas las disoluciones se prepararon en H₂O ultrapura.

3.5 Actividad de eliminación de radicales OH^{*}

La actividad eliminadora de OH^{*} del POMo fue evaluada de acuerdo con el método descrito por Pezo y colaboradores (Pezo et al., 2006, 2008). Brevemente, se prepararon films de PLA de 12x24 cm con recubrimientos de PVA que contenían 4 y 10 % de POMo (PVA-POMo 4 % y PVA-POMo 10 %) y se sellaron usando una termoselladora (Cibra, Italia) para crear bolsas con unas dimensiones de 12x12 cm (Figura 1.3). Las muestras control se prepararon recubriendo los films de PLA sólo con PVA y se analizaron simultáneamente mediante el mismo procedimiento. Las bolsas se fabricaron dejando una entrada y una salida para facilitar el flujo de radicales OH^{*} a través de la bolsa.

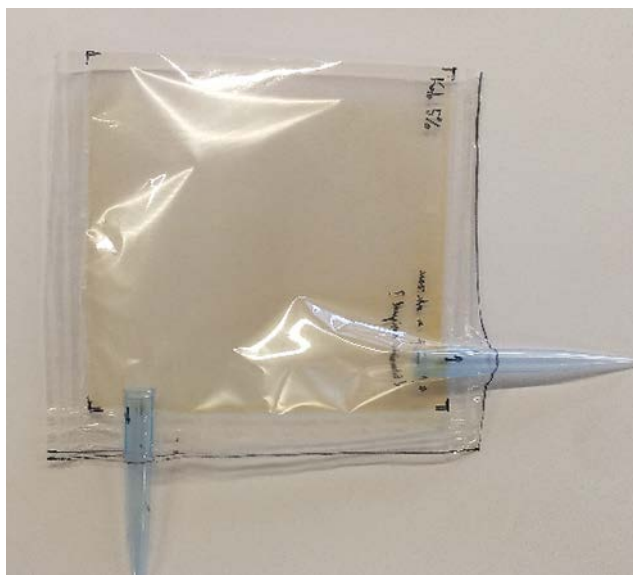


Figura 1.3. Bolsa termosellada de PLA con un recubrimiento de PVA-POMo en el interior. Las puntas de pipeta permiten el paso del flujo de radicales OH^{*} por su interior.

Estos radicales OH^{*} fueron transportados por un gas inerte (N₂) a través de las bolsas y, al final, burbujearon en una disolución de salicilato de sodio. Aquí, tiene lugar una reacción (Figura 1.4) entre los radicales libres no eliminados y la disolución de ácido salicílico, produciendo mayoritariamente 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB), entre otros compuestos minoritarios (2,3-dihidroxibenzoico y 2,4-dihidroxibenzoico).

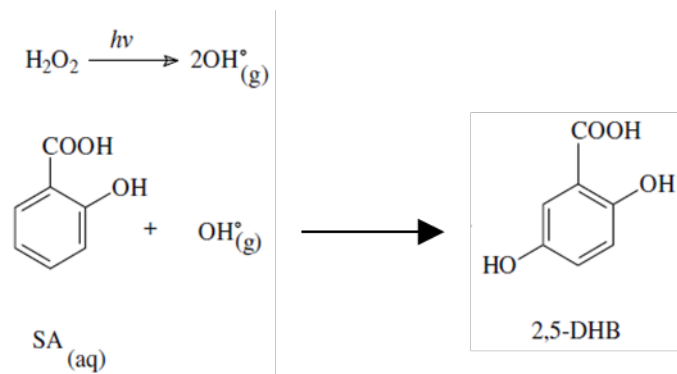


Figura 1.4. Reacción que tiene lugar durante el ensayo. La luz UV crea radicales OH^\bullet a partir de H_2O_2 , y estos reaccionan con el ácido salicílico creando 2,5-dihidroxibenzoico.

Posteriormente, el 2,5-DHB fluorescente se analizó mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia (Figura 1.5) a longitudes de onda de emisión y excitación de 324 y 448 nm, respectivamente. Una disminución de la intensidad de fluorescencia de las muestras respecto a la proporcionada por los controles supone una mayor capacidad antioxidante del material estudiado, ya que supone que el material activo es capaz de secuestrar radicales libres y, por tanto, disminuir la concentración de 2,5-DHB en la disolución de ácido salicílico. Los resultados se expresan como porcentaje de hidroxilación en comparación con el control. La separación entre el ácido salicílico y el 2,5-DHB se logró utilizando un HPLC Waters Separation module 2695 (Waters, Milford, MA, EE. UU.) acoplado a un detector de fluorescencia Waters 474 (Waters, Milford, MA, EE. UU.) con una columna de fase reversa C_{18} (100 mm de largo, 46 mm de d.i. y 3 μm de tamaño de partícula) de Waters (Demlab, España). La fase móvil utilizada fue una mezcla 10:90 (v/v) de metanol con tampón acetato (3,5 mmol, pH 5,9), en modo isocrático a un caudal de 1 mL/min. Las temperaturas del muestreador automático y de la columna se ajustaron a 25 °C. Los estándares y los volúmenes de muestra inyectados fueron de 10 μL . Todas las disoluciones se prepararon utilizando H_2O ultrapura.

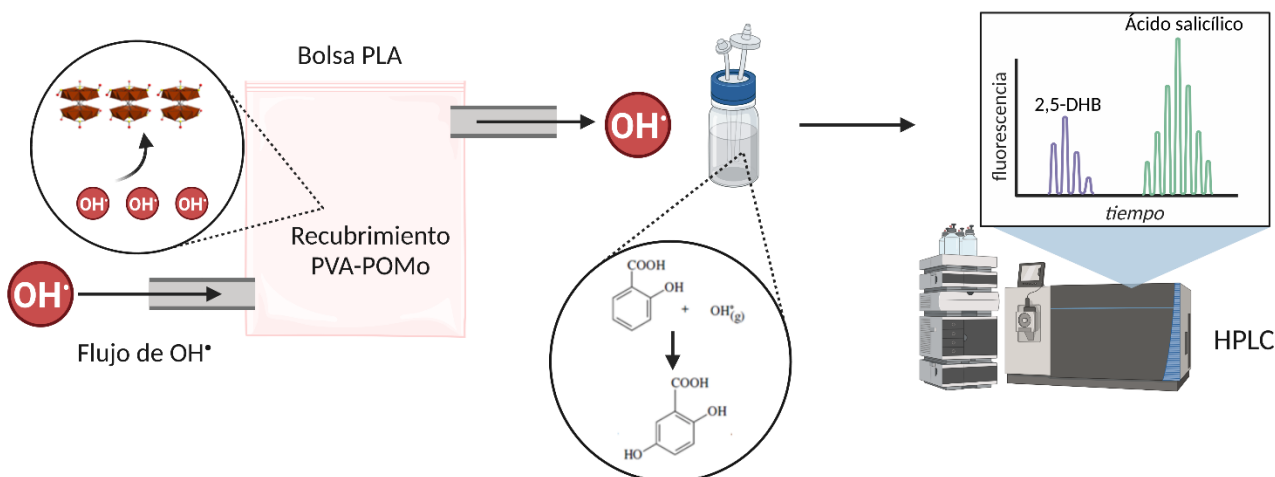


Figura 1.5. Esquema del ensayo de la actividad de eliminación de $\text{OH}\cdot$ utilizando el recubrimiento de PVA-POMo en bolsas de PLA.

3.6 Envase antioxidante en melocotón de IV gama

3.6.1 Envasado del melocotón

Las muestras de melocotón se compraron en una frutería local en su temporada de producción. El envase del melocotón se preparó de la siguiente manera, en primer lugar, cada melocotón se cortó en ocho porciones de tamaño aproximado. A continuación, la mitad de ellos se sumergieron en una disolución acuosa de 200 mg/L de HClO durante 2 min, se escurrieron y se sumergieron en una disolución acuosa de ácido ascórbico (1 g/100 mL) y ácido cítrico (1 g/100 mL) durante 2 min para evitar el pardeamiento de la superficie y lavar el HClO restante (Denoya et al., 2015). Estas muestras se designaron a lo largo del estudio como “lavadas”. La otra mitad no recibió ningún tratamiento para evitar el pardeamiento, siendo estas muestras designadas como “sin lavar”. Se han usado muestras con tratamiento para el pardeamiento y muestras sin tratamiento para verificar la existencia de alguna sinergia entre el recubrimiento de POMo-PVA y el lavado antioxidante. Se colocaron cuatro rodajas de melocotón en bandejas compostables de bagazo de caña de azúcar (Biozoyg, Alemania) que contenían almohadillas absorbentes de celulosa-PE (Linpac Packaging, España). Se prepararon films de PLA de 12x17 cm con recubrimientos de PVA que contenían 4 y 10 % de POMo como se explica en la sección 3.4, como envase antioxidante sin contacto. Los films se pegaron a los bordes de la bandeja con el adhesivo Axilat XP 4201 (Samtack, España) y se almacenaron a 4 °C durante 12 días. Las muestras de melocotón se analizaron a los días 0, 4, 7 y 12

para la evaluación del color, pardeamiento, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales y producción de compuestos volátiles. Todas las disoluciones se prepararon con H₂O ultrapura.

3.6.2 Medición de color

El color de los melocotones se evaluó durante la duración del ensayo para conocer su evolución. Se midieron tres puntos diferentes de cada rodaja de melocotón utilizando un colorímetro (Minolta, Japón) para obtener los parámetros de color (L, a y b) y se hizo el valor medio de los 12 puntos tomados por cada envase. tonalidad (h°) también se calculó con la siguiente fórmula (Ec. 3):

$$\text{Ec. 3: } h^{\circ} = \arctan \frac{b}{a}$$

3.6.3 Índice de pardeamiento

El efecto del POMo sobre el pardeamiento de los melocotones fue estudiado determinando el índice de pardeamiento (IP) según el método descrito por Sommano y colaboradores (Sommano et al., 2011). Este método consistió en la medición visual del área marrón en cada porción de melocotón con la escala de 1 (sin dorado, excelente calidad), 2 (ligeramente dorado), 3 (<25% marrón), 4 (25–50% marrón), 5 (>50% marrón).

El IP se calculó utilizando la siguiente fórmula (Ec. 4):

$$\text{Ec. 4: } IP = \Sigma(\% \text{ de fruta en cada clase } \times \text{ escala de pardeamiento})$$

3.6.4 Determinación del pH

Se prepararon muestras de zumo a partir de las rodajas de melocotón envasadas. Brevemente, se mezclaron y trituraron hasta obtener una mezcla homogeneizada. Luego, se centrifugaron en tubos Falcon de 50 mL a 3046 g (4350 rpm) durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el zumo se decantó a un tubo nuevo y el pH del zumo de melocotón se midió con un pHmetro (Mettler-Toledo, Suiza) bajo agitación a temperatura ambiente.

3.6.5 Acidez titulable

La acidez titulable se midió en las muestras de zumo previamente preparadas utilizando un método basado en el método oficial AOAC 942.15 (AOAC International, 2000). Se diluyeron cinco gramos de zumo de melocotón en 50 mL de agua destilada y se tituló con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N desde un pH 6,0 hasta un pH de 8,1. Las mediciones de pH se realizaron utilizando un pHmetro (Mettler-Toledo, Suiza).

Para el cálculo de la acidez titulable se utilizó la siguiente ecuación (Ec. 5):

$$\text{Ec. 5: } \textit{Acidez titulable} = \frac{(v \times 0,1 \times 0.064)}{\textit{peso/volumen de zumo}} \times 100,$$

donde: 0,1 es la normalidad de NaOH (N), 0064 es el factor de conversión para ácido cítrico, v es el volumen de NaOH requerido (mL). La acidez titulable se puede expresar convencionalmente en g de ácido por 100 g o por 100 ml de producto. Todas las disoluciones se prepararon utilizando H₂O ultrapura.

3.6.6 Sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales se midieron agregando varias gotas de zumo de melocotón al refractómetro (MTD-045-nD, TR Turoni Srl, Italia). Los resultados se expresaron en porcentaje, siendo que 1 % corresponde a 1 g de sacarosa en 100 g de zumo.

3.7 Análisis de volátiles por SPME-GC-MS

El método utilizado para cuantificar los volátiles producidos por las muestras de melocotón se basó en el descrito previamente por Montero-Prado y colaboradores (Montero-Prado et al., 2013). Brevemente, se pipetearon 5 mL del zumo de melocotón en viales de vidrio con tapa roscada de 20 mL y se mezclaron inmediatamente con 1 ml de NaCl saturado. Las muestras se han congelado a -20 °C y se descongelaron a temperatura ambiente antes del análisis. Como estándar interno se utilizó nonanoato de etilo (10 µg/mL). Los componentes volátiles del espacio de cabeza se extrajeron mediante microextracción en fase sólida (SPME) utilizando una fibra SPME (Supelco, Bedford, MA), compuesta de divinilbenceno/carboxeno de 50/30 µm en polidimetilsiloxano en un StableFlex de 2 cm, que se insertó en el espacio de cabeza de la muestra durante 30 min a

30 °C. Luego, la fibra se insertó directamente en el puerto de entrada del GC a 200 °C durante 2 min para la desorción de los volátiles y posterior inyección en el sistema con una proporción de *split* 20:1. Se utilizó un cromatógrafo de gases de la serie GC6850 de Agilent, equipado con una columna capilar de (5 %-fenil)-metilpolisiloxano (30 m x 0,248 mm de diámetro interno con un espesor de 0,25 µm) conectada a un detector selectivo de masas Agilent 5973 (Agilent Technologies, EE. UU.). El GC se utilizó bajo las siguientes condiciones: el helio fue el gas portador (1 mL min⁻¹), la temperatura del puerto del inyector era de 200 °C, la temperatura del detector se fijó en 250 °C y el horno de columna se programó para iniciar la medición a 50 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 3 min, seguido de un aumento de temperatura a una velocidad y de 5 °C min⁻¹ hasta 120 °C y de 10 °C min⁻¹ hasta 250 °C. La grabación de espectros se realizó en modo de impacto de electrones (EI) con una energía de electrones de 70 eV en el modo de Scan con un rango de masa establecido (m/z=45–450). La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación entre los espectros de masas de los compuestos estándar que se encuentran en la librería del instrumento (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de EE. UU., NIST) y en la literatura. Se realizó un análisis semicuantitativo de sustancias volátiles mediante la comparación de áreas relativas integradas en relación al área del estándar interno (Ec. 6).

$$\text{Ec. 6: } \textit{Área relativa (\%)} = \frac{\textit{Área de la muestra}}{\textit{Área del estándar interno}} \times 100$$

3.8 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software Microsoft Excel (Redmond, WA, EE. UU.). Para las variables con 3 o más categorías, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un factor. Se utilizó un valor de $p < 0,05$ para indicar diferencias estadísticamente significativas.

4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis y caracterización de $(\text{NH}_4)_{15}\{\text{Na}[(\text{Mo}_2^{\text{V}}\text{O}_4)_6(\mu_2\text{-SO}_3)_3(\mu_6\text{-SO}_3)_2]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (POMo)

Se sintetizaron monocristales solubles en agua de color rojo anaranjado de POMo usando un procedimiento descrito en la literatura (Manos et al., 2002). La composición y la pureza de la muestra se confirmaron mediante espectroscopia FTIR-ATR y análisis termogravimétrico (TGA). El FTIR-ATR del POMo mostró las vibraciones metal-oxo específicas de la estructura Kabanos (Figura 1.6). Las vibraciones de longitud de onda características de POMo se identificaron a 974 cm^{-1} debido a los enlaces terminales $\text{Mo}=\text{O}$, a 727 cm^{-1} asociados con puentes de vibraciones Mo-O-Mo , así como cationes NH_4^+ a 1408 cm^{-1} , aniones SO_3^- a 1077 cm^{-1} y SO_3^{2-} a 860 cm^{-1} (Bridgeman, 2003; Manos et al., 2002).

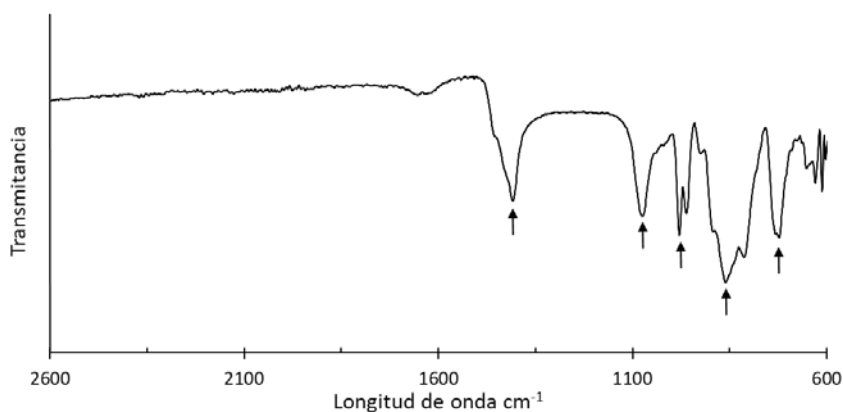


Figura 1.6. FTIR-ATR del POMo indicando con flechas las principales vibraciones específicas del compuesto.

El TGA mostró una pérdida de masa del 30 % entre $100\text{-}200\text{ °C}$ (Figura 1.7) correspondiente a la pérdida de aniones de azufre de la molécula. Esto significa que el POMo no posee la estabilidad térmica requerida para su inclusión en un material de envasado mediante procesos de extrusión y, por lo tanto, optamos por incluirlo en el material de envase mediante recubrimiento.

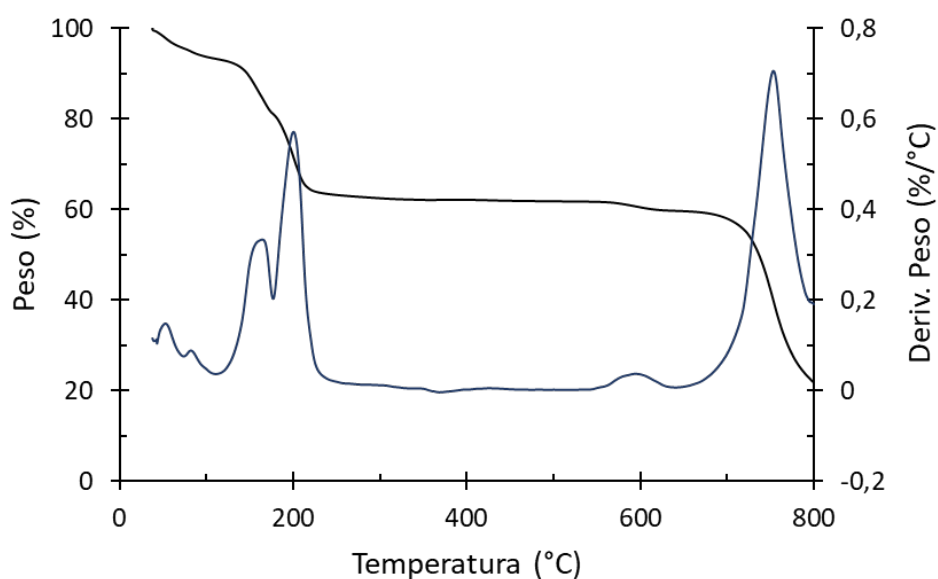


Figura 1.7. TGA del POMo mostrando la pérdida de peso (%) y su derivada (%/°C) entre 20-800 °C.

4.2 Actividad antioxidante

Se utilizó el DPPH^{*} para determinar la IC₅₀ y la AAI del POMo. La IC₅₀ del POMo (Tabla 1.1) se interpoló a partir del rango lineal ($R^2 \geq 0,99$) de cada concentración de DPPH^{*}. De acuerdo con los datos de la literatura, se considera que los compuestos presentan poca actividad antioxidante cuando AAI < 0,5; una actividad antioxidante moderada con un AAI entre 0,5 y 1,0; una actividad antioxidante fuerte entre 1,0 y 2,0 y muy fuerte cuando AAI > 2,0 (Scherer & Godoy, 2009). El AAI se determinó utilizando la Ec. 2, donde las concentraciones finales de las disoluciones de DPPH^{*} fueron 76,89; 47,75 y 30,75 µg/mL para las disoluciones de 0,2; 0,12 y 0,08 mM, respectivamente.

Tabla 1.1. Índice de Actividad Antioxidante (AAI) e IC₅₀ de POMo, Mo132 y Mo 154 frente a tres concentraciones diferentes de DPPH^{*} (0,08, 0,12 y 0,20 mM). Los resultados están expresados como la media junto a la desviación estándar.

DPPH [*] mM	POMo		Mo132		Mo154	
	AAI	IC ₅₀ (µg/mL)	AAI	IC ₅₀ (µg/mL)	AAI	IC ₅₀ (µg/mL)
0,08	2,97±0,12	10,95±0,58	1,86±0,04	16,7±1,4	0,78±0,04	39,1±1,6
0,12	3,13±0,20	15,0±1,5	1,87±0,07	26,4±1,7	0,82±0,04	60,5±6,1
0,20	3,35±0,20	22,0±1,5	1,77±0,06	42,9±2,0	0,75±0,05	99,9±1,8
Media	3,15±0,23	-	1,83±0,06	-	0,78±0,04	-

El control positivo de ácido ascórbico tuvo una AAI de 7,64, mientras que la IC₅₀ fue de 4,1; 6,35 y 9,73 µg/mL para 0,08; 0,12 y 0,20 mM, respectivamente. El POMo mostró una AAI de 3,15, lo que se considera como un antioxidante muy fuerte según la clasificación mencionada (Scherer & Godoy, 2009), mientras que la IC₅₀ fue de 10,95; 15 y 22 µg/mL para 0,08; 0,12 y 0,20 mM, respectivamente. Respecto al Mo154 y Mo132, sus AAI fueron de 0,78 y 1,83, respectivamente, lo que significa que el Mo154 tiene una actividad moderada. Mientras que el Mo132 tiene una AAI fuerte, aunque esta sea bastante inferior a la demostrada por el POMo (3,15). La actividad antioxidante del POMo es consistente con las propiedades redox de los POM de molibdeno con heteroátomos de S en la literatura consultada (Tanaka et al., 2018; Ueda, 2018). Además, su actividad frente al DPPH^{*} fue mayor que la de los otros dos POM de Mo utilizados y de otras nanopartículas metálicas como el NiO dopado con Mo (Alam et al., 2023) o del Se acuoso (Dumore & Mukhopadhyay, 2020).

4.3 Actividad eliminadora de radicales OH^{*}

Se estudió la actividad de eliminación de radicales libres para evaluar la capacidad del recubrimiento de PVA-POMo para reducir los radicales OH^{*} en un flujo de aire constante a través de la bolsa de PLA. La disminución de la hidroxilación del ácido salicílico a 2,5 DHB se logró con los dos materiales de envase basados en POMo, lo que significa que los porcentajes de hidroxilación más bajos corresponden a una actividad antioxidante más alta (Figura 1.8). Las

bolsas de PLA con recubrimiento de PVA-POMo 4 % produjeron una hidroxilación de $60,9 \pm 5,1$ %, mientras que las bolsas con PVA-POMo 10 % resultaron en una hidroxilación de $48,9 \pm 3,7$ %. La diferencia de hidroxilación entre ambas concentraciones fue del 12 %, lo que significa que la disminución de la hidroxilación del ácido salicílico no es proporcional a la concentración de POMo en el recubrimiento de PVA. Este ensayo ha sido capaz de demostrar la capacidad del POMo para eliminar los radicales OH^{\bullet} de la atmósfera del envase. Para que el material de envase desarrollado ejerza su actividad antioxidante, no es necesario el contacto directo entre el alimento envasado y el envase de PLA-PVA-POMo, ya que la actividad antioxidante se produce por eliminación de las ROS de la atmósfera del envase, como previamente descrito para otro tipo de envases basados en nanomateriales.

Aunque sólo se ha medido la actividad eliminadora de radicales OH^{\bullet} con POMo, se ha demostrado que otros óxidos de molibdeno son eliminadores de ROS de amplio espectro contra OH^{\bullet} , H_2O_2 , O_2^- y $^1\text{O}_2$ (Xie et al., 2015). Por lo tanto, el POMo debería poder eliminar otras ROS en la atmósfera del paquete además de OH^{\bullet} . Estas ROS pueden colisionar con las moléculas de POMo en la superficie del film o en las regiones más externas del recubrimiento, donde reaccionan y se transforman en sustancias no reactivas, reduciendo la probabilidad de iniciar los procesos de oxidación en el alimento (Vera et al., 2016). Este sería el mecanismo principal de actuación del envase de POMo, ya que el POMo no podría actuar como antioxidante por la eliminación de O_2 . Este se debe al hecho de que el POMo no tenía la capacidad intrínseca de poder reducir O_2 , ya que los polioxomolibdatos reducidos sólo se han utilizado como soporte para la reducción de O_2 por nanopartículas de Pd (Xie et al., 2015).

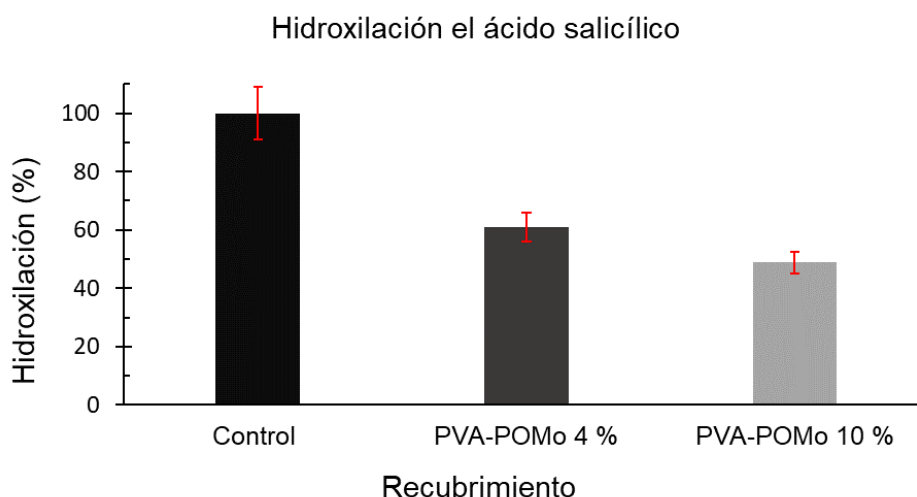


Figura 1.8. Porcentaje de hidroxilación de ácido salicílico tras 24 h de exposición de las bolas con recubrimiento de PVA-POMo a un flujo constante de radicales OH^{*}.

En comparación con otros films antioxidantes estudiados por este método, los recubrimientos de PVA-POMo mostraron una reducción prometedora de la actividad de hidroxilación producida por los radicales OH^{*} porque los valores de hidroxilación obtenidos están dentro del rango de los obtenidos para otros envases antioxidantes. Por ejemplo, los films multicapa de PET/LDPE con nanopartículas de selenio exhibieron valores de hidroxilación entre 25 y 70 % (Vera et al., 2016). En un recubrimiento de base orgánica sobre PET utilizando oleoresina de romero y extracto de té verde, la hidroxilación obtenida fue del 55 y 75 %, respectivamente (Song et al., 2020). Por lo tanto, el recubrimiento de POMo tiene una actividad eliminadora de radicales hidroxilo similar o incluso mejor que otros antioxidantes estudiados para el envasado de alimentos antioxidantes. Dado que los resultados obtenidos con ambos envases antioxidantes de PVA-POMo fueron similares o incluso mejores que los consultados en la literatura, se seleccionaron ambas concentraciones de POMo (4 y 10 %) para los ensayos de envasado antioxidante *in vivo* en melocotón de IV gama.

4.4 Envasado activo de melocotón de IV gama

4.4.1 Mediciones de color

El color del melocotón se midió con un colorímetro para calcular el ángulo de tonalidad y evaluar la influencia del material de envasado antioxidante a base de

POMo en el proceso de oxidación de la fruta. Un ángulo de tonalidad más cercano a 90° significa una rodaja amarilla, mientras que si está más cerca de 70° significa que la fruta está madurando o pardeando, ya que el ángulo de tonalidad del color del melocotón desciende con la maduración (Farcuh & Hopfer, 2023). Se observó una clara diferencia en el efecto del envase antioxidante de POMo entre las rodajas de melocotón lavadas y sin lavar con el baño antioxidante. En las rodajas de melocotón sin lavar (Figura 1.9), el día 0 el ángulo de tonalidad fue de $86,8 \pm 1,8^\circ$ y el día 12 descendió a $79,7 \pm 2,0^\circ$ en el control con PVA, a $83,6 \pm 0,1^\circ$ con PVA-POMo 4 %, y a $80,2 \pm 1,5^\circ$ en el envase de PVA-POMo 10 %. El PVA-POMo 4 % fue mejor en mantener el color del melocotón ($p < 0,05$) que las muestras de control en todos los días, mientras que el PVA-POMo 10 % solo fue significativamente mejor ($p < 0,05$) que el control en el día 4. Entre ambas concentraciones de POMo, la del 4 % produjo mejores resultados ($p < 0,05$) que la del 10 % excepto en el cuarto día, donde no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). En las rodajas de melocotón lavadas (Figura 1.9), se observó un comportamiento similar entre el control y el PVA-POMo 4 %. Ambos comenzaron en $87,3 \pm 2,2^\circ$ el día 0 y, en el día 12, hubo una disminución a $80,0 \pm 2,1^\circ$ para el control de PVA y a $80,6 \pm 1,9^\circ$ para PVA-POMo 4 %, y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los envases. Mientras que en el caso del envase de PVA-POMo 10 %, el ángulo de tonalidad también evolucionó de forma similar al control, a excepción del día 12 donde el grado de tonalidad fue de $84,1 \pm 0,3^\circ$ para PVA -POMo 10 %, superando ($p < 0,05$) al del control y al del PVA-POMo 4 %. No obstante, esta muestra parecía extraña y podría considerarse un valor atípico. Esto podría deberse a la variabilidad intrínseca del estado de maduración de las rodajas de melocotón.

No se observó ningún efecto sinérgico ni aditivo entre el baño antioxidante y el envase activo de PVA-POMo. Por lo tanto, la combinación del tratamiento y el envase antioxidante no mejoró el mantenimiento del color en las rodajas de melocotón porque, para el envase de PVA-POMo 4 %, por ejemplo, se obtuvieron ángulos de tonalidad de $83,6 \pm 0,1^\circ$ y $80,6 \pm 1,9^\circ$ para las rodajas de melocotón sin lavar y lavadas, respectivamente en el día 12.

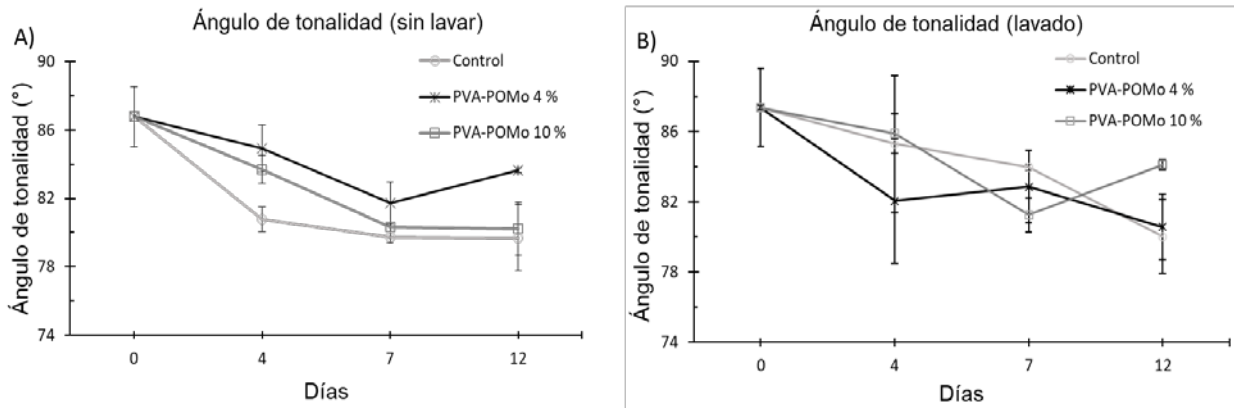


Figura 1.9. Evolución del color desde el día 0 al 12, expresado como ángulo de tonalidad, del envase de PVA-POMo para rodajas de melocotón sin lavar (A) y lavadas (B).

4.4.2 Índice de pardeamiento

El pardeamiento de las rodajas de melocotón se evaluó calculando el índice de pardeamiento (IP) y comparándolo con la medida del color para evaluar la influencia del POMo en el proceso de oxidación de la fruta. Los resultados (Figura 1.10) mostraron que las rodajas de melocotón con el envase de PVA-POMo 4 % sin lavar fueron las que mostraron menos pardeamiento. Al día 12, el envase control mostró un índice de pardeamiento de 4,5, mientras que el envase de PVA-POMo 4 % tuvo un índice de 3 y PVA-POMo 10 % de 4. PVA-POMo 4 % fue significativamente mejor ($p < 0,05$) que PVA-POMo 10 % y el control los días 7 y 12. En las rodajas de melocotón lavadas (Figura 1.10), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras con PVA-POMo 4 y 10 % y el control en los días 4 y 7. Sin embargo, en el día 12, los envases antioxidantes (PVA-POMO 4 y 10 %) con un IP de 4 fueron mejores ($p < 0,05$) que el control (IP=4,5).

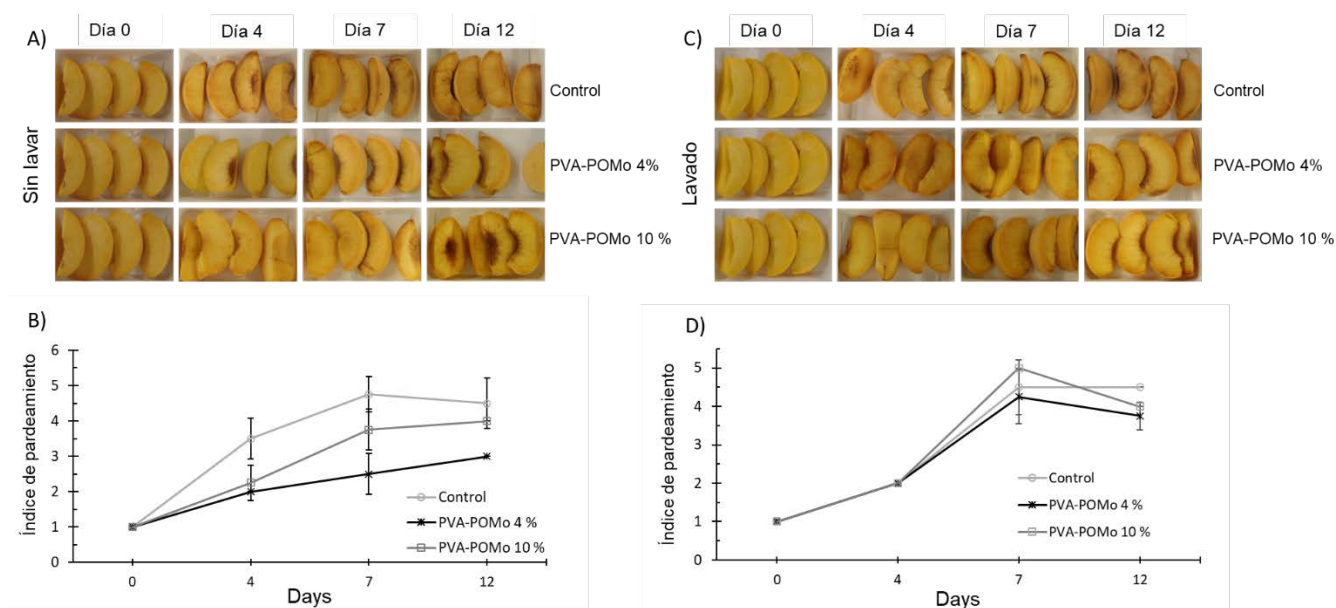


Figura 1.10. Imágenes de las rodajas de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (C), y la evolución del índice de pardeamientos de las rodajas de melocotón, sin lavar (B) y lavadas (D), con el envase antioxidante de PVA-POMo 4 y 10 % y el control sin POMo, desde el día 0 al 12.

El melocotón de IV gama tuvo un índice de pardeamiento más bajo ($p < 0,05$) en las muestras sin lavar, que en las rodajas lavadas donde todas las muestras tuvieron un aumento de pardeamiento en el día 7. Además, las mediciones del ángulo de tonalidad y el índice de pardeamiento confirman que el PVA-POMo 4 % es capaz de prolongar el color natural y reducir el pardeamiento en las rodajas de melocotón sin lavar.

El ángulo de tonalidad y el índice de pardeamiento arrojaron resultados similares que no muestran ningún efecto sinérgico del tratamiento antioxidante y el envase de PVA-POMo. La reducción de la eficacia del envase de PVA-POMo al 10 % podría deberse al hecho de que el porcentaje de gramaje y peso de POMo (peso de POMo: 53 %) presente en el recubrimiento redujo la permeabilidad al agua de los films de PLA (Duan & Thomas, 2014). Esta hipótesis también se puede confirmar con la observación de la condensación de agua en las tapas de los envases de PVA-POMo al 10 %.

4.4.3 Acidez del melocotón y sólidos solubles totales

Se midió el pH y la acidez titulable del zumo de melocotón para saber si el POMo afectaba o no la maduración. La acidez está relacionada con el estado de madurez del melocotón, siendo que, durante la maduración de la fruta, el pH debe aumentar con el tiempo mientras que la acidez titulable debe disminuir (Barcelon et al., 1999). En cuanto al pH (Figura 1.11), no se observó influencia perjudicial del envase antioxidante en las rodajas de melocotón sin lavar con el baño antioxidante. Mientras tanto, en las rodajas lavadas, la influencia de los films de PVA-POMo sobre el pH y, por lo tanto, sobre la maduración, fue significativamente mejor ($p < 0,05$) que en los films control de PVA únicamente el día 7. Donde el pH de las muestras control fue de 4,51, mientras que con PVA-POMo 10 % fue de 4,38 y con PVA-POMo 4 % fue de 4,20, lo que significaría que el envase es capaz de retardar el aumento del pH provocada por las ROS, sin necesidad de contacto directo con las rodajas de melocotón. El mecanismo de acción de este tipo de envases antioxidantes se conoce como captación de radicales (Nerín, 2010). Se trata de envases antioxidantes que tienen la capacidad de captar las ROS del ambiente del envase en cuanto se crean los radicales, retrasando así la oxidación y maduración de los alimentos sin la necesidad de estar en contacto directo con los alimentos (Nerín et al., 2008).

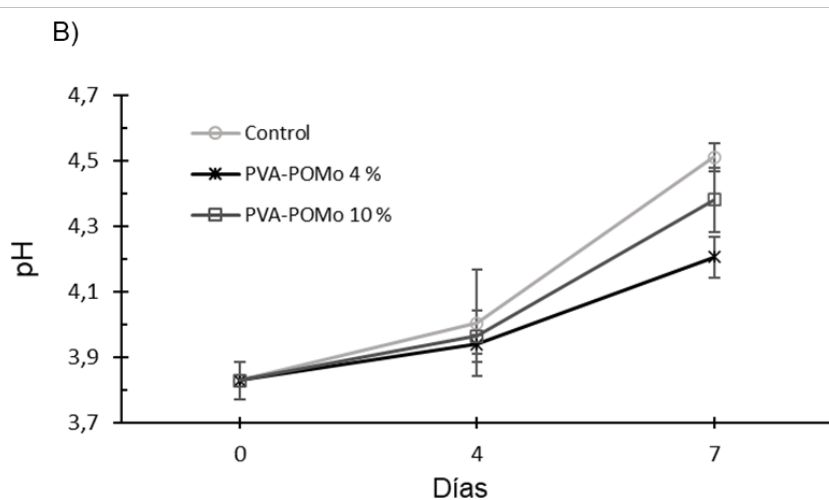
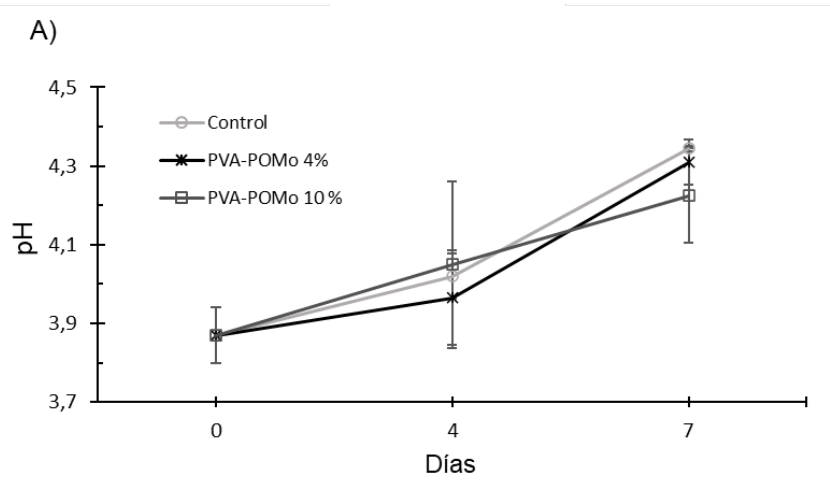


Figura 1.11. Determinación del pH de las muestras de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo y el control de PVA.

En cuanto a la acidez titulable no se observaron diferencias significativas (Figura 1.12) entre el control y los envases de PVA-POMo tanto en rodajas de melocotón lavadas como sin lavar, a excepción del día 4 donde la acidez fue mayor para el envase de PVA-POM 4 % en las muestras de melocotón lavadas. De acuerdo con los resultados observados, el PVA-POMo no tendría efecto sobre la maduración de la fruta. Ya que, tanto el pH como la acidez de las muestras lavadas con PVA-POMo (4 y 10 %), únicamente fueron significativamente mejores en uno de los días de los ensayos.

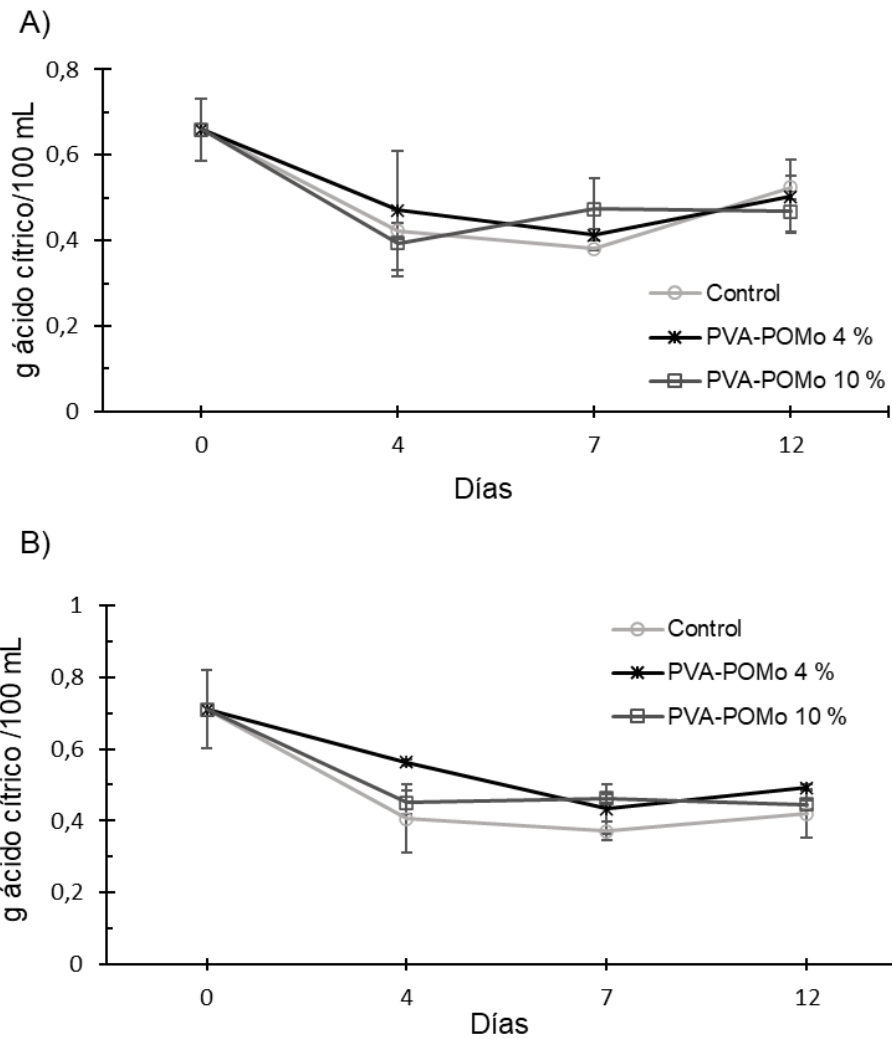


Figura 1.12. Determinación de la acidez de las muestras de melocotón, sin lavar (A) y lavadas (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo y el control de PVA.

Se midieron los sólidos solubles totales para saber si el POMo afectaba a la madurez y la producción de azúcares solubles en las rodajas de melocotón, ya que tienden a aumentar con la maduración (Lopresti et al., 2014). No se observó relación entre el POMo y la producción de azúcares solubles, ya que no hubo diferencias significativas entre los envases control con PVA y con PVA-POMo.

Así, debido a los resultados de pH, acidez y sólidos solubles totales, el envase antioxidante de PVA-POMo no tuvo ningún efecto significativo en el retraso de la maduración del melocotón. Solo pudo mantener un pH más bajo en las rodajas de melocotón lavadas, pero debido a la falta de datos del día 12, no podemos asegurar que el efecto se mantenga. Además, los resultados obtenidos indican que el envase de PVA-POMo (4 y 10 %) no tiene ningún efecto perjudicial sobre

la maduración, ya que no la acelera en el caso de la ausencia de un lavado antioxidante previo.

4.5 Volátiles de melocotón

Los volátiles estudiados fueron las lactonas γ -decalactona, δ -decalactona y γ -dodecalactona, los aldehídos 2-hexanal y benzaldehído, y otros dos compuestos, β -ionona y 2-etilhexanol fueron seleccionados por su impacto en el aroma del melocotón y en su aceptación por el consumidor (Aubert et al., 2014; Montero-Prado et al., 2013).

Se midieron los volátiles del melocotón para saber si el POMo obstaculizaba la producción de volátiles, lo que podría tener un impacto directo en la aceptación del melocotón envasado por parte del consumidor. Para ello, se analizaron muestras de melocotón a los días 7 y 12 para examinar posibles cambios en la producción de volátiles.

Para las muestras de melocotón lavadas con el baño antioxidante (Figura 1.13), las lactonas, γ -decalactona y δ -decalactona, sufrieron una disminución (30-32 % y 61-65 %, respectivamente) entre los días 7 y 12 para todas las muestras, con excepción del envase de PVA-POMo 10 % donde la reducción de δ -decalactona fue ligeramente más pequeña (51 %). Por otro lado, para la γ -dodecalactona, hubo un aumento similar en el control y las muestras de PVA-POMo (60 %). Para los aldehídos, se observó una disminución general en su concentración. Sin embargo, el 2-hexanal tuvo una reducción menor (26 %) en el envase POV-POMo 4 % y la concentración de benzaldehído aumentó (36 %) en el paquete PVA-POMo 10 %. Para la β -ionona, se observó un gran aumento en la concentración en el control y las muestras. En el caso del 2-etilhexanol, el envase de PVA-POMo al 10 % evitó la disminución de concentración observada en el control (56 %) y el envase de PVA-POMo 4 % (63 %).

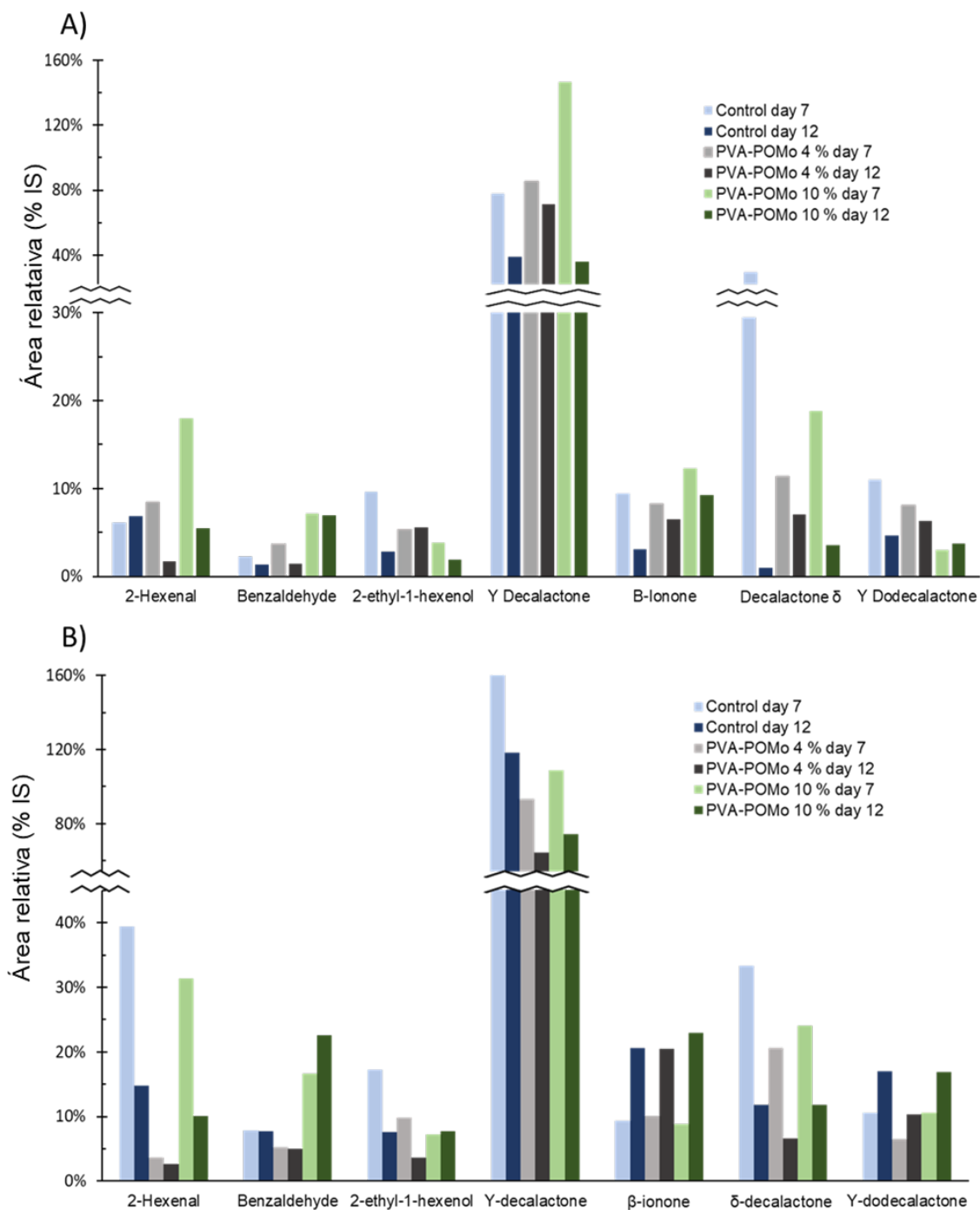


Figura 1.13. Determinación por GC-MS de los principales volátiles de las muestras de melocotón, lavadas (A) y sin lavar (B), con el envase antioxidante de PVA-POMo. Expresado como el porcentaje del área relativa del estándar interno utilizado.

Para las muestras de melocotón sin lavar con el baño de antioxidante (Figura 1.13), las lactonas, γ -decalactona y δ -decalactona disminuyeron en el control (50 y 97 %, respectivamente), aunque la disminución fue menor con PVA-POMo 4 %

(17 y 38 %, respectivamente). Por otro lado, para la γ -dodecalactona, ambos envases antioxidantes funcionaron mejor que el control. Para los aldehídos, el 2-hexenal fue el único volátil donde el control fue mejor que en los envases antioxidantes, ya que la concentración mejoró en un 11 % en lugar de disminuir. En el caso del benzaldehído, PVA-POMo 10 % casi logró mantener su concentración (del 7,2 % el día 7 al 6,9 % el día 12) en comparación con el control. Para la β -ionona, la disminución fue menor en ambos envases antioxidantes que en control (alrededor del 20 %). En el caso del 2-etilhexanol, ambos envases antioxidantes fueron mejores que el control, siendo que el PVA-POMo 4 % incluso causó una mejora en la concentración de β -ionona en un 4 %.

El envasado antioxidante PVA-POMo funcionó mejor que el control en la mayoría de los volátiles estudiados en rodajas de melocotón lavadas y sin lavar. Solo en el caso del 2-hexenal el control fue mejor que el envase antioxidante con el melocotón sin lavar, aunque se observa una gran variabilidad entre muestras tanto para las muestras sin lavar como para las lavadas, probablemente debido a los diferentes estados de maduración de las muestras de melocotón (Kakiuchi & Ohmiya, 1991; Xin et al., 2018).

El comportamiento de las sustancias volátiles fue similar al observado en otros estudios (Aubert et al., 2014; Raffo et al., 2008; Visai & Vanoli, 1997), y en función del estado inicial de maduración del melocotón. En general, los envases antioxidantes de PVA-POMo no obstaculizaron los volátiles y en algunos casos incluso evitaron una gran disminución o incluso mejoraron su liberación en comparación con el control, como el benzaldehído o 2-etilhexanol con PVA-POMo 10 % en las muestras de melocotón sin lavar o γ -decalactona y δ -decalactona con PVA-POMo 4 % en las muestras de melocotón lavado.

5. Conclusión

El desarrollo de materiales de envasado activos antioxidantes para extender la vida útil de frutas de IV gama es crucial para mejorar su consumo en todo el mundo, al tiempo que reduce el desperdicio alimentario. Esto ha llevado, en este estudio, al desarrollo de un nuevo envase antioxidante a base de polioxometalatos (PVA-POMo) y films de PLA, como una solución de envasado

viable para frutas de IV gama, como los melocotones, que son altamente propensas a sufrir procesos de oxidación. El polioxomolibdato POMo mostró una actividad antioxidante muy fuerte y también fue capaz de reducir la hidroxilación producida por los radicales OH^{*} cuando se incorporó como recubrimiento de PVA en films de PLA. Además, los envases de PVA-POMo fueron capaces de disminuir el pardeamiento en el melocotón envasado de IV gama en atmósfera normal sin afectar a su maduración. Además, el recubrimiento antioxidante de PVA-POMo no afectó e incluso mejoró la calidad volátil de la fruta, un factor que es primordial para conseguir la aceptación del consumidor. En general, los films de PLA con PVA-POMo 4 % produjeron mejores resultados en la mayoría de los ensayos, lo que justifica el uso de recubrimientos menos concentrados y, por lo tanto, reduciendo los costes y recursos para la producción del envase antioxidante.

En general, los resultados obtenidos muestran una nueva y prometedora oportunidad para el desarrollo de envases antioxidantes para frutas de IV gama y abre un nuevo campo para la explotación de polioxometalatos como antioxidantes y su uso en el sector alimentario. Adicionalmente, esta estrategia puede incluso eliminar la necesidad de utilizar baños de antioxidantes aplicados a la fruta, ya que este recubrimiento podría ser un sustituto efectivo del mismo, sin requerir ningún contacto directo entre el envase y la fruta, disminuyendo así la presencia de químicos en la fruta de IV gama y su posterior ingestión por los consumidores.

CAPÍTULO 2

Síntesis de un complejo antimicrobiano de etil lauroil arginato y desarrollo de films antimicrobianos para jamón curado

Índice:

1. Introducción.....	159
2. Objetivos.....	162
3. Materiales y métodos.....	163
4. Resultados y discusión.....	179
5. Conclusión.....	202

1. Introducción

Las enfermedades alimentarias causadas por microorganismos contaminantes de los alimentos suponen un grave peligro para la población mundial, especialmente en países poco desarrollados donde las condiciones de higiene y almacenamiento de los alimentos son deficientes (FAO, 2022). Estas contaminaciones, en su mayoría, tienen lugar durante el procesado del alimento en la industria alimentaria, el almacenamiento y la manipulación en los hogares, en un proceso denominado contaminación cruzada (Alía, et al., 2020b; Kwok et al., 2022). Esta situación es especialmente grave en el caso de los alimentos listos para el consumo (RTE), ya que no reciben ningún tratamiento térmico previo a su consumo, por lo que las bacterias presentes no son eliminadas al cocinarlo. En los últimos años, los alimentos con baja actividad de agua se han asociado cada vez más con brotes de enfermedades debido a la contaminación de los alimentos RTE por patógenos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* o *Escherichia coli* verotoxigénica (EFSA, 2022; Gurtler et al., 2014). Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que inhiban el crecimiento de estas bacterias y sus biofilms.

Un antimicrobiano eficaz frente a bacterias patógenas alimentarias es el etil lauroil arginato (LAE, E-243). El LAE es un compuesto catiónico sintético soluble en agua (FAO, 2008) que tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a mohos, levaduras y bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, debido a sus propiedades como surfactante (Becerril et al., 2013; Pezo et al., 2012). La Unión Europea ha incluido el LAE como aditivo alimentario conservante en productos cárnicos tratados térmicamente, estableciéndose una dosis máxima, en su uso como conservante, de 160 mg/kg. Además, el LAE también se considera una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) (Comisión Europea, 2008; Nerin et al., 2016). En cuanto a su toxicidad en humanos, la EFSA ha concluido que este compuesto no es genotóxico en mamíferos, siendo los NOAEL (máxima concentración de una sustancia que no causa alteraciones adversas observables) calculados de 106 mg/kg/día y de 50 mg/kg/día (EFSA, 2013). La EFSA, basándose en estos informes sobre el LAE, establece una ingesta diaria aceptable (ADI) de 0,5 mg/kg peso corporal/día para humanos (EFSA, 2009b).

Esta baja toxicidad se debe a la rápida metabolización del LAE en etanol, urea y CO₂, por lo que, en la ingestión humana, el LAE se descompondrá rápidamente en productos normales del metabolismo y es excretado.

Debido a las características del LAE como conservante alimentario y a su baja toxicidad en los últimos años se han propuesto varias estrategias para su aplicación como conservante en alimentos, siendo una de ellas su incorporación a materiales de envase para el desarrollo de envases alimentarios activos el envasado activo alimentario que ha sido investigado especialmente en pollo y derivados de pollo (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Ejemplos de utilización del LAE como agente activo antimicrobiano en films de distintos materiales para envase activo alimentario.

Material de envasado	Alimento	Adición	Referencia
Quitosano	Pollo	Incorporación directa	(Higueras et al., 2013)
Zein	Sopa de pollo	Incorporación directa	(Kashiri et al., 2019)
Quitosano y PVA	-	Incorporación directa	(Haghighi et al., 2020)
Nanocelulosa	-	Incorporación directa	(Silva et al., 2019c)
EVOH	Pollo	Incorporación directa	(Muriel-Galet et al., 2016)
PP	Queso	Coating	(Otero et al., 2014)

Sin embargo, el LAE tiene un grave problema a la hora de su utilización como agente activo en envase activo alimentario debido a su elevada solubilidad en agua resultante de su carácter iónico. Esto provoca su liberación del envase activo al alimento, lo que dificulta su uso antimicrobiano, ya que la liberación rápida y casi total inicial no permite mantener a largo plazo la actividad

antimicrobiana del LAE en el alimento (Silva et al., 2019c). Además, su liberación también provoca que la ADI pueda alcanzarse o superarse fácilmente en lactantes y niños pequeños (Younes et al., 2019). Por lo tanto, se demandan nuevas estrategias para reducir su disponibilidad y solubilidad en agua.

Una estrategia para aumentar la insolubilidad de LAE en agua sería a través de la formación de complejos de LAE con polioxometalatos (POM). Ya que gracias a la naturaleza aniónica de los POM estos son capaces de formar complejos con compuestos catiónicos (Figura 2.1), pudiendo combinarse con cationes funcionales y producir compuestos multifuncionales (Song & Tsunashima, 2012). Recientemente, se ha demostrado que estas uniones entre POM y catión pueden formar complejos antimicrobianos altamente efectivos y ser utilizados como recubrimientos de superficies, como los líquidos iónicos de polioxometalato (POM-IL) que el POM $K_8SiW_{11}O_{39}$ tiene la capacidad de formar (Enderle et al., 2022; Kubo et al., 2017; Misra et al., 2018).

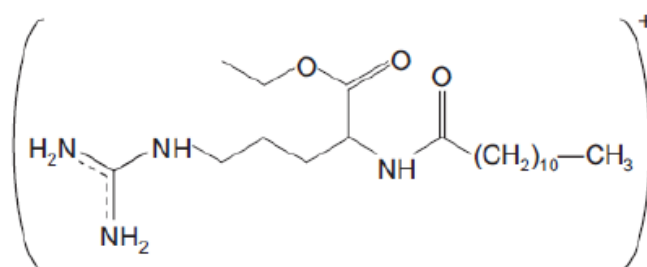


Figura 2.1. Estructura catiónica del etil lauroil arginato (LAE) que le puede permitir formar complejos con compuestos aniónicos.

Además, respecto a su toxicidad, se ha demostrado que los polioxowolframatos son tóxicos contra las células mononucleares primarias de sangre periférica humana en concentraciones superiores a $79,5 \mu\text{M}$ (Rhule et al., 1998). Si bien no existen estudios sobre la ingesta diaria admisible (IDA) de polioxowolframatos, los datos de la literatura mencionan que la dosis letal media oral (LD_{50}) es superior a 2000 mg/kg de peso corporal (NICNAS, 1996). De esta forma la formación de un complejo de etil lauroil arginato (LAE) catiónico con POM aniónicos podría generar un agente antimicrobiano efectivo que, además, podría limitar la solubilidad acuosa del LAE y, así integrar dichos complejos en

envases activos antimicrobianos para alimentos RTE, mejorando la liberación del LAE del material de envase en presencia de agua.

A la hora de desarrollar nuevos envases activos alimentarios es vital que sean biodegradables para reducir el grave problema ambiental de la contaminación producida por plásticos, ya que los envases producen alrededor del 60 % de los residuos plásticos en la UE, principalmente a través de plásticos de un solo uso, que son los utilizados generalmente en el envasado alimentario, especialmente en los alimentos RTE (Comisión Europea, 2018; FAO, 2021). Una alternativa a los materiales de envasado tradicionales implica el uso del PLA, que es un biopolímero que se obtiene a partir de la fermentación de carbohidratos del almidón y que ya se utiliza comercialmente para envase alimentario (Del Nobile et al., 2009; Gan & Chow, 2018). Las propiedades del PLA incluyen la alta resistencia mecánica, excelente capacidad de termoformado, su biocompatibilidad y biodegradabilidad (compostable). Además, el PLA se puede utilizar en envase activo alimentario añadiendo directamente al polímero los agentes activos antimicrobianos o antioxidantes (Jin & Zhang, 2008; Videira-Quintela et al., 2022) para la formación de films activos por extrusión o *casting*.

Otra alternativa al uso de polímeros plásticos tradicionales es la carboximetilcelulosa (CMC), un polisacárido derivado de la celulosa (Huang & Wang, 2022), lo que hace que la CMC sea un excelente producto sostenible y una opción barata para desarrollar films biodegradables, ya que es soluble en agua. La CMC es actualmente uno de los derivados más comunes utilizados en la preparación de films porque, cuando se entrecruza con ácido cítrico, aumenta su resistencia al agua y disminuye su capacidad de hinchamiento (Dashipour et al., 2015; Kanatt & Makwana, 2020). Por lo tanto, los films desarrollados con estos biopolímeros podrían usarse junto a agentes activos antimicrobianos en alimentos RTE con baja actividad de agua.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antibacteriana del complejo LAE₇KSiW₁₁O₃₉ (POM-LAE) y desarrollar nuevos films biodegradables frente a bacterias patógenas alimentarias. Para ello, se sintetiza en una reacción de intercambio catiónico del polioxowolframato monolacunar K₈SiW₁₁O₃₉ con LAE

para formar un complejo híbrido antimicrobiano, POM-LAE. Posteriormente, el complejo POM-LAE se agregó a granza de PLA para realizar films antimicrobianos por extrusión por soplado. Adicionalmente, se ha añadido el complejo POM-LAE a la CMC para producir films antimicrobianos de POM-LAE-CMC por casting (Figura 2.2). Por último, se ha evaluado la actividad antibacteriana de ambos films *in vitro* y el film con más actividad se ha seleccionado para pruebas *in vivo* como envase activo para jamón curado.

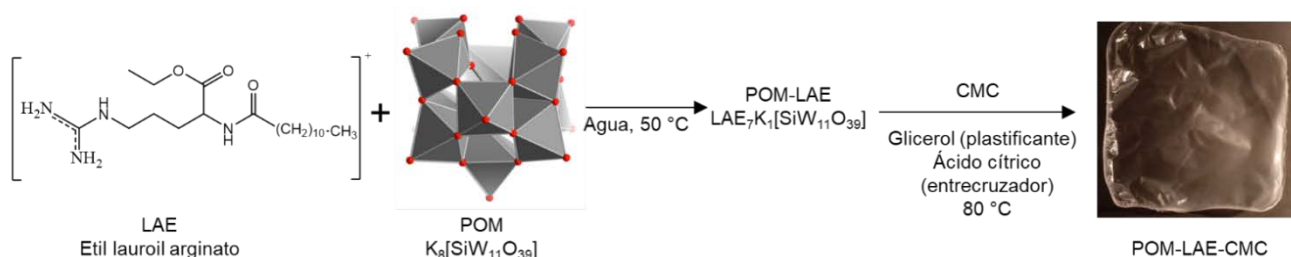


Figura 2.2. Proceso de síntesis de los films de CMC con POM-LAE, desde la síntesis inicial del complejo antimicrobiano hasta su incorporación al film de CMC.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

El etil lauroil arginato al 20 % en etanol (LAE) (Myrenat®-ET) se adquirió a VEDEQSA, España. El ácido clorhídrico al 37% (HCl) se adquirió a Scharlab, España. El metasilicato de sodio pentahidratado al 98 % ($Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$), el wolframato de sodio tetrahidratado > 99 % ($Na_2WO_4 \cdot 4H_2O$) y la carboximetilcelulosa (CMC) se adquirieron a Sigma-Aldrich, Alemania. El cloruro de potasio al 92 % (KCl) se compró a Merck, Alemania. El ácido poliláctico (PLA) PLE 005-A y el aditivo MOC 006 se compraron en forma de granza a Natureplast, Francia.

3.2 Síntesis y caracterización

3.2.1 $K_8[SiW_{11}O_{39}]$ (POM)

La síntesis fue una modificación del protocolo citado en la literatura (Tézé et al., 1990). Brevemente, se disolvió $Na_2WO_4 \cdot 4H_2O$ (182 g, 0,55 mol) en agua destilada (300 ml) y la disolución se calentó a reflujo a $120\text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se añadió gota a gota HCl acuoso 4 M (165 ml) a la disolución con agitación

vigorosa y se dejó a reflujo durante 30 min a 120 °C. Se permitió que cualquier precipitado formado (ácido wolfrámico) se volviera a disolver antes de agregar más ácido. Se añadió una disolución acuosa de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (11 g, 50 mmol en 100 ml de agua destilada) seguida de una adición rápida de HCl acuoso 4 M (50 ml), obteniendo una disolución con un pH de 5,0. Posteriormente, la disolución se calentó a reflujo durante 1 hora a 120 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió KCl (150 g) y se formó un precipitado incoloro. El producto sólido se recogió por filtración, se lavó dos veces con 50 ml de una disolución acuosa de KCl (1 M) seguido de otros dos lavados de 30 ml de H_2O ultrapura fría. El producto bruto se recristalizó en agua, se filtró y el producto cristalino incoloro se secó en el desecador a vacío (rendimiento: 173,25 g, 67,4 % basado en Si).

3.2.2 LAE₇K[SiW₁₁O₃₉] (POM-LAE)

La síntesis del POM-LAE se llevó a cabo de la siguiente forma. Se disolvieron 8 g de POM en 50 mL de agua con agitación magnética a 50 °C, luego se añadieron gota a gota 46 g de LAE (80% etanol, Myrenat®-ET, VEDEQSA, España) hasta la aparición de un precipitado. Después de la formación del precipitado, se mantuvo la agitación durante 30 min, seguido de centrifugación a 2504 g durante 15 min. Luego, el precipitado de POM-LAE se lavó con etanol y se centrifugó a 2504 g durante 10 min. Finalmente, el polvo resultante se secó a 50 °C durante 48 h (rendimiento: 12,86 g, 92 % basado en W).

Para la caracterización se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) en un analizador térmico Q5000SA (TA Instruments, EE. UU.), y las mediciones se realizaron en aire con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ desde temperatura ambiente hasta 800 °C. También se realizó espectroscopia FTIR-ATR del producto de síntesis en un FT-IR 4100 (Jasco, Japón) utilizando muestras en polvo sin preparación adicional. Los espectros se tomaron con 32 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹ en un rango de número de onda de 500–4000 cm⁻¹.

3.3 Concentración Micelar Crítica

Para calcular la concentración micelar crítica se utilizó un método de conductividad extraído de la literatura con algunas modificaciones (Poša et al.,

2009). Las conductividades se midieron utilizando un medidor de conductividad FiveEasy (Mettler Toledo, Suiza) con un electrodo LE703 (Mettler Toledo, Suiza). Se prepararon muestras de POM-LAE con concentraciones de 0,325; 0,3; 0,275; 0,25; 0,225; 0,2; 0,175; 0,15; 0,125 y 0,10 % (p/p) y muestras de LAE con concentraciones de 1,2; 1,1; 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 y 0,1% (p/p). Las muestras se prepararon con DMSO al 50 % debido a la baja solubilidad en agua de POM-LAE. Toda el agua utilizada fue agua ultrapura.

3.4 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron cuatro cepas bacterianas de referencia: *Listeria monocytogenes* CECT 911 serotipo 1/2c, *Escherichia coli* CECT 5947 serotipo O157:H7 (no toxigénico), *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *Bacillus cereus* CECT 131. Las cepas bacterianas se almacenaron en el medio de cultivo apropiado suplementado con glicerol al 30% (v/v) a -80 °C hasta su uso. *E. coli* CECT 5947, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *B. cereus* CECT 131 se subcultivaron en placas de agar Mueller-Hinton (MHA, Scharlab, España) a 37 °C en condiciones aerobias, mientras que *L. monocytogenes* CECT 911 se subcultivó en placas de agar con infusión de cerebro y corazón (agar BHI, Scharlab, España) en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera.

En cuanto al crecimiento en medio líquido, *E. coli*, *S. Typhimurium* y *B. cereus* se cultivaron a 37 °C en condiciones aeróbicas utilizando medio Mueller-Hinton ajustado por cationes (MHB, Scharlab, España), mientras que para *L. monocytogenes* se utilizó medio Mueller-Hinton-F (MH-F) (medio líquido MH con ajuste de cationes suplementado con sangre de caballo lisada al 5%).

3.5 Ensayos antimicrobianos *in vitro* del POM LAE

3.5.1 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana POM-LAE

Para evaluar la actividad antimicrobiana del compuesto POM-LAE (LAE₇K[SiW₁₁O₃₉]) y sus componentes, se utilizó un método de microdilución en caldo de acuerdo con las pautas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M07-A9 y M45 para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) (CLSI, 2012, 2015) y M26-A para la concentración mínima bactericida (MBC) (CLSI, 1999). Brevemente, se prepararon suspensiones de *E. coli*, *S.*

Typhimurium y *B. cereus* a partir de colonias cultivadas durante la noche a 37 °C en agar MHA y a partir de BHI agar en el caso de *L. monocytogenes*. Para la preparación del inóculo, esta suspensión se diluyó hasta obtener una absorbancia a 600 nm de 0,08-0,12 (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL) en una disolución de NaCl al 0,9%. Luego, se preparó una dilución 1:100 del inóculo en medio líquido MHB para *E. coli*, *S. Typhimurium* y *B. cereus*, y MH-F para *L. monocytogenes* para obtener una concentración final de inóculo de 1×10^6 UFC/mL. La disolución madre de POM-LAE se preparó a 25 mg/mL en DMSO. En una placa de 96 pocillos estéril se prepararon diluciones seriadas (factor de dilución 1:2) en un rango entre 1024 y 8 µg/mL de POM-LAE en medio líquido MHB o MH-F, de acuerdo con los requerimientos de crecimiento de cada bacteria. Esto garantiza que la concentración final de DMSO en los medios de cultivo no supere el 2 % en la concentración más alta de POM-LAE, para evitar cualquier efecto tóxico del DMSO sobre el crecimiento bacteriano (Kothari, 2009). Se agregaron 50 µL del inóculo bacteriano a cada pocillo de la placa de 96 pocillos conteniendo las diluciones de antimicrobiano (POM-LAE), obteniendo un volumen final de 100 µL con una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/mL y una concentración final de antimicrobiano que oscilaba entre 512 y 4 µg/mL. Se prepararon controles positivos para cada bacteria en su respectivo medio de cultivo con DMSO al 2%, correspondiente a la concentración máxima de DMSO utilizada. Los controles negativos se prepararon con agente antimicrobiano en el rango de concentración probado (512-4 µg/mL) y medio de cultivo. Se realizó la misma preparación para LAE para comparar la actividad antimicrobiana del LAE libre y complejado con el POM. Luego, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. El valor de MIC se determinó como la concentración en la que no se pudo observar un crecimiento visible. Estos resultados fueron confirmados por lecturas de absorbancia a 620 nm en lector de microplacas (Thermo Scientific, España) y con resazurina. Brevemente, se preparó una disolución de resazurina con una concentración de 1 mg/mL en agua. A continuación, se diluyó en el medio apropiado de cada bacteria para alcanzar una concentración de 0,1 mg/mL. Finalmente, se añadieron 30 µL, de la disolución de 0,1 mg/mL, a cada pocillo utilizado y se incubó durante 1 h a 37 °C y se observó si se producía cambio de color de morado a rosa. Si la resazurina

mantenía su color morado no había crecimiento bacteriano, mientras que si cambiaba a color rosa sí que había crecimiento bacteriano.

Para determinar la MBC, se sembraron gotas de 20 μL de los pocillos correspondientes a valores iguales y superiores al valor de MIC en placas de agar MHA y MH-F y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La MBC se determinó como la concentración en la que están presentes menos de 5 colonias, lo que corresponde a una reducción de viabilidad de 3 log (99,9%). El proceso se repitió al menos cinco veces y se seleccionaron los valores modales para MIC y MBC.

3.5.2 Actividad antimicrobiana del POM-LAE tras incubación

Se evaluó la actividad antimicrobiana del POM-LAE frente a *L. monocytogenes* simulando las temperaturas de extrusión a diferentes tiempos. Para ello, el POM-LAE se incubó a 165 °C durante 15, 30, 60 y 90 min. El resto de las condiciones de preparación del ensayo fueron idénticas a las realizadas en el apartado anterior. También se realizó el mismo ensayo con un POM-LAE sin incubación a 165 °C. El valor de concentración inhibitoria del POM-LAE se determinó como la concentración en la que no se pudo observar un crecimiento visible y, en caso de duda, se confirmó llevando a cabo el ensayo de resazurina previamente explicado. El ensayo se realizó por triplicado hasta que se obtuvieron tres valores iguales.

3.5.3 Ensayos de susceptibilidad de biofilms

La actividad antibiofilm frente *L. monocytogenes* y *E. coli* se determinó según Luís y colaboradores (Luís et al., 2014) con algunas modificaciones. Para la determinación del efecto del POM-LAE en la formación de biofilms, se prepararon suspensiones bacterianas a partir de un cultivo en medio líquido crecido durante la noche y la turbidez de la suspensión se ajustó a OD_{600} de 0,04 (2×10^7 UFC/mL). A continuación, las disoluciones de POM-LAE se prepararon como se describió anteriormente para la determinación del valor de MIC. Después, se agregaron 50 μL del inóculo bacteriano a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía la respectiva dilución antimicrobiana (512-8 $\mu\text{g/mL}$), obteniendo un volumen final de 100 μL . Esto resultó en una concentración final del inóculo de 1×10^7 UFC/mL en cada pocillo y una concentración antimicrobiana final de 256-4 $\mu\text{g/mL}$. Luego, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C. Se

prepararon controles positivos, para los cálculos del porcentaje de inhibición, para cada bacteria en su respectivo medio de cultivo con un 2% de DMSO. Los controles negativos se prepararon solo con medio de cultivo.

También se examinó el efecto de POM-LAE en biofilms preformados (24 h). Los biofilms se prepararon inoculando la suspensión de *L. monocytogenes* y *E. coli* en los pocillos de una placa de 96 pocillos como se mencionó anteriormente. Después de la incubación a 37 °C durante 24 h, se decantó el sobrenadante del cultivo de cada pocillo y se eliminaron las células planctónicas lavando los pocillos con NaCl al 0,9 %. Posteriormente, se prepararon diluciones en serie de POM-LAE como se describió anteriormente y se agregaron 100 µL de cada dilución a los biofilms preformados en los pocillos. A continuación, la placa se incubó a 37 °C durante 24 h. Para este ensayo, el inóculo bacteriano cultivado en medio de cultivo se usó como control positivo y como control negativo se utilizó sólo el medio de cultivo.

La determinación de la actividad metabólica del biofilm se evaluó mediante un ensayo de reducción de XTT basado en Purkait y colaboradores (Purkait et al., 2020). Brevemente, después del período de incubación de los biofilms con POM-LAE, se eliminó el sobrenadante y los biofilms se lavaron tres veces con NaCl al 0,9 %. Luego, se agregaron 100 µL de una disolución de XTT-menadiona a cada pocillo. La disolución de XTT-menadiona se preparó el mismo día, agregando 1,5 ml de XTT (1 mg/ml en NaCl al 0,9 % estéril) a 300 µl de una disolución de menadiona (0,4 mmol/l en acetona). Después de la adición de XTT-menadiona, las placas se incubaron en la oscuridad durante 1 hora a 37 °C. Luego se transfirieron 100 µL del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos y se midió el cambio de color en la disolución a 450 nm en un lector de microplacas (Themo Scientific, España).

3.6 Análisis del mecanismo de acción del POM-LAE por citometría de flujo

3.6.1 Exposición de las bacterias al POM-LAE

El método se basó en el realizado por Silva (Silva et al., 2011). Brevemente, las suspensiones bacterianas se obtuvieron a partir de un cultivo en crecimiento exponencial de cada cepa en medio líquido BHI a 37 °C y 200 rpm en un agitador

orbital durante 8 h. Esta suspensión celular se utilizó para inocular tubos que contenían las concentraciones apropiadas de POM-LAE (valores 1/2x, 1x, 2x y 4xMIC) y DMSO al 2 % (v/v) en medio líquido BHI para *L. monocytogenes* y MHB para *E. coli* para obtener una densidad celular de alrededor de 1×10^6 UFC/mL. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 8 h. Después del tiempo de contacto con POM-LAE, las muestras se centrifugaron primero a 735 g durante 2 min, para eliminar el POM-LAE precipitado, para que este no interfiriera con el análisis por citometría de flujo. Después de la primera centrifugación, las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 9875 g durante 10 min y los sedimentos se resuspendieron en una disolución salina tamponada con fosfato estéril (PBS, pH = 7,4) o PBS + ácido etilendiaminotetraacético 4 mM (EDTA, pH 7,4) filtradas (0,22 µm) para posterior tinción.

3.6.2 Protocolo de tinción

Para la evaluación de la permeabilidad de la membrana, se incubaron suspensiones bacterianas (1×10^6 UFC/mL) con 5 µg/mL de yoduro de propidio (PI) (ThermoFisher Scientific, España), en tampón PBS, y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. El yoduro de propidio penetra en las células con membranas permeabilizadas y se une a los ácidos nucleicos, emitiendo una fluorescencia roja. Para la evaluación de la despolarización de la membrana, las células se tiñeron con bis-(1,3-ácido dibutilbarbiturico) trimetino oxonol (BOX) (ThermoFisher Scientific, España), que penetra en las células con potencial de membrana comprometido y se acumula dentro de la célula, emitiendo una fluorescencia verde. Para la tinción de BOX, *L. monocytogenes* y *E. coli* se incubaron con 2,5 µg/ml de BOX en PBS o PBS-EDTA, respectivamente, a 37 °C durante 15 min. Después de la tinción, las células teñidas con PI y BOX se centrifugaron a 9875 g y se resuspendieron en 200 µl de PBS antes del análisis. La tinción de células totales se realizó con 10 µL/mL de una disolución de trihidrato de trihidrocloruro Hoescht 33342 de 10 mg/mL en agua (ThermoFisher Scientific, España) durante 15 min a temperatura ambiente. Hoescht 33342 es un fluorocromo que se une al DNA y al cual las membranas de las células bacterianas son permeables, lo que permite la tinción de todas las bacterias de la muestra de azul Las células se incubaron con BHI con DMSO al 2 % (v/v) y se usaron como control negativo y las células fijadas con etanol se usaron como

control positivo para las tinciones con PI y BOX. Se realizaron dos réplicas biológicas.

3.6.3 Citometría de flujo

Las muestras bacterianas se analizaron en un instrumento Amnis ImageStreamX Analyzer (Seattle, WA, EE. UU.) equipado con el software Amnis INSPIRE. El análisis se realizó con el software Amnis IDEAS. La imagen de campo brillante se recolectó en el canal 1 después de la iluminación con luz blanca, las señales de fluorescencia de BOX y PI se recolectaron en el canal 2 (480-560 nm) y el canal 4 (560-595 nm), respectivamente, después de la excitación con láser de 488 nm y la señal de Hoescht 33342 se recolectó en el canal 6 (430-505 nm), después de la excitación con láser UV (375 nm). Se recolectaron imágenes y datos de 10 000 eventos para cada muestra utilizando niveles de umbral en FSC y el canal 6 (Hoescht 33342) para excluir ruido o partículas (de desechos celulares) mucho más pequeñas que las células intactas. Las células bacterianas se seleccionaron de acuerdo con los parámetros de relación Area/Aspect.

3.7 Análisis del daño celular por Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El método se basa en el protocolo utilizado por Misra y colaboradores (Misra et al., 2018). Las suspensiones bacterianas (1×10^5 UFC/mL) se incubaron con POM-LAE a concentraciones MIC y sub-MIC para *L. monocytogenes* y *E. coli*, en sus respectivos medios líquidos durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 160 g durante 10 min. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato (10 mM; pH 7,2) para la fijación celular. Estas suspensiones se dejaron en agitación durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron una vez con 1 mL de PBS estéril y filtrado y tres veces con agua MilliQ, centrifugando a 735 g durante 15 min entre lavados para eliminar el exceso de glutaraldehído. Finalmente, los pellets se resuspendieron en 200 μ L de agua MilliQ, se depositaron 2 μ L de esta suspensión sobre un soporte de sílice que se recubrió con Pd después de seca. Las imágenes de SEM se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Inspect F50 (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Zaragoza, España).

3.8 Caracterización de la granza de PLA

Para conocer la temperatura de fusión y de transición vítrea del PLA se realizó una calorimetría diferencial de barrido utilizando un equipo DSC Q100 (TA Instruments, EE.UU.). Las muestras (5-7 mg) se sellaron en capsulas de aluminio, mientras que una capsula de aluminio vacía sirvió como referencia. El rango de temperatura estudiado fue de 40 a 210 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

3.9 Extrusión de PLA con POM-LAE

La fusión y mezcla del PLA con el POM-LAE se realizó en una extrusora de doble husillo (LABTECH Engineering Company LTD, Tailandia) con una relación longitud/diámetro equivalente a 40, un diámetro de husillo de 16 mm con 10 zonas de calentamiento diferentes y un diámetro de salida de 2 mm. El perfil de temperatura en la extrusora se puede ver en la figura 2.3 con una velocidad de extrusión de 50 rpm. En primer lugar, se secó durante 24 h el PLA y el POM-LAE a 40 °C para eliminar la humedad. A continuación, se mezclaron manualmente los pellets de PLA con el polvo de POM-LAE al 20 % y se fue introduciendo en la extrusora. Una vez obtenido el filamento de la mezcla al 20 % se hicieron pellets de un grosor de 1,5 mm en una peletizadora (Thermo Haake, EE.UU). Por último, se repitió la extrusión dos veces, en las mismas condiciones de trabajo, para diluir la concentración de POM-LAE en PLA hasta obtener una mezcla final con una concentración de POM-LAE de aproximadamente 5,5 %.

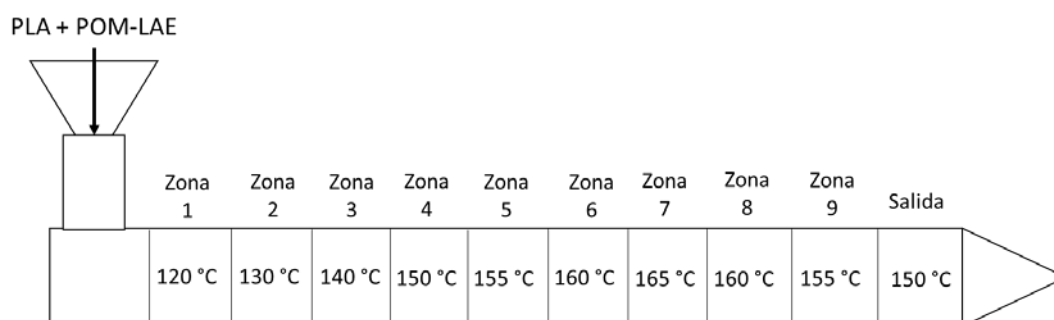


Figura 2.3. Perfil de temperatura de las diez secciones de la extrusora durante el proceso de extrusión de la granza de PLA junto al POM-LAE.

3.10 Caracterización granza PLA-POM-LAE

3.10.1 DSC

Para conocer la temperatura de fusión y de transición vítrea del PLA-POM-LAE 5,5 % se realizó una calorimetría diferencial de barrido utilizando un equipo DSC Q100 (TA Instruments, EE.UU.) Las muestras (5-7 mg) se sellaron en bandejas de aluminio, mientras que una bandeja de aluminio vacía sirvió como referencia. El rango de temperatura estudiado fue de 40 a 210 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min en atmósfera de nitrógeno. La muestra control fue PLA extruido sin POM-LAE.

3.10.2 TGA

Para la caracterización del PLA con POM-LAE 5,5 % se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) en un analizador térmico TGA 4000 (Perkin Elmer, EE. UU.), y las mediciones se realizaron en aire con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ desde temperatura ambiente hasta 800 °C. La muestra control usada fue PLA extruido sin POM-LAE.

3.11 Extrusión de soplado de los films de PLA-POM-LAE

Para la extrusión por soplado se utilizó una extrusora Thermo Haake Rheomex 252p (Thermo Fisher, EE.UU.) de un solo husillo con una relación de longitud/diámetro de 25, un diámetro de husillo de 19 mm con 3 zonas de calentamiento diferentes y un diámetro de salida de 2 mm, con una velocidad de extrusión de 50 rpm. El perfil de temperatura en la extrusora se puede ver en la figura 2.4. Se utilizó aire comprimido en la salida de la extrusora a una presión de 0,5 bar para obtener la burbuja del polímero. En primer lugar, se secó durante 24 h la granza de PLA-POM-LAE y el aditivo MOC 006 a 40 °C para eliminar la humedad. A continuación, se mezclaron manualmente los pellets de PLA-POM-LAE 5,5 % y el aditivo MOC 006 (6 %) que se fueron añadiendo al alimentador de la extrusora para obtener una concentración final de POM-LAE de 5 %. El control fue una mezcla de PLA y MOC 006 (6 %) en las mismas condiciones.

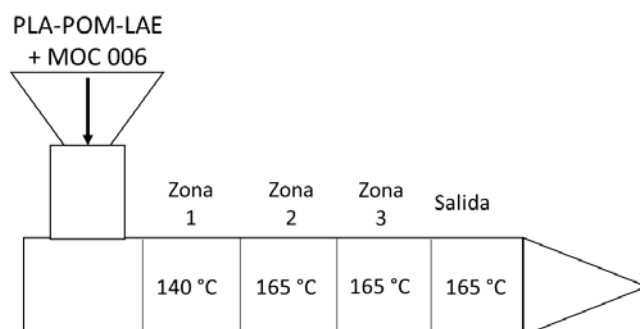


Figura 2.4. Perfil de temperatura de las cuatro secciones de la extrusora donde se llevó a cabo el proceso de extrusión por soplado para obtener films de PLA-POM-LAE 5%.

3.12 Preparación de los films de carboximetilcelulosa (CMC)

Todos los films se prepararon mediante el método de *casting* basado en un protocolo ya descrito (Kanatt & Makwana, 2020). Se preparó una disolución madre de CMC (2 %, m/v) en H₂O ultrapura a 80 °C con agitación constante hasta su completa disolución. Luego, se añadió ácido cítrico al 15 % (m/m_{CMC}) como agente entrecruzador y se agitó durante 1 h. Además, también se añadió glicerol como plastificante a una concentración de 0,1 % (m/m_{CMC}).

Posteriormente, se agregó a la disolución de CMC, POM-LAE disuelto en DMSO a una concentración de 50 mg/mL para obtener concentraciones finales de POM-LAE en los films de 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 % (m/m_{CMC}). Las disoluciones de los films de CMC con POM-LAE se colocaron en placas cuadradas de poliestireno de 12 x 12 cm (0,24 mL/cm²) y en pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos (69 µl; 0,24 ml/cm²). Una vez secos, los films se colocaron a 80 °C durante 24 h para la reacción de entrecruzamiento (Figura 2.5). Los films control de CMC se prepararon de la misma forma, con una concentración máxima de 10 % de DMSO (m/m_{CMC}).



Figura 2.5. Film de CMC-POM-LAE 5 %.

3.13 Caracterización de los films de PLA-LAE y CMC-LAE

3.13.1 TGA

Para la caracterización de los films de CMC y PLA con POM-LAE se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) en un analizador térmico TGA 4000 (Perkin Elmer, EE. UU.), y las mediciones se realizaron en aire con una rampa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ desde temperatura ambiente hasta $800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como controles se utilizaron films de PLA y CMC sin POM-LAE.

3.13.2 DSC

Para conocer la temperatura de fusión de los films de CMC y PLA con POM-LAE se realizó una calorimetría diferencial de barrido utilizando un equipo DSC Q100 (TA Instruments, EE.UU.) Las muestras (5-7 mg) se sellaron en bandejas de aluminio, mientras que una bandeja de aluminio vacía sirvió como referencia. El rango de temperatura estudiado fue de 40 a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ en atmósfera de nitrógeno. Como controles se utilizaron films de PLA y CMC sin POM-LAE.

3.13.3 FTIR

La espectroscopia FTIR-ATR se realizó en un FT-IR 4100 (Jasco, Japón) utilizando muestras en polvo sin preparación adicional. Los espectros de los films

de CMC y CMC-POM-LAE 5 % se tomaron con 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de número de onda de $500\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$.

3.13.4 Grosor

Se usó un micrómetro manual (Mitotuyo no. 7327, Japón) para medir el espesor de los films de CMC y PLA con POM-LAE y los controles de CMC y PLA. Para cada muestra, se calculó el promedio de diez films diferentes medidos en cinco puntos aleatorios a temperatura ambiente.

3.13.5 Grado de hinchamiento y solubilidad en agua

Los films secos de CMC y CMC-POM-LAE se sumergieron en agua destilada a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 h. Se eliminó el exceso de agua y se midió el peso de los films húmedos e hinchados. El porcentaje del grado de hinchamiento en los films se calculó de la siguiente forma (Ec.1):

$$\text{Ec.1: Grado de hinchamiento} = (W_e - W_0) / W_0,$$

Luego, los films se secaron nuevamente a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar un peso constante y el porcentaje de solubilidad en agua se calculó de la siguiente manera (Ec.2):

$$\text{Ec.2: Solubilidad en agua de las films (\%)} = (W_0 - W_d) / W_0 \times 100,$$

donde, W_e es el peso del film en equilibrio absorbente, W_0 es el peso seco inicial del film, W_d es el peso seco del film después del proceso de secado final.

3.13.6 Contenido de humedad

El contenido de humedad de los films de CMC-POM-LAE y el control de CMC se midió determinando la pérdida de peso del film al ser secado en una estufa a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Se analizaron 5 films por muestra. Se utilizó agua destilada.

3.14 Actividad antimicrobiana *in vitro* de los films de PLA

3.14.1 Ensayo en medio sólido

En este ensayo se probó la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los films de PLA POM-LAE 5 % frente a *L. monocytogenes* en medio sólido. Se prepararon los

films cortándolos en cuadrados de 2x2 cm. Por otro lado, se preparó el inóculo de *L. monocytogenes* que se sembró en las placas de medio BHI. En primer lugar, se hizo una suspensión de *L. monocytogenes* en NaCl 0,9% con una absorbancia a 600 nm entre 0,08-0,12 (1×10^8 UFC/mL). A continuación, se diluyó 1:100 para conseguir una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/mL. Después, se sembraron 100 μ L en placas de medio BHI y se extendieron sobre la superficie utilizando un asa de Drigalsky para conseguir una extensión del inóculo lo más homogénea posible. Tras esto, se dejó secar durante 10-15 min. Por último, se colocaron los films de PLA-POM-LAE 5 % en la superficie del medio, aplicando una ligera presión para que el film se adhiriese correctamente. Se dejaron incubar las placas a 37 °C midiendo los halos de inhibición a las 24 h. Los controles se prepararon a partir de los films de PLA extruidos sin POM-LAE. EL ensayo se realizó por triplicado.

3.14.2 Ensayo en medio líquido

En este ensayo se probó la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los films de PLA-POM-LAE 5 % frente a *L. monocytogenes* en medio líquido. Se prepararon los films cortándolos en cuadrados de 2x2 cm y se colocaron en cada pocillo de una placa de 12 pocillos. Después, se preparó el inóculo de *L. monocytogenes* que se añadió a placas de 12 pocillos. En primer lugar, se hizo una suspensión de *L. monocytogenes* en NaCl 0,9% con una absorbancia a 625 nm entre 0,08-0,12 (1×10^8 UFC/mL). A continuación, se diluyó 1:100 en medio líquido BHI para conseguir una concentración bacteriana de 1×10^6 UFC/mL. Después, se añadieron 500 μ L de la suspensión a cada pocillo junto a otros 500 μ L de medio líquido BHI para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Se dejaron incubar las placas a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, se extrajeron 20 μ L de cada pocillo y se transfirieron a otra placa de 96 pocillos, diluyéndolos en 180 μ L de NaCl 0,9% estéril, para realizar diluciones en serie según el método descrito por Chen y colaboradores (Chen et al., 2003) para fines de recuento de colonias. Posteriormente, se sembraron 10 μ L de cada dilución en placas de agar BHI. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se determinó el número de colonias de *L. monocytogenes*. Los controles se prepararon a partir de los films de PLA extruidos sin POM-LAE. El ensayo se realizó por triplicado.

3.14.3 Ensayo de susceptibilidad de biofilms

La actividad del antibiofilm de los films se determinó según Silva y colaboradores (Silva et al., 2019c) con algunas modificaciones. Brevemente, se colocaron films de PLA POM-LAE 5 % y de PLA de 2x2 cm en placas de 12 pocillos. La suspensión de *L. monocytogenes* (0,02 OD₆₀₀) se prepararon a partir de un cultivo crecido durante la noche a 37 °C en medio líquido BHI. Se inoculó un mililitro de cada suspensión en los pocillos de las placas que contenían films de PLA POM-LAE 5 % y PLA. Se usaron pocillos sin films como control positivo. El control negativo se preparó solo con medio líquido BHI para los films de PLA y de PLA POM-LAE 5 %. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C. Después de la incubación, las células planctónicas se retiraron de cada pocillo y los films se pasaron a los pocillos de una nueva placa donde se lavaron dos veces con 2 ml de NaCl al 0,9 %. Posteriormente, los films se tiñeron con 1 mL de una disolución de violeta cristal al 1 % (m/v) en etanol al 95 % (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente. Los films teñidos se enjuagaron a fondo tres veces con agua y se dejaron secar durante 30 min a 50 C. La formación de biofilm se cuantificó mediante la adición de 1 ml de una disolución de etanol/acetona al 80:20 % a los films teñidos con cristal violeta y, después de 15 min de incubación, se registró la absorbancia de la disolución a 570 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. DU 730 (Beckman Coulter, España). Este procedimiento se repitió al menos tres veces independientes.

3.15 Ensayos antimicrobianos *in vitro* de los films

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los films de CMC-POM-LAE frente *L. monocytogenes*, se prepararon films de CMC que contenían 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 % de POM-LAE ($m_{\text{POM-LAE}}/m_{\text{CMC}}$) en placas de 96 pocillos, como se explicó previamente.

Se preparó un inóculo de *L. monocytogenes* con una absorbancia de 0,02 (OD₆₀₀) a partir de cultivos incubados durante 24 h a 37 °C en caldo BHI. Luego se inocularon 200 µL de la suspensión bacteriana en los pocillos de las placas que contenían los films. Se utilizaron como controles positivos placas que contenían pocillos sin films de CMC y con films de CMC sin POM-LAE. Los controles negativos se realizaron con films de CMC en medio líquido de BHI. Las

placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. A continuación, se hicieron diluciones seriadas de cada muestra y se sembraron en medio BHI como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.14.2. Se realizaron tres réplicas biológicas en al menos tres ensayos independientes.

3.16 Ensayos antimicrobianos *in vivo* de los films de CMC

Los films de CMC con POM-LAE preparados en placas cuadradas de 12x12 cm se cortaron en cuadrados de 2,5x2,5 cm para llevar a cabo los ensayos *in vivo* con jamón curado. En primer lugar, se realizó una inoculación de *L. monocytogenes* en jamón curado. El inóculo de *L. monocytogenes* se preparó a partir de una suspensión bacteriana en NaCl al 0,9 % a una DO_{600} de 0,08-0,12 (1×10^8 UFC/mL), que se diluyó 1000 veces para obtener una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Una vez preparado el inóculo, se prepararon dos lonchas de jamón curado de aproximadamente 3 g de peso total en placas de Petri de 90 mm y se depositaron en la superficie del jamón 200 μ L, gota a gota, de la suspensión de *L. monocytogenes*, 100 μ L en cada loncha. Se dejaron secar durante 1 h en ambiente estéril dentro de una cabina de bioseguridad de nivel II. Posteriormente, se colocaron films de CMC entre las dos lonchas de jamón, ejerciendo presión para que el film se adhiriera correctamente a las dos lonchas de jamón curado. Finalmente, las muestras fueron envasadas en bolsas de PET, termoselladas y refrigeradas a 4 °C durante tres semanas. Las muestras se analizaron los días 0, 4, 7, 11, 14 y 21.

Para los análisis microbiológicos, las muestras se colocaron en bolsas de Stomacher con 36 mL de agua peptonada (factor de dilución 1:13) y se homogeneizaron en un Stomacher-400 Circulator (Seward, UK) durante 3 min a 300 rpm. A continuación, se realizaron diluciones seriadas y 100 μ L o 1 mL de cada muestra se sembraron en agar PALCAM selectivo y se incubaron durante 48 h a 37 °C. Se hicieron tres réplicas biológicas de todas las muestras.

3.17 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software Microsoft Excel (Redmond, WA, EE. UU.). Para las variables con 3 o más categorías, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un factor. Se utilizó un p-valor indicando la

probabilidad de significancia de $<0,05$ para indicar diferencias estadísticamente significativas.

4. Resultados y discusión

4.1 Síntesis y caracterización del POM-LAE

El POM-LAE, un polvo blanco con baja solubilidad en agua, se sintetizó usando una ruta de metátesis catiónica y se obtuvo con un rendimiento casi del 100 %. La composición y la pureza de la muestra se confirmaron mediante espectroscopia FTIR-ATR y análisis termogravimétrico (TGA). El espectro de FTIR-ATR del POM-LAE mostró las vibraciones específicas de los componentes moleculares del polioxowolframato y del LAE (Figura 2.6). Las vibraciones de longitud de onda características de LAE se observaron a $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ correspondientes al enlace N-H en el grupo amino, a $2923-2853\text{ cm}^{-1}$ corresponde a los enlaces C-H, a 1650 cm^{-1} debido al C=O en el grupo secundario amida, y a 1538 cm^{-1} asociado a la vibración de N-N y N-C del grupo amida (Rubilar et al., 2016; Li et al., 2021). Mientras tanto, las vibraciones de longitud de onda características de $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$ se observaron a 989 cm^{-1} correspondiente a la vibración de W=O, y en 877 y 719 cm^{-1} asociadas con W-O-W (Chermette & Lefebvre, 2012; Sari & Situngkir, 2016).

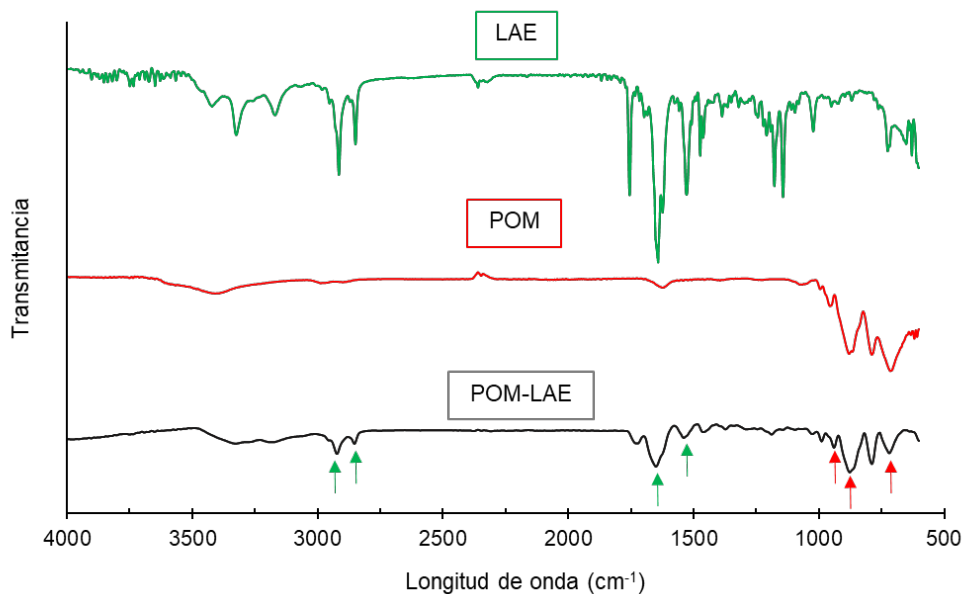


Figura 2.6. Comparación de los espectros de FTIR-ATR del LAE, POM y POM-LAE. Las flechas señalan los picos principales descritos en el texto. Las flechas verdes corresponden al LAE y las rojas al POM.

El TGA mostró (Figura 2.7) una pérdida de masa del 50,8 % correspondiente a siete cationes LAE por anión $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$, de lo que se concluye que la fórmula final del producto sea $\text{LAE}_7\text{K}[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]$. Esto significa que el LAE no ha sido capaz de sustituir los ocho cationes K^+ presentes en la molécula original del POM, probablemente debido a un impedimento estereoquímico resultante del mayor tamaño de la molécula de LAE. Además, el POM-LAE mostró estabilidad térmica hasta una temperatura de 200 °C, lo que podría permitir su uso en procesos de extrusión de materiales para envase alimentario.

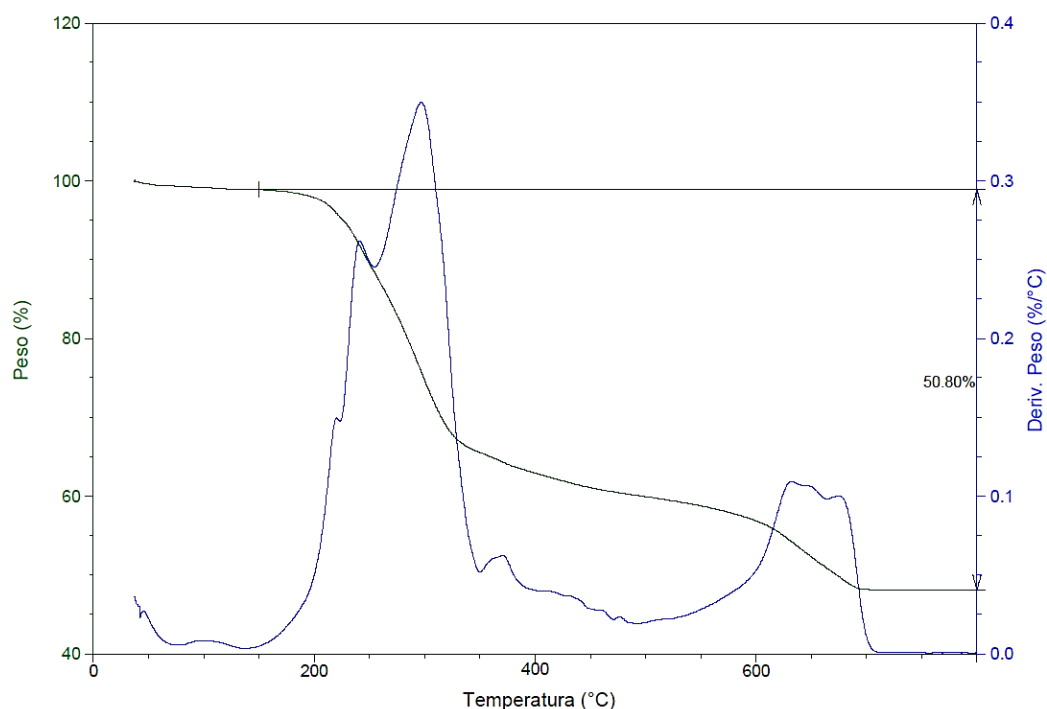


Figura 2.7. TGA del POM-LAE mostrando la pérdida de masa entre 20-800 °C.

4.2 Concentración micelar crítica

La concentración micelar crítica (CMC) es el punto donde un surfactante comienza a formar micelas. La conductividad aumenta linealmente con el aumento de la concentración de surfactante hasta que alcanza un punto de inflexión, correspondiente al valor de CMC (Poša et al., 2009). Los resultados de conductividad de LAE y POM-LAE se presentan en la Figura 2.8. El valor se obtiene como el punto donde se cruzan las dos líneas. Para LAE, la concentración micelar crítica es de $0,60 \pm 0,03$ %, mientras que para POM-LAE fue de $0,22 \pm 0,01$ %. El valor de concentración micelar crítica de LAE fue superior a los descritos en la literatura ($0,18$ - $0,19$ %) (Bai et al., 2018; Bonnaud et al., 2010) debido al efecto inhibitorio del DMSO sobre la formación de micelas (Dey et al., 2017), resultando en valores más elevados de concentración micelar crítica. El POM-LAE tuvo una concentración micelar crítica más baja que el LAE, e incluso similar al valor de LAE observado en la bibliografía, probablemente debido a su mayor solubilidad en DMSO, en comparación con el LAE. Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que el complejo de LAE en forma de POM-LAE no afecta las propiedades tensioactivas de este compuesto.

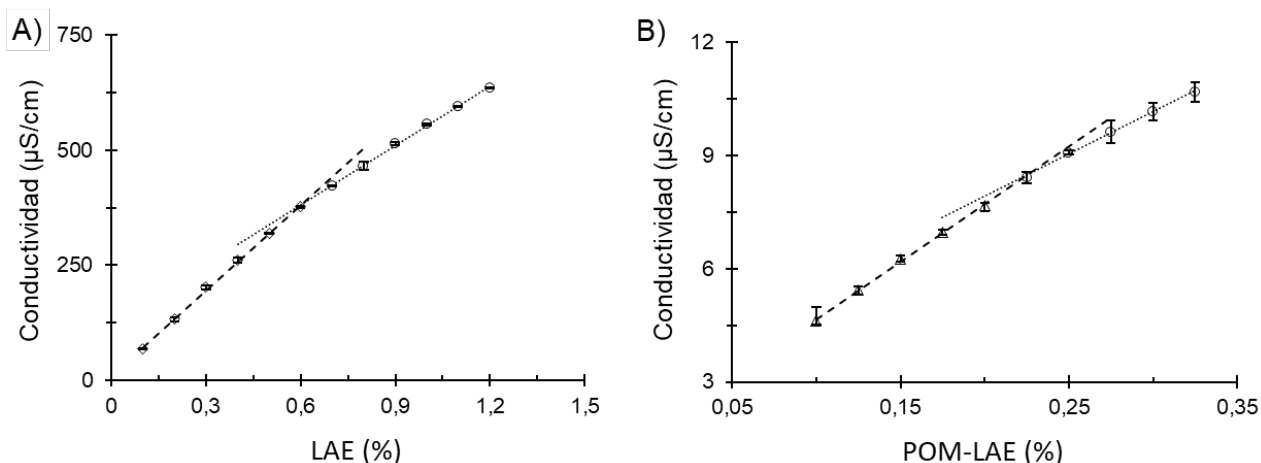


Figura 2.8. Determinación de la concentración micelar crítica del LAE y del POM-LAE: A) Conductividad del LAE con un 50% de DMSO, B) Conductividad del POM-LAE con un 50% DMSO. Los resultados están expresados como la media de los valores y la desviación estándar (barras de error) de tres replicas independientes.

4.3 Actividad antimicrobiana del POM-LAE

Los valores correspondientes de MIC y MBC obtenidos en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas *L. monocytogenes* y *B. cereus* y las bacterias Gram negativas *E. coli* y *S. Typhimurium*, dos bacterias comunes que contaminan los alimentos se proporcionan en la Tabla 2.2. El POM-LAE mostró actividad bacteriostática contra las bacterias utilizadas, debido a que el MBC es más alto que el MIC excepto para *B. cereus*, en el cual los valores de MIC han resultado en un efecto bactericida. Los valores correspondientes de MIC y MBC para LAE fueron iguales para las cuatro bacterias, lo cual es similar a lo observado en la literatura para *E. coli* O157:H7 y otras cepas de *L. monocytogenes* incluyendo el serotipo 1/2c (Nerín et al., 2016; Soni et al., 2010), al igual que para *B. cereus* (Elisseeva et al., 2020; Techathuvanan et al., 2014) y para otros serotipos de *S. enterica* (C. Nerin et al., 2016).

Tabla 2.2. MIC y MBC del LAE₇K[SiW₁₁O₃₉] (POM-LAE) y LAE, frente a *L. monocytogenes* CECT 911, *B. cereus* CECT 131, *E. coli* CECT 5947 y *S. enterica* Typhimurium ATCC 14028 expresado en µg/mL.

Agente	Actividad antimicrobiana (µg/mL)				
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	
POM-LAE	MIC	32	64	32	128
	MBC	128	128	32	>512
LAE	MIC	32	32	32	32
	MBC	32	32	32	32

La MIC de POM-LAE frente a *E. coli* y *S. Typhimurium* fue inferior a la del LAE, mientras que frente a *L. monocytogenes* y *B. cereus* los valores fueron similares. En cambio, los valores de MBC de POM-LAE contra las bacterias en estudio fueron más altos en comparación con LAE libre, excepto para *B. cereus* que se mantuvo en 32 µg/mL. En el caso de *L. monocytogenes*, se calculó la concentración molar de LAE correspondiente a una concentración de 32 µg/mL para el POM-LAE (41,4 µM) y LAE solo (83,2 µM), obteniendo una reducción del 50 % en la concentración molar de LAE requerido para producir un efecto inhibitorio. Esto indica que, cuando forman complejos, se requieren concentraciones más bajas de LAE para inhibir eficazmente el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Con los resultados obtenidos se seleccionó una bacteria Gram negativa y una Gram positiva para continuar los ensayos de los antimicrobianos del POM-LAE. Como Gram negativa, se eligió *E. coli* frente a *S. Typhimurium* por sus mejores resultados tanto en la MIC como en la MBC. Mientras que, como Gram positiva, se seleccionó *L. monocytogenes* sobre *B. cereus* por su mayor importancia como patógeno alimentario.

4.3.1 Efecto de la potencial degradación del POM-LAE con la temperatura y su efecto en la actividad antimicrobiana

Se evaluó la MIC del POM-LAE sometido a una incubación de 165 °C a diferentes tiempos y se comparó con la MIC del POM-LAE a temperatura ambiente. De esta forma, se podría determinar si el POM-LAE podría resistir el

proceso de extrusión y mantener su actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. No se observaron diferencias entre la MIC del POM-LAE a temperatura ambiente y las MIC del POM-LAE a diferentes tiempos de incubación (Tabla 2.3) a 165 °C. Se concluye así que los tiempos de extrusión a 165 °C hasta al menos 90 min no afectan a la actividad antimicrobiana del POM-LAE frente a *L. monocytogenes*.

Tabla 2.3. Actividad antimicrobiana, expresada como la MIC, del POM-LAE frente a *L. monocytogenes* a diferentes tiempos de incubación a 165 °C.

Tiempo a 165 °C	MIC (µg/mL)
Control (0 min)	32
15 min	32
30 min	32
60 min	32
90 min	32

4.3.2 Actividad antibiofilm del POM-LAE

L. monocytogenes y *E. coli* tienen la capacidad de formar biofilms (C. G. Kumar & Anand, 1998) tanto en alimentos como en superficies. Dado que se sabe que el LAE tiene actividad antibiofilm (Kim et al., 2017; Kim & Park, 2016), el siguiente paso fue evaluar el efecto antibiofilm del POM-LAE en la formación de biofilms y en biofilms preformadas. Los resultados obtenidos para la actividad antibiofilm (Figura 2.9) mostraron inhibición de la formación de biofilm y reducción en biofilms preformados a concentraciones correspondientes al valor de MIC para *L. monocytogenes* y a ¼ MIC para *E. coli*. El resultado demuestra que, a concentraciones de MIC, el POM-LAE sería eficaz contra los biofilms formados por cualquiera de las dos bacterias en estudio.

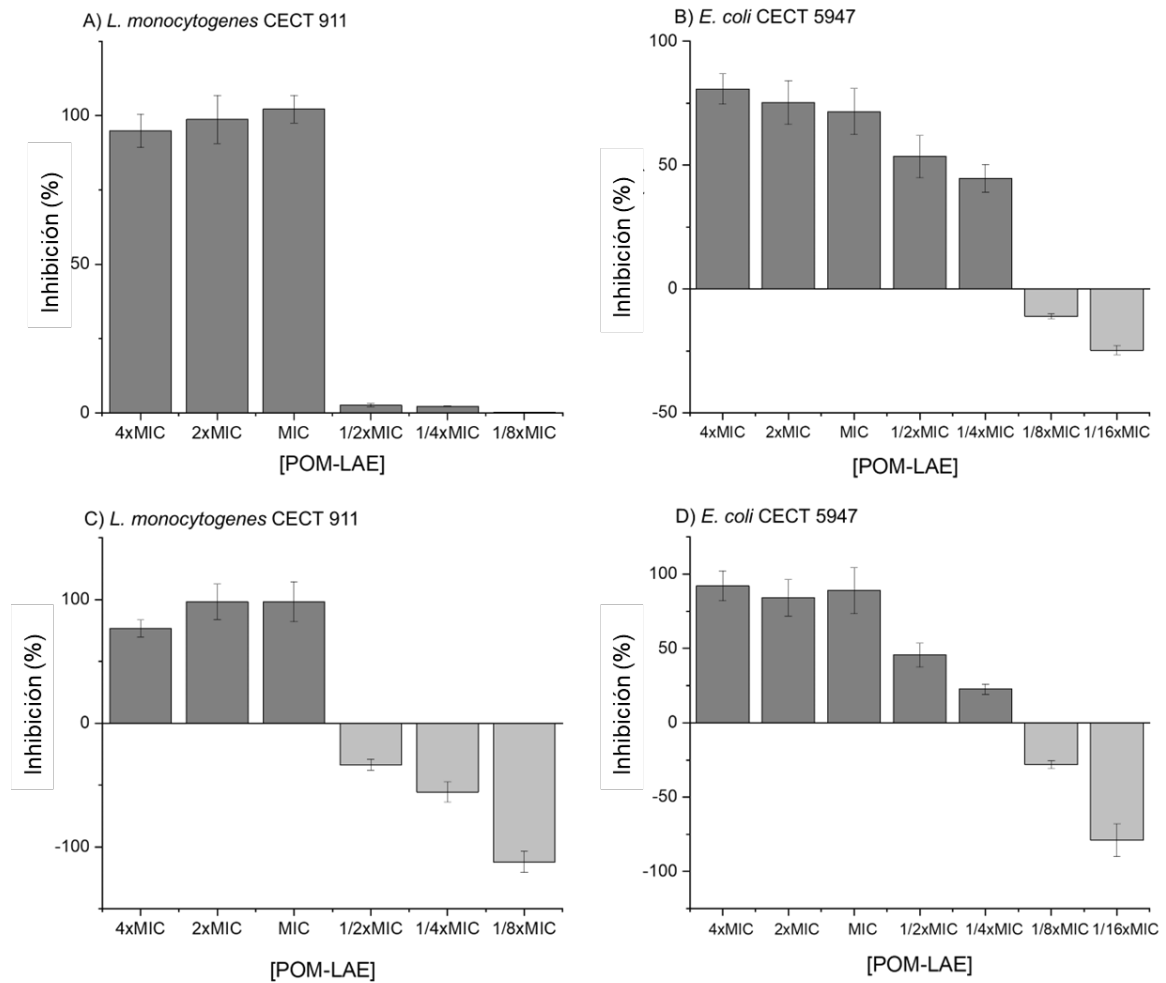


Figura 2.9. Actividad antibiofilm del POM-LAE frente a la formación de biofilm (A) y al biofilm preformado (C) de *L. monocytogenes* CECT 911, y frente a la formación de biofilm (B) y biofilm preformado (D) de *E. coli* CECT 5947. Los controles positivos de cada bacteria con un 2 % de DMSO se usaron como referencia. Los resultados están expresados como la media de los valores y la desviación estándar (barras de error) de tres replicas independientes.

Se observó que, a concentraciones más bajas de POM-LAE (16, 8 y 4 $\mu\text{g/mL}$), el crecimiento del biofilm mejoró con respecto al control positivo en *E. coli* y a los biofilms preformados en *L. monocytogenes*. Especialmente para los biofilms preformados de 24 h, donde los biofilms de *L. monocytogenes* duplicaron su crecimiento. Esto significaría que, a concentraciones por debajo de la MIC, el POM-LAE tendría la propiedad de mejorar el crecimiento de biofilms. Esto podría deberse al hecho de que, en bajas concentraciones, los POM tienen la capacidad de inducir estrés oxidativo en las bacterias, lo que podría conducir a una respuesta de defensa al estrés oxidativo, como una mayor proliferación o

secreción de enzimas y polisacáridos para facilitar la producción de biofilms y su matriz (Gambino & Cappitelli, 2016; Olwal et al., 2018).

Nuestros resultados mostraron que el POM-LAE tuvo una mejor actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* en comparación con *E. coli*, debido a los valores más bajos de MIC obtenidos. Además, la actividad antibiofilm de POM-LAE frente a la formación de biofilms de *L. monocytogenes* es mayor que la de *E. coli* debido a los mayores porcentajes de inhibición obtenidos y a que, en el caso de *L. monocytogenes*, no hay crecimiento a concentraciones subMIC (16, 8 y 4 µg/mL). Por estas razones, se eligió *L. monocytogenes* para evaluar la actividad antimicrobiana de los films activos tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.4 Daño celular por SEM

Se empleó un microscopio electrónico de barrido para observar el efecto del POM-LAE en células de *L. monocytogenes* y *E. coli* a las concentraciones correspondientes de MIC y ½ MIC. Como resultado del efecto surfactante del POM-LAE, se han observado daños en las membranas celulares de ambas bacterias (Figura 2.10), lo que también se confirma por el aumento del daño de la membrana (despolarización y permeabilidad) observado en los resultados de citometría de flujo (Tabla 2.3). El POM-LAE ha causado un daño estructural celular similar al observado para LAE donde las bacterias mostraron alteraciones en su morfología haciéndolas pleomórficas, distorsionadas y con hoyuelos (Pattanayaiying et al., 2014; Zhao et al., 2022), lo que podría indicar que el modo de acción antimicrobiano de POM-LAE podría deberse al LAE del complejo.

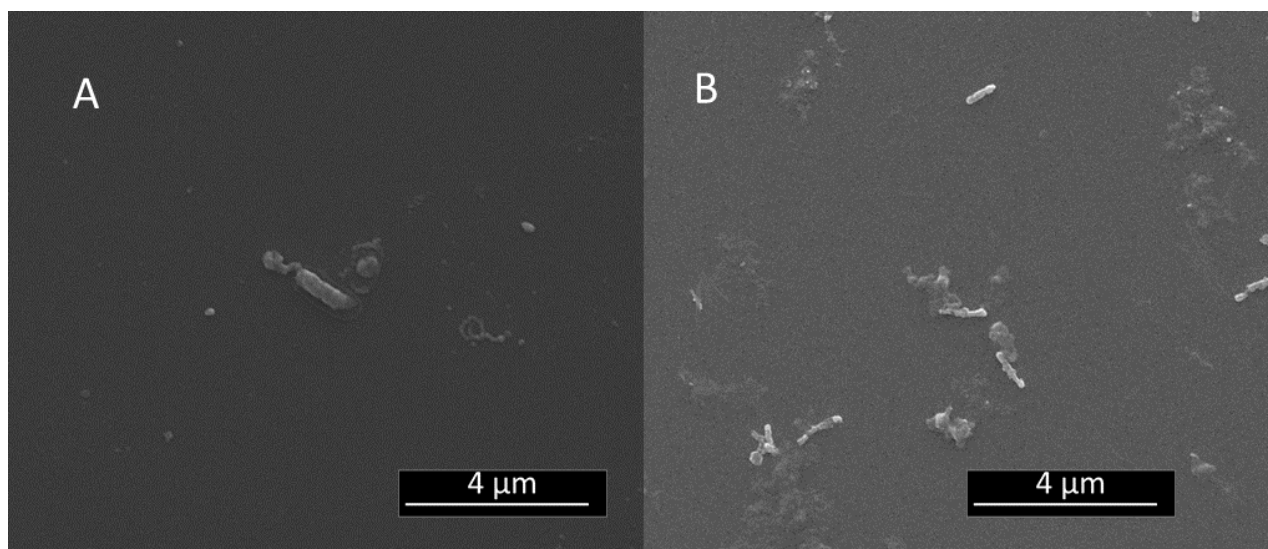


Figura 2.10. Imágenes de SEM de bacterias incubadas con POM-LAE: *L. monocytogenes* CECT 911 con 32 µg/mL (A) de POM-LAE y *E. coli* CECT 5947 con 64 µg/mL (B) de POM-LAE.

4.5 Citometría de flujo

El PI se utilizó para evaluar la integridad de la membrana bacteriana porque, si la integridad de la membrana se ve comprometida, el PI puede introducirse en la célula donde se une a los ácidos nucleicos. Suele estar relacionado con la viabilidad celular, cuanto mayor sea la concentración de PI acumulado dentro de las células, menor será la viabilidad. Por otro lado, se utilizó BOX para evaluar el potencial de membrana, ya que las células polarizadas pueden excluir moléculas aniónicas como BOX y las células despolarizadas permiten la acumulación de BOX dentro de la célula bacteriana. La pérdida del potencial de membrana es un estado de transición, debido a que las células despolarizadas tienen la capacidad de volver a crecer en medios sólidos (Díaz et al., 2010). Los resultados se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Porcentaje de células de *L. monocytogenes* CECT 911 y *E. coli* CECT 5947 tratadas con POM-LAE y teñidas con fluorocromos.

Bacteria	POM-LAE	Células teñidas	
		PI (%)	BOX (%)
<i>L. monocytogenes</i>	Control	4,25±0,45	13,4±1,6
	1xMIC	98,5±1,3	99,55±0,64
	2xMIC	98,95±0,92	99,10±0,57
	4xMIC	98,90±0,85	98,90±0,57
<i>E. coli</i>	Control	4,5±1,9	12,6±3,2
	1xMIC	40,8±7,4	76,8±7,7
	2xMIC	95,1±2,1	98,95±0,78
	4xMIC	99,05±0,49	98,8±1,3

La permeabilización de células de *L. monocytogenes* fue casi del 100 % a concentraciones de POM-LAE correspondientes a los valores 1x, 2x y 4xMIC. Para *E. coli*, el porcentaje de células teñidas con PI a la concentración de la MIC fue del 40 % y cercano al 100 % en concentraciones más altas correspondientes a los valores de 2x y 4xMIC. La despolarización de la membrana es mayor en *L. monocytogenes* en comparación con *E. coli*. Para *L. monocytogenes*, una concentración correspondiente a 1xMIC produjo un porcentaje de células teñidas con BOX del 99,5 %, mientras que *E. coli* tiene un porcentaje de células teñidas con BOX del 76,8 % a la concentración de MIC. Se ha observado que los POM, por sí mismos, se acumulan alrededor de la membrana citoplasmática de las células bacterianas (Inoue et al., 2006). Por lo tanto, las diferencias observadas entre la captación de PI y BOX tanto por *E. coli* como por *L. monocytogenes* pueden estar relacionadas con la diferente acumulación de POM y POM-LAE dentro de la membrana celular. Así, el POM-LAE sería más efectivo en la ruptura de la membrana de *L. monocytogenes* incluso a concentraciones de MIC, aunque no se puede establecer una correlación efectiva entre el porcentaje de células teñidas con PI y su capacidad de cultivo (Shi et al., 2007).

4.6 Caracterización granza PLA y PLA-POM-LAE

Se realizó una calorimetría diferencial de barrido para identificar la temperatura de fusión del PLA necesaria para llevar a cabo la extrusión. Se identificó (Figura 2.11) mediante DSC la temperatura de fusión (T_m) del PLA a 149,9 °C, estando completamente fundido a 160 °C. La temperatura de transición vítrea (T_g) se obtuvo a 67,7 °C. Estas temperaturas se encuentran entre las habituales del PLA en la literatura consultada (Farah et al., 2016).

El TGA se llevó a cabo para ver la temperatura de degradación del PLA (Figura 2.12). Ésta se alcanzó en torno a los 330 °C, ya que antes la pérdida de peso fue inferior al 1 %, encontrándose el rango habitual de degradación del PLA entre 325-375 °C (Farah et al., 2016). Una vez alcanzada esta temperatura el PLA sufre una rápida degradación que se frena al alcanzar los 400 °C, alcanzando una completa degradación a los 515 °C (0,04 % del peso inicial).

Con los resultados obtenidos del DSC del PLA y los obtenidos del TGA del POM-LAE, se decidió la temperatura máxima a la que se llevaría a cabo la extrusión del polímero con el agente antimicrobiano. Se estableció una temperatura máxima de 165 °C para la extrusión, ya que a esa temperatura el PLA está fundido y el POM-LAE no se degrada.

De la extrusión se obtuvo un largo filamento blanco y homogéneo que se transformó en granza con un tamaño de pellet de 1,5 mm. La granza de PLA obtenida tras las extrusiones consecutivas tenía una concentración de aproximadamente un 5,5 % de POM-LAE. Esta granza se caracterizó mediante DSC para observar si la adición de POM-LAE modificaba la T_m y T_g del PLA inicial. Se observó (Figura 2.12) que la T_g del PLA con POM-LAE disminuyó aproximadamente 6 °C respecto a la del polímero en solitario (61 °C frente a 67 °C, respectivamente), mientras que la T_m que era de 149 °C en el PLA y de 146 °C en el PLA con POM-LAE. También se observó diferencia a la temperatura a la que todo el polímero está fundido, que descendió desde los 160 °C hasta los 157 °C en el PLA con agente activo. La adición del POM-LAE provocó una ligera disminución de todas las temperaturas del PLA. Estos cambios están en consonancia con lo observado en la literatura, donde la adición de agentes

activos al PLA por debajo del 10 % tiene un efecto muy ligero en las propiedades térmicas del PLA (Tawakkal et al., 2014).

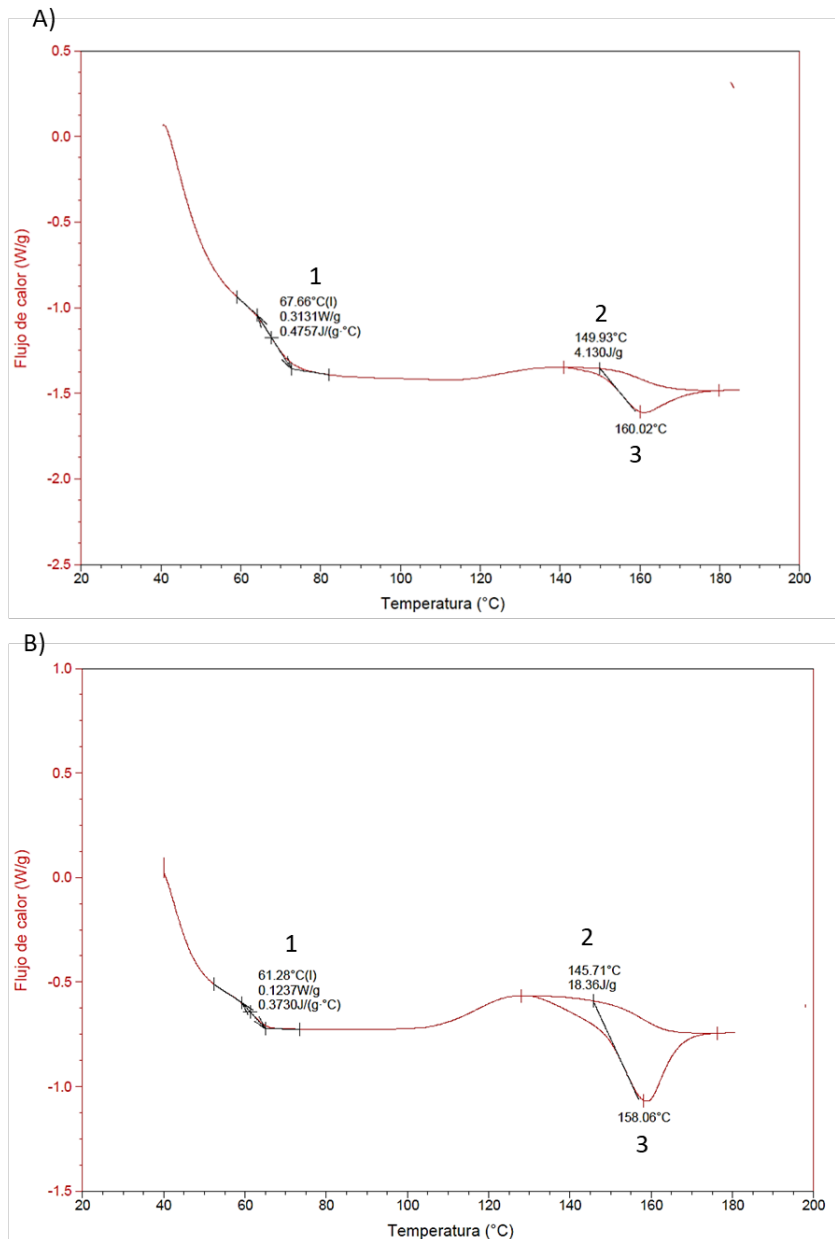


Figura 2.11. Gráfica que representa el flujo de calor del PLA con el aumento de temperatura. B) Gráfica que representa el flujo de calor del PLA con POM-LAE 5,5 % con el aumento de temperatura. (1) Temperatura de transición vítrea (T_g). (2) Temperatura de fusión (T_m). (3) Temperatura a la que el PLA está completamente fundido.

El TGA del PLA con POM-LAE (Figura 2.12) no mostró cambios respecto a la temperatura de degradación del PLA que se mantuvo en torno a los 330 °C. La única diferencia fue que la muestra no se degradó completamente, debido a la

presencia del polioxometalato presente en el POM-LAE. El que no haya un cambio perceptible en la temperatura de degradación del PLA concuerda con lo observado por Liu y colaboradores (Liu et al., 2010), al añadir bacteriocinas al polímero, donde pequeñas concentraciones del agente activos no alteran, o sólo provocan alteraciones mínimas en las propiedades térmicas del PLA.

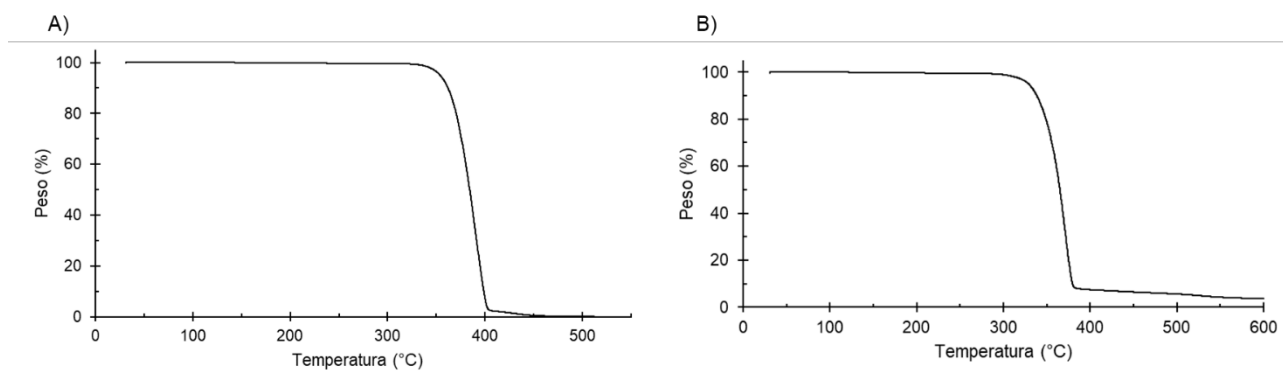


Figura 2.12. A) TGA de la granza de PLA (PLE 005-A) B) TGA de la granza de PLA con un 5,5 % de POM-LAE.

4.7 Caracterización de los films de PLA-POM-LAE

La extrusión por soplado, de los films de PLA con y sin POM-LAE, se llevó a cabo añadiendo el aditivo MOC 006 que permitió mejorar las propiedades físicas del PLA y que pudiera formarse una burbuja estable a partir de la cual se obtuvieron los films. Se consiguió mantener la estabilidad de la burbuja (Figura 2.13), aunque se produjeron fluctuaciones cada 1 o 2 m de film, estas zonas se descartaron posteriormente debido a su irregularidad en grosor y diámetro.



Figura 2.13. Proceso de extrusión por soplado de los films de PLA-POM-LAE 5 %. La burbuja que se forma se hace pasar por unos rodillos que permiten alisarla y obtener la bolsa que posteriormente se corta para obtener el film.

Se evaluó la influencia del agente activo en el grosor de los films de PLA. El grosor de los films control de PLA fue de $63,0 \pm 4,8 \mu\text{m}$, mientras que el de los films de PLA con POM-LAE 5 % fue de $39,4 \pm 5,2 \mu\text{m}$. Esta diferencia de grosor puede ser debida a la interacción entre el agente activo y el PLA, ya que las diferencias de concentraciones en la formulación de las mezclas (Shirai et al., 2013) puede provocar cambios en las propiedades físicas del PLA alterando su grosor (Rojas et al., 2021). Esto depende de la interacción específica de cada agente activo con el material, pudiendo causar aumentos de grosor (Martins et al., 2018) o disminuciones (Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015).

El TGA y el DSC de los films de PLA con y sin POM-LAE fue idéntico al obtenido en la caracterización de sus respectivas granzas. Manteniéndose la temperatura de degradación en torno a los $330 \text{ }^\circ\text{C}$ en ambos films. Las temperaturas de fusión ($150 \text{ }^\circ\text{C}$) y de transición vítrea ($68 \text{ }^\circ\text{C}$) se mantuvieron también respecto a la

granza previamente caracterizadas. Esto indica que el aditivo MOC 006 no influyo en las propiedades térmicas de los films.

4.8 Caracterización de los films de CMC-POM-LAE

El TGA de los films de CMC-POM-LAE se realizó para observar si el POM-LAE afectaba a la estabilidad térmica de la CMC respecto al control. Ambos films mostraron una pérdida de, aproximadamente, el 10-12 % de peso antes de alcanzar los 230 °C, temperatura a partir de la cual la pérdida de peso aumentó exponencialmente (Figura 2.14). La pérdida de peso total de los films de CMC fue del 83 %, mientras que la de los films con un 5 % de POM-LAE fue del 80 %. Esta diferencia se debe probablemente a la presencia del POM en el film, ya que, como se ha referido en la caracterización del POM-LAE, un 50,8 % del POM-LAE no se degradaba, lo que corresponde a la parte del POM.

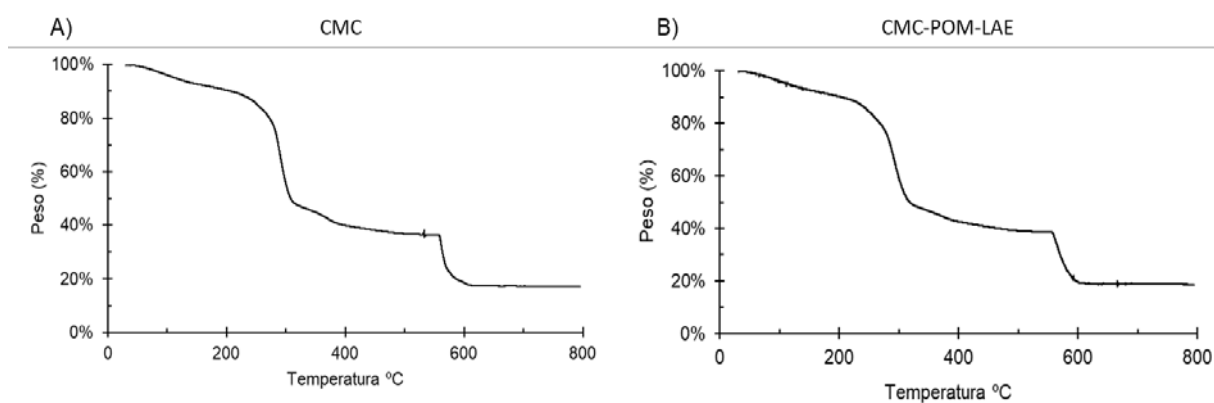


Figura 2.14. TGA del film control de CMC (A) y del film de CMC con un 5 % de POM-LAE (B).

La DSC se llevó a cabo para conocer a temperatura de fusión de ambos films y para observar si el POM-LAE tenía alguna influencia en los films de CMC. Para el film control de CMC la temperatura de fusión fue de 119,6 °C, mientras que la de los films de CMC-POM-LAE fue de 119,4 °C, similar a la descrita por Kanatt y colaboradores (Kanatt & Makwana, 2020), por lo que se verifica que el POM-LAE no ejerce ningún efecto sobre la temperatura de fusión de la CMC.

La presencia del POM-LAE en los films de CMC se confirmó a través de FTIR-ATR (Figura 2.15). Las vibraciones de longitud de onda características de la CMC entrecruzada con ácido cítrico se observaron en torno a 2930-2840 cm^{-1} , las vibraciones de los enlaces C-H, a 1650-1690 cm^{-1} enlace C=O del ácido cítrico,

a 1580 cm^{-1} que corresponde al enlace C=O del grupo carboxilo, a 1060 cm^{-1} correspondiente a la vibración de CH-O-CH₂ y a 1405 cm^{-1} asociado a las vibraciones de -CH₂ (Kanatt & Makwana, 2020; Tongdeesoontorn et al., 2011). Las señales de las vibraciones de la CMC ocultan las del LAE, por lo que solo es posible identificar su presencia a través de las vibraciones de longitud de onda características de $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}]^{8-}$ que se observaron en 989 cm^{-1} correspondiente a la vibración de W=O, y en 877 y 719 cm^{-1} asociadas con W-O-W (Chermette & Lefebvre, 2012; Sari & Situngkir, 2016).

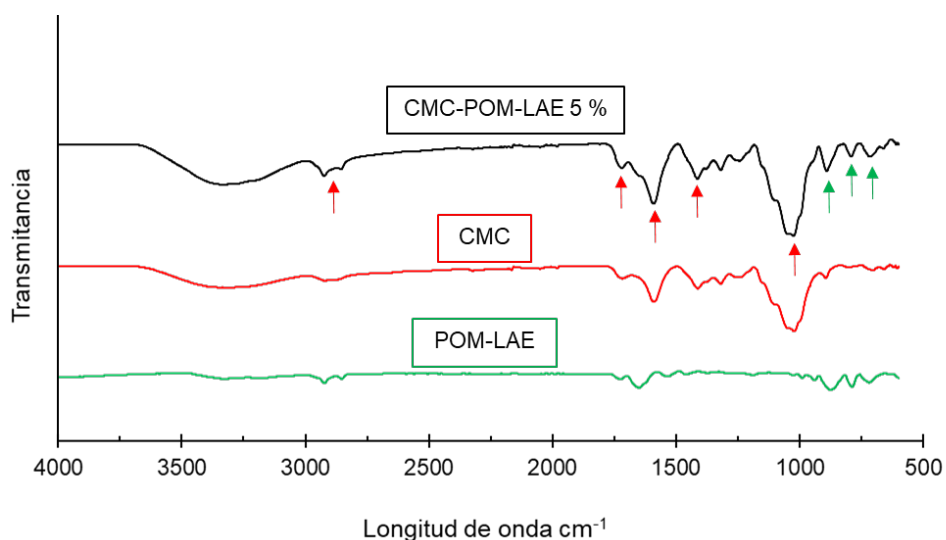


Figura 2.15. Comparación de los espectros de FTIR-ATR del POM-LAE, films de CMC y films de CMC-POM-LAE 5 %. Las flechas señalan los picos principales descritos en el texto. Las flechas verdes corresponden al POM-LAE y las rojas a la CMC.

Se evaluó la influencia del agente activo (POM-LAE) en el grosor de los films de CMC. El grosor de los films control de CMC fue de $40,4 \pm 3,9\ \mu\text{m}$, mientras que el de los films de CMC-POM-LAE 5 % fue de $47,6 \pm 3,4\ \mu\text{m}$ (Tabla 2.5). El grosor de los films con POM-LAE es significativamente mayor ($p < 0,05$) que los films control. Este incremento del grosor de los films está en consonancia con otros films de CMC en los que el agente activo incrementa el grosor de los films (Dashipour et al., 2015; Simsek et al., 2020).

Se determinó la habilidad de los films de CMC, con y sin POM-LAE, para atrapar moléculas de agua en su estructura, denominado grado de hinchamiento. El grado de hinchamiento de los films (Tabla 2.5) control fue de $1,85 \pm 0,11$, mientras que el de los films con un 5 % de POM-LAE fue de $3,72 \pm 0,42$. Los films de CMC-

POM-LAE obtuvieron un mayor grado de hinchamiento ($p < 0,05$) que los films control de CMC. Esto puede ser debido al mayor grosor de los films con POM-LAE, por lo que el POM-LAE afectaría a esta propiedad física de los films de CMC entrecruzados con ácido cítrico.

Por otro lado, la solubilidad determina la resistencia del film al agua. La solubilidad de los films control de CMC fue de $48,8 \pm 1,9$ %, mientras que la de los films con un 5 % de POM-LAE fue de $44,1 \pm 1,7$ % (Tabla 2.5). Es decir, los films con POM-LAE son significativamente ($p < 0,05$) menos solubles que los films que contienen únicamente CMC entrecruzado con ácido cítrico. Esta situación puede ser debido a la insolubilidad del POM-LAE en agua, ya que el film perdería propiedades hidrofílicas, esto es similar a los resultados observados en la literatura, donde la adición de agentes activos insolubles en agua disminuyen la solubilidad de la CMC (Abdin et al., 2023; Simsek et al., 2020). Los resultados de solubilidad obtenidos indicarían que los films no deberían usarse en alimentos con alta actividad de agua, ya que esto provocaría que se disolvieran parcialmente. Estos resultados también justificarían el mayor grado de hinchamiento de los films de CMC-POM-LAE, ya que, al ser menos solubles, tienen mayor capacidad de acumular agua, por lo que su grado de hinchamiento es mayor.

Las moléculas de agua totales que están presentes en la estructura del film contribuyen a su contenido en humedad. El contenido de humedad en los films control de CMC fue de $11,7 \pm 0,7$ %, mientras que los films de con un 5 % de POM-LAE fue del $10,2 \pm 0,3$ % (Tabla 2.5). El contenido de humedad en los films con POM-LAE fue significativamente menor ($p < 0,05$) que en los films control. Estos resultados obtenidos con el POM-LAE son similares a los observados en la literatura (Simsek et al., 2020), donde la adición de un agente activo hidrofóbico reducía el contenido de humedad de la CMC. Esto se debería a la interacción entre los grupos hidroxilo de la CMC y los componentes del LAE, junto con la propia insolubilidad del POM-LAE (Dashipour et al., 2015).

Tabla 2.5. Propiedades físicas de los films control de CMC y de los films de CMC con un 5 % de POM-LAE.

	Control CMC	CMC-POM-LAE 5 %
Grosor (μm)	40,4 \pm 3,9	47,6 \pm 3,4
Contenido de humedad (%)	11,69 \pm 0,70	10,24 \pm 0,30
Hinchamiento	1,85 \pm 0,11	3,72 \pm 0,42
Solubilidad (%)	48,8 \pm 1,9	44,1 \pm 1,7
Temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	119,6	119,4

4.9 Actividad antimicrobiana de films de CMC-POM-LAE contra *Listeria monocytogenes*

4.9.1 Actividad antilisteria *in vitro*

Se determinó la actividad antimicrobiana de los films de PLA extruidos con POM-LAE 5 %, tanto en medio líquido como sólido BHI, frente a *L. monocytogenes*. Respecto al ensayo en medio sólido BHI, no se observó halo de inhibición alrededor del film ni debajo de él. Esto puede indicar que no se produce difusión del POM-LAE desde el film de PLA al medio de cultivo BHI agar.

En cuanto al ensayo en medio líquido BHI (Figura 2.16), tampoco se observó ninguna reducción significativa ($p > 0,05$) en los recuentos de *L. monocytogenes*, expresados como log (UFC/mL), respecto al film de PLA y al control sin film. En este caso, tampoco se produce difusión del POM-LAE desde el film al medio líquido.

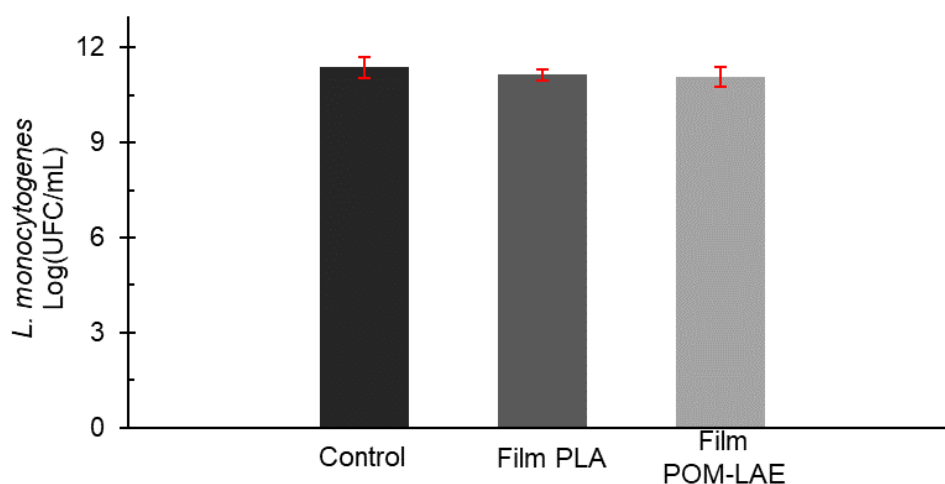


Figura 2.16. Actividad antimicrobiana de los films de PLA con POM-LAE 5 % frente a *L. monocytogenes* CECT 911 comparado con controles con (Film PLA) y sin film de PLA (Control). El crecimiento de *L. monocytogenes* se muestra en log (UFC/mL). Los resultados están expresados como la media de los valores y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes.

La ausencia de actividad puede deberse a la ausencia de un plastificante como el glicerol triacetato, ya que en el caso de films de PLA con nisina realizados por extrusión la ausencia del glicerol triacetato provocaba que los films no tuvieran actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* (Liu et al., 2009). Otra explicación, independiente del uso de plastificantes, es el proceso de fabricación de los films de PLA, ya que en gran parte de la literatura se realizan por *casting* o *casting* por extrusión (Jin & Zhang, 2008; Videira-Quintela et al., 2022; Wang & Rhim, 2016) y no por extrusión por soplado. También puede ser debido a que el propio LAE interaccione con el material de envase inactivándose y dejando de estar disponible para llevar a cabo su actividad antimicrobiana (Otero et al., 2014).

4.9.2 Ensayo de susceptibilidad de biofilms

Se evaluó la actividad antibiofilm de los films de PLA con POM-LAE 5 % frente a *L. monocytogenes* para ver si los films eran capaces de inhibir la formación de biofilms bacterianos en su superficie, ya que los resultados de actividad antimicrobiana habían sido negativos. Los resultados obtenidos (Figura 2.17) indican que los films de POM-LAE no son capaces de inhibir el crecimiento de

biofilms ya que no se verifican diferencias significativas ($p>0,05$) con los films control de PLA.

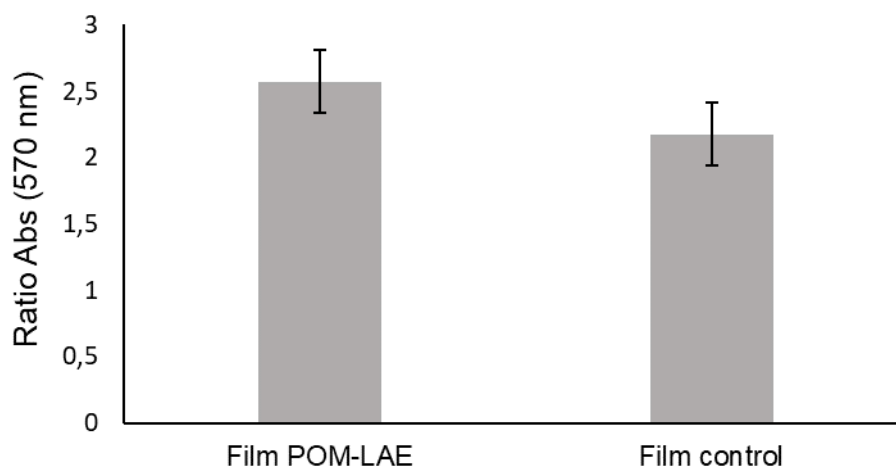


Figura 2.17. Actividad antibiofilm de los films de PLA con POM-LAE 5 % y films de PLA (Film control) frente a la formación de biofilm de *L. monocytogenes* CECT 911. Los resultados están expresados como el ratio de la absorbancia media de cada film y el control sin film, y la desviación estándar (barras de error) de tres replicas independientes.

Los resultados de la actividad antibiofilm confirman lo ya observado en los ensayos antimicrobianos *in vitro*, que el POM-LAE no es capaz de llevar a cabo su acción antimicrobiana cuando está incluido en el PLA. Debido a los resultados negativos obtenidos utilizando el PLA, se han desarrollado otros films alternativos utilizando un polímero diferente, la CMC, evaluando su actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*.

4.10 Actividad antimicrobiana de films de CMC-POM-LAE contra *Listeria monocytogenes*

4.10.1 Actividad antimicrobiana *in vitro*

Se eligió la CMC debido a su facilidad para disolverse en agua, lo que la convierte en una buena candidata para crear films biodegradables. Además, el ácido cítrico mejora su resistencia al agua, posibilitando el uso de CMC en alimentos con baja actividad de agua (Kanatt & Makwana, 2020). Los films de CMC con POM-LAE se evaluaron frente a *L. monocytogenes* *in vitro* para determinar su eficacia antibacteriana.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción progresiva de los recuentos bacterianos, expresados como log (UFC/mL), con el aumento de la concentración de POM-LAE en el film (Figura 2.18). Los films con 5 y 10 % de POM-LAE lograron la mayor actividad antimicrobiana, con una reducción de 6,98 y 7,91 log (UFC/mL), respectivamente. Mientras tanto, los films con 0,1% no produjeron ninguna actividad antimicrobiana. No hubo diferencia entre los controles con y sin films de CMC, lo que significa que el DMSO restante no tuvo efecto sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. A excepción del film con 0,1 % de POM-LAE, todas las demás concentraciones de la muestra fueron significativamente mejores que los controles ($p < 0,05$).

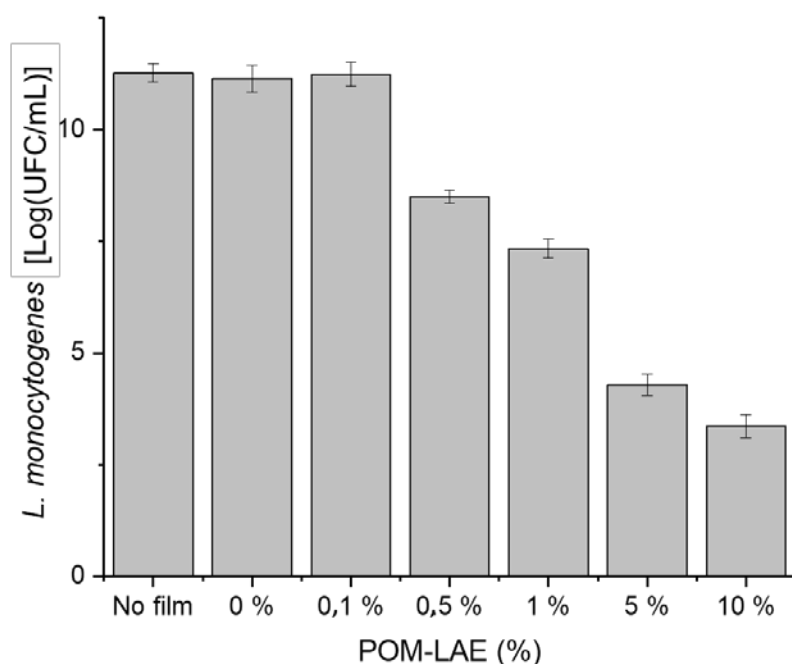


Figura 2.18. Actividad antimicrobiana de los films de POM-LAE-CMC frente a *L. monocytogenes* CECT 911 comparado con controles con (0 %) y sin film de CMC (No film). El crecimiento de *L. monocytogenes* CECT 911 se muestra en log (UFC/mL). Los resultados están expresados como la media de los valores y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes.

Los resultados obtenidos fueron mejores que los obtenidos por otros autores (Haghighi et al., 2020; Kashiri et al., 2016), donde se realizaron films de LAE con quitosano-poli(vinil alcohol) (PVA) y zeína. Los films de quitosano-PVA con 5 y

10 % de LAE tuvieron una actividad antimicrobiana claramente menor, con una reducción de 0,3 y 1,5 log (UFC/mL), en comparación con los resultados descritos en este trabajo. Por otro lado, los films de zeína con 5 y 10 % de LAE lograron una reducción de 2,6 y 4,99 log (UFC/mL), respectivamente. Los mejores resultados obtenidos en este trabajo pueden deberse a la menor solubilidad en agua del LAE en forma de POM-LAE que la del LAE libre. Esto puede conducir a una mejora de la actividad antimicrobiana de los films activos, ya que la matriz del film es capaz de mantener la actividad antimicrobiana del film durante periodos de tiempo más largos, porque el LAE no se disuelve fácilmente en el medio líquido acuoso. La diferencia de comportamiento respecto a los films de PLA-POM-LAE que no tenían actividad antimicrobiana puede deberse a la capacidad de los films de CMC-POM-LAE de absorber el agua como se observaba en el grado de hinchamiento, además de su solubilidad parcial, lo que permite la liberación del POM-LAE y su contacto con las bacterias para ejercer su actividad antibacteriana.

4.10.2 Actividad antimicrobiana *in vivo*

Dados los resultados obtenidos en los resultados *in vitro* con films de POM-LAE-CMC, solo se ensayaron films de CMC con 5% y 10% de POM-LAE sobre lonchas de jamón curado inoculadas artificialmente con *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos (Figura 2.19, Tabla 2.6) mostraron crecimiento de *L. monocytogenes* en el día cuatro para el control, mientras que las muestras envasadas con films de CMC con 5 y 10% de POM-LAE revelaron una reducción significativa de log (UFC/mL) en la carga microbiana de las lonchas de jamón. En el cuarto día, el control creció del 3,19 inicial a 3,43 log (UFC/g), mientras que los films de POM-LAE al 5 % y al 10 % pudieron controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* e incluso reducir significativamente el número de recuentos de *L. monocytogenes* de 3,47 a 2,7 log (UFC/g) en comparación con las muestras del control. Además, en el día 14 hubo un pequeño aumento en el crecimiento de las muestras de control (de 2,64 a 2,79 log (UFC/g)), mientras que no se observó crecimiento en las muestras con films de POM-LAE-CMC. Finalmente, en el día 21, ya no hubo diferencia significativa entre el control y los films de POM-LAE-CMC, probablemente debido al impacto de la disminución de la actividad de agua del jamón curado en el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Tabla 2.6. Actividad antimicrobiana de los films de CMC con POM-LAE comparado con el film control de CMC, expresado como (log (UFC/g)). Los resultados están expresados como media±desviación estándar de tres replicas independientes.

Muestra de film	<i>L. monocytogenes</i> CECT 911 en muestras de jamón [log (UFC/g)]					
	Día 0	Día 4	Día 7	Día 11	Día 14	Día 21
CMC		3,47±0,03 ^a	2,88±0,09 ^a	2,64±0,00 ^a	2,79±0,01 ^a	2,11±0,07 ^a
CMC+5% POM-LAE	3,19±0,00	2,70±0,03 ^b	2,64±0,08 ^b	2,50±0,02 ^b	2,50±0,07 ^b	2,06±0,04 ^a
CMC+10% POM-LAE		2,69±0,04 ^b	2,66±0,01 ^b	2,37±0,06 ^c	2,39±0,05 ^b	2,07±0,10 ^a

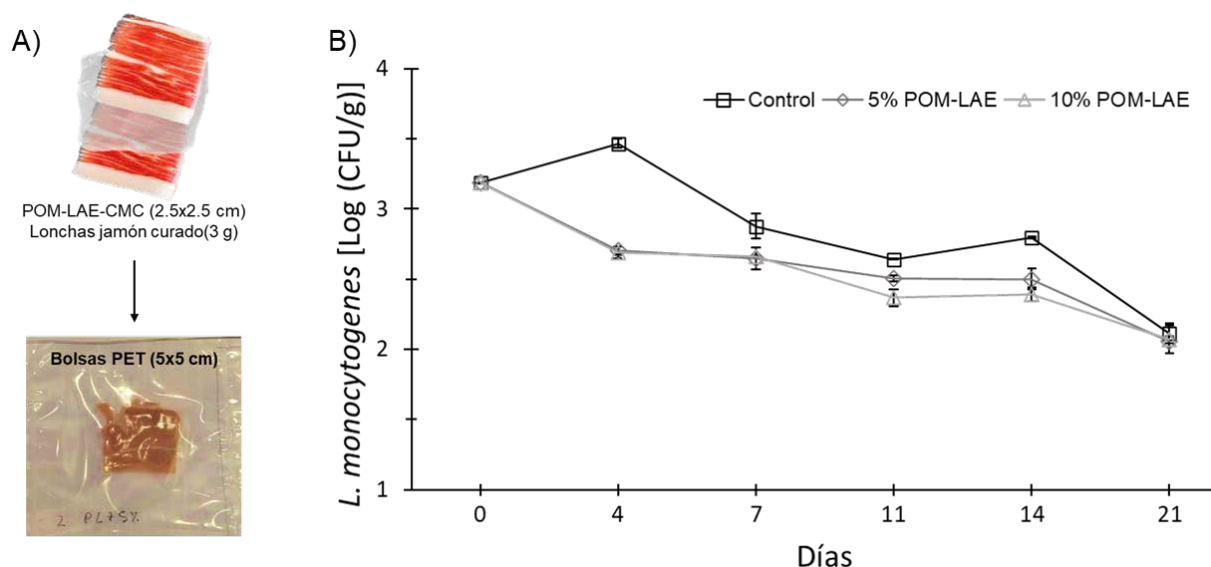


Figura 2.19. A) Proceso de preparación de la muestra para el ensayo *in vivo*. B) Actividad antimicrobiana de los films de CMC con POM-LAE (5 y 10 %) en jamón curado inoculado con *L. monocytogenes* CECT 911 y almacenado a 4 °C, expresado en log (UFC/g). Los resultados se muestran como la media de los valores y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes.

Los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento de crecimiento de *L. monocytogenes* están de acuerdo con los obtenidos por otros autores sobre jamón curado (Michaelsen et al., 2006; Sullivan et al., 2012), que observaron un pequeño crecimiento de *L. monocytogenes* en los primeros días y una posterior disminución en los días posteriores. Las muestras con POM-LAE mostraron la misma disminución, aunque los films de CMC con POM-LAE fueron significativamente mejores ($p < 0,05$) que el control, excepto en el día 21. No se obtuvieron diferencias significativas entre los films de CMC con 5 y 10 % de POM-LAE, a excepción de las muestras recogidas el día 11 ($p < 0,05$). Estos

resultados suponen una mejora respecto a los comunicados por Hereu y colaboradores utilizando films de alcohol polivinílico con nisina sobre jamón curado, donde durante los primeros días los autores no observaron una reducción significativa de *L. monocytogenes* (Hereu et al., 2012). Los films de POM-LAE-CMC utilizados para ambas pruebas, *in vitro* e *in vivo*, demostraron ser estables durante el tiempo que se realizaron las pruebas, sin pérdida de actividad antimicrobiana dentro del período de seis meses que se probaron los films.

5. Conclusión

El desarrollo de materiales de envasado fácilmente biodegradables y de base biológica para alimentos listos para el consumo es crucial para reducir la omnipresente contaminación plástica en los ecosistemas. La necesidad de desarrollar films biodegradables y mejorar la seguridad alimentaria nos ha llevado a desarrollar un nuevo complejo antimicrobiano híbrido (POM-LAE) e incorporarlo en films de PLA y CMC biodegradables, como una solución viable de envase antimicrobiano para alimentos listos para el consumo, que son altamente propensos a la contaminación bacteriana y causadores de varios brotes de intoxicación alimentaria por su ingesta. El POM-LAE mostró actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *E. coli* verotoxigénica, tanto en sus formas planctónicas, pudiendo inhibir el crecimiento bacteriano; como en la forma de biofilms, inhibiendo la formación de biofilms y matar las células en biofilms preformados al comprometer la integridad bacteriana. Además, los films de CMC conteniendo 5 y 10 % de POM-LAE fueron eficaces para reducir el crecimiento de *L. monocytogenes* en un alimento listo para el consumo, el jamón curado. En cambio, los films de PLA que contenían un 5 % de POM-LAE no demostraron tener actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *L. monocytogenes*.

En general, los resultados obtenidos con los films de CMC-POM-LAE muestran una nueva estrategia prometedora para el desarrollo de films antimicrobianos y biodegradables para ser utilizados como films separadores para alimentos listos para el consumo con baja actividad de agua, reduciendo así la cantidad de plástico generado en productos envasados de charcutería en lonchas. Además, esta estrategia puede incluso eliminar la necesidad de utilizar envases en

atmósfera modificada, ya que el film separador podría reducir la carga microbiana por sí sola y, por lo tanto, garantizar la seguridad del producto si se produjera una contaminación cruzada con *L. monocytogenes* durante el procesamiento y envasado del jamón curado.

CAPÍTULO 3

Encapsulación de compuestos orgánicos volátiles en nanoesponjas de ciclodextrina para combatir mohos alimentarios contaminantes

Índice:

1. Introducción.....	205
2. Objetivos.....	211
3. Materiales y métodos.....	212
4. Resultados y discusión.....	221
5. Conclusión.....	239

1. Introducción

Uno de los mayores desafíos a los cuales se enfrentan la agricultura y la industria agroalimentaria es la presencia de mohos causantes de deterioro en los alimentos. Los mohos representan uno de los mayores peligros para la seguridad alimentaria mundial (Fisher et al., 2012), ya que son responsables de causar grandes pérdidas en cosechas cuyos costes económicos se estiman en unos 60 mil millones de euros, incluyendo el gasto en fungicidas para el control de los mohos (Kettles & Luna, 2019). Los mohos son los microorganismos más comunes que causan el deterioro de los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria, desde los cultivos hasta los hogares, siendo algunos de los géneros más habituales *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Botrytis* (Dean et al., 2012; Rico-Munoz et al., 2019). Estos mohos afectan a una amplia variedad de alimentos como los cereales, frutas, verduras, pan, bebidas y productos lácteos, debido a que son capaces de crecer en un amplio rango de pH, actividad de agua y temperatura (Dagnas & Membre, 2013). Por la dificultad en su control y por su ubiquidad, es necesario desarrollar nuevas soluciones que permitan controlar el crecimiento fúngico en los alimentos. Una de estas soluciones pasa por la formulación de nuevos envases activos antifúngicos capaces de reducir las pérdidas ocasionadas por los mohos. Un tipo de compuestos antifúngicos poco investigados en la industria alimentaria son los compuestos orgánicos volátiles (COV), que pueden utilizarse para desarrollar envases activos antifúngicos.

Los COV se definen como aquellos compuestos orgánicos cuya presión de vapor es superior a 10 Pa a 25 °C, tienen un punto de ebullición de hasta 260 °C a presión atmosférica y poseen 15 o menos átomos de carbono (Williams & Koppmann, 2007). Algunos de estos COV se encuentran aprobados por la EFSA para su uso como aromatizantes alimentarios, como es el caso del benzaldehído, acetaldehído, 2-etilhexanol, diacetilo, 2-nonanona o el nonanal que son utilizados en la industria alimentaria (Comisión Europea, 2012). El origen de estos COV puede ser natural, ya que son producidos por microorganismos (Korpi et al., 2009) como los pertenecientes al género *Bacillus* o forman parte de la composición de los aceites esenciales (Tisserand & Young, 2014) que producen las plantas. Aunque normalmente se pueden obtener de fuentes naturales por

fermentación o destilación, la demanda supera con creces a la oferta (Wolken et al., 2004), por lo que, actualmente, los COV se producen industrialmente (Valentini et al., 2021) por medio de síntesis química.

Además de sus características saborizantes o aromáticas, los COV poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias y mohos, ya que muchos de estos COV son utilizados por bacterias, como las pertenecientes al género *Bacillus* (Grahovac et al., 2023). Estos COV producidos por las bacterias inhiben la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de mohos fitopatógenos, por lo que promueven el crecimiento de las plantas a la vez que inducen su resistencia frente a los mohos (Torralba et al., 2021). La capacidad antifúngica de los COV, como el benzaldehído, el diacetilo (Calvo et al., 2020) o el 2-etilhexanol (Wang et al., 2021) los hace candidatos perfectos a la hora de ser utilizados para controlar a los patógenos fúngicos que causan graves pérdidas en alimentos, como las F&V en la etapa de postcosecha.

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto α -dicetona soluble en agua y volátil que tiene un olor a mantequilla. Está generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA y aceptado como aditivo alimentario por la UE, por lo que se usa ampliamente como saborizante en alimentos y bebidas (Schaeffer & Iannucci, 2014). El diacetilo se encuentra naturalmente en plantas, frutas, café, miel, cacao y productos lácteos, principalmente mantequilla, margarina y algunos quesos (Hernandez-Valdes et al., 2020) y en alimentos como la cerveza y el vino, ya que también es un subproducto natural de la fermentación. En cuanto a su actividad antimicrobiana, el diacetilo es un antimicrobiano que ha demostrado ser efectivo en altas concentraciones y que tiene una mayor actividad frente a bacterias Gram negativas, levaduras y mohos que sobre bacterias Gram positivas (Dillon, 2014). El diacetilo ha mostrado su actividad antimicrobiana frente a bacterias como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* (Lanciotti et al., 2003) y frente a mohos del género *Penicillium* (Shi & Knøchel, 2021), *Aspergillus* (Rama Devi & Polasa, 1985) y especies de *B. cinerea* (Li et al., 2022).

Otro COV antifúngico es el benzaldehído, un compuesto aromático formado por un benceno con un sustituyente aldehído, que está generalmente reconocido como seguro (GRAS) (CIR, 2006) y está aprobado como saborizante alimentario en la UE (EFSA, 2012) como potenciador del sabor y también como ingrediente

clave en el sabor a cereza y otras frutas (Verma et al., 2017). El benzaldehído es un compuesto natural, que se puede obtener fácilmente por extracción o destilación de diferentes fuentes naturales, como la almendra, o las semillas del melocotón o el albaricoque (Paula Dionísio et al., 2012). Sin embargo, para cubrir su demanda global, se sintetiza generalmente a partir del tolueno (Valentini et al., 2021). El benzaldehído también tiene actividad antimicrobiana demostrada frente a mohos y bacterias, como por ejemplo cepas de mohos de *Aspergillus* y *Penicillium* (Fitzgerald et al., 2005) y bacterias como *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. enterica* (Friedman et al., 2003).

Por último, el 2-etilhexanol es un compuesto alcohol incoloro con un suave olor floral que está generalmente reconocido como seguro (GRAS) y está aprobado por la UE para su utilización como saborizante alimentario, además también se usa para fragancias aromáticas y como disolvente (EFSA, 2009a; McGinty et al., 2010). Este alcohol es producido naturalmente por algunas bacterias (Korpi et al., 2009), aunque se obtenga industrialmente a partir del butanal. Se ha descrito la actividad antifúngica de este compuesto frente a mohos como *B. cinerea* (R. Huang et al., 2012) y *Alternaria solani* (D. Zhang et al., 2020).

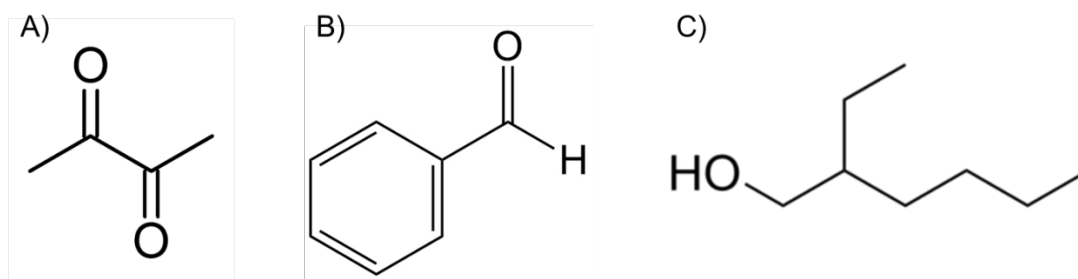


Figura 3.1. Estructura del diacetilo (A), benzaldehído (B) y 2-etil-1-hexanol (C). Su pequeño tamaño, junto con su estructura, es adecuado para su encapsulación en CDNS debido a las características hidrofóbicas de las cavidades internas y las hidrofílicas de la nanoesponja de ciclodextrina.

Debido a su volatilidad e inestabilidad, la utilización de COV en el campo del envasado activo alimentario está aún por explorar. Una posible estrategia para posibilitar su uso en el desarrollo de envases activos antimicrobianos podría pasar por su encapsulación en moléculas capaces de estabilizarlos y promover su liberación de forma más controlada, aumentando su eficacia a largo plazo.

Además, su pequeño tamaño facilita su encapsulación y su carácter anfipático (Figura 3.1) los hace ideales a la hora de ser encapsulados en CD o CDNS, como se ha estudiado en el caso del limoneno en β -CDNS (Salehi et al., 2021) o de la 2-nonanona en β -CD (Abarca et al., 2016). En este sentido, el uso de moléculas encapsuladoras como las ciclodextrinas o polímeros basados en éstas, pueden ser opciones viables para la incorporación de estos compuestos a un envase que pueda ser utilizado para el control de mohos patógenos y causantes de deterioro en alimentos envasados, por contacto indirecto, es decir, sin la necesidad de que el alimento esté en contacto directo con el material de envase activo.

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos que constan de seis (α -ciclodextrina), siete (β -ciclodextrina), ocho (γ -ciclodextrina) o más unidades de glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4) que se sintetizan enzimáticamente a partir del almidón (Del Valle, 2004) y son solubles en agua, aunque la β -ciclodextrina en menor medida. Se pueden definir como oligómeros de glucopiranosas cíclicas que forman una estructura tridimensional cónica hueca, con una cavidad interior hidrófoba y una pared exterior hidrófila (Liu et al., 2022). Esto les permite incluir una amplia gama de compuestos hidrofóbicos como compuestos orgánicos volátiles antimicrobianos (2-nonanona o limoneno), aceites esenciales e incluso gases dentro de su cavidad (Pawar et al., 2019). Los monómeros de ciclodextrina α -ciclodextrina (α -CD, E-457), γ -ciclodextrina (γ -CD, E-458) y β -ciclodextrina (β -CD, E-459) están aceptados como aditivos alimentarios por la UE y están generalmente reconocidas como seguros (GRAS) por la FDA. No existe una ADI para α -CD y γ -CD debido a sus perfiles toxicológicos favorables (Matencio et al., 2020), pero sí para β -CD, en la que se aconseja un nivel máximo de ingesta de 5 mg/kg/día (EFSA, 2016a). Sin embargo, las CD tienen algunas limitaciones, principalmente la solubilidad en agua, que puede provocar que las CD migren del envase activo al alimento y se pierda el efecto de los compuestos encapsulados en su interior.

Por ello, las CD pueden entrecruzarse para formar polímeros de ciclodextrina insolubles usando compuestos como el 1,1-carbonil diimidazol (CDI), ácido cítrico o difenil carbonato (DFC) como agentes de entrecruzamiento. Estos nuevos polímeros, designados nanoesponjas de ciclodextrina (CDNS), son un tipo nanoestructurado de ciclodextrina polimerizada en una red tridimensional

con propiedades mejoradas sobre los monómeros de CD, en especial por su insolubilidad en agua y disolventes orgánicos (Sherje et al., 2017). Ésta no es la única ventaja que poseen sobre las CD, ya que las CDNS pueden formar complejos con una serie más amplia de moléculas debido a la presencia de espacios intersticiales entre las CD entrecruzadas, que pueden albergar compuestos más hidrofílicos (Krabicová et al., 2020). Otra ventaja, derivada del uso de CDNS, se debe a la red polimérica que rodea las cavidades y dificulta la difusión de las moléculas huésped atrapadas, lo que promueve una cinética de liberación más lenta de los compuestos encapsulados (Caldera et al., 2017). Actualmente, la principal línea de investigación de las CDNS se enfoca en su aplicación farmacéutica como sistemas transportadores de medicinas gracias a su capacidad de encapsulación de compuestos y su baja toxicidad (Trotta et al., 2012).

Existen diferentes métodos para sintetizar CDNS, siendo lo más habitual la utilización de solventes orgánicos como la dimetil formamida (DMF) (Trotta & Cavalli, 2009) o el dimetil sulfóxido (DMSO) (Torne et al., 2013), seguido de una posterior purificación realizando lavados con etanol. Estos procesos requieren la utilización de disolventes orgánicos que pueden ser tóxicos, además de un proceso de lavado largo e intensivo para eliminar completamente los disolventes. Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de síntesis de CDNS que permiten una menor utilización de compuestos tóxicos, es decir, una síntesis verde que utilice menos disolventes y sea más eficiente. como la síntesis mecanoquímica (Pedrazzo et al., 2020), que, en el caso de las CDNS, elimina la necesidad de usar disolventes orgánicos, tanto en su síntesis como en su purificación. La síntesis mecanoquímica se basa en la utilización de un molino planetario de bolas para llevar a cabo el entrecruzamiento de las moléculas de CD a través de la energía mecánica generada por el choque entre las bolas y las moléculas de reactivos, siendo capaz de activar enlaces químicos y formar los entrecruzamientos necesarios para la formación de CDNS (Figura 3.2). Posteriormente se realiza un lavado con agua para eliminar el agente de entrecruzamiento y la CD que no hayan reaccionado. Por lo tanto, la mecanoquímica es un método más sostenible que no tiene la necesidad de usar

solventes orgánicos a través de una molienda eficiente en estado sólido (Utzeri et al., 2022).

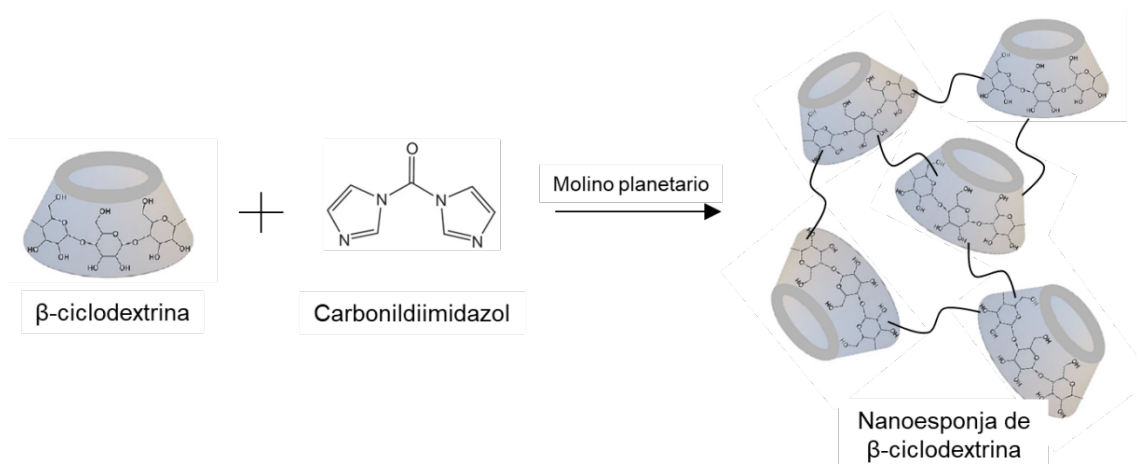


Figura 3.2. Síntesis mecanoquímica de β-CDNS. Utilizando únicamente la ciclodextrina y un agente de entrecruzamientos, en este caso carbonildiimidazol.

Gracias a las características hidrofóbicas de su cavidad interna y las hidrofílicas de su exterior, mejoradas por el entrecruzamiento, las CDNS son candidatas apropiadas a la hora de encapsular compuestos que se liberen lentamente al exterior, siendo la β-CDNS la mejor para llevar a cabo las encapsulaciones de este tipo de compuesto, gracias al tamaño de su cavidad interna y su reducido coste (Pawar et al., 2019; Trotta & Cavalli, 2009). Aunque la principal aplicación de las β-CDNS se enfoca en la encapsulación de fármacos y eliminación de contaminantes, se está empezando a investigar la encapsulación de compuestos volátiles, como los aceites esenciales o COV (Tabla 3.1), para su uso potencial como antimicrobiano en el desarrollo de envases activos alimentarios.

Tabla 3.1. Agentes activos antimicrobianos encapsulados en CDNS frente a distintos microorganismos patógenos.

Agente activo	Nanoesponja de ciclodextrina	Microorganismo	Referencia
Aceite esencial de cilantro	α - y β -CDNS	<i>L. monocytogenes</i> , <i>C. jejuni</i>	(Silva et al., 2019b)
Aceite esencial de canela	α - y β -CDNS	<i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	(Simionato et al., 2019)
Limoneno	β -CDNS	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(Salehi et al., 2021)
Aceite esencial de Babchi	β -CDNS	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(Kumar et al., 2018)
Camptotecina	β -CDNS	-	(Gigliotti et al., 2016)
Ácido azelaico	β -CDNS	<i>S. aureus</i>	(Kumar & Rao, 2021)

La efectividad antibacteriana de estos encapsulados abre la puerta a la encapsulación, no sólo de aceites esenciales, sino también de otros compuestos orgánicos volátiles con actividad antimicrobiana y, de esa forma, desarrollar nuevos envases activos.

2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es el desarrollo de un envase activo antifúngico basado en la encapsulación de COV, como el diacetilo o el benzaldehído en CDNS (Figura 3.3), y así generar un agente activo susceptible de ser más fácilmente incorporado a un envase. Para ello, se ha procedido a la evaluación de la actividad antifúngica de los COV estudiados frente a mohos causantes de deterioro en F&V, como *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Además, se ha estudiado la eficiencia de encapsulación en las CDNS y la liberación de los COV desde las CDNS.

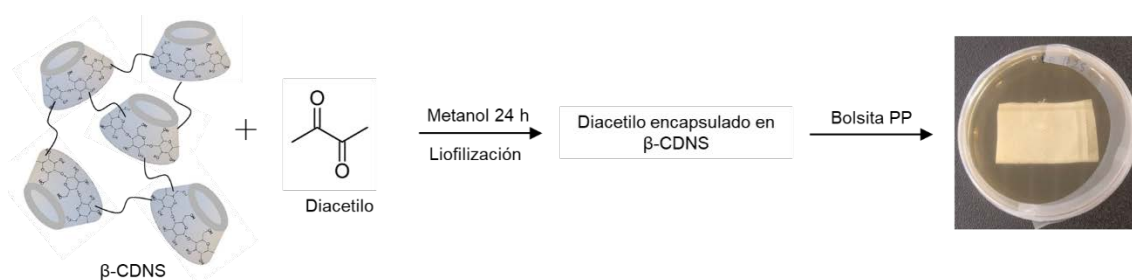


Figura 3.3. Proceso de síntesis de la encapsulación de diacetilo en β-CDNS y desarrollo del prototipo del envase activo en una bolsita de polipropileno (PP).

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

La α-ciclodextrina (α-CD) y la β-ciclodextrina (β-CD) se compraron a Roquette, Francia. El carbonil diimidazol (CDI) y la acetofenona se compraron a Sigma Aldrich, Alemania. El diacetilo y el 2-etilhexanol se adquirieron a TCI, Bélgica. El benzaldehído se compró a Glentham Life Sciences, Reino Unido. La 2-nonanona se adquirió a Honeywell, Alemania. El polipropileno (PP) no tejido de 190 μm de grosor fue cedido por Samtack, España.

3.2 Síntesis de nanoesponjas de ciclodextrina (CDNS)

La síntesis de α- y β-CDNS es una modificación del método desarrollado por Pedrazzo y colaboradores (Pedrazzo et al., 2020). Brevemente, para sintetizar α-CDNS, se dejó secar α-CD a 100 °C durante 24 horas para eliminar la humedad. Después, se mezclaron 33,8 g de α-CD y 22,5 g de CDI obteniendo ratio molar α-CD 1:4 CDI. A continuación, se añadieron a una jarra de 500 mL de ZrO₂ (Retsch, Alemania) junto con 100 bolas de 10 mm de ZrO₂. Luego, se colocó la jarra en un molino planetario PM 100 (Retsch, Alemania), se equilibró el peso y se realizó la molienda durante 3 h, a 350 rpm (19 g) y cambiando el sentido cada 15 min. Una vez realizada la síntesis, se separaron las bolas del producto utilizando un tamiz, con un tamaño de poro de 0,5 mm, para proceder al lavado de la α-CDNS sintetizada. Al producto obtenido se le añadieron aproximadamente 300 mL de H₂O miliQ para disolver el CDI y la α-CD que no hubiesen reaccionado y se filtró a vacío utilizando filtros de celulosa MN 640 d (Duren, Alemania) para recuperar las α-CDNS sólidas. A continuación, se llevó a cabo un lavado con aproximadamente 500 mL de H₂O miliQ durante 6 h con

agitación constante a 40 °C para eliminar el imidazol unido a las α -CDNS. Finalmente, se filtró a vacío otra vez y las α -CDNS lavadas se dejaron secar en una estufa durante 24 h a 50°C. (Rendimiento = 96 %).

El método para realizar la síntesis de β -CDNS fue igual que para α -CDNS, con alguna modificación. Brevemente, se pesaron 37,5 g de β -CD y 22,5 g de CDI para ratio molar β -CD 1:4 CDI, y las condiciones de molienda fueron 3 h, a 325 rpm (17 g), cambiando el sentido del giro a cada 15 min. El resto de la síntesis y lavado fue idéntico a lo descrito para las α -CDNS (Rendimiento = 95 %). Por último, las α y β -CDNS obtenidas fueron molidas en un molino ZM-200 (Retsch, Alemania) a 14000 rpm en intervalos de 5 segundos utilizando un tamiz con un poro de 0,5 mm para obtener un polvo uniforme.

3.3 Caracterización de CDNS

La caracterización de α - y β -CDNS se llevó a cabo realizando espectroscopia FTIR-ATR en un FT-IR 4100 (Jasco, Japón) utilizando las muestras en polvo sin preparación adicional. Se utilizaron como blancos α - y β -CD. Los espectros se tomaron con 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de longitud de onda de 500–4000 cm^{-1} .

3.4 Actividad antifúngica de los COV

3.4.1 Cepas fúngicas y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron tres cepas fúngicas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT): *Aspergillus niger* CECT 2088; *Penicillium expansum* CECT 2278, *Botrytis cinerea* CECT 2100. Para el crecimiento previo a la realización de los ensayos, *A. niger* CECT 2088 y *P. expansum* CECT 2278 se subcultivaron en *slants* de medio agar Saboraud dextrosa (SDA, Scharlab, España) a 25 °C en condiciones aerobias durante 4 días, mientras que *B. cinerea* CECT 2100 se subcultivó en placas de Petri de medio SDA durante 10 días en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera.

3.4.2 Actividad antifúngica en fase vapor

El método utilizado para evaluar la actividad antifúngica en fase vapor de los COV es una modificación de la literatura (López et al., 2005; Simionato et al., 2019). Los COV utilizados fueron diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, 2-

nonanona y acetofenona. Brevemente, para preparar el inóculo de *A. niger* y *P. expansum*, se resuspendieron las esporas de los mohos en los *slants* con medio SDA en 2 mL de H₂O suplementada con Tween 20 al 0,1 %. A continuación, se transfirió la suspensión de esporas a un tubo nuevo y se añadieron 3,5 mL de H₂O+Tween 20 al 0,1 %. Después, se midió la absorbancia a 620 nm de la suspensión y se preparó una suspensión de 0,1 OD₆₂₀ en H₂O+0,1 % Tween 20 (10⁶ UFC/mL). Para el inóculo de *B. cinerea* se utilizó un hisopo húmedo para transferir las esporas desde la placa a un tubo con 3,5 mL de H₂O+Tween 20 al 0,1%. Después, se midió la absorbancia a 620 nm de la suspensión y se preparó una suspensión de 0,1 OD₆₂₀ en H₂O con 0,1 % Tween 20 (10⁶ UFC/mL). Las placas de medio SDA se inocularon añadiendo 100 µL (10⁵ UFC) de cada suspensión fúngica y se extendieron por toda la placa utilizando un asa de Drigalsky.

A continuación, se prepararon los discos de papel para los COV. Se colocó un cubreobjetos de vidrio en el centro de la parte interior de la tapa, sobre una gota de NaCl 0,9 % estéril, y el disco de papel de 10 mm se colocó encima del cubreobjetos. Se agregaron 1; 2,5 y 5 µL de cada COV a los discos de papel estériles (Figura 3.4). Finalmente, las placas se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 25 °C durante 4 días para *A. niger* y *P. expansum*, con excepción de las placas de *B. cinerea*, que se incubaron durante 10 días a 25 °C. Al final del tiempo de incubación se registraron los halos de inhibición del crecimiento con un calibre digital o se indicó si había un 100 % de inhibición al no haber crecimiento del moho. Los controles se realizaron sin añadir el COV al disco de papel. El experimento se llevó a cabo haciendo un mínimo de tres réplicas.

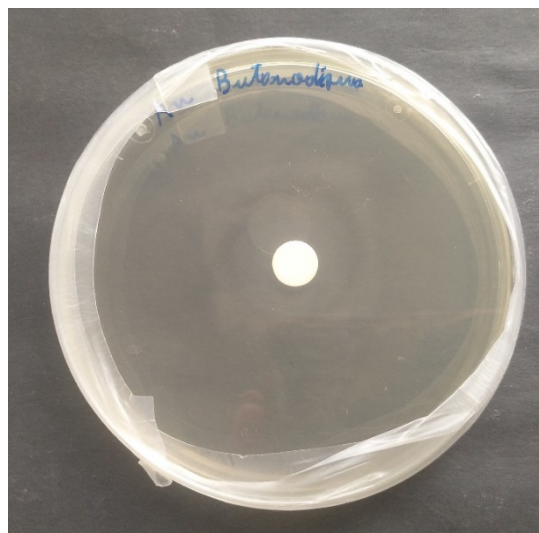


Figura 3.4. Ejemplo del ensayo de fase vapor del diacetilo frente *A. niger* antes de incubarlo a 25 °C durante 4 días.

3.5 Encapsulación de compuestos orgánicos volátiles en CDNS

Se realizaron dos encapsulaciones diferentes. En primer lugar, se hizo una encapsulación a pequeña escala para comprobar si la encapsulación tenía éxito y los COV (diacetilo y benzaldehído y 2-etilhexanol) mantenían su actividad antifúngica. Una vez comprobada su actividad, se hizo una segunda encapsulación a mayor escala para realizar los ensayos.

El método utilizado para llevar a cabo la encapsulación de diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol fue extraído de la literatura con alguna modificación (Simionato et al., 2019). Brevemente, para la primera encapsulación en α - y β -CDNS, se pesaron $50 \pm 0,2$ mg de cada nanoesponja y se colocaron en microtubos de 2 mL. Luego, se agregaron a cada tubo 50 μ L de diacetilo, benzaldehído o 2-etilhexanol junto con 950 μ L de metanol. El encapsulado se realizó mediante agitación magnética de las muestras a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para recuperar las nanoesponjas encapsuladas. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, que contenía el solvente y el COV no incorporado, y las nanoesponjas encapsuladas se almacenaron a -80 °C antes de la liofilización. Las muestras se liofilizaron en un liofilizador Lyobeta 25 de Telstar, España. El proceso de liofilización constó de varias fases. En primer lugar, se la temperatura se mantuvo a -50 °C durante 2

horas. A continuación, la temperatura se aumentó a -28 °C a una presión de 100 µbar durante 48 horas. Por último, la temperatura se aumentó nuevamente de -28 °C a 25 °C en 6 horas y las muestras se mantuvieron durante 24 horas a 25 °C. Por último, las muestras liofilizadas se guardaron a -18 °C hasta su uso.

Para la encapsulación a gran escala en α - y β -CDNS, se pesaron $3\pm 0,1$ g de nanoesponja y se añadieron a un bote de 100 mL junto a 3 mL de diacetilo o benzaldehído y 57 mL de metanol. El encapsulado se llevó a cabo mediante agitación magnética de las muestras a temperatura ambiente durante 24 h. Después, las muestras se decantaron eliminando la mayor cantidad posible de solvente y el COV no incorporado. Las CDNS encapsuladas se almacenaron a -80 °C antes de la liofilización. Las muestras se liofilizaron en las mismas condiciones antes explicadas. Los encapsulados se denominaron α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído. Por último, se guardaron a -18 °C hasta su uso. Las muestras de α - y β -CDNS control, denominadas blanco, se prepararon realizando el mismo proceso, pero sin añadir los COV.

3.6 Análisis preliminar de la actividad antifúngica de los encapsulados

Se comprobó si los encapsulados de los tres COV (diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol) tenían actividad antifúngica frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Brevemente, las placas de SDA se inocularon con *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea* (10^5 UFC) como se ha explicado en el anterior apartado. A continuación, se colocaron 50 mg de las nanoesponjas encapsuladas en el centro de la parte interior de la tapa de la placa de Petri. Finalmente, las placas se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 25 °C durante 4 días para *A. niger* y *P. expansum* y durante 10 días para *B. cinerea*. Una vez terminada la incubación se midió el halo de inhibición o se comprobó si había un 100 % de inhibición del crecimiento. Los controles se prepararon sin añadir las nanoesponjas encapsuladas. Los blancos se realizaron añadiendo 50 mg de las CDNS preparadas únicamente con metanol. El ensayo se realizó por duplicado.

3.7 Análisis de la encapsulación y liberación de COV en CDNS por GC-FID

Para todos los análisis se utilizó un equipo de cromatografía de gases (GC) Agilent 8860 (Agilent, EE. UU.) equipado con una columna Zebron ZB-624 (320 μm , 30 m y 1,8 μm) y acoplado a un detector de ionización de llama (FID). Para el análisis de datos se utilizó el software OpenLab CDS ChemStation Edition C.01.10 (Agilent, EE. UU.).

3.7.1 Cuantificación de la encapsulación de los COV en α - y β -CDNS

Se desarrolló un método para cuantificar la concentración de diacetilo y benzaldehído encapsulado en α - y β -CDNS.

Para la determinación de la cantidad de diacetilo encapsulado, se realizó una recta de calibrado con disoluciones de diacetilo en metanol: 150, 300, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 $\mu\text{g/mL}$. A continuación, se transfirió aproximadamente 1 mL de cada concentración a viales de análisis para su inyección automática en el equipo de GC-FID. La temperatura de entrada (*inlet*) fue de 220 °C y en el detector de 150 °C. La separación se llevó a cabo a una temperatura inicial de 35 °C, que se mantuvo constante durante 4 min, con un posterior incremento hasta 80 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min y finalmente una nueva rampa de calentamiento de 20 °C/min hasta 150 °C. El tiempo de separación cromatográfica fue de 13,25 min, siendo el tiempo de retención del diacetilo de 11,5 min. Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1,6 mL min⁻¹. Se inyectaron 10 μL de cada concentración de las disoluciones patrón con un *split* de 10:1. La recta de calibrado se obtuvo representando el área obtenida en el GC-FID frente a la concentración en $\mu\text{g/g}$.

Las muestras se analizaron pesando 50 mg de α - y β -CDNS-diacetilo en un microtubo de 2 mL al que se añadieron 950 μL de metanol y se incubaron en baño de ultrasonidos para extraer todo el diacetilo encapsulado durante 30 y 60 min. Se estudiaron distintos tiempos de extracción de 30 y 60 min para asegurar que todo el diacetilo había sido extraído. A continuación, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min y se trasvasó el sobrenadante a un vial de análisis. Después, 10 μL de cada muestra se inyectaron automáticamente

como se ha explicado anteriormente. El área obtenida en el GC-FID se interpoló en la recta de calibrado para conocer la concentración de diacetilo encapsulado.

Para la determinación de la cantidad de benzaldehído encapsulado, se realizó la recta de calibrado modificando parcialmente el método anterior. Brevemente, la temperatura de entrada (*inlet*) fue de 190 °C y en el detector de 230 °C, el tiempo de ejecución fue de 15 min, siendo el tiempo de retención del benzaldehído de 13,5 min. La separación se llevó a cabo con una temperatura inicial de 35 °C, que se mantuvo constante durante 4 min, luego se fue incrementando con una rampa de calentamiento de 20 °C/min hasta 220 °C. Las muestras de benzaldehído encapsulado se incubaron en el baño de ultrasonidos durante 30, 60 y 90 min para asegurar que todo el benzaldehído había sido extraído.

3.7.2. Análisis de la liberación de los COV encapsulados por GC-FID

Los métodos cromatográficos utilizados para la determinación de cada uno de los COV fueron los mismos que los descritos en el apartado anterior.

Para la determinación de la cantidad de diacetilo y benzaldehído liberado, se realizó una recta de calibrado preparando, en viales de 20 mL, disoluciones de cada COV en metanol con las siguientes concentraciones: 150, 500, 1000, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500 y 10000 µg/mL. De cada disolución se extrajeron 10 µL que se transfirieron a otro vial y se incubaron a 80 °C durante 20 min para conseguir su evaporación. Después, se extrajeron 0,5 mL de gas del espacio de cabeza del vial y se inyectaron manualmente en el equipo GC-FID. Para las muestras de gas inyectadas manualmente se utilizó una jeringa hermética Trajan de 1 ml equipada con una aguja Luer-lock de orificio lateral de 50 mm de longitud y 0,63 mm de diámetro externo (Trajan, Australia). La separación se llevó a cabo en las mismas condiciones explicadas en el apartado 3.7.1, pero en *splitless*. La recta de calibrado se realizó representando la concentración (µg/g) de cada punto frente al área obtenida en el GC-FID.

Para la determinación del diacetilo y benzaldehído liberado por las CDNS, las muestras se prepararon pesando 50 mg de cada α - y β -CDNS encapsulada con el COV en viales de 20 mL y se incubaron durante 4 días a 25 °C. Después, se inyectaron manualmente en el GC-FID extrayendo del espacio de cabeza 0,5 mL como descrito en el párrafo anterior. El área obtenida se interpoló en la recta de

calibrado para calcular la concentración de diacetilo y benzaldehído liberada. El ensayo se realizó por triplicado.

3.8 Actividad antifúngica de los COV encapsulados en CDNS

3.8.1 Actividad antifúngica de los encapsulados

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar la actividad antifúngica de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído frente a los mohos estudiados.

Se estudió la actividad antifúngica en fase vapor de los encapsulados a gran escala de diacetilo y benzaldehído en α - y β -CDNS frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Brevemente, las placas de SDA se inocularon (10^5 UFC/mL) con cada moho como se ha explicado en el anterior apartado. A continuación, se colocaron 50, 25 y 10 mg de las nanoesponjas encapsuladas en el centro de la tapa de la placa de Petri. Finalmente, las placas se cerraron con Parafilm® y se incubaron a 25 °C durante 4 días en el caso de *A. niger* y *P. expansum* y durante 10 días para *B. cinerea*. Una vez terminada la incubación se midió el halo de inhibición. Los controles se prepararon sin añadir las nanoesponjas encapsuladas. Los blancos se realizaron añadiendo 50 mg de las CDNS preparadas únicamente con metanol. El ensayo se llevó a cabo haciendo un mínimo de tres réplicas.

3.8.2 Actividad antifúngica de los encapsulados incorporados en bolsitas

Se estudió la actividad antifúngica en fase vapor de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído incorporados en bolsitas de PP frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Brevemente, las placas de SDA se inocularon (10^5 UFC/mL) con *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea* como se ha explicado en el apartado 3.6.2. A continuación, se prepararon bolsas de PP no tejido con unas dimensiones aproximadas de 2 x 4 cm. Después, se colocaron en el interior de las bolsitas 10, 25 y 50 mg de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído. Las bolsas se sellaron utilizando una termoselladora (Cibra, Italia). Por último, las bolsas se colocaron en el centro de la tapa de la placa de Petri y se cerraron con Parafilm®. Los controles se prepararon sin colocar las bolsas con las CDNS encapsuladas. Los blancos se realizaron añadiendo a las bolsas 50 μ g de las nanoesponjas preparadas únicamente con metanol (Figura 3.5). Las muestras se incubaron a 25 °C durante 4 días en el caso de *A. niger* y

P. expansum y durante 10 días para *B. cinerea*. Una vez terminada la incubación se comprobó si había inhibición completa del crecimiento. El ensayo se llevó a cabo haciendo un mínimo de tres réplicas.

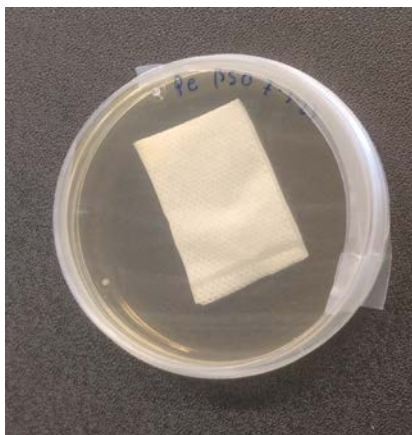


Figura 3.5. Ejemplo del ensayo de la actividad antifúngica en fase vapor de los encapsulados incorporados en bolsitas de PP. En la imagen *P. expansum* con el blanco de β -CDNS antes de incubarlo a 25 °C durante 4 días.

3.9 Análisis del daño estructural por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se evaluaron los cambios morfológicos de los mohos *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea* en presencia de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído. Para ello, las muestras se prepararon de la misma manera a la mencionada en el apartado anterior (punto 3.7.1), pero evaluando cantidades de encapsulado inferiores a las que inhiben completamente el crecimiento de los mohos. Para *A. niger* se utilizaron 10 mg de α - y β -CDNS-diacetilo y 50 y 25 mg de α - y β -CDNS-benzaldehído, respectivamente. Para *P. expansum*, se usaron 10 y 5 mg de α - y β -CDNS-diacetilo, respectivamente y 25 mg de α -CDNS-benzaldehído y 10 mg de β -CDNS-benzaldehído. Para *B. cinerea* se utilizaron 10 mg de los cuatro encapsulados. Los controles se prepararon con 50 mg de α - y β -CDNS sin encapsular para cada moho.

El protocolo de preparación de las muestras está basado en el realizado por Manso (Manso, 2015). Brevemente, tras la incubación de los mohos con los encapsulados, se extrajo de cada placa un *plug* (1 cm²) de moho junto con el medio de cultivo. Cada *plug* se introdujo en un tubo de ensayo de 5 mL que contenía 1 mL de 2,5 % de glutaraldehído en tampón cacodilato de sodio. Las

muestras se dejaron a temperatura ambiente toda la noche para su fijación. Al día siguiente, se retiró el tampón cacodilato y se lavó cada una de las muestras dejándolas 20 minutos con 1 mL de agua destilada. A continuación, se realizó una deshidratación en gradiente ascendente de etanol en agua (30, 50, 70, 90 y 100 %), repitiendo cada paso de deshidratación dos veces y dejándolos actuar durante 20 minutos. Las muestras fueron almacenadas en 100% etanol en nevera hasta el momento de análisis. Antes de la observación de las muestras por SEM, se retiró cada *plug* de muestra del tubo y se depositaron sobre un cubreobjetos de vidrio, para su recubrimiento con Pd. Las imágenes de SEM se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Inspect F50 (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Zaragoza, España).

3.10 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el software Microsoft Excel (Redmond, WA, EE. UU.). Para las variables con 3 o más categorías, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de un factor. Se utilizó un p-valor indicando la probabilidad de significancia de <0,05 para indicar diferencias estadísticamente significativas.

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización de las CDNS

Se llevó a cabo la caracterización de las α - y β -CDNS para confirmar el entrecruzamiento de los monómeros de ciclodextrina. La figura 3.6 muestra los espectros FTIR-ATR de las α - y β -CDNS sintetizadas. La banda presente en torno a 1750 cm^{-1} indicó la presencia de un enlace carbonilo dentro de la estructura, lo que es indicativo de un entrecruzamiento efectivo entre los grupos hidroxilo de la ciclodextrina (Pedrazzo et al., 2020). Además, se ha demostrado que los polímeros de α - y β -CDNS eran insolubles en distintos disolventes como agua, dimetilsulfóxido o etanol.

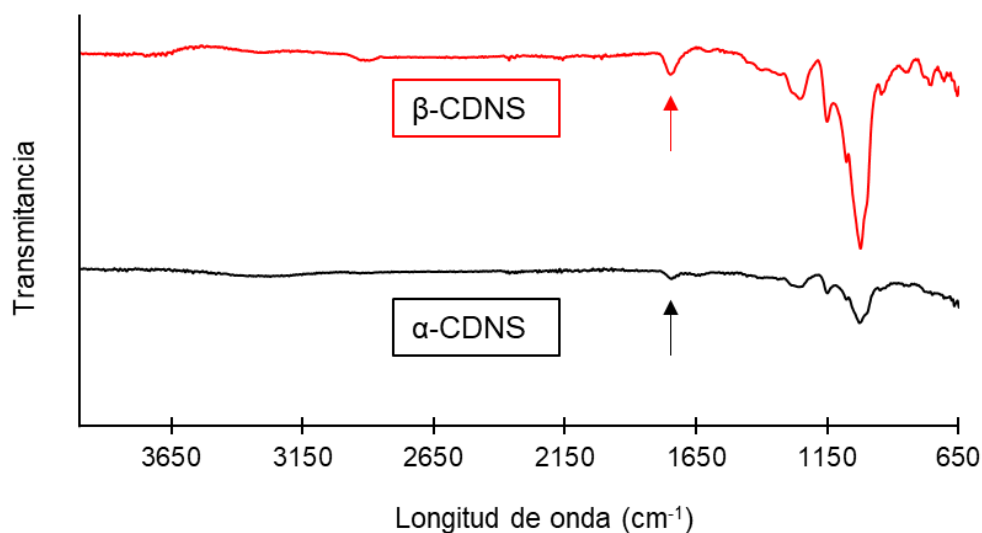


Figura 3.6. Comparación de los espectros de FTIR-ATR de α - y β -CDNS. Las flechas señalan el pico característico del enlace carbonilo descrito en el texto.

4.2 Actividad antifúngica de los COV en fase vapor

Se determinó, mediante un ensayo en fase vapor, la actividad antifúngica de los COV estudiados (diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, 2-nonanona y acetofenona) frente a tres mohos contaminantes alimentarios (*A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*). A los volúmenes indicados de diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol (Tabla 3.2) se observó la completa inhibición del crecimiento de los tres mohos estudiados y no se observaron halos de inhibición en ninguna muestra. Asimismo, a las cantidades que no inhibían al 100 % el crecimiento, el moho crecía completamente y tampoco se formaban halos de inhibición. El diacetilo fue el COV que presentó mejor actividad frente a *A. niger* y *P. expansum*, con la obtención de una inhibición completa de crecimiento de los mohos con 1 μL frente a los 5 μL necesarios para las muestras de moho incubadas con benzaldehído y 2-etilhexanol. Mientras que en el caso de *B. cinerea*, tanto el benzaldehído como el 2-etilhexanol obtuvieron la misma actividad antifúngica que el diacetilo, con un volumen de 2,5 μL . En cambio, la 2-nonanona no inhibió completamente el crecimiento de los mohos y sólo formó, frente a *P. expansum*, halos de inhibición de 4 cm de radio a un volumen de 5 μL , lo que supone un 44 % de inhibición. Por último, en las muestras de acetofenona no se observaron halos de inhibición a los volúmenes estudiados, por lo que se concluye que este compuesto no presentó actividad antifúngica frente a los tres mohos en estudio.

Tabla 3.2. Actividad antifúngica del diacetilo, benzaldehído, 2-etilhexanol, 2-nonanona y acetofenona frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Se indica la cantidad de cada COV y el % de inhibición del crecimiento respecto a la superficie total de la placa de Petri. Los resultados se expresan como la moda del volumen (μL) y porcentaje (%) de inhibición de cada COV que se obtuvo en al menos tres muestras independientes.

COV	Diacetilo		Benzaldehído		2-nonanona		Acetofenona		2-etilhexanol		
	Moho	Volumen (μL)	Inhibición (%)	Volumen (μL)	Inhibición (%)	Volumen (μL)	Inhibición (%)	Volumen (μL)	Inhibición (%)	Volumen (μL)	Inhibición (%)
<i>A. niger</i>		1	100	5	100	>5	0	>5	0	5	100
<i>P. expansum</i>		1	100	5	100	5	44	>5	0	5	100
<i>B. cinerea</i>		2,5	100	2,5	100	>5	0	>5	0	2,5	100

Los resultados de los COV estudiados confirmaron la fuerte actividad antifúngica de tres de los cinco COV utilizados (diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol) con los que se obtenía la inhibición total del crecimiento de los mohos. Por otro lado, en el caso de la 2-nonanona solo se obtuvo una actividad inhibitoria parcial frente a *P. expansum*, y en el caso de la acetofenona no se obtuvo actividad antifúngica frente a ninguno de los tres mohos en las cantidades estudiadas. Esta actividad antifúngica está en consonancia con lo observado en la literatura (Calvo et al., 2020; Fernando et al., 2005; Ling et al., 2022; Zhang et al., 2020) frente a distintos mohos contaminantes de F&V como *B. cinerea*, *P. expansum*, *Aspergillus flavus*, *Sclerotinia sclerotiorum* o *Alternaria solani*. La falta de actividad inhibitoria en el ensayo de fase vapor de la 2-nonanona y la acetofenona puede deberse a la poca cantidad utilizada, ya que otros autores han descrito que estos COV son capaces de inhibir el crecimiento de *B. cinerea* (Abarca et al., 2016) y *P. expansum*, entre otros mohos alimentarios (Grahovac et al., 2023). Por ello, con los resultados obtenidos, se descartaron la 2-nonanona y la acetofenona para la encapsulación en α - y β -CDNS debido a su baja o nula actividad antifúngica a los volúmenes utilizados y se han encapsulado en las CDNS solo los compuestos con más actividad, el diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol.

4.3 Análisis preliminar de la actividad antifúngica de los encapsulados

Se evaluó la actividad de los encapsulados preliminares de cada COV en α - y β -CDNS frente a los tres mohos estudiados. En el ensayo de los encapsulados a pequeña escala, el 2-etilhexanol encapsulado en α -CDNS y β -CDNS no mostró actividad antifúngica frente a ninguno de los tres mohos en estudio, por lo que no se estudió su encapsulación en las CDNS ni se siguió evaluando su actividad antifúngica. La nula actividad antifúngica del 2-etilhexanol encapsulado puede estar debido a su débil naturaleza anfipática, ya que al poseer un único grupo -OH su capacidad polar es muy baja, por lo que se unirá débilmente al exterior hidrofílico de las CDNS (Knight et al., 2017).

Una vez que tanto los encapsulados de diacetilo como de benzaldehído demostraron actividad antifúngica en los ensayos preliminares, se eligieron estos encapsulados para los siguientes ensayos de actividad antifúngica y para su caracterización más detallada en lo que respecta a la encapsulación y liberación de estos COV de las CDNS.

4.4 Análisis de los encapsulados de COV

4.4.1 Extracción de los COV

Se probaron diferentes tiempos de tratamiento en el baño de ultrasonidos para la extracción del diacetilo y el benzaldehído encapsulados en las α - y β -CDNS (Tabla 3.3). Respecto al diacetilo, no se observaron diferencias en las muestras tratadas con ultrasonidos entre 30 y 60 min, por lo que todas las extracciones de las muestras encapsuladas se realizaron durante 30 min. En cuanto al benzaldehído, hubo diferencias entre 30 y 60 min de extracción, pero no se observaron diferencias en las muestras tratadas con ultrasonidos entre 60 y 90 min, por lo que todas las extracciones del benzaldehído se realizaron durante 60 min.

Tabla 3.3. Áreas de las extracciones de los encapsulados de diacetilo y benzaldehído a distintos tiempos. Las letras indican si las diferencias entre los tiempos de extracción son significativas.

Encapsulado	Tiempo de extracción (min)		
	30	60	90
α-CDNS-Diacetilo	1289±224 ^a	1224±127 ^a	-
α-CDNS-Benzaldehído	6164±91 ^a	8709±183 ^b	8834±238 ^b
β-CDNS-Diacetilo	1660±91 ^a	1478±213 ^a	-
β-CDNS-Benzaldehído	7254±103 ^a	9518±246 ^b	9389±498 ^b

4.4.2 Encapsulación de los COV

Se determinó la cantidad de diacetilo y benzaldehído presente en los encapsulados en α- y β-CDNS para conocer la eficiencia de la encapsulación. Para ello, en primer lugar, se realizaron rectas de calibrado (Figura 3.7) para posteriormente interpolar las áreas de las muestras y conocer las concentraciones de α- y β-CDNS-diacetilo y α- y β-CDNS-benzaldehído.

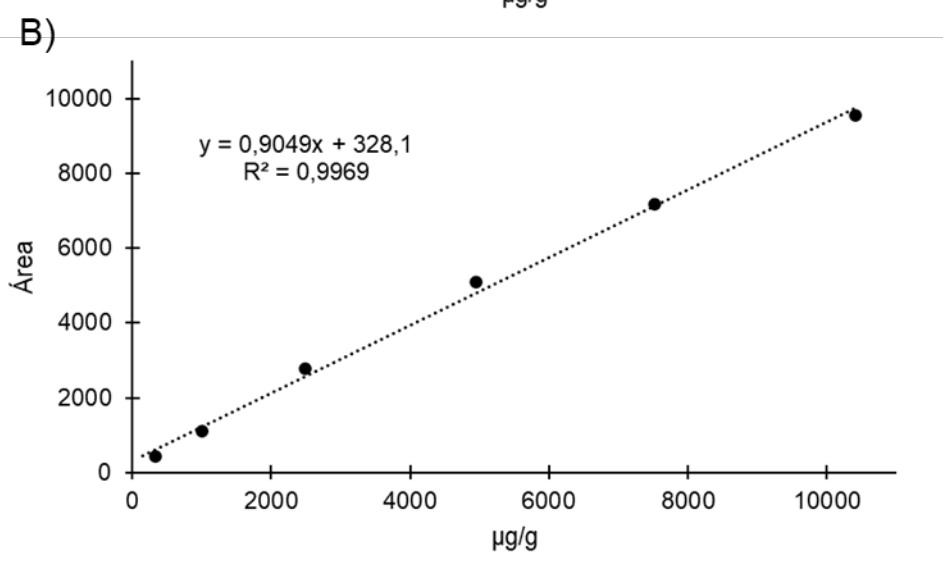
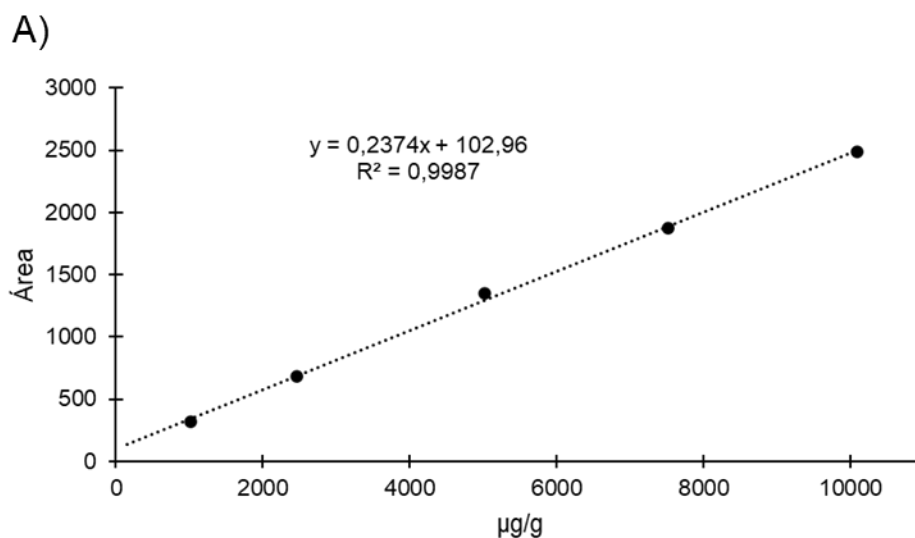


Figura 3.7. A) Recta de calibración del diacetilo en disolución de metanol. Se representa el área de señal del FID frente a los µg/g de diacetilo presentes en el 1 µL inyectado. B) Recta de calibración del benzaldehído en disolución de metanol. Se representa el área de señal del FID frente a los µg/g de benzaldehído presentes en el 1 µL inyectado.

Para el diacetilo, los resultados obtenidos en las extracciones realizadas en el baño de ultrasonidos se interpolaron en la recta de calibrado obtenida dando una concentración de diacetilo encapsulado de $96,1 \pm 4,0$ mg/g $_{\alpha}$ -CDNS y de $137,9 \pm 8,5$ mg/g $_{\beta}$ -CDNS (Tabla 3.4). Esto significa que la eficiencia de la encapsulación de diacetilo respecto a la cantidad inicial utilizada fue en α -CDNS de $9,7 \pm 0,4$ %, mientras que en β -CDNS fue de $13,9 \pm 0,9$ %, por lo que se concluye que las β -CDNS fueron mejores ($p < 0,05$) para la encapsulación de diacetilo.

En cuanto al benzaldehído, los resultados obtenidos en el GC-FID de las extracciones realizadas en el baño de ultrasonidos se interpolaron en la recta de calibrado obtenida dando una concentración de diacetilo encapsulado de 148 ± 13 mg/g $_{\alpha}$ -CDNS y de $192,0 \pm 7,0$ mg/g $_{\beta}$ -CDNS (Tabla 3.4). Esto significa que la eficiencia de la encapsulación de diacetilo respecto a la cantidad inicial utilizada fue en α -CDNS de $14,2 \pm 1,2$ %, mientras que en β -CDNS fue de $18,46 \pm 0,68$ %, por lo que, de forma similar al diacetilo, la encapsulación de benzaldehído fue significativamente ($p < 0,05$) más eficiente en las β -CDNS que en las α -CDNS.

Tabla 3.4. Resultados de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído tras los análisis realizados por GC-FID. La eficiencia expresa en porcentaje de COV encapsulado en las CDNS respecto al total utilizado. La encapsulación expresa los mg de COV encapsulados por g de CDNS. La liberación expresa los mg de COV liberados durante 4 días a 25 °C por g de CDNS. El porcentaje de liberación expresa la cantidad de COV liberado respecto al total encapsulado. Todos los resultados se muestran como la media de los valores obtenidos y su desviación estándar. Las letras indican si las diferencias entre los encapsulados en α - y β -CDNS de cada COV son significativas o no.

Encapsulado	α -CDNS- Diacetilo	β -CDNS- Diacetilo	α -CDNS- Benzaldehído	β -CDNS- Benzaldehído
Eficiencia (%)	$9,7 \pm 0,4^a$	$13,9 \pm 0,9^b$	$14,2 \pm 1,2^a$	$18,46 \pm 0,68^b$
Encapsulación (mg/g)	$96,1 \pm 4,0^a$	$137,9 \pm 8,5^b$	148 ± 13^a	$192,0 \pm 7,0^b$
Liberación (mg/g)	$36,2 \pm 1,2^a$	$42,2 \pm 1,8^b$	$40,9 \pm 3,4^a$	$50,5 \pm 5,6^b$
Liberación (%_{total} encapsulado)	$37,8 \pm 2,1^a$	$30,8 \pm 3,4^b$	$27,7 \pm 1,8^a$	$26,4 \pm 3,6^a$

La encapsulación, tanto de diacetilo como de benzaldehído, fue mayor en β -CDNS. Esto concuerda con sus características físicas, especialmente el tamaño de su cavidad interna que permite que entren compuestos de mayor tamaño (Brewster & Loftsson, 2007; Pawar et al., 2019) y con los resultados de

encapsulados de otros compuestos volátiles como el aceite esencial de cilantro y sus componentes (Silva et al., 2019b). La mayor capacidad de las CDNS, tanto de β -CDNS como de α -CDNS, para encapsular benzaldehído puede estar debida a las características anfipáticas del benzaldehído, ya que el anillo benceno es apolar y tiene un grupo aldehído que es polar. Esto permitiría la unión del benzaldehído tanto a la cavidad hidrófoba como al exterior hidrofílico de las CDNS. Mientras que, en el caso del diacetilo, su polaridad e hidrofobicidad, además de su pequeño tamaño, pueden perjudicar su encapsulación (Clark & Winter, 2015).

La cantidad de diacetilo y de benzaldehído encapsulados en β -CDNS (137,9 y 192,0 mg/g, respectivamente) fue superior a la de otros compuestos volátiles como el aceite esencial de cilantro (Silva et al., 2019b), cuya encapsulación fue de 41 mg/g, o el aceite esencial de canela con una encapsulación de 50-70 mg/g β -CDNS (Simionato et al., 2019), indicando que estas moléculas pueden ser buenos agentes encapsulantes específicamente para este tipo de compuestos.

4.5 Análisis de liberación de los COV

Se determinó por GC-FID la cantidad de diacetilo y benzaldehído que se liberaba durante 4 días a 25 °C, ya que estas fueron las condiciones de los ensayos antifúngicos frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. En primer lugar, se hizo una recta de calibrado (Figura 3.8) a partir de la cual interpolar los resultados obtenidos en el GC-FID de las muestras de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído.

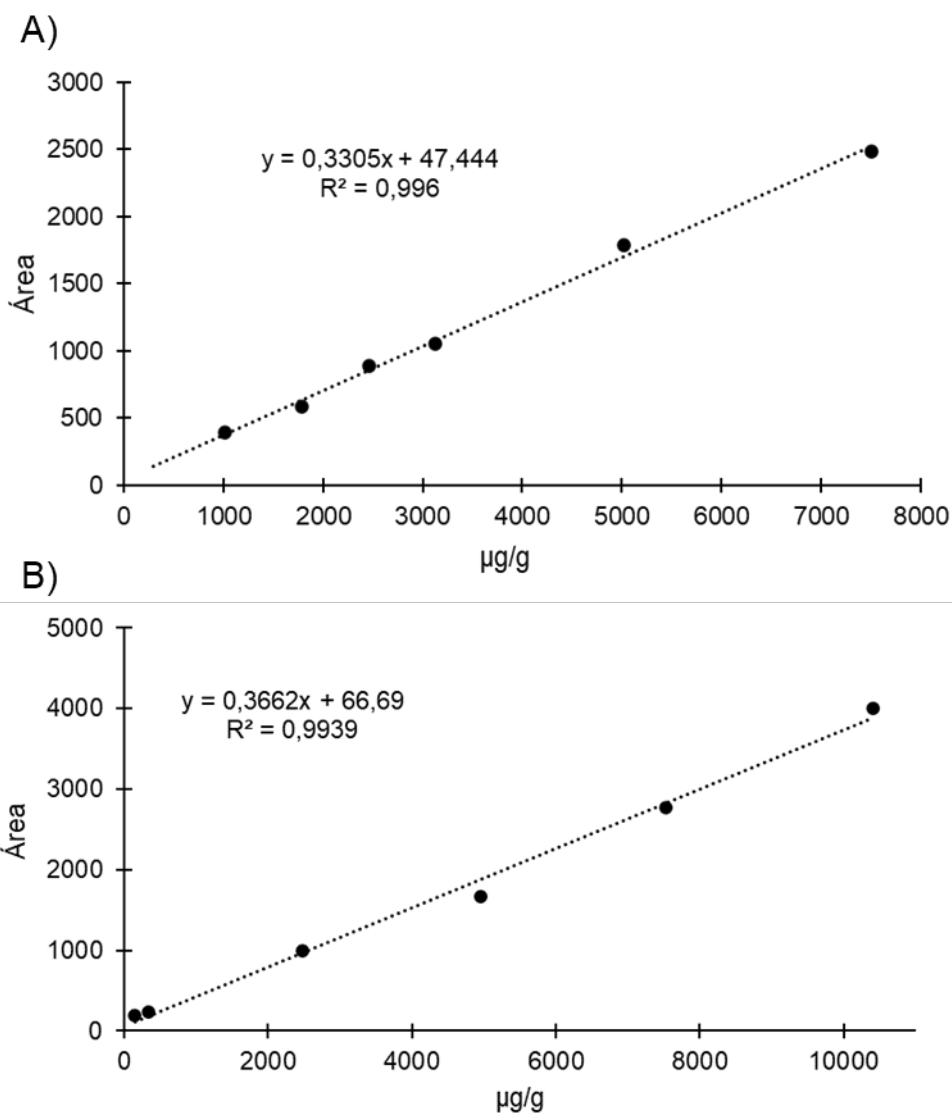


Figura 3.8. A) Recta de calibración del diacetilo en el espacio de cabeza del vial. Se representa el área de señal del FID frente a los $\mu\text{g/g}$ de diacetilo presentes en los 0,5 mL de gas inyectados. B) Recta de calibración del benzaldehído en el espacio de cabeza del vial. Se representa el área de señal del FID frente a los $\mu\text{g/g}$ de benzaldehído presentes en los 0,5 mL de gas inyectados.

Las áreas obtenidas de los picos correspondientes a los encapsulados de diacetilo se interpolaron en la recta de calibrado obtenida dando una concentración de diacetilo liberado de $36,2 \pm 1,2 \text{ mg/g}_{\alpha\text{-CDNS}}$ y de $42,2 \pm 1,8 \text{ mg/g}_{\beta\text{-CDNS}}$ (Tabla 3.4). $\beta\text{-CDNS}$ -diacetilo liberó mayor cantidad de diacetilo ($p < 0,05$) que las de $\alpha\text{-CDNS}$ -diacetilo. Esto está en consonancia con la mayor concentración de agente activo encapsulado en $\beta\text{-CDNS}$ -diacetilo. Respecto al porcentaje de diacetilo liberado respecto al total encapsulado se observaron

diferencias significativas ($p < 0,05$) entre α -y β -CDNS, ya que en α -CDNS-diacetilo se liberó un $37,8 \pm 2,1$ %, mientras que en β -CDNS-diacetilo se liberó un $30,8 \pm 3,4$ %. Esto significaría que la liberación del diacetilo encapsulado es más lenta en β -CDNS, por lo que su actividad antifúngica se podría potencialmente mantener durante más tiempo que en α -CDNS.

En cuanto a los encapsulados de benzaldehído, las áreas de los picos se interpolaron en la recta de calibrado obtenida dando una concentración de diacetilo liberado de $40,9 \pm 3,4$ mg/g α -CDNS y de $50,5 \pm 5,6$ mg/g β -CDNS (Tabla 3.4). β -CDNS-benzaldehído liberó mayor cantidad de agente activo ($p < 0,05$) que α -CDNS-benzaldehído. Esto concuerda con la mayor concentración de COV encapsulado en β -CDNS-benzaldehído. En el caso del porcentaje de benzaldehído liberado respecto al total encapsulado no se observó ninguna diferencia ($p > 0,05$) entre α - y β -CDNS-benzaldehído, ya que en ambos casos se liberó en torno al 27 % del benzaldehído encapsulado. Esto indicaría que no hay diferencia en la liberación del benzaldehído entre ambas CDNS.

Se produjo mayor liberación de benzaldehído en β -CDNS que de diacetilo ($p < 0,05$), pero no en α -CDNS donde la diferencia entre benzaldehído y diacetilo no fue significativa ($p > 0,05$). Respecto a la diferencia entre la liberación de los COV en las dos CDNS utilizadas, hubo una mayor liberación de ambos COV desde β -CDNS que desde α -CDNS ($p < 0,05$). En cuanto al porcentaje de liberación de los COV respecto al total encapsulado en las CDNS, el diacetilo se liberó en mayor proporción ($p < 0,05$) que el benzaldehído en α -CDNS, mientras que para β -CDNS no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de liberación del diacetilo y del benzaldehído.

Se observa una clara relación entre la cantidad de COV liberado y el total encapsulado en α -CDNS, ya que la mayor eficiencia de encapsulación del benzaldehído indica una mayor afinidad con α -CDNS que resulta en una liberación menor sobre el total encapsulado (27,7 %), que indicaría una liberación más lenta. Mientras que, en el caso de diacetilo, la eficiencia de encapsulación indica menor afinidad entre el COV y α -CDNS y ello se traduce en una mayor liberación (37,8 %). En cambio, esta relación no se observa en β -CDNS, ya que la mayor eficiencia de encapsulación del benzaldehído no se traduce en un porcentaje de liberación significativamente menor, probablemente debido a las

características que posee β -CDNS para encapsular compuestos volátiles, como aceites esenciales o sus componentes (COV), y liberarlos más lentamente (Brewster & Loftsson, 2007; Pawar et al., 2019; Silva et al., 2019b).

4.6 Actividad antifúngica de los COV encapsulados

4.6.1 Actividad antifúngica de los encapsulados

Se evaluó la actividad de los encapsulados de cada COV en α - y β -CDNS frente a los tres mohos estudiados. En el ensayo realizado con los encapsulados de diacetilo y benzaldehído a gran escala, el compuesto encapsulado que mayor actividad antifúngica (Tabla 3.5) mostró fue el diacetilo debido a que inhibió el crecimiento de *A. niger* y *B. cinerea* con 25 mg de α - y β -CDNS-diacetilo (Figura 3.9), además *A. niger* mostró decoloración con 10 mg de β -CDNS-diacetilo pasando del negro característico al blanco. En el caso de β -CDNS-diacetilo frente a *P. expansum*, se inhibió completamente el crecimiento con 10 mg. Por consiguiente, *P. expansum* fue el moho más susceptible frente a los encapsulados de diacetilo. Respecto al benzaldehído, no tuvo actividad antifúngica a las cantidades utilizadas de α -CDNS-benzaldehído frente a *A. niger*, pero sí con β -CDNS-benzaldehído (50 mg). El moho más susceptible frente a α - y β -CDNS-benzaldehído fue *B. cinerea*, ya que se observó inhibición completa con 25 mg.

Tabla 3.5. Actividad antifúngica de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Los resultados se expresan como la moda de la masa (mg) de cada CDNS encapsulada con COV que se obtuvo en al menos tres muestras independientes, e indican la cantidad de encapsulado necesaria para inhibir el 100 % del crecimiento fúngico.

Moho	Masa de encapsulado (mg)			
	α -CDNS-diacetilo	β -CDNS-diacetilo	α -CDNS-benzaldehído	β -CDNS-benzaldehído
<i>A. niger</i>	25	25	>50	50
<i>P. expansum</i>	25	10	50	25
<i>B. cinerea</i>	25	25	25	25

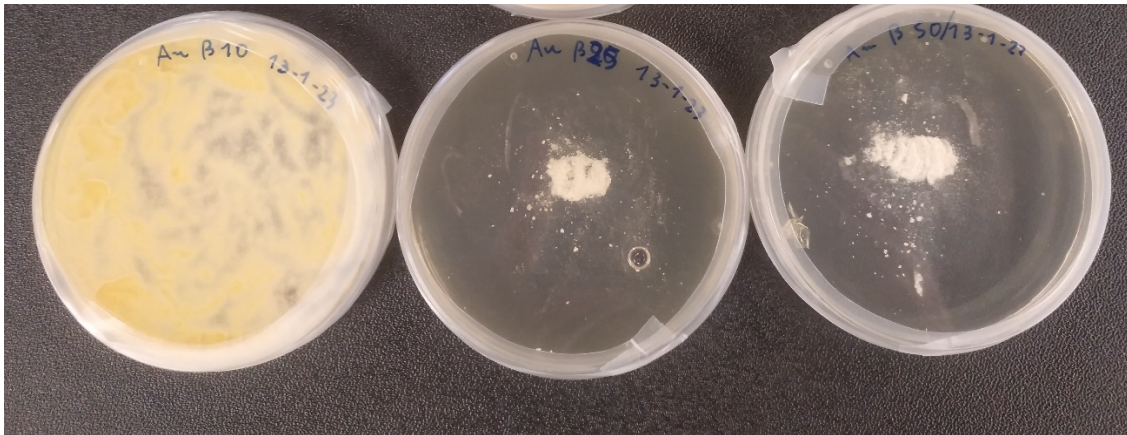


Figura 3.9. Ensayo de actividad antifúngica en fase vapor de β -CDNS-diacetilo frente a *A. niger*. Se observa la completa inhibición del crecimiento del moho con 25 y 50 mg, mientras que con 10 mg el moho crece completamente.

La actividad antifúngica de los COV está también relacionada con su liberación desde las CDNS. En el caso de α -CDNS, se observa una mayor actividad antifúngica de α -CDNS-diacetilo en comparación con el benzaldehído frente a *A. niger* y *P. expansum*, ya que se libera un 37,8 % de diacetilo frente a un 27,7 % de benzaldehído que, unido a la mayor actividad antifúngica del diacetilo, provoca que la inhibición se consiga con menor cantidad de encapsulado (25 mg). Sólo frente a *B. cinerea* la cantidad α -CDNS-benzaldehído era igual a la de α -CDNS-diacetilo (25 mg). Respecto a β -CDNS, el menor porcentaje de liberación del diacetilo (30,8 %) comparado con el de α -CDNS-diacetilo (37,8 %) se suplía con una mayor cantidad de COV encapsulado (137,9 mg/g β -CDNS frente a 96,1 mg/g α -CDNS) y, por tanto, liberado (42,2 mg/g β -CDNS frente a 36,2 mg/g α -CDNS). Así, la cantidad de encapsulado necesaria para inhibir totalmente el crecimiento en los encapsulados de β -CDNS-diacetilo, respecto a α -CDNS-diacetilo, era la misma para *A. niger* y *B. cinerea* (25 mg) y se reducía para *P. expansum* (10 mg). Para β -CDNS-benzaldehído, el porcentaje de liberación era similar (26,4 %) al de α -CDNS-benzaldehído (27,7 %), pero al encapsularse mayor cantidad (192 mg/g β -CDNS frente a 148 mg/g α -CDNS) provocaba que se liberara más compuesto (50,5 mg/g β -CDNS frente a 40,9 mg/g α -CDNS), por lo que la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento de *P. expansum*, comparado con α -CDNS-benzaldehído, bajó de 50 a 25 mg, mientras que para *A. niger* se consiguió inhibir el crecimiento con 50 mg. Con *B. cinerea* no hubo diferencias entre α - y β -CDNS-benzaldehído, siendo necesarios 25 mg en ambos casos para

obtener un 100% de inhibición de crecimiento. A su vez, el daño estructural observado en el SEM, en el caso de β -CDNS-diacetilo frente a *A. niger* y de β -CDNS-benzaldehído frente a *B. cinerea*, podría estar relacionado con la mayor cantidad de COV liberada desde β -CDNS, ya que no se observaba daño estructural en los encapsulados en α -CDNS.

Gracias al análisis por GC-FID de los COV encapsulados, se pudo calcular la cantidad de COV presente en los encapsulados de CDNS utilizados en los ensayos antifúngicos. Si se comparan las cantidades (mg) de COV a las que se consiguió un 100 % de inhibición del crecimiento de los mohos frente al mismo compuesto encapsulado en CDNS (Tabla 3.6) son, en general, inferiores en el caso de los encapsulados, debido a que se libera entre el 26-38 % de la cantidad total de COV encapsulado, por ejemplo, β -CDNS-benzaldehído y β -CDNS-diacetilo fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. expansum* con un 75 % y un 57 % menos de COV. Por lo que se consigue la inhibición completa de los mohos con menos cantidad de COV. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo para β -CDNS-diacetilo frente a *A. niger*, ya que, habiendo inhibición completa, la cantidad de diacetilo liberada fue ligeramente mayor que para el diacetilo libre. Tampoco ocurre para α -CDNS-benzaldehído donde no se produjo inhibición del crecimiento frente a *A. niger*, aunque la cantidad liberada (2,05 mg) era, aproximadamente, un 60 % menor que la del COV libre. La inhibición con cantidades más bajas de COV puede ser debido a que, en los encapsulados en CDNS, la liberación de los COV antifúngicos es más lenta y gradual, teniendo un efecto constante (Zhang et al., 2022). En cambio, en los ensayos con los COV libres la liberación desde el algodón es prácticamente inmediata debido a la volatilidad de los compuestos estudiados (Becerril et al., 2020). La ventaja de una liberación más lenta es la capacidad de mantener la actividad antifúngica durante más tiempo, aunque puede ocurrir que la cantidad de COV liberada no sea capaz de inhibir el crecimiento de los mohos debido a diferencias entre la lenta cinética de liberación del COV y el rápido crecimiento del moho (Ju et al., 2019), como en los dos casos de *A. niger*.

Tabla 3.6. Cantidad de diacetilo y de benzaldehído (mg) libre y liberado de los encapsulados en las α - y β -CDNS que produjeron el 100% de inhibición de crecimiento de los tres mohos. Los datos están expresados en mg de diacetilo o benzaldehído liberados de la CDNS utilizada.

Moho	Diacetilo Libre	α -CDNS-diacetilo	β -CDNS-diacetilo	Benzaldehído Libre	α -CDNS-benzaldehído	β -CDNS-benzaldehído
<i>A. niger</i>	0,99	0,905 \pm 0,038	1,062 \pm 0,060	5,2	>2,05 \pm 0,18	2,53 \pm 0,10
<i>P. expansum</i>	0,99	0,905 \pm 0,038	0,425 \pm 0,021	5,2	2,05 \pm 0,18	1,27 \pm 0,050
<i>B. cinerea</i>	2,48	0,905 \pm 0,038	1,062 \pm 0,060	2,6	1,02 \pm 0,10	1,27 \pm 0,050

4.6.2 Actividad antifúngica de los COV en bolsitas

Se evaluó la actividad antifúngica de los encapsulados de diacetilo y benzaldehído en α -CDNS y β -CDNS en bolsitas de PP como prueba de concepto frente a los tres mohos estudiados. Los resultados obtenidos (Tabla 3.7) son idénticos a los obtenidos en el apartado previo de los encapsulados indicando que el PP no afecta a la liberación del diacetilo y el benzaldehído de las CDNS ni los absorbe impidiendo que actúen frente a los mohos estudiados. Por lo que permitiría su uso para contener los encapsulados en un envase alimentario.

Tabla 3.7. Actividad antifúngica de α - y β -CDNS-diacetilo y α - y β -CDNS-benzaldehído en bolsitas de PP frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Se muestran las cantidades de encapsulado que inhiben el 100 % del crecimiento fúngico. Los resultados se expresan como la moda de la masa (mg) de cada encapsulado de CDNS con el COV en al menos tres muestras independientes.

Moho	Masa de encapsulado (mg)			
	α -CDNS-diacetilo	β -CDNS-diacetilo	α -CDNS-benzaldehído	β -CDNS-benzaldehído
<i>A. niger</i>	25	25	>50	50
<i>P. expansum</i>	25	10	50	25
<i>B. cinerea</i>	25	25	25	25

4.7 Observación de daño celular por SEM

Se empleó un microscopio electrónico de barrido para observar el efecto de los encapsulados de diacetilo y benzaldehído y observar el daño que producían frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*. Respecto a *A. niger*, los mayores daños estructurales fueron observados en las muestras incubadas con 10 mg de β -CDNS-diacetilo (Figura 3.10). En el control se puede observar un micelio aéreo donde se alzan numerosos conidióforos que muestran vesículas globosas con las esporas, y las hifas se muestran rígidas y lisas. En cambio, en la muestra de *A. niger* incubada con 10 mg de β -CDNS-diacetilo no se observan conidióforos, mientras que las hifas están muy dañadas y han perdido su forma característica formando agregados. Con el resto de encapsulados no se observaron diferencias morfológicas destacables entre las muestras y los controles. Los efectos del diacetilo están en consonancia con lo observado en los ensayos con 10 mg de β -CDNS-diacetilo, ya que *A. niger* sufría decoloración, perdiendo el color negro característico por el blanco, lo que significa la desaparición de los conidióforos y las esporas.

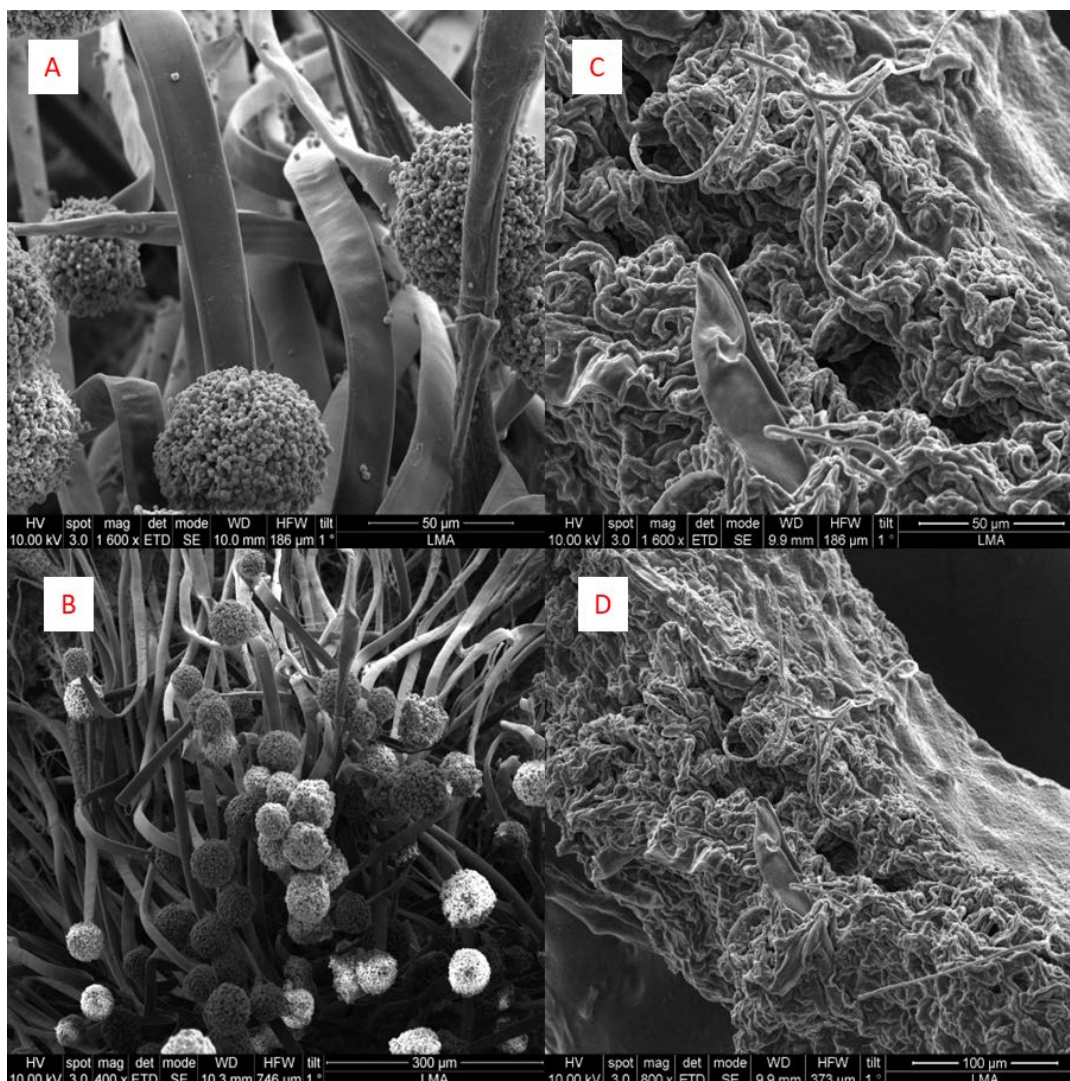


Figura 3.10. A y B) Imágenes de los controles de *A. niger*. C y D) Imágenes de *A. niger* bajo los efectos de 10 mg de β -CDNS-diacetilo.

En cuanto a *P. expansum*, no se apreciaron los efectos de los COV encapsulados y no se vieron diferencias morfológicas entre el control y las muestras tratadas con los COV encapsulados en α -CDNS y β -CDNS (Figura 3.11). Las hifas y conidióforos de *P. expansum* se veían en buen estado en todas las muestras y controles preparados. Aunque *P. expansum* fue bastante sensible frente al diacetilo encapsulado (25 mg de α -CDNS-diacetilo y 10 mg de β -CDNS-diacetilo) y libre (1 μ L), no se observó daño estructural en las concentraciones inferiores a las de inhibición del crecimiento.

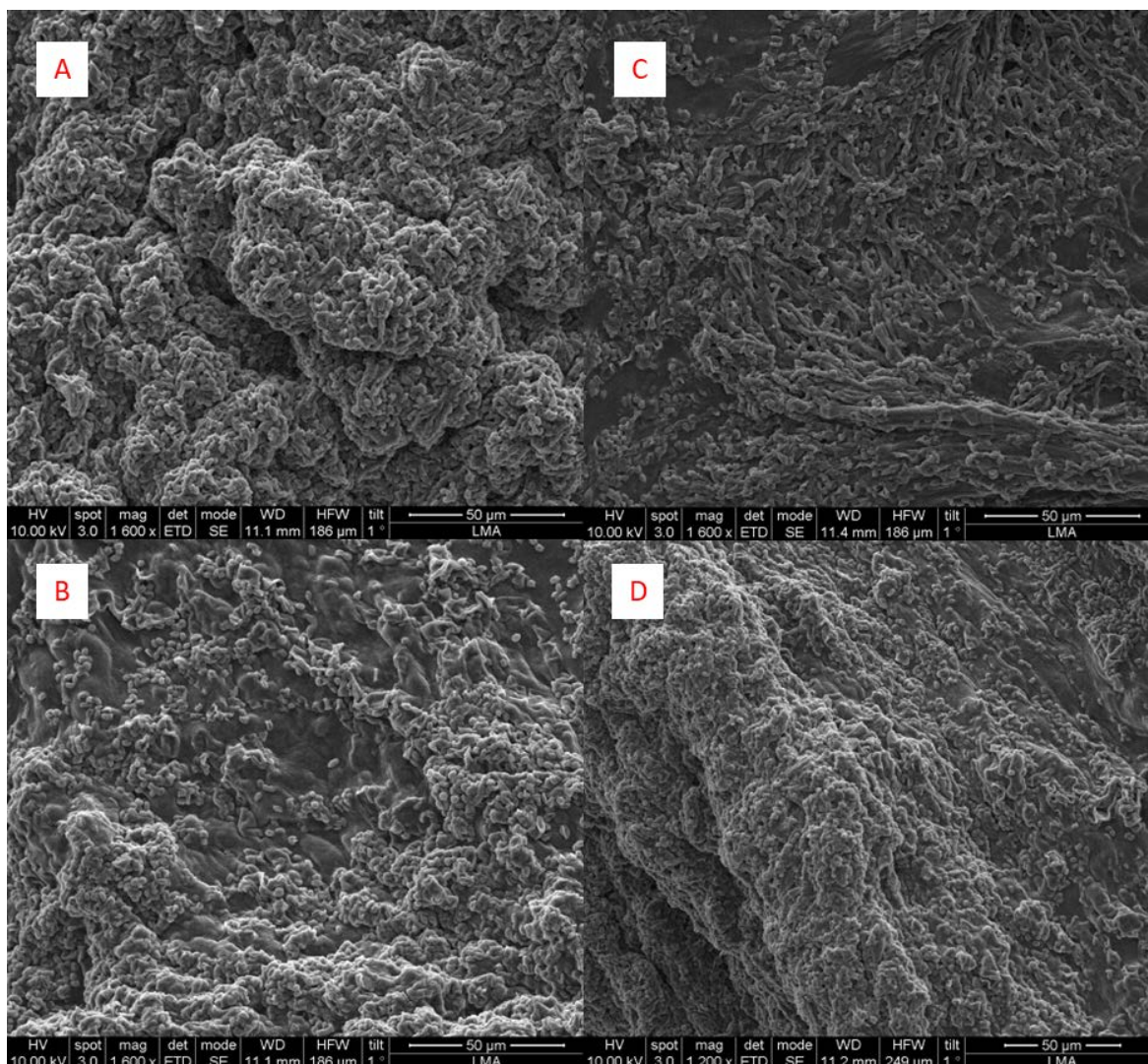


Figura 3.11. A y B) Imágenes de los controles de *P. expansum*. C) Imagen de *P. expansum* bajo los efectos de 5 mg de β -CDNS-diacetilo. D) Imagen de *P. expansum* bajo los efectos de 10 mg de β -CDNS-benzaldehído.

Por último, en *B. cinerea* los mayores daños morfológicos se observaron en las muestras de moho incubadas con 10 mg de β -CDNS-benzaldehído (Figura 3.12). En el control se puede observar un micelio donde las hifas se encuentran enrolladas entre sí y también se pueden visualizar conidióforos en buen estado en varias hifas. En cambio, en la muestra de *B. cinerea* incubada con 10 mg de β -CDNS-benzaldehído no se observan conidióforos. Asimismo, las hifas están muy dañadas, no pudiendo distinguirse su forma en muchos casos. En el resto de encapsulados no se observaron diferencias morfológicas relevantes entre los controles y las muestras incubadas con encapsulados. El mayor daño causado por el benzaldehído a *B. cinerea* confirma los resultados observados en los

ensayos con el benzaldehído libre y los encapsulados, ya que era el moho más sensible con 2,5 μ L y 25 mg, respectivamente.

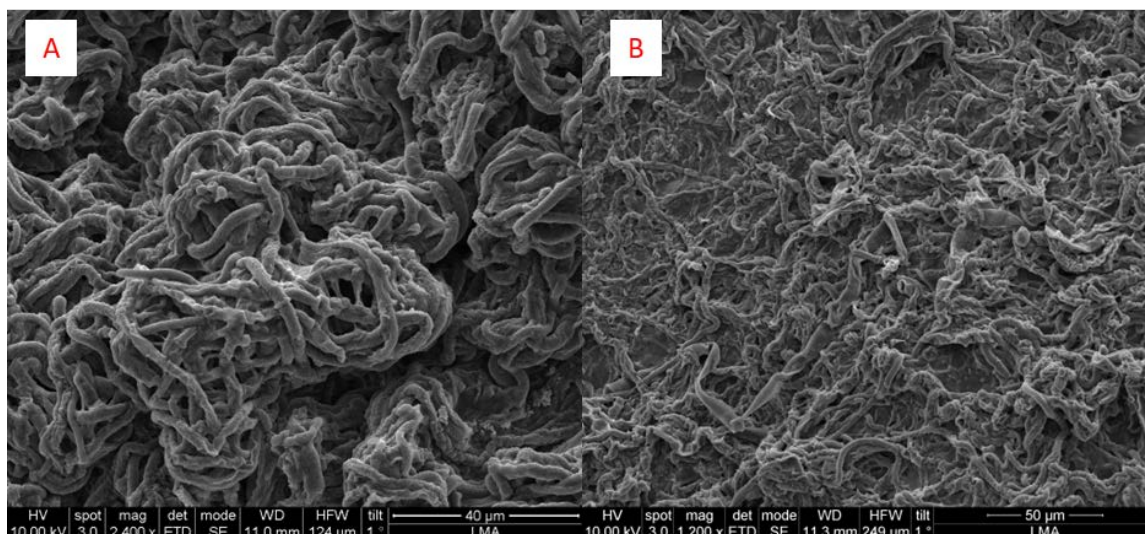


Figura 3.12. A) Imagen del control de *B. cinerea*. B) Imagen de la muestra de *B. cinerea* expuesta a los 10 mg de β -CDNS-benzaldehído.

Las imágenes obtenidas en el SEM indican que β -CDNS-diacetilo es capaz de causar un claro daño estructural en *A. niger*, al liberarse el diacetilo. Este daño es similar al observado por otros autores con el uso de aceites esenciales como el de naranja (Sharma & Tripathi, 2008) o de camomila (Tolouee et al., 2010) donde también las hifas sufrían daños y desaparecían los conidióforos. En el caso de *P. expansum*, no se observaron diferencias morfológicas por debajo de la cantidad de encapsulado necesaria para causar inhibición. Esto es similar a lo observado en estudios con otros compuestos volátiles como el cinamaldehído y el citral (Y. Wang et al., 2018) donde concentraciones subMIC no producían alteraciones morfológicas apreciables. Este efecto también puede ser debido a que *P. expansum* es resistente al diacetilo y al benzaldehído a las cantidades utilizadas. Por último, los efectos de β -CDNS-benzaldehído sobre *B. cinerea*, al igual que en el caso del diacetilo en *A. niger*, se asemejan a los inducidos por los aceites esenciales, como en el caso del orégano (Soylu et al., 2010) y de la citronela (Mbili et al., 2017), con la desaparición de los conidióforos y las malformaciones de las hifas. Las imágenes obtenidas demostrarían que la actividad antifúngica del diacetilo y el benzaldehído encapsulados en β -CDNS es similar a la de los aceites esenciales, al menos frente a *A. niger* y *B. cinerea*.

5. Conclusión

La necesidad de reducir la pérdida y deterioro de los alimentos debidos a su contaminación por mohos requiere el desarrollo de nuevas estrategias capaces de inhibir su crecimiento, como su potencial incorporación a un envase alimentario. Esta situación nos ha llevado a investigar el uso de compuestos orgánicos volátiles (COV) como antifúngicos y su encapsulación en α - y β -CDNS. El diacetilo, el benzaldehído y el 2-etilhexanol demostraron tener actividad antifúngica frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea* pudiendo inhibir su crecimiento en su forma libre, aunque sólo el diacetilo y el benzaldehído encapsulados en α - y β -CDNS consiguieron inhibir el crecimiento de los mohos. El diacetilo fue el compuesto volátil que mayor actividad antifúngica demostró en su forma libre y también encapsulado en las CDNS. El encapsulado que más actividad antifúngica demostró fue β -CDNS-diacetilo, a pesar de su menor porcentaje de encapsulación respecto al benzaldehído (13,9 % frente a 18,5 %, respectivamente). Los encapsulados de diacetilo fueron más efectivos frente a *P. expansum*, ya que 10 mg inhibían completamente su crecimiento, mientras que para *A. niger* y *B. cinerea* fueron necesarios 25 mg de β -CDNS-diacetilo para obtener la inhibición completa de su crecimiento. La actividad de los encapsulados está estrechamente relacionada con la liberación y encapsulación de los COV, siendo las β -CDNS las que más cantidad de diacetilo (42,2 mg/g β -CDNS) y benzaldehído (50,5 mg/g β -CDNS) liberaban gracias a su mayor capacidad para encapsular COV. De esta forma, utilizando β -CDNS se necesitaría menos cantidad de encapsulado para inhibir el crecimiento de los mohos. Esto se debe a que, cuando comparados con los COV libres, los encapsulados β -CDNS-benzaldehído y β -CDNS-diacetilo fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. expansum* con un 75 % y un 57 % menos de COV, respectivamente, demostrando las ventajas de una liberación lenta y gradual.

En general, los resultados obtenidos con los encapsulados de diacetilo y benzaldehído en α -CDNS y β -CDNS muestran una nueva vía de control de los mohos, permitiendo así desarrollar nuevas vías de control fúngico para reducir las pérdidas y el deterioro de los alimentos causadas por estos mohos. Además, la utilización de bolsitas y la volatilidad inherente a los COV facilita su uso en el envase, ya que la bolsita no necesita estar en contacto con el alimento envasado

para ejercer su acción, ya que los COV se están liberando para la atmosfera del envase. Esta es una nueva estrategia prometedora para el desarrollo de bolsitas antimicrobianas que podrían ser utilizadas en una amplia variedad de alimentos envasados susceptibles al deterioro que ocasionan los mohos.

SECCIÓN IV: CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En cada capítulo se han presentado las conclusiones del trabajo realizado por lo que a continuación únicamente se presenta una exposición de las conclusiones más relevantes alcanzadas en la tesis:

1. Se demostró la actividad antioxidante del POMo eliminando radicales DPPH*, obteniéndose que su AAI era muy fuerte, superando a otros polioxomolibdatos y nanopartículas metálicas.
2. POMo demostró tener compatibilidad con el PVA para poder formar un recubrimiento (PVA-POMo) extensible en films de PLA.
3. Las bolsas de PLA recubiertas en su interior con PVA-POMo fueron capaces de eliminar radicales hidroxilo de su atmósfera, lo que permitiría su utilización como un eliminador de ROS sin necesidad de estar en contacto directo con el alimento.
4. Se desarrolló un envase antioxidante para melocotón de Calanda DOP de IV gama, donde el recubrimiento de PVA-POMo fue capaz de reducir el pardeamiento producido por la oxidación y mantener su color durante más tiempo, además de mantener los volátiles responsables del aroma del melocotón sin afectar a la maduración de la fruta.
5. Se demostró la actividad antimicrobiana del complejo POM-LAE frente a *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* y *B. cereus*, siendo similar a la del LAE libre. También demostró capacidad de inhibir la formación de biofilms y destruir los biofilms formados de *L. monocytogenes* y *E. coli*.
6. Se comprobó que el mecanismo de acción del POM-LAE se debe a la actividad surfactante del LAE, que se mantiene después de la formación del complejo como comprueban los valores de concentración micelar crítica observados.
7. Esta capacidad de actuar como surfactante lleva al aumento de permeabilidad de la pared y membrana de las bacterias, y resultar en su posterior desintegración, como confirman los resultados obtenidos por citometría de flujo y SEM.

8. El POM-LAE también fue Este complejo de POM y LAE demostró tener compatibilidad con polímeros como la CMC y el PLA para formar films por casting y extrusión, respectivamente.
9. Aunque los films de PLA-POM-LAE no tuvieron actividad antimicrobiana *in vitro*, los de CMC-POM-LAE sí que la tuvieron frente a *L. monocytogenes*.
10. Los films de CMC-POM-LAE utilizados en jamón curado inoculado con *L. monocytogenes* evitaron el crecimiento inicial y mantuvieron una población significativamente menor durante el ensayo que el control.
11. Se demostró la actividad antifúngica en fase vapor del diacetilo, benzaldehído y 2-etilhexanol frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea*, importantes mohos alimentarios que causan graves pérdidas y deterior de alimentos.
12. Los encapsulados de diacetilo y benzaldehído en α - y β -CDNS demostró su actividad antifúngica frente a los tres mohos. El encapsulado β -CDNS-diacetilo fue el que tuvo mayor actividad antifúngica frente a los tres mohos estudiados.
13. La actividad antifúngica frente a *A. niger*, *P. expansum* y *B. cinerea* se mantuvo al desarrollar, *in vitro*, una prueba de concepto utilizando bolsitas de PP con los encapsulados en su interior.
14. Se estudió la eficiencia de encapsulación de los compuestos orgánicos volátiles en las CDNS demostrando que las β -CDNS eran capaces de encapsular en torno a un 4 % más de diacetilo y benzaldehído que las α -CDNS, siendo β -CDNS-benzaldehído el que más cantidad de COV encapsuló.
15. En cuanto a la liberación de los encapsulados, los de β -CDNS fueron los que más cantidad liberaban, gracias a su mayor capacidad para encapsular los COV, siendo β -CDNS-benzaldehído el que más cantidad de COV liberó.

En general, los resultados obtenidos con ambos polioxometalatos muestran una nueva y prometedora oportunidad para el desarrollo de envases activos para frutas y alimentos listos para el consumo, ya que abren un nuevo campo para el uso de estos compuestos en el sector alimentario, un sector en el que su utilización aún no se había explorado previamente. Adicionalmente, estas

estrategias pueden incluso eliminar la necesidad de utilizar tratamientos actuales, como los baños de antioxidantes aplicados a la fruta o la utilización de atmósferas modificadas.

En cuanto a los encapsulados en CDNS, teniendo en cuenta que tanto el diacetilo como el benzaldehído son aromatizantes alimentarios aceptados, su uso no supondría ningún peligro para la salud. Con los resultados obtenidos se abren las puertas a la potencial utilización de bolsitas con encapsulados de diacetilo en β -CDNS como una solución para inhibir el crecimiento de mohos en distintos tipos de alimentos envasados y susceptibles al deterioro causado por mohos, debido a la versatilidad y compatibilidad de este tipo de envases (bolsitas) con distintos tipos de envases.

Los agentes activos estudiados en esta tesis doctoral abren nuevos caminos para el desarrollo de envases activos alimentarios para la mejora de la seguridad alimentaria. Asimismo, se han utilizado materiales biodegradables, como las ciclodextrinas, la CMC, el PVA y el PLA cuando ha sido posible, para crear los prototipos de los envases y así presentar nuevas alternativas de envase para intentar reducir los daños causados al medioambiente por los envases plásticos y compuestos no biodegradables. Conjugando la utilización estos agentes activos y polímeros, se puede reducir la pérdida y deterioro de alimentos, así como inhibir el crecimiento de microorganismo patógenos causantes de enfermedades alimentarias, utilizando materiales biodegradables para el desarrollo de envases alimentarios.

CONCLUSIONS

Dans chaque chapitre, les conclusions du travail effectué ont été présentées, de sorte que seules les conclusions les plus pertinentes de la thèse sont présentées ci-dessous :

1. L'activité antioxydante du POMo a été démontrée en piégeant les radicaux DPPH^{*}, et son AAI s'est avéré très puissant, surpassant les autres polyoxomolybdates et les nanoparticules métalliques.

2. Le POMo s'est avéré compatible avec le PVA pour former un revêtement étirable (PVA-POMo) sur les films PLA.
3. Les sacs en PLA dont l'intérieur est recouvert de PVA-POMo ont pu piéger les radicaux hydroxyles dans leur atmosphère, ce qui leur permet d'être utilisés comme *scavengers* de ROS sans être en contact direct avec les aliments.
4. Un emballage antioxydant a été mis au point pour les pêches de Calanda AOP fraîchement coupées. L'enrobage PVA-POMo a permis de réduire le brunissement produit par l'oxydation et de maintenir la couleur plus longtemps, ainsi que de conserver les substances volatiles responsables de l'arôme de la pêche sans affecter la maturation du fruit.
5. L'activité antimicrobienne du complexe POM-LAE contre *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* et *B. cereus* s'est avéré similaire à celle du LAE libre. Il a également démontré sa capacité à inhiber la formation de biofilms et à détruire les biofilms formés par *L. monocytogenes* et *E. coli*.
6. Le mécanisme d'action du POM-LAE s'est avéré être dû à l'activité tensioactive des LAE, qui est maintenue après la formation du complexe, comme le montrent les valeurs de concentration micellaire critique observées.
7. Cette capacité à agir comme un surfactant entraîne une perméabilité accrue de la paroi et de la membrane bactériennes, ce qui entraîne leur désintégration ultérieure, comme le confirment les résultats obtenus par cytométrie de flux et MEB.
8. Le POM-LAE s'est également révélé compatible avec des polymères tels que le CMC et le PLA pour former des films par moulage et extrusion, respectivement.
9. Bien que les films PLA-POM-LAE n'aient pas d'activité antimicrobienne *in vitro*, les films CMC-POM-LAE ont une activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes*.
10. Les films CMC-POM-LAE utilisés sur du jambon cru inoculé avec *L. monocytogenes* ont empêché la croissance initiale et ont maintenu une population significativement plus faible pendant le test que le contrôle.

11. L'activité antifongique en phase vapeur du diacétyle, du benzaldéhyde et du 2-éthylhexanol a été démontrée contre *A. niger*, *P. expansum* et *B. cinerea*, d'importantes moisissures alimentaires causant de graves pertes et détériorations des aliments.
12. Les encapsulations α - et β -CDNS de diacétyle et de benzaldéhyde ont montré une activité antifongique contre les trois moisissures. L'encapsulation β -CDNS-diacétyle a eu l'activité antifongique la plus élevée contre les trois moisissures testées.
13. L'activité antifongique contre *A. niger*, *P. expansum* et *B. cinerea* a été maintenue en développant une preuve de concept *in vitro* en utilisant des sachets en PP avec les encapsulés à l'intérieur.
14. L'efficacité d'encapsulation des composés organiques volatils dans les CDNS a été étudiée, montrant que les β -CDNS étaient capables d'encapsuler environ 4 % de plus de diacétyle et de benzaldéhyde que les α -CDNS.
15. Quant aux encapsulés de β -CDNS, ils ont libéré la plus grande quantité en raison de leur plus grande capacité à encapsuler les COV.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec les deux polyoxométalates montrent une nouvelle opportunité prometteuse pour le développement d'emballages actifs pour les fruits et les aliments prêts à consommer, car ils ouvrent un nouveau champ pour l'utilisation de ces composés dans le secteur alimentaire, un secteur dans lequel leur utilisation n'a pas été explorée auparavant. En outre, ces stratégies peuvent même éliminer la nécessité des traitements actuels, tels que les bains d'antioxydants appliqués aux fruits ou l'utilisation d'atmosphères modifiées.

Quant aux encapsulés de CDNS, compte tenu du fait que le diacétyle et le benzaldéhyde sont des arômes alimentaires acceptés, leur utilisation ne présenterait aucun risque pour la santé. Les résultats obtenus ouvrent la voie à l'utilisation potentielle de sachets contenant du diacétyle encapsulé dans du β -CDNS comme solution pour inhiber la croissance des moisissures dans différents types d'aliments emballés susceptibles d'être altérés par les moisissures, en

raison de la polyvalence et de la compatibilité de ce type d'emballage (sachets) avec différents types d'emballage.

Les agents actifs étudiés dans cette thèse de doctorat ouvrent de nouvelles voies pour le développement d'emballages alimentaires actifs afin d'améliorer la sécurité alimentaire. En outre, des matériaux biodégradables tels que les cyclodextrines, le CMC, le PVA et le PLA ont été utilisés dans la mesure du possible pour créer les prototypes d'emballage et présenter ainsi de nouvelles alternatives d'emballage pour tenter de réduire les dommages causés à l'environnement par les emballages en plastique et les composés non biodégradables. En combinant l'utilisation de ces agents actifs et de ces polymères, il est possible de réduire la perte et la détérioration des aliments et d'inhiber la croissance des microorganismes pathogènes à l'origine des maladies d'origine alimentaire, en utilisant des matériaux biodégradables pour le développement des emballages alimentaires.

CONCLUSIONS

In each chapter, the conclusions of the work carried out have been presented, so that only the most relevant conclusions reached in the thesis are presented below:

1. The antioxidant activity of POMo was demonstrated by scavenging DPPH radicals*, and its AAI was found to be very strong, outperforming other polyoxomolybdates and metal nanoparticles.
2. POMo was shown to be compatible with PVA to form a stretchable (PVA-POMo) coating on PLA films.
3. PLA bags coated on the inside with PVA-POMo were able to scavenge hydroxyl radicals from their atmosphere, which would allow them to be used as a ROS *scavenger* without being in direct contact with the food.
4. An antioxidant packaging was developed for fresh-cut PDO Calanda peaches, where the PVA-POMo coating was able to reduce the browning produced by

oxidation and maintain its colour for longer, as well as maintaining the volatiles responsible for peach aroma without affecting the ripening of the fruit.

5. The antimicrobial activity of the POM-LAE complex against *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* and *B. cereus* was demonstrated to be similar to that of free LAE. It also demonstrated the ability to inhibit biofilm formation and to destroy biofilms formed by *L. monocytogenes* and *E. coli*.
6. The mechanism of action of POM-LAE was found to be due to the surfactant activity of LAE, which is maintained after the formation of the complex as evidenced by the observed critical micellar concentration values.
7. This ability to act as a surfactant leads to increased permeability of the bacterial wall and membrane, resulting in their subsequent disintegration, as confirmed by results obtained by flow cytometry and SEM.
8. POM-LAE was also shown to be compatible with polymers such as CMC and PLA to form films by casting and extrusion, respectively.
9. Although PLA-POM-LAE films had no *in vitro* antimicrobial activity, CMC-POM-LAE films had antimicrobial activity against *L. monocytogenes*.
10. CMC-POM-LAE films used on cured ham inoculated with *L. monocytogenes* prevented initial growth and maintained a significantly lower population during the test than the control.
11. The vapour phase antifungal activity of diacetyl, benzaldehyde and 2-ethylhexanol was demonstrated against *A. niger*, *P. expansum* and *B. cinerea*, important food moulds causing severe food losses and spoilage.
12. The α - and β -CDNS encapsulations of diacetyl and benzaldehyde showed antifungal activity against all three moulds. The β -CDNS-diacetyl encapsulation had the highest antifungal activity against the three moulds tested.
13. The antifungal activity against *A. niger*, *P. expansum* and *B. cinerea* was maintained by developing an *in vitro* proof of concept using PP sachets with the encapsulates inside.

14. The encapsulation efficiency of volatile organic compounds in CDNS was studied, showing that β -CDNS were able to encapsulate about 4 % more diacetyl and benzaldehyde than α -CDNS, with β -CDNS-benzaldehyde encapsulating the highest amount of VOCs.

15. As for the release of the β -CDNS encapsulates, they released the highest amount due to their higher capacity to encapsulate VOCs, with β -CDNS-benzaldehyde releasing the highest amount of VOCs.

Overall, the results obtained with both polyoxometalates show a new and promising opportunity for the development of active packaging for fruits and ready-to-eat foods, as they open a new field for the use of these compounds in the food sector, a sector in which their use has not been previously explored. In addition, these strategies may even eliminate the need for current treatments, such as antioxidant baths applied to the fruit or the use of modified atmospheres.

As for the CDNS encapsulates, taking into account that both diacetyl and benzaldehyde are accepted food flavourings, their use would not pose any health hazard. The results obtained open the door to the potential use of sachets with diacetyl encapsulated in β -CDNS as a solution to inhibit mould growth in different types of packaged foods susceptible to mould spoilage, due to the versatility and compatibility of this type of packaging (sachets) with different types of packaging.

The active agents studied in this PhD thesis open new avenues for the development of active food packaging to improve food safety. Furthermore, biodegradable materials such as cyclodextrins, CMC, PVA and PLA have been used where possible to create the packaging prototypes and thus present new packaging alternatives to try to reduce the damage caused to the environment by plastic packaging and non-biodegradable compounds. By combining the use of these active agents and polymers, food loss and spoilage can be reduced, as well as inhibiting the growth of pathogenic microorganisms that cause foodborne diseases, by using biodegradable materials for the development of food packaging.

SECCIÓN V: REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abarca, R. L., Rodríguez, F. J., Guarda, A., Galotto, M. J., & Bruna, J. E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*, *196*, 968–975.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.023>
- Abdin, M., Mabrouk, M., El-Sebaiy, L., Eissa, M., El-Bana, M., Salama, M. A., El-Beltagy, A. E., & Naeem, M. A. (2023). Composite films based on carboxy methyl cellulose and sodium alginate incorporated *Thymus vulgaris* purified leaves extract for food application: Assessment, antimicrobial and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *240*(January), 124474.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124474>
- Abdollahi, M., Damirchi, S., Shafafi, M., Rezaei, M., & Ariaii, P. (2019). Carboxymethyl cellulose-agar biocomposite film activated with summer savory essential oil as an antimicrobial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, *126*, 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.115>
- AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición). (2015). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimento por mujeres embarazadas.
https://zaguan.unizar.es/record/87783/files/texto_completo.pdf
- Ahmad, M. S., & Siddiqui, M. W. (2015). Postharvest quality assurance of fruits: Practical approaches for developing countries. In *Postharvest Quality Assurance of Fruits: Practical Approaches for Developing Countries* (pp. 1–265).
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-21197-8>
- Alam, M. W., BaQais, A., Mir, T. A., Nahvi, I., Zaidi, N., & Yasin, A. (2023). Effect of Mo doping in NiO nanoparticles for structural modification and its efficiency for antioxidant, antibacterial applications. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-28356-y>
- Alegbeleye, O., Odeyemi, O. A., Strateva, M., & Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research*, *2*(1), 100122.
<https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122>
- Alía, A., Andrade, M. J., Córdoba, J. J., Martín, I., & Rodríguez, A. (2020a). Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria*

- monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants. *Food Microbiology*, 87, 7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103367>
- Alía, A., Andrade, M. J., Rodríguez, A., Martín, I., Pérez-Baltar, A., Medina, M., & Córdoba, J. J. (2020b). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in deboning and slicing areas of Spanish dry-cured ham processing. *LWT - Food Science and Technology*, 128, 8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109498>
- ANSES. (2021). *Bacillus cereus*. In *e de l'alimentation, de l'environnement et du travail*.
- AOAC International. (2000). AOAC Official Method 942.15: Acidity (titratable) of fruit products. In *AOAC Official Method*.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Inovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113–126. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
- Aubert, C., Bony, P., Chalot, G., Landry, P., & Lurol, S. (2014). Effects of storage temperature, storage duration, and subsequent ripening on the physicochemical characteristics, volatile compounds, and phytochemicals of western red nectarine (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4707–4724. <https://doi.org/10.1021/jf4057555>
- Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2010). Optimizing the use of garlic oil as antimicrobial agent on fresh-cut tomato through a controlled release system. *Journal of Food Science*, 75(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01723.x>
- Azevedo, A. G., Barros, C., Miranda, S., Machado, A. V., Castro, O., Silva, B., Saraiva, M., Silva, A. S., Pastrana, L., Carneiro, O. S., & Cerqueira, M. A. (2022). Active Flexible Films for Food Packaging: A Review. *Polymers*, 14(12), 1–32. <https://doi.org/10.3390/polym14122442>
- Bai, L., Xiang, W., Huan, S., & Rojas, O. J. (2018). Formulation and stabilization of concentrated edible Oil-in-water emulsions based on electrostatic complexes of a food-grade cationic surfactant (ethyl lauroyl arginate) and cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 19, 1674–1685. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00233>
- Baldev, R., Matche, R. S., & Jagadish, R. S. (2011). Incorporation of chemical antimicrobial agents into polymeric films for food packaging. *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, 368–420. <https://doi.org/10.1533/9780857092786.3.368>

- Barcelon, E. G., Tojo, S., & Watanabe, K. (1999). X-ray CT imaging and quality detection of peach at different physiological maturity. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 42(2), 435–441. <https://doi.org/10.13031/2013.13375>
- Baselice, A., Colantuoni, F., Lass, D. A., Nardone, G., & Stasi, A. (2017). Trends in EU consumers' attitude towards fresh-cut fruit and vegetables. *Food Quality and Preference*, 59, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.008>
- Bastarrachea, L. J., Wong, D. E., Roman, M. J., Lin, Z., & Goddard, J. M. (2015). Active packaging coatings. *Coatings*, 5(4), 771–791. <https://doi.org/10.3390/coatings5040771>
- Becerril, R., Manso, S., Nerin, C., & Gómez-Lus, R. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32, 404–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.003>
- Becerril, R., Nerin, C., & Silva, F. (2020). Encapsulation systems for antimicrobial food packaging components: An update. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051134>
- Benbettaieb, N., Mlaouah, E., Moundanga, S., Brachais, C. H., Kurek, M., Galić, K., & Debeaufort, F. (2023). Bioactive antioxidant coatings for poly(lactic acid) packaging films: polyphenols affect coating structure and their release in a food simulant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(3), 1115–1126. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12106>
- Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The antibacterial activity of polyoxometalates: structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical Communications*, 54(10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>
- Bonnaud, M., Weiss, J., & McClements, D. J. (2010). Interaction of a food-grade cationic surfactant (Lauric Arginate) with food-grade biopolymers (pectin, carrageenan, xanthan, alginate, dextran, and chitosan). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9770–9777. <https://doi.org/10.1021/jf101309h>
- Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
- Bridgeman, A. J. (2003). Density functional study of the vibrational frequencies of α -Keggin heteropolyanions. *Chemical Physics*, 287(1–2), 55–69.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(02\)00978-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(02)00978-3)

- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 247–272.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004>
- Caldera, F., Tannous, M., Cavalli, R., Zanetti, M., & Trotta, F. (2017). Evolution of Cyclodextrin Nanosponges. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.072>
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166(November 2019), 111208.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Castro-Ibáñez, I., Gil, M. I., & Allende, A. (2017). Ready-to-eat vegetables: Current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *Lwt*, 85, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.073>
- Chandio, A. D., Channa, I. A., Rizwan, M., Akram, S., Javed, M. S., Siyal, S. H., Saleem, M., Makhdoom, M. A., Ashfaq, T., Khan, S., Hussain, S., Albaqami, M. D., & Alotabi, R. G. (2021). Polyvinyl alcohol and nano-clay based solution processed packaging coatings. *Coatings*, 11(8), 942.
<https://doi.org/10.3390/coatings11080942>
- Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5)
- Chermette, H., & Lefebvre, F. (2012). Theoretical study of the four isomers of [Siw 11o 39] 8-: Structure, stability and physical properties. *Comptes Rendus Chimie*, 15, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.09.002>
- Cichello, S. A. (2015). Oxygen absorbers in food preservation: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1889–1895. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1265-2>

- CIR, C. I. R. (2006). Final report on the safety assessment of benzaldehyde. *International Journal of Toxicology*, 25(SUPPL. 1), 11–27. <https://doi.org/10.1080/10915810600716612>
- Clark, S., & Winter, C. K. (2015). Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 634–643. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12150>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. CLSI document M26-A*. www.clsi.org.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. CLSI document M07-A9*. www.clsi.org.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). M45: Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. In *Guidelines CLSI* (Vol. 35).
- Comisión Europea. (2006). *Reglamento(CE) N o 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios* (pp. 1–39).
- Comisión Europea. (2008a). *REGLAMENTO (UE) N o 231/2012 DE LA COMISIÓN de 9 de marzo de 2012* (Vol. 1999, pp. 1–18).
- Comisión Europea. (2008b). *Reglamento (CE) N o 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios* (pp. 1–18).
- Comisión Europea. (2009). *Reglamento (CE) n°450/2009*. 11. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0450&from=EN>
- Comisión Europea. (2012). *Reglamento de ejecución (UE) N° 872/2012 de la comisión de 1 de octubre de 2012 por el que se adopta la lista de sustancias aromatizantes*. 161.
- Comisión Europea. (2018). European strategy for plastics in a circular economy. In *European Commission*.
- Comisión Europea. (2022). *EU policy framework on biobased, biodegradable and compostable plastics*.
- Correa, J. P., Molina, V., Sanchez, M., Kainz, C., Eisenberg, P., & Massani, M. B.

- (2017). Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.11.004>
- Da Silva, T. B. V., Moreira, T. F. M., De Oliveira, A., Bilck, A. P., Gonçalves, O. H., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Barreiro, M. F., Yamashita, F., Shirai, M. A., & Leimann, F. V. (2019). *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. *Food and Function*, 10(12), 7697–7706. <https://doi.org/10.1039/c9fo01315f>
- Dagnas, S. P., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, 76(3), 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., Khakpour, M., & Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.006>
- de Abreu, D. A. P., Cruz, J. M., & Losada, P. P. (2012). Active and Intelligent Packaging for the Food Industry. *Food Reviews International*, 28(2), 146–187. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595022>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Del Nobile, M. A., Conte, A., Buonocore, G. G., Incoronato, A. L., Massaro, A., & Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.022>
- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- Denoya, G. I., Vaudagna, S. R., & Polenta, G. (2015). Effect of high pressure processing and vacuum packaging on the preservation of fresh-cut peaches. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 801–806.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.036>

Dey, Aishee, & Neogi, S. (2019). Oxygen scavengers for food packaging applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 90(May), 26–34.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.013>

Dey, Apensu, Patra, N., Mal, A., & Ghosh, S. (2017). Impact of organic polar solvents (DMSO and DMF) on the micellization and related behavior of an anionic (AOT), cationic (CEM2AB) and cationic gemini surfactant (16-5-16). *Journal of Molecular Liquids*, 244, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.094>

Diao, E., Ma, K., Zhang, H., Xie, P., Qian, S., Song, H., Mao, R., & Zhang, L. (2021). Thermal stability and degradation kinetics of patulin in highly acidic conditions: Impact of cysteine. *Toxins*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/toxins13090662>

Díaz, M., Herrero, M., García, L. A., & Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385–407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>

Dillon, V. M. (2014). Natural Anti-Microbial Systems: Preservative Effects During Storage. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00238-X>

dos Santos, C. A., Ingle, A. P., & Rai, M. (2020). The emerging role of metallic nanoparticles in food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(6), 2373–2383. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10372-x>

Duan, Z., & Thomas, N. L. (2014). Water vapour permeability of poly(lactic acid): Crystallinity and the tortuous path model. *Journal of Applied Physics*, 115(6), 064903. <https://doi.org/10.1063/1.4865168>

Dumore, N. S., & Mukhopadhyay, M. (2020). Antioxidant properties of aqueous selenium nanoparticles (ASeNPs) and its catalysts activity for 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction. *Journal of Molecular Structure*, 1205, 127637. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127637>

Duvanova, E., Krasnou, I., Krumme, A., Mikli, V., Radio, S., Rozantsev, G. M., & Karpichev, Y. (2022). Development of Functional Composite Cu(II)-Polyoxometalate/PLA with Antimicrobial Properties. *Molecules*, 27(8). <https://doi.org/10.3390/molecules27082510>

Echeverría, I., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2018). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite-

- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 266(October 2017), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.003>
- EFSA. (2006). *Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin a in food*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.365>
- EFSA. (2009a). Flavouring Group Evaluation 04 –2-Ethylhexyl derivatives from chemical group 2: scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC). *EFSA Journal*, 7(1), 1–46. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.929>
- EFSA. (2009b). Statement on the evaluation of the new information provided on the food additive ethyl lauroyl arginate. *EFSA Journal*, 7(10), 1–5. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1333>
- EFSA. (2012). Scientific opinion on flavouring group evaluation 20, revision 4 (FGE.20Rev4): Benzyl alcohols, benzaldehydes, a related acetal, benzoic acids, and related esters from chemical groups 23 and 30. *EFSA Journal*, 10(12), 1–140. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2994>
- EFSA. (2013). Refined exposure assessment of ethyl lauroyl arginate based on revised proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*, 11(6), 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3294>
- EFSA. (2016a). Re-evaluation of b-cyclodextrin (E 459) as a food additive. *EFSA Journal*, 14(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4628>
- EFSA. (2016b). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. In *EFSA Journal* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- EFSA. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. In *EFSA Journal* (Vol. 20, Issue 12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Elisseeva, S., Kelly, C., Cruz-Romero, M., Zhdanov, A. V., Kerry, J. P., & Papkovsky, D. B. (2020). The use of optical oxygen sensing and respirometry to quantify the effects of antimicrobials on common food spoilage bacteria and food samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 322(May), 128572. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128572>
- Enderle, A. G., Franco-Castillo, I., Atrián-Blasco, E., Martín-Rapún, R., Lizarraga, L.,

- Culzoni, M. J., Bollini, M., de la Fuente, J. M., Silva, F., Streb, C., & Mitchell, S. G. (2022). Hybrid Antimicrobial Films Containing a Polyoxometalate-Ionic Liquid. *ACS Applied Polymer Materials*, 4(6), 1–10.
<https://doi.org/10.1021/acsapm.2c00110>
- Errampalli, D. (2014). *Penicillium expansum* (Blue Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00006-5>
- FAO/WHO. (2002). *Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens*.
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/42618>
- FAO/WHO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series.*, 4, 1–48.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42875/1/9241562625.pdf?ua=1>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2008). *Ethyl lauroyl arginate: chemical and technical assessment prepared*. JECFA - Chemical and Technical Assessment.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2019). *The State of Food and Agriculture: Moving forward on food and waste reduction*.
<http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2021). Assessment of agricultural plastics and their sustainability: A call for action. In *Assessment of agricultural plastics and their sustainability: A call for action*. <https://doi.org/10.4060/cb7856en>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2022). Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. In *The State of Food Security and Nutrition in the World 2022*. <https://doi.org/10.4060/cc0639en>
- Food and Agriculture Organization (FAO) & Ministry of Social Development and Family of Chile. (2021). *Promoting fruit and vegetable consumption*.
<https://doi.org/10.4060/cb7956en>
- 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>
- Faruh, M., & Hopfer, H. (2023). Aroma volatiles as predictors of chilling injury development during peach (*Prunus persica* (L) Batsch) cold storage and subsequent shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*, 195, 112137.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112137>

- Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.021>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2005). Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1769–1775. <https://doi.org/10.1021/jf048575t>
- Franco Castillo, I., Garcíá Guillén, E., M. De La Fuente, J., Silva, F., & Mitchell, S. G. (2019). Preventing fungal growth on heritage paper with antifungal and cellulase inhibiting magnesium oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(41), 6412–6419. <https://doi.org/10.1039/c9tb00992b>
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2003). Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 66(10), 1811–1821. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1811>
- Gabas, I. M., Stepien, G., Moros, M., Mitchell, S. G., & De La Fuente, J. M. (2016). In vitro cell cytotoxicity profile and morphological response to polyoxometalate-stabilised gold nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 40(2), 1039–1047. <https://doi.org/10.1039/c5nj02775f>
- Gaikwad, K. K., Singh, S., & Aiji, A. (2019). Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 609–628. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0810-z>
- Gaikwad, K. K., Singh, S., & Negi, Y. S. (2020). Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 269–284. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00938-1>
- Gambino, M., & Cappitelli, F. (2016). Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32, 167–178. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1134515>
- Gan, I., & Chow, W. S. (2018). Antimicrobial poly(lactic acid)/cellulose

- bionanocomposite for food packaging application: A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 17(June), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.06.012>
- Gherardi, R., Becerril, R., Nerin, C., & Bosetti, O. (2016). Development of a multilayer antimicrobial packaging material for tomato puree using an innovative technology. *Lwt*, 72, 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.063>
- Giannakourou, M. C., & Tsironi, T. N. (2021). Application of processing and packaging hurdles for fresh-cut fruits and vegetables. *Foods*, 10, 1–23.
- Gigliotti, C. L., Minelli, R., Cavalli, R., Occhipinti, S., Barrera, G., Pizzimenti, S., Cappellano, G., Boggio, E., Conti, L., Fantozzi, R., Giovarelli, M., Trotta, F., Dianzani, U., & Dianzani, C. (2016). In vitro and in vivo therapeutic evaluation of camptothecin-encapsulated β -cyclodextrin nanosponges in prostate cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12(1), 114–127. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2144>
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.008>
- Grahovac, J., Pajčin, I., & Vlajkov, V. (2023). *Bacillus* VOCs in the Context of Biological Control. *Antibiotics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030581>
- Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00438-2)
- Gumienna, M., & Górna, B. (2021). Antimicrobial food packaging with biodegradable polymers and bacteriocins. *Molecules*, 26(12). <https://doi.org/10.3390/molecules26123735>
- Gurtler, J. B., Doyle, M. P., & Kornacki, J. L. (2014). The microbiological safety of low water activity foods and spices. In *Food Microbiology and Food Safety*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_5
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl). <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>
- Haghighi, H., Leugoue, S. K., Pfeifer, F., Siesler, H. W., Licciardello, F., Fava, P., & Pulvirenti, A. (2020). Development of antimicrobial films based on chitosan-polyvinyl alcohol blend enriched with ethyl lauroyl arginate (LAE) for food packaging applications. *Food Hydrocolloids*, 100, 105419–105430.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105419>

- Han, C., Wang, J., Li, Y., Lu, F., & Cui, Y. (2014). Antimicrobial-coated polypropylene films with polyvinyl alcohol in packaging of fresh beef. *Meat Science*, *96*(2), 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.003>
- Han, J. H., Patel, D., Kim, J. E., & Min, S. C. (2014). Retardation of *Listeria monocytogenes* growth in mozzarella cheese using antimicrobial sachets containing rosemary oil and thyme oil. *Journal of Food Science*, *79*(11), E2272–E2278. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12659>
- Hann, S., Scholes, R., Molteno, S., Hilton, M., Favoino, E., & Geest Jakobsen, L. (2020). *Relevance of biodegradable and compostable consumer plastic products and packaging in a circular economy*. <https://doi.org/10.2779/497376>
- Hansen, A. Å., Moen, B., Rødbotten, M., Berget, I., & Pettersen, M. K. (2016). Effect of vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) in combination with a CO₂ emitter on quality parameters of cod loins (*Gadus morhua*). *Food Packaging and Shelf Life*, *9*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.05.005>
- He, Y., Li, H., Fei, X., & Peng, L. (2021). Carboxymethyl cellulose/cellulose nanocrystals immobilized silver nanoparticles as an effective coating to improve barrier and antibacterial properties of paper for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, *252*(September 2020), 117156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117156>
- Helmiyati, H., Hidayat, Z. S. Z., Sitanggang, I. F. R., & Liftyawati, D. (2021). Antimicrobial packaging of ZnO–Nps infused into CMC–PVA nanocomposite films effectively enhances the physicochemical properties. *Polymer Testing*, *104*. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107412>
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., & Aymerich, T. (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *154*, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.027>
- Hernandez-Valdes, J. A., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2020). Development of *Lactococcus lactis* Biosensors for Detection of Diacetyl. *Frontiers in Microbiology*, *11*(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01032>
- Higueras, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., & Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE

- (ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 339–345.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.003>
- Hossain, M., Karim, M., & Juthee, S. (2020). Postharvest physiological and biochemical alterations in fruits: a review. *Fundamental and Applied Agriculture*, 5(0), 1.
<https://doi.org/10.5455/faa.22077>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111–119.
<https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Huan, C., Jiang, L., An, X., Yu, M., Xu, Y., Ma, R., & Yu, Z. (2016). Potential role of reactive oxygen species and antioxidant genes in the regulation of peach fruit development and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 294–303.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.013>
- Huang, K., & Wang, Y. (2022). Recent applications of regenerated cellulose films and hydrogels in food packaging. *Current Opinion in Food Science*, 43, 7–17.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.003>
- Huang, R., Che, H. J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D. H., & Li, G. Q. (2012). Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biological Control*, 62(1), 53–63.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.02.010>
- Inoue, M., Suzuki, T., Fujita, Y., Oda, M., Matsumoto, N., & Yamase, T. (2006). Enhancement of antibacterial activity of β -lactam antibiotics by [P2W18O62]6-, [SiMo12O40]4-, and [PTi2W10O40]7- against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1225–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.004>
- Jin, T., & Zhang, H. (2008). Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, 73(3).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00681.x>
- Ju, J., Chen, X., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2019). Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 92(1800), 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.005>

- Kaewklin, P., Siripatrawan, U., Suwanagul, A., & Lee, Y. S. (2018). Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.124>
- Kakiuchi, N., & Ohmiya, A. (1991). Changes in the Composition and Content of Volatile Constituents in Peach Fruits in Relation to Maturity at Harvest and Artificial Ripening. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *60*(1), 209–216. <https://doi.org/10.2503/jjshs.60.209>
- Kanatt, S. R., & Makwana, S. H. (2020). Development of active, water-resistant carboxymethyl cellulose-poly vinyl alcohol-aloe vera packaging film. *Carbohydrate Polymers*, *227*, 115303–115312. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115303>
- Kashiri, M., Cerisuelo, J. P., Domínguez, I., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2016). Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). *Food Hydrocolloids*, *61*, 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.012>
- Kashiri, M., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2019). Antimicrobial packaging based on a LAE containing zein coating to control foodborne pathogens in chicken soup. *International Journal of Food Microbiology*, *306*(July), 108272. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108272>
- Kawai, F., & Hu, X. (2009). Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*, 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2113-6>
- Kettles, G. J., & Luna, E. (2019). Food security in 2044: How do we control the fungal threat? *Fungal Biology*, *123*(8), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.04.006>
- Kim, T. S., Ham, S. Y., Park, B. B., Byun, Y., & Park, H. D. (2017). Lauroyl arginate ethyl blocks the iron signals necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00970>
- Kim, T. S., & Park, H. D. (2016). Lauroyl arginate ethyl: An effective antibiofouling agent applicable for reverse osmosis processes producing potable water. *Journal of Membrane Science*, *507*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.01.056>
- Knight, A. W., Qiao, B., Chiarizia, R., Ferru, G., Forbes, T., Ellis, R. J., & Soderholm, L.

- (2017). Subtle Effects of Aliphatic Alcohol Structure on Water Extraction and Solute Aggregation in Biphasic Water/n-Dodecane. *Langmuir*, 33(15), 3776–3786. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04657>
- Korpi, A., Järnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(2), 139–193. <https://doi.org/10.1080/10408440802291497>
- Krabicová, I., Appleton, S. L., Tannous, M., Hoti, G., Caldera, F., Pedrazzo, A. R., Cecone, C., Cavalli, R., & Trotta, F. (2020). History of cyclodextrin nanosponges. *Polymers*, 12(5), 1–23. <https://doi.org/10.3390/POLYM12051122>
- Kuai, L., Liu, F., Chiou, B. Sen, Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Zhong, F. (2021). Controlled release of antioxidants from active food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 120(June), 106992. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106992>
- Kubo, A. L., Kremer, L., Herrmann, S., Mitchell, S. G., Bondarenko, O. M., Kahru, A., & Streb, C. (2017). Antimicrobial activity of polyoxometalate ionic liquids against clinically relevant pathogens. *ChemPlusChem*, 82, 867–871. <https://doi.org/10.1002/cplu.201700251>
- Kumar, A., & Rao, R. (2021). Enhancing efficacy and safety of azelaic acid via encapsulation in cyclodextrin nanosponges: development, characterization and evaluation. *Polymer Bulletin*, 78(9), 5275–5302. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03366-2>
- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00060-9)
- Kumar, S., Pooja, Trotta, F., & Rao, R. (2018). Encapsulation of babchi oil in cyclodextrin-based nanosponges: Physicochemical characterization, photodegradation, and in vitro cytotoxicity studies. *Pharmaceutics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040169>
- Kwok, T. yiu, Ma, Y., & Chua, S. L. (2022). Biofilm dispersal induced by mechanical cutting leads to heightened foodborne pathogen dissemination. *Food Microbiology*, 102(June 2021), 103914. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103914>
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria*

- monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 20(5), 537–543.
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00159-4)
- Lang, Z., Miao, J., Lan, Y., Cheng, J., Xu, X., & Cheng, C. (2020). Polyoxometalates as electron and proton reservoir assist electrochemical CO₂ reduction. *APL Materials*, 8(12), 120702. <https://doi.org/10.1063/5.0031374>
- Latou, E., Mexis, S. F., Badeka, A. V., & Kontominas, M. G. (2010). Shelf life extension of sliced wheat bread using either an ethanol emitter or an ethanol emitter combined with an oxygen absorber as alternatives to chemical preservatives. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 457–465.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.07.011>
- Li, G., Chen, Y., Zhang, Z., Li, B., Chen, T., & Tian, S. (2022). 2,3-Butanedione suppresses gray mold of postharvest fruit by activating the autophagy of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 193(May), 112057.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112057>
- Ling, L., Jiang, K., Cheng, W., Wang, Y., Pang, M., Luo, H., Lu, L., Gao, K., & Tu, Y. (2022). Biocontrol of volatile organic compounds obtained from *Bacillus subtilis* CL2 against *Aspergillus flavus* in peanuts during storage. *Biological Control*, 176(967). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105094>
- Liu, J., Huang, M., Zhang, X., Hua, Z., Feng, Z., Dong, Y., Sun, T., Sun, X., & Chen, C. (2022). Polyoxometalate nanomaterials for enhanced reactive oxygen species theranostics. *Coordination Chemistry Reviews*, 472, 214785.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214785>
- Liu, L., Jin, T. Z., Coffin, D. R., & Hicks, K. B. (2009). Preparation of antimicrobial membranes: Coextrusion of poly(lactic acid) and nisaplin in the presence of plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8392–8398.
<https://doi.org/10.1021/jf902213w>
- Liu, L. S., Jin, T., Coffin, D. R., Liu, C. K., & Hicks, K. B. (2010). Poly(lactic acid) membranes containing bacteriocins and edta for inhibition of the surface growth of gram-negative bacteria. *Journal of Applied Polymer Science*, 117(1), 486–492.
<https://doi.org/10.1002/app.31550>
- Liu, Y., Chen, Y., Gao, X., Fu, J., & Hu, L. (2022). Application of cyclodextrin in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(10), 2627–2640.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1856035>

- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Bãnos, A., Núñez, C., Bermúdez, J. M., Guillamón, E., Aucejo, S., & Cameán, A. M. (2015). Characterisation and evaluation of PLA films containing an extract of *Allium* spp. to be used in the packaging of ready-to-eat salads under controlled atmospheres. *Lwt*, *64*(2), 1354–1361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.057>
- López-de-Dicastillo, C., Pezo, D., Nerín, C., López-Carballo, G., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Reducing oxidation of foods through antioxidant active packaging based on ethyl vinyl alcohol and natural flavonoids. *Packaging and Technology and Science*, *25*(8), 457–466. <https://doi.org/10.1002/pts>
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., & Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(17), 6939–6946. <https://doi.org/10.1021/jf050709v>
- Lovato, A., Zenoni, S., Tornielli, G. B., Colombo, T., Vandelle, E., & Polverari, A. (2019). Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, *156*(May), 110924. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.025>
- Luís, Â., Domingues, F., & Silva, F. (2021). Bio-based materials for active food packaging: dream or reality. In *Food Packaging* (p. 82).
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, *30*, 69–79. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.845878>
- Manos, M., Woollins, D. J., Slawin, A. M. Z., & Kabanos, T. A. (2002). Polyoxomolybdenum(v) Sulfite Complexes: Synthesis, Structural, and Physical Studies. *Angewandte Chemie - International Edition*, *41*(15), 2801–2805. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020802\)41:15<2801::AID-ANIE2801>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020802)41:15<2801::AID-ANIE2801>3.0.CO;2-1)
- Manso, S. (2015). *Combinación de técnicas analíticas y microbiológicas para el estudio de un envase activo antifúngico frente a mohos alterantes de alimentos*. <https://zaguan.unizar.es/record/30652>
- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of

- soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 508–517.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029>
- Martins, C., Vilarinho, F., Sanches Silva, A., Andrade, M., Machado, A. V., Castilho, M. C., Sá, A., Cunha, A., Vaz, M. F., & Ramos, F. (2018). Active polylactic acid film incorporated with green tea extract: Development, characterization and effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 123(June), 100–110.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.056>
- Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., García-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 104, pp. 132–143). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.009>
- Mbili, N. C., Opara, U. L., Lennox, C. L., & Vries, F. A. (2017). Citrus and lemongrass essential oils inhibit *Botrytis cinerea* on ‘Golden Delicious’, ‘Pink Lady’ and ‘Granny Smith’ apples. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(5), 499–511. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0121-9>
- McGinty, D., Scognamiglio, J., Letizia, C. S., & Api, A. M. (2010). Fragrance material review on 2-ethyl-1-hexanol. *Food and Chemical Toxicology*, 48(SUPPL. 4), S115–S129. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.042>
- Meitha, K., Pramesti, Y., & Suhandono, S. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. *International Journal of Food Science*, 2020, 11. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>
- Menon, D., Thomas, R. T., Narayanan, S., Maya, S., Jayakumar, R., Hussain, F., Lakshmanan, V. K., & Nair, S. V. (2011). A novel chitosan/polyoxometalate nano-complex for anti-cancer applications. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 887–893.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.030>
- Michaelsen, A. R., Sebranek, J. G., & Dickson, J. S. (2006). Effects of microbial inhibitors and modified atmosphere packaging on growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Typhimurium and on quality attributes of injected pork chops and sliced cured ham. *Journal of Food Protection*, 69, 2671–2680. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2671>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>

- Misra, A., Franco Castillo, I., Müller, D. P., González, C., Eyssautier-Chuine, S., Ziegler, A., de la Fuente, J. M., Mitchell, S. G., & Streb, C. (2018). Polyoxometalate-ionic liquids (POM-ILs) as anticorrosion and antibacterial coatings for natural stones. *Angewandte Chemie*, *130*, 15142–15147. <https://doi.org/10.1002/ange.201809893>
- Mohan, S., & Panneerselvam, K. (2022). A short review on mechanical and barrier properties of polylactic acid-based films. *Materials Today: Proceedings*, *56*, 3241–3246. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.375>
- Montero-Prado, P., Bentayeb, K., & Nerín, C. (2013). Pattern recognition of peach cultivars (*Prunus persica* L.) from their volatile components. *Food Chemistry*, *138*(1), 724–731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.145>
- Montero-Prado, P., Rodriguez-Lafuente, A., & Nerin, C. (2011). Active label-based packaging to extend the shelf-life of “ Calanda” peach fruit: Changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology*, *60*(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.01.008>
- Moss, M. O. (2008). Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(5), 1239–1243. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x>
- Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2018). Photo-oxidative stress during leaf, flower and fruit development. *Plant Physiology*, *176*(2), 1004–1014. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01127>
- Munteanu, B. S., Sacarescu, L., Vasiliu, A. L., Hitruc, G. E., Pricope, G. M., Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., & Vasile, C. (2018). Antioxidant/antibacterial electrospun nanocoatings applied onto PLA films. *Materials*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/ma11101973>
- Muriel-Galet, V., Carballo, G. L., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2016). Ethyl lauroyl arginate (LAE): usage and potential in antimicrobial packaging. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 313–318). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00024-3>
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2012). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, *157*(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.009>

- Murmu, S. B., & Mishra, H. N. (2018). Selection of the best active modified atmosphere packaging with ethylene and moisture scavengers to maintain quality of guava during low-temperature storage. *Food Chemistry*, 253(May 2017), 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.134>
- Nagarkar, R., & Patel, J. (2019). Polyvinyl alcohol: a comprehensive study. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 34–44. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/928/7/072157>
- National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, & (NICNAS). (1996). *National Industrial Chemicals (Notification and Assessment Scheme). Full Public Report: Lithium Silicotungstate*.
- Nerín, C. (2010). Antioxidant active food packaging and antioxidant edible films. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, 496–515. <https://doi.org/10.1533/9780857090331.3.496>
- Nerín, C., Becerril, R., Manso, S., & Silva, F. (2016). Ethyl lauroyl arginate (LAE): antimicrobial activity and applications in food systems. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 305–312). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00023-1>
- Nerín, C., Tovar, L., & Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.027>
- Nerín, C., Vera, P., & Canellas, E. (2017). Active and Intelligent Food Packaging. In *Food Safety and Protection* (p. 33). <https://doi.org/10.1201/9781315153414-14>
- Nerín, Cristina. (2016). Plastics and Polymers for Food Packaging Manufacturing. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03195-4>
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2006). Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7840–7846. <https://doi.org/10.1021/jf060775c>
- Nguyen, S. Van, & Lee, B. K. (2022). Polyvinyl alcohol/alkyl ketene dimer films with excellent water resistance and water vapor barrier properties. *Materials Letters*, 307(October 2021), 131045. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131045>
- Olwal, C. O., Ang'lenda, P. O., Onyango, D. M., & Ochiel, D. O. (2018). Susceptibility

- patterns and the role of extracellular DNA in *Staphylococcus epidermidis* biofilm resistance to physico-chemical stress exposure. *BMC Microbiology*, 18, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1183-y>
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M. A., González, L. A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M. I. H., Munuera, I. P., Fiszman, S., & Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.04.001>
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J. A., Rodríguez-Calleja, J. M., Nerín, C., & García-López, M. L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157: H7 strains invitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.022>
- Otoni, C. G., Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., & McHugh, T. H. (2016). Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food Research International*, 83, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.018>
- Padrão, J., Gonçalves, S., Silva, J. P., Sencadas, V., Lanceros-Méndez, S., Pinheiro, A. C., Vicente, A. A., Rodrigues, L. R., & Dourado, F. (2016). Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. *Food Hydrocolloids*, 58, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.019>
- Park, H. Y., Kim, S. J., Kim, K. M., You, Y. S., Kim, S. Y., & Han, J. (2012). Development of Antioxidant Packaging Material by Applying Corn-Zein to LLDPE Film in Combination with Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*, 77(10). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02906.x>
- Passarinho, A. T. P., Dias, N. F., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Otoni, C. G., Moraes, A. R. F., & Soares, N. D. F. F. (2014). Sliced bread preservation through oregano essential oil-containing sachet. *Journal of Food Process Engineering*, 37(1), 53–62. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12059>
- Patriarca, A. (2019). Fungi and mycotoxin problems in the apple industry. *Current Opinion in Food Science*, 29, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.002>
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A., & Cutter, C. N. (2014). Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 135–146.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.013>

Paula Dionísio, A., Molina, G., Souza de Carvalho, D., dos Santos, R., Bicas, J. L., & Pastore, G. M. (2012). Natural flavourings from biotechnology for foods and beverages. In *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (Issue Guentert 2007). Woodhead Publishing Limited.

<https://doi.org/10.1533/9780857095725.1.231>

Pawar, S., Shende, P., & Trotta, F. (2019). Diversity of β -cyclodextrin-based nanosponges for transformation of actives. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 333–350. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.015>

Pech, J. C., Purgatto, E., Bouzayen, M., & Latché, A. (2012). Ethylene and fruit ripening. In *Annual Plant Reviews* (Vol. 44, pp. 275–304).

<https://doi.org/10.1002/9781118223086.ch11>

Pedrazzo, A. R., Caldera, F., Zanetti, M., Appleton, S. L., Dhakar, N. K., & Trotta, F. (2020). Mechanochemical green synthesis of hyper-crosslinked cyclodextrin polymers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16(Cdi), 1554–1563.

<https://doi.org/10.3762/BJOC.16.127>

Peng, Z., Liu, G., Li, H., Wang, Y., Gao, H., Jemrić, T., & Fu, D. (2022). Molecular and Genetic Events Determining the Softening of Fleshy Fruits: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20).

<https://doi.org/10.3390/ijms232012482>

Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakamchanakul, W., & Samson, R. A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59, 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>

Pezo, D., Navascués, B., Salafranca, J., & Nerín, C. (2012). Analytical procedure for the determination of Ethyl Lauroyl Arginate (LAE) to assess the kinetics and specific migration from a new antimicrobial active food packaging. *Analytica Chimica Acta*, 745, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.07.038>

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(7), 1241–1246. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0395-4>

Pezo, D., Salafranca, J., & Nerín, C. (2008). Determination of the antioxidant capacity

- of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1178(1–2), 126–133.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.062>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp. (Black Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00008-9>
- Pope, M. T., & Müller, A. (1991). Polyoxometalate chemistry: an old field with new dimensions in several disciplines. *Angewandte Chemie - International Edition*, 30(202), 34.
- Poša, M., Guzsvány, V., & Csanádi, J. (2009). Determination of critical micellar concentrations of two monoketo derivatives of cholic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.06.029>
- Purkait, S., Bhattacharya, A., Bag, A., & Chattopadhyay, R. R. (2020). Evaluation of antibiofilm efficacy of essential oil components β -caryophyllene, cinnamaldehyde and eugenol alone and in combination against biofilm formation and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*, 71, 195–202. <https://doi.org/10.1111/lam.13308>
- Raffo, A., Nardo, N., Tabilio, M. R., & Paoletti, F. (2008). Effects of cold storage on aroma compounds of white- and yellow-fleshed peaches. *European Food Research and Technology*, 226(6), 1503–1512. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0682-0>
- Rajkowska, K., Koziróg, A., Otlewska, A., Piotrowska, M., Atrián-Blasco, E., Franco-Castillo, I., & Mitchell, S. G. (2020). Antifungal activity of polyoxometalate-ionic liquids on historical brick. *Molecules*, 25(23).
<https://doi.org/10.3390/molecules25235663>
- Rama Devi, G., & Polasa, H. (1985). Diacetyl-A growth and toxin inhibitor of *Aspergilli*. *Journal of Stored Products Research*, 21(4), 195–197.
[https://doi.org/10.1016/0022-474X\(85\)90015-3](https://doi.org/10.1016/0022-474X(85)90015-3)
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Puoci, F., Vinci, G., & Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of

- active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Rhule, J. T., Hill, C. L., Judd, D. A., & Schinazi, R. F. (1998). Polyoxometalates in medicine. *Chemical Reviews*, 98, 327–357. <https://doi.org/10.1021/cr960396q>
- Richards, S. L., Wilkins, K. A., Swarbreck, S. M., Anderson, A. A., Habib, N., Smith, A. G., McAinsh, M., & Davies, J. M. (2015). The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 37–46. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru398>
- Rico-Munoz, E., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 81, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.016>
- Rojas-Graü, M. A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(5), 875–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01911.x>
- Rojas, A., Velásquez, E., Vidal, C. P., Guarda, A., Galotto, M. J., & de Dicastillo, C. L. (2021). Active PLA packaging films: Effect of processing and the addition of natural antimicrobials and antioxidants on physical properties, release kinetics, and compostability. *Antioxidants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antiox10121976>
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>
- Rux, G., Mahajan, P. V., Linke, M., Pant, A., Sänglerlaub, S., Caleb, O. J., & Geyer, M. (2016). Humidity-Regulating Trays: Moisture Absorption Kinetics and Applications for Fresh Produce Packaging. *Food and Bioprocess Technology*, 9(4), 709–716. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1671-0>
- Saleh, I., & Goktepe, I. (2019). The characteristics, occurrence, and toxicological effects of patulin. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.036>
- Salehi, O., Sami, M., & Rezaei, A. (2021). Limonene loaded cyclodextrin nanosponge: Preparation, characterization, antibacterial activity and controlled release. *Food Bioscience*, 42(March), 101193. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101193>
- Salomão, B. de C. M. (2018). Pathogens and Spoilage Microorganisms in Fruit Juice:

- An Overview. *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*, 291–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00016-3>
- Sari, Y. M. A., & Situngkir, M. D. (2016). Thermal stability of polyoxometalate compound of Keggin $K_8[2-SiW_{11}O_{39}] \cdot nH_2O$ supported with SiO_2 . *Science & Technology Indonesia*, 1, 8–15. <https://doi.org/10.26554/sti.2016.1.1.8-15>
- Schaeffer, V., & Iannucci, A. (2014). Diacetyl. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 2, 47–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01103-9>
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, 163(3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Shen, Z., Rajabi-Abhari, A., Oh, K., Yang, G., Youn, H. J., & Lee, H. L. (2021). Improving the barrier properties of packaging paper by polyvinyl alcohol based polymer coating—effect of the base paper and nanoclay. *Polymers*, 13(8), 1334. <https://doi.org/10.3390/polym13081334>
- Sherje, A. P., Dravyakar, B. R., Kadam, D., & Jadhav, M. (2017). Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review. *Carbohydrate Polymers*, 173, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.086>
- Shi, C., & Knøchel, S. (2021). Susceptibility of dairy associated molds towards microbial metabolites with focus on the response to diacetyl. *Food Control*, 121(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107573>
- Shi, L., Günther, S., Hübschmann, T., Wick, L. Y., Harms, H., & Müller, S. (2007). Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry Part A*, 71, 592–598. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20402>
- Shirai, M. A., Grossmann, M. V. E., Mali, S., Yamashita, F., Garcia, P. S., & Müller, C. M. O. (2013). Development of biodegradable flexible films of starch and poly(lactic acid) plasticized with adipate or citrate esters. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.038>
- Siemann, U. (2005). Solvent cast technology - A versatile tool for thin film production. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 130(June), 1–14.

<https://doi.org/10.1007/b107336>

- Silva, F., Becerril, R., & Nerín, C. (2019a). *Safety Assessment of Active Food Packaging: Role of Known and Unknown Substances*.
<https://doi.org/10.2174/9789811421587119010004>
- Silva, F., Caldera, F., Trotta, F., Nerín, C., & Domingues, F. C. (2019b). Encapsulation of coriander essential oil in cyclodextrin nanosponges: A new strategy to promote its use in controlled-release active packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56(May), 102177.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102177>
- Silva, F., Gracia, N., McDonagh, B. H., Domingues, F. C., Nerín, C., & Chinga-Carrasco, G. (2019c). Antimicrobial activity of biocomposite films containing cellulose nanofibrils and ethyl lauroyl arginate. *Journal of Materials Science*, 54, 12159–12170. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03759-3>
- Silva, F., Domingues, F. C., & Nerín, C. (2018). Control microbial growth on fresh chicken meat using pinosylvic inclusion complexes based packaging absorbent pads. *Lwt*, 89(May 2017), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.043>
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1479–1486.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.034157-0>
- Silva, N. H. C. S., Vilela, C., Almeida, A., Marrucho, I. M., & Freire, C. S. R. (2018). Pullulan-based nanocomposite films for functional food packaging: Exploiting lysozyme nanofibers as antibacterial and antioxidant reinforcing additives. *Food Hydrocolloids*, 77, 921–930. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.039>
- Simionato, I., Domingues, F. C., Nerín, C., & Silva, F. (2019). Encapsulation of cinnamon oil in cyclodextrin nanosponges and their potential use for antimicrobial food packaging. *Food and Chemical Toxicology*, 132(January), 110647.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110647>
- Simsek, M., Eke, B., & Demir, H. (2020). Characterization of carboxymethyl cellulose-based antimicrobial films incorporated with plant essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2172–2179.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.075>
- Singh, N., Ogunseitan, O. A., Wong, M. H., & Tang, Y. (2022). Sustainable materials

- alternative to petrochemical plastics pollution: A review analysis. *Sustainable Horizons*, 2(January), 100016. <https://doi.org/10.1016/j.horiz.2022.100016>
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>
- Soltani Firouz, M., Mohi-Alden, K., & Omid, M. (2021). A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Food Research International*, 141(January), 110113. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110113>
- Sommano, S., Kanphet, N., Sirtana, D., & Ittipunya, P. (2011). Correlation between browning index and browning parameters during the senescence of longan peel. *International Journal of Fruit Science*, 11(2), 197–205. <https://doi.org/10.1080/15538362.2011.578522>
- Song, X. C., Canellas, E., Wrona, M., Becerril, R., & Nerin, C. (2020). Comparison of two antioxidant packaging based on rosemary oleoresin and green tea extract coated on polyethylene terephthalate for extending the shelf life of minced pork meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100588. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100588>
- Song, Y. F., & Tsunashima, R. (2012). Recent advances on polyoxometalate-based molecular and composite materials. *Chemical Society Reviews*, 41, 7384–7402. <https://doi.org/10.1039/c2cs35143a>
- Soylu, E. M., Kurt, Ş., & Soyly, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Sperber, W. H., & Doyle, M. P. (2009). *Food Microbiology and Food Compendium of the microbial spoilage of foods and beverages*.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. In *Food Research International* (Vol. 136). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>

- Sullivan, G. A., Jackson-Davis, A. L., Niebuhr, S. E., Xi, Y., Schrader, K. D., Sebranek, J. G., & Dickson, J. S. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* using natural antimicrobials in no-nitrate-or-nitrite-Added ham. *Journal of Food Protection*, *75*, 1071–1076. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-511>
- Tanaka, Y., Hasegawa, T., Shimamura, T., Ukeda, H., & Ueda, T. (2018). Potentiometric evaluation of antioxidant capacity using polyoxometalate-immobilized electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *828*(May), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.024>
- Tas, C. E., Hendessi, S., Baysal, M., Unal, S., Cebeci, F. C., Menciloglu, Y. Z., & Unal, H. (2017). Halloysite Nanotubes/Polyethylene Nanocomposites for Active Food Packaging Materials with Ethylene Scavenging and Gas Barrier Properties. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(4), 789–798. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1860-0>
- Tawakkal, I. S. M. A., Cran, M. J., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2014). A review of poly(lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. *Journal of Food Science*, *79*(8). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12534>
- Techathuvanan, C., Reyes, F., David, J. R. D., & Davidson, P. M. (2014). Efficacy of commercial natural antimicrobials alone and in combinations against pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Food Protection*, *77*(2), 269–275. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-288>
- Testa, R., Schifani, G., & Migliore, G. (2021). Understanding consumers' convenience orientation. An exploratory study of fresh-cut fruit in Italy. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/su13031027>
- Tézé, A., Hervé, G., Finke, R. G. ., & Lyon, D. . (1990). a-, B, and y-dodecatungstosilicic acids: isomers and related lacunary compounds. In *Inorganic Syntheses* (Vol. 27, pp. 85–96).
- Tian, F., Decker, E. A., & Goddard, J. M. (2013). Controlling lipid oxidation of food by active packaging technologies. *Food and Function*, *4*(5), 669–680. <https://doi.org/10.1039/c3fo30360h>
- Tian, S., Qin, G., & Li, B. (2013). Reactive oxygen species involved in regulating fruit senescence and fungal pathogenicity. *Plant Molecular Biology*, *82*, 593–602. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0035-2>

- Tisserand, R., & Young, R. (2014). Essential oil composition. In *Essential Oil Safety* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06241-4.00002-3>
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M. B., Kawachi, M., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2010). Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.032>
- Tongdeesoontorn, W., Mauer, L. J., Wongruong, S., Sriburi, P., & Rachtanapun, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central Journal*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-6>
- Toral, L., Rodríguez, M., Martínez-Checa, F., Montaña, A., Cortés-Delgado, A., Smolinska, A., Llamas, I., & Sampedro, I. (2021). Identification of Volatile Organic Compounds in Extremophilic Bacteria and Their Effective Use in Biocontrol of Postharvest Fungal Phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773092>
- Torne, S., Darandale, S., Vavia, P., Trotta, F., & Cavalli, R. (2013). Cyclodextrin-based nanosponges: effective nanocarrier for tamoxifen delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(3), 619–625. <https://doi.org/10.3109/10837450.2011.649855>
- Torres-Arreola, W., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cárdenas-López, J. L., & Ezquerra-Brauer, J. M. (2007). Effect of a low-density polyethylene film containing butylated hydroxytoluene on lipid oxidation and protein quality of sierra fish (*Scomberomorus sierra*) muscle during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6140–6146. <https://doi.org/10.1021/jf070418h>
- Trotta, F., & Cavalli, R. (2009). Characterization and applications of new hyper-cross-linked cyclodextrins. *Composite Interfaces*, 16(1), 39–48. <https://doi.org/10.1163/156855408X379388>
- Trotta, F., Zanetti, M., & Cavalli, R. (2012). Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8, 2091–2099. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.235>
- Ueda, T. (2018). Electrochemistry of polyoxometalates: from fundamental aspects to applications. *ChemElectroChem*, 5(6), 823–838.

<https://doi.org/10.1002/celc.201701170>

Ueda, T. (2021). Polyoxometalates in Analytical Sciences. *Analytical Sciences*, 37(1), 107–118. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.20SAR17>

United Nations Environment Programme (UNEP). (2021a). *Food waste index report 2021*.

United Nations Environment Programme (UNEP). (2021b). *From pollution to solution: a global assessment of marine litter and plastic pollution*. <https://www.unep.org/>

Utzeri, G., Matias, P. M. C., Murtinho, D., & Valente, A. J. M. (2022). Cyclodextrin-Based Nanosponges: Overview and Opportunities. *Frontiers in Chemistry*, 10(March), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.859406>

Valentini, F., Ferracci, G., Galloni, P., Pomarico, G., Conte, V., & Sabuzi, F. (2021). Sustainable highly selective toluene oxidation to benzaldehyde. *Catalysts*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/catal11020262>

Vera, P., Echegoyen, Y., Canellas, E., Nerín, C., Palomo, M., Madrid, Y., & Cámara, C. (2016). Nano selenium as antioxidant agent in a multilayer food packaging material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(24), 6659–6670. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9780-9>

Verma, R. S., Padalia, R. C., Singh, V. R., Goswami, P., Chauhan, A., & Bhukya, B. (2017). Natural benzaldehyde from *Prunus persica* (L.) Batsch. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 1259–1263. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1338728>

Vermeiren, L., Devlieghere, F., VanBeen, M., Kruijf, N. de, & Debevere, J. (1999). Developments in the active food packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 77–86.

Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2015). Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry*, 178, 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.098>

Videira-Quintela, D., Guillen, F., Martin, O., Cumbal, L., & Montalvo, G. (2022). Antibacterial and antioxidant triple-side filler composed of fumed silica, iron, and tea polyphenols for active food packaging. *Food Control*, 138(March). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109036>

- Vilela, C., Kurek, M., Hayouka, Z., Röcker, B., Yildirim, S., Antunes, M. D. C., Nilsen-Nygaard, J., Pettersen, M. K., & Freire, C. S. R. (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 80(July), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.006>
- Visai, C., & Vanoli, M. (1997). Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Scientia Horticulturae*, 70(1), 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00032-0)
- Wang, C., Wang, Y., Wang, L., Fan, W., Zhang, X., Chen, X., Wang, M., & Wang, J. (2021). Biocontrol potential of volatile organic compounds from *Pseudomonas chlororaphis* ZL3 against postharvest gray mold caused by *Botrytis cinerea* on Chinese cherry. *Biological Control*, 159(April), 104613. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104613>
- Wang, H. J., An, D. S., Rhim, J.-W., & Lee, D. S. (2015). A multi-functional biofilm used as an active insert in modified atmosphere packaging for fresh produce. *Packaging and Technology and Science*, 28, 999–1010. <https://doi.org/10.1002/pts2179>
- Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2016). Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix. *Lwt*, 74, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.066>
- Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Zhang, Z., Yuan, Y., & Yue, T. (2018). Effect of cinnamaldehyde and citral combination on transcriptional profile, growth, oxidative damage and patulin biosynthesis of *Penicillium expansum*. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00597>
- Werner, B. G., Koontz, J. L., & Goddard, J. M. (2017). Hurdles to commercial translation of next generation active food packaging technologies. *Current Opinion in Food Science*, 16, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.07.007>
- WHO. (1995). *Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42100>
- WHO. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_3884
- WHO. (2018a). *E. coli: notas descriptivas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

- WHO. (2018b). *Listeriosis: notas descriptivas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- WHO. (2018c). *Salmonella (no tifoidea): notas descriptivas*.
[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Wieczyńska, J., & Cavoski, I. (2018). Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Chemistry*, 259(December 2017), 251–260.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.137>
- Williams, J., & Koppmann, R. (2007). Volatile Organic Compounds in the Atmosphere: An Overview. *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*, 1–32.
<https://doi.org/10.1002/9780470988657.ch1>
- Wolken, W. A. M., Tramper, J., & van der Werf, M. J. (2004). Amino acid-catalysed retroaldol condensation: The production of natural benzaldehyde and other flavour compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(2), 115–120.
<https://doi.org/10.1002/ffj.1326>
- Wong, S. P., Leong, L. P., & William Koh, J. H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4), 775–783.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>
- Wu, Z., Tu, M., Yang, X., Xu, J., & Yu, Z. (2019). Effect of cutting on the reactive oxygen species accumulation and energy change in postharvest melon fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 257, 108752.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108752>
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: active packaging. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1681–1692.
<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>
- Xie, X., Nie, Y., Chen, S., Ding, W., Qi, X., Li, L., & Wei, Z. (2015). A catalyst superior to carbon-supported-platinum for promotion of the oxygen reduction reaction: reduced-polyoxometalate supported palladium. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(26), 13962–13969. <https://doi.org/10.1039/c5ta02196k>
- Xin, R., Liu, X., Wei, C., Yang, C., Liu, H., Cao, X., Wu, D., Zhang, B., & Chen, K. (2018). E-nose and gc-ms reveal a difference in the volatile profiles of white- and red-fleshed peach fruit. *Sensors (Switzerland)*, 18(3).
<https://doi.org/10.3390/s18030765>

- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165–199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>
- Younes, M., Aquilina, G., Engel, K. H., Fowler, P., Frutos Fernandez, M. J., Fürst, P., Gürtler, R., Gundert-Remy, U., Husøy, T., Mennes, W., Moldeus, P., Oskarsson, A., Shah, R., Waalkens-Berendsen, I., Wölfle, D., Gott, D., Leblanc, J. C., Smeraldi, C., Tard, A., & Castle, L. (2019). Safety of ethyl lauroyl arginate (E 243) as a food additive in the light of the new information provided and the proposed extension of use. In *EFSA Journal* (Vol. 17). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5621>
- Yousuf, B., Qadri, O. S., & Srivastava, A. K. (2017). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.051>
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., Fan, S., Yang, Z., & Zhu, J. (2020). Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01196>
- Zhang, W., Jiang, H., Rhim, J. W., Cao, J., & Jiang, W. (2022). Effective strategies of sustained release and retention enhancement of essential oils in active food packaging films/coatings. *Food Chemistry*, 367(March 2021), 130671. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130671>
- Zhang, Y., Liu, J., Li, S. L., Su, Z. M., & Lan, Y.-Q. (2019). Polyoxometalate-based materials for sustainable and clean energy conversion and storage. *EnergyChem*, 1(3), 100021. <https://doi.org/10.1016/j.enchem.2019.100021>
- Zhao, P., Ndayambaje, J. P., Liu, X., & Xia, X. (2022). Microbial Spoilage of Fruits: A Review on Causes and Prevention Methods. *Food Reviews International*, 38(S1), 225–246. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1858859>