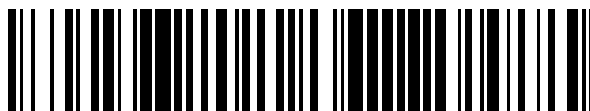


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 727**

51 Int. Cl.:

C08J 3/00 (2006.01)
C08J 3/22 (2006.01)
C08J 5/18 (2006.01)
A23B 4/20 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)
C08K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11805937 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2646496**

54 Título: **Procedimiento para obtener una película que se compone de la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases para aumentar el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado**

30 Prioridad:

03.12.2010 CL 13422010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE (100.0%)
Av. Alameda Libertador Bernardo O'Higgins 3363
CP 9170022, Estación Central Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**GUARDA, ABEL;
RUBILAR, JAVIERA y
GALOTTO, MARÍA JOSÉ**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 532 727 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener una película que se compone de la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases para aumentar el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para obtener una película que comprende la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases para aumentar el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado. En la presente invención, el agente activo se incorpora microencapsulado en la superficie de una película de plástico de modo que se obtiene una cinética diferenciada en función del tipo de recubrimiento usado para obtener la microcápsula.

Antecedentes de la invención

En las últimas décadas, ha tenido lugar un gran desarrollo tecnológico en el envasado de alimentos para satisfacer las demandas de los consumidores referentes a métodos de conservación más naturales, y modos de control de envasado y almacenamiento para garantizar la calidad y la seguridad de los alimentos. Entre las innovaciones más interesantes en este campo se encuentran las técnicas de envasado activo, con las que se pretende que los envases desempeñen un papel interactivo, así como constituyan una barrera física entre el producto y su entorno, aprovechando las interacciones entre el envase y el producto alimenticio hacia su calidad, aceptabilidad y seguridad. El reglamento del Parlamento Europeo CE n.º 1935/2004 define por primera vez los materiales activos para el envasado como aquéllos destinados a aumentar el término de caducidad, o a mantener o mejorar el estado de alimentos envasados, y están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmiten sustancias a alimentos envasados o a su entorno, o que absorben sustancias de alimentos envasados o de su entorno.

Sin embargo, la tecnología de envasado activo a la que se ha prestado más atención es indudablemente el envasado activo antimicrobiano. Tal como se sabe bien, el crecimiento de microorganismos es la causa principal para el deterioro de alimentos frescos. El crecimiento de microorganismos que producen deterioro reduce la vida del alimento, mientras que el crecimiento de microorganismos patógenos pone en riesgo la salud. El uso de envasado antimicrobiano promueve la liberación de sustancias que inhibirán el crecimiento de microorganismos en la superficie de los alimentos. La acción antimicrobiana en envasado activo puede basarse en la emisión de sustancias volátiles al espacio de cabeza del envase, o en la migración del componente activo del material hasta la superficie del alimento envasado.

En el estado de la técnica, existen varios procedimientos para incorporar compuestos antimicrobianos en la película de envasado. Por ejemplo, en el documento WO 2006/000032 (Miltz *et al.*), publicado el 5 de enero de 2006, se da a conocer un material para el envase antimicrobiano que contiene desde el 0,05% hasta el 1,5% de aceite esencial natural en peso. El aceite puede seleccionarse de linalool y/o metilchavicol, pero también de uno o más de citral, geraniol, cinamato de metilo, metileugenol, 1,8-cineol, trans- α -bergamoteno, carvacrol y timol mezclado con uno o más polímeros seleccionados de copolímeros de alcohol vinílico-etileno, poliacrilatos, incluyendo los copolímeros de metacrilato, acrilato de etilo, ionómeros, nailon, y otros polímeros hidrófilos, o polímeros que tienen grupos funcionales que pueden anclar parcialmente los aditivos y la mezcla de aglutinante recubierto que está ubicada en la cara de contacto de la película del envasado de alimentos o incorporada en una película de envasado de alimentos. Se añade un agente de unión como polietilenglicol a la mezcla para potenciar la retención de aceites volátiles en el polímero durante el procedimiento. Este material no tiene limitaciones normativas y, a las concentraciones a las que se hace referencia, no genera sabores no deseados en el alimento envasado.

El documento WO 2010/006710 (Yildirim *et al.*) publicado el 21 de enero de 2010 da a conocer una película de envasado para producir un envase que usa un sustrato de una sola capa o de múltiples capas, y una capa funcional antimicrobiana y/o antifúngica aplicada al sustrato, y la formación de la capa más externa de la película de envasado de al menos dos segmentos. Según las divulgaciones en este documento, la capa funcional comprende partículas como agentes antimicrobianos y/o sustancias activas antifúngicas.

El documento WO 2010/057658 (Del Nobile *et al.*) publicado el 27 de mayo de 2010 da a conocer un método para producir una película de material termoplástico, especialmente polietileno de baja densidad, que incorpora sustancias con actividad antimicrobiana. El procedimiento de producción para la película comprende las siguientes etapas: a) mezclar a una temperatura menor de o igual a 160°C un polímero termoplástico que tiene un punto de fusión menor de o igual a 160°C, y al menos una sustancia con actividad antimicrobiana seleccionada del grupo que consiste en lisozima, timol y extracto de limón; b) someter la mezcla obtenida en esta etapa a) a una compresión a la misma temperatura indicada anteriormente; c) enfriar bajo compresión hasta una temperatura menor de o igual a 40°C, obteniéndose tiras, que se dividen en pequeños trozos (gránulos); d) alimentar estos pequeños trozos (gránulos) a una extrusora dotada de una hilera y de medios de calentamiento para llevar la temperatura en el interior de la misma hasta un valor menor de o igual a 160°C; y e) extruir la película a través de la hilera.

Los tres documentos descritos anteriormente dan a conocer los procedimientos para incorporar agentes antimicrobianos en una película de plástico. Sin embargo, la presente invención propone la incorporación de agentes

antimicrobianos de manera mucho más sencilla que las descritas en la técnica anterior.

La tesis doctoral de Liyanaarachchige Sanjeewani Rupika Heralth, titulada "Development and Evaluation of Low Density Polyethylene-Based Antimicrobial Food Packaging Films Containing Natural Agents", publicada el 30 de septiembre de 2010, describe el efecto antimicrobiano de timol y carvacrol en películas a base de polietileno de baja densidad para el envasado de alimentos en presencia de un agente de unión.

El documento no de patente de M. Martins, titulado "Microencapsulation of thyme oil by coacervation", Journal of Microencapsulation, publicado el 1 de diciembre de 2009, describe la encapsulación de aceites esenciales procedentes de orégano en liposomas a base de fosfatidilcolina.

El documento no de patente de C. C. Liolios, titulado "Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity", Food Chemistry, publicado el 1 de enero de 2009, describe la encapsulación de aceite de tomillo con polilactida en presencia de Tween 20.

El documento no de patente de S. Krishnan, titulado "The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent", Carbohydrate Polymers, publicado el 14 de diciembre de 2005, describe el uso de goma arábica en la microencapsulación de agente saborizante alimentario (oleoresina de cardamomo).

Sumario de la invención

El principal mecanismo de deterioro para el salmón comercializado fresco y refrigerado es el crecimiento de microorganismos a nivel de superficie, siendo esto la causa principal para su corta vida.

Existe la posibilidad de usar componentes volátiles naturales con características antimicrobianas que pueden incorporarse en el envase. Pero ha de determinarse el mecanismo apropiado para incorporar estos agentes en la propia estructura de plástico, y para que éstos se suministren con una cinética diferente durante el tiempo en el que el salmón está envasado.

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una película que comprende la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases que aumenten el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado.

El fin de esta invención es proporcionar una película de envasado de plástico con capacidad antimicrobiana usando aceites esenciales volátiles (timol), que se incorporan en la propia hilera de plástico como recubrimiento sobre el material de plástico a través de un sistema de microencapsulación que permite el suministro del compuesto activo con diferente cinética en función del agente de encapsulación que esté usándose.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar un conocimiento más profundo de la invención.

La figura 1 muestra un diagrama de la metodología usada para la formación de las microcápsulas.

La figura 2 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol (10.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 3 muestra un gráfico de la cinética de liberación de carvacrol (10.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 4 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol (20.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 5 muestra un gráfico de la cinética de liberación de carvacrol (20.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 6 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol (50.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 7 muestra un gráfico de la cinética de liberación de carvacrol (50.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 8 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol (100.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 9 muestra un gráfico de la cinética de liberación de carvacrol (100.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 10 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol y carvacrol (10.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 11 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol y carvacrol (20.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 12 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol y carvacrol (50.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 13 muestra un gráfico de la cinética de liberación de timol y carvacrol (100.000 ppm) en función del tiempo.

La figura 14 muestra un gráfico de la concentración de timol (1.000 ppm) liberada de las microcápsulas en el medio

metanólico modelo.

La figura 15 muestra un gráfico de la concentración de carvacrol (3.000 ppm) liberada de las microcápsulas en el medio metanólico modelo.

5 La figura 16 muestra un gráfico de los halos de inhibición del crecimiento para diferentes microorganismos en películas microencapsuladas que contienen agentes antimicrobianos.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para obtener una película que comprende la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases para aumentar el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado.

10 El agente activo, extraído de aceites esenciales vegetales, se incorpora en forma de microcápsulas en la superficie interna del envase de plástico en contacto directo con la superficie de la carne. Se usan diferentes agentes de encapsulación para permitir una liberación con diferente cinética, y diferentes velocidades de liberación.

Preparación de microcápsulas

15 La producción de microcápsulas se logra mediante una técnica de emulsionamiento a partir de un tipo de emulsión de aceite en agua. Para hacerlo, se preparó una fase acuosa disolviendo 15 g de goma arábica (Quimatic) y 2 g de Tween 20 en 100 ml de agua destilada. La goma arábica se añade lentamente al agua destilada, con agitación continua durante 5 minutos por medio de un agitador magnético a temperatura ambiente. Se ajusta el pH de esta disolución a un valor de 6 añadiendo 10 ml de NaOH.

20 La fase de aceite se prepara mediante una disolución del agente antimicrobiano obtenido de fuentes naturales con diferentes concentraciones (ppm) de timol-carvacrol. Estas concentraciones de timol-carvacrol en ppm son de: 10.000-10.000, 20.000-20.000, 50.000-50.000, 100.000-100.000, respectivamente, disueltos en 4,3 g de aceite de soja o vaselina. Esta mezcla se somete a agitación manual suave durante dos minutos a temperatura ambiente.

25 La emulsión se prepara usando un homogeneizador, dispositivo dispensador que permite emulsionar, homogeneizar y producir suspensiones en medios líquidos generando un movimiento mecánico por medio de rotores que proporcionan un intervalo de velocidad ajustable. Como es un tipo de emulsión de aceite en agua, la fase acuosa se incorporó sobre la fase de aceite. Se realiza el funcionamiento del homogeneizador a una velocidad creciente de 0 hasta 10.000 rpm, acelerando desde 1.100 rpm cada 20 segundos durante 3 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, se obtiene la microencapsulación de la combinación sinérgica óptima de timol y carvacrol con un material de encapsulación de goma arábica. La figura 1 muestra un esquema de la metodología usada para producir las microcápsulas mediante una técnica de emulsión con separación.

Primer estudio sobre la cinética de liberación de la concentración microencapsulada óptima

35 Se realizó el análisis de la liberación controlada de agentes antimicrobianos microencapsulados mediante la evaluación de la velocidad a la que se liberan a una disolución acuosa a una temperatura de 4°C durante un periodo de un mes. A continuación, se presenta la tabla 1 en la que se exponen los factores experimentales para el análisis de la liberación de los agentes antimicrobianos.

Combinación de niveles con los factores experimentales			
Experimentos	Agente antimicrobiano	Concentración de agente antimicrobiano (ppm)	Medio de dispersión
1	Timol - carvacrol	10.000	Aceite
2	Timol - carvacrol	20.000	Aceite
3	Timol - carvacrol	50.000	Aceite
4	Timol - carvacrol	100.000	Aceite

Tabla 1. Combinación de niveles con los factores experimentales para el estudio de la liberación controlada.

40 Para llevar a cabo este experimento, se tomó una disolución de 24 ml de microcápsulas y se centrifugó en una microcentrífuga durante 6 minutos a 30 rpm, luego se tomó un sobrenadante de microcápsulas y se sometió a un lavado con 10 ml de hexano, repitiendo este procedimiento una vez más. Tras el lavado, se tomaron 100 µl de microcápsulas y se pusieron en un tubo Eppendorf que contenía 2 ml de agua destilada. Luego, se evaluó la concentración de agente antimicrobiano liberada en este medio acuoso en función del tiempo. Se tomaron muestras

a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 1440, 2880, 4320, 8640, 10080, 20160, 30240, 40320 min, y luego se filtraron usando microfiltros de 0,45 μm . Finalmente, se inyectaron 2 μl de esta disolución filtrada en el cromatógrafo de gases con detector FID (ionizador de llama).

Cuantificación de timol y carvacrol

- 5 Se lleva a cabo la determinación de los analitos (timol y carvacrol) mediante un cromatógrafo de gases equipado con un sistema de inyección de columna, control de presión y detector de ionizador de llama (FID).

Se llevaron a cabo los análisis en una columna capilar de sílice fundida. Se llevó a cabo la inyección de muestras por el inyector automático del dispositivo. La temperatura del inyector y la del detector permanecieron a 250°C y 300°C, respectivamente. El programa de temperatura fue: 100°C como temperatura inicial, luego se aumentó la
10 temperatura a una velocidad de 8°C/min hasta 180°, y luego a 20°C/min hasta 250, a la que permaneció durante 5 minutos. El gas portador era helio, que circulaba con un flujo constante de 2 ml/min.

Para determinar la cantidad de timol y carvacrol que se liberó a la disolución acuosa, se diseñaron dos curvas patrón para cada agente antimicrobiano puro, cuya área en cromatografía era en función de la concentración de agente antimicrobiano. Basándose en estas curvas e interpolando el área de las muestras inyectadas, se calculó el valor
15 para la concentración de agente antimicrobiano liberada desde el interior de las microcápsulas al medio acuoso externo en el tiempo.

Para el estudio de la cinética de liberación de agentes antimicrobianos microencapsulados, la concentración de agente antimicrobiano encapsulada era de 200.000 ppm, que consistía en el 50% de timol (100.000 ppm) y el 50% de carvacrol (100.000 ppm). Con el fin de determinar la cantidad microencapsulada final, se determinó la pérdida de
20 agentes antimicrobianos que quedaban sin microencapsular, que consistía en una concentración de 2.281,97 ppm de timol, lo que representa un 1,14%, y 9.102,88 ppm de carvacrol (4,6%), lo que indica que los porcentajes reales de microencapsulación fueron del 98,86% para timol y del 95,4% para carvacrol.

En las figuras 2 y 3, se presenta la liberación de timol y carvacrol desde la microcápsula con concentraciones
25 iniciales para los agentes antimicrobianos de 10.000 ppm de timol y 10.000 ppm de carvacrol, respectivamente; se realizó el ajuste de la cinética basándose en el modelo de Weibull (Papadopoulou *et al.*, 2006).

A partir de los resultados obtenidos (tabla 2) se observó que la cantidad máxima de timol liberada tras 48 h (2.880 min) había sido de 21,39 ppm, y en un periodo de 30 días (40.320 min) había sido de 32,98 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E. de timol	Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E. de timol
0	6,38	0,06	1.440	19,95	1,56
10	6,73	0,28	2.880	21,39	2,21
20	13,71	1,05	4.320	23,42	0,33
50	15,32	0,94	8.640	27,22	1,59
60	16,32	4,55	10.080	28,99	0,60
240	17,86	4,26	20.160	31,55	3,29
300	17,16	3,39	30.240	32,34	0,21
420	19,33	3,54	40.320	32,98	1,20

Tabla 2. Datos de cinética de liberación de timol (10.000 ppm).

[ppm] Timol: concentración de timol en ppm

30 D.E. = desviación estándar

Los resultados obtenidos en la tabla 3 ayudan a establecer que la cantidad máxima de carvacrol liberada tras 48 h (2.880 min) había sido de 39,35 ppm, y en un periodo de 30 días (40.320 min) había sido de 75,72 ppm.

Comparando la liberación de carvacrol y timol en concentraciones microencapsuladas iguales (10.000 ppm), puede asegurarse que el estado líquido del carvacrol facilitará la liberación a través de la membrana porosa proporcionada
35 por la goma arábiga como material de encapsulación.

Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E. de carvacrol	Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E. de carvacrol
0	0,07	0,06	420	33,02	3,54
10	2,41	0,28	1.440	37,87	5,51
20	15,31	0,05	2.880	39,35	1,34
50	20,95	0,94	8.640	56,51	1,59
60	25,18	4,55	10.080	59,17	0,6
240	27,17	4,26	20.160	69,68	3,29

300	29,23	3,39	30.240	72,21	0,21
			40.320	75,72	1,2

Tabla 3. Datos de cinética de liberación de carvacrol (10.000 ppm).

En las figuras 4 y 5, se presenta la cinética de liberación de timol y carvacrol encapsulados a 20.000 ppm.

Entonces, los resultados obtenidos en la tabla 4 ayudan a establecer que la cantidad máxima de timol liberada tras 48 h (2.880 min) había sido de 50,78 ppm, y en un periodo de 30 días (40.320 min) había sido de 62,19 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E. de timol	Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E. de timol
0	13,84	1,5	1.440	48,51	3,26
10	16,73	0,87	2.880	50,78	3,52
60	27,96	0,87	8.640	58,07	4,67
120	31,48	2,23	20.160	59,66	3,51
180	35,94	0,71	30.240	60,19	2,11
240	38,99	0,87	40.320	62,19	1,86

5 Tabla 4. Datos de cinética de liberación de timol (20.000 ppm)

A partir de los resultados obtenidos (tabla 5), se observa que la cantidad máxima de carvacrol liberada tras 30 días (40.320 min) es de 186,05 ppm, y tras 48 h (2.880 min), se han liberado 146,97 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E. de carvacrol	Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E. de carvacrol
0	17,95	7,76	240	107,19	0,34
10	35,78	9,5	1.440	143,51	2,46
20	44,16	0,39	2.880	146,97	1,46
30	45,97	0,28	4.320	156,97	8,85
60	70,63	0,38	8.640	169,77	4,92
120	86,05	1,59	20.160	181,82	4,37
180	98,69	1,53	40.320	186,05	5,97

Tabla 5. Datos de cinética de liberación de carvacrol (20.000 ppm).

10 Se analizó la cinética de microcápsula que contiene una concentración de timol de 50.000 ppm (figura 6), y 50.000 ppm de carvacrol (figura 7).

En la tabla 6, la liberación de timol en un periodo de 48 h (2.880 min) fue de 108,46 ppm, y tras 30 días alcanzó una concentración liberada de 181,16 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E.	Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E.
0	20,59	7,94	330	101,17	1,42
10	21,12	2,61	1.440	105,05	3,32
20	35,62	7,31	2.880	108,46	4,07
30	49,51	7,56	8.640	110,33	2,74
40	62,99	6,01	10.080	118,36	2,43
50	77,87	8,51	11.520	122,78	4,15
60	81,17	4,92	12.960	124,36	7,24
120	82,69	2,09	14.400	137,08	3,86
180	87,21	5,45	20.160	148,90	5,92
240	95,30	4,21	30.240	166,68	1,25
300	98,97	1,55	40.320	181,16	5,44

Tabla 6. Datos de cinética de liberación de timol (50.000 ppm)

15 En la tabla 7, aumentando la cantidad de carvacrol microencapsulado, la liberación de este agente antimicrobiano en un periodo de 48 h (2.880 min) fue de 688,96 ppm, y la liberación máxima de carvacrol desde la microcápsula obtenida tras un mes fue de 972,1 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E.	Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E.
0	70,93	11,88	240	485,69	2,72
10	72,02	32,73	300	509,68	12,1
20	155,58	2,12	330	546,87	14,05

30	236,04	2,09	1.440	656,48	12,33
40	310,34	1,05	2.880	688,96	3,44
50	387,64	4,2	20.160	883,19	7,48
60	417,55	5,59	30.240	952,82	6,82
120	422,85	1,26	40.320	972,1	6,49
180	458,9	3,23			

Tabla 7. Datos de cinética de liberación de carvacrol (50.000 ppm).

También se estudió la cinética de liberación de principios activos de microcápsulas que contenían 100.000 ppm de timol y 100.000 ppm de carvacrol (figuras 8 y 9).

- 5 En la tabla 8, habiendo aumentado incluso más la cantidad de timol microencapsulado, la liberación de timol en un periodo de 48 h (2.880 min) fue de 256,21 ppm. Tras 30 días de liberación de timol, se alcanzó una concentración máxima liberada de 390 ppm, lo que reflejaría que existe una liberación continua en el tiempo de agente AM.

Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E.	Tiempo (min)	[ppm] Timol	D.E.
0	58,68	3,61	330	220,09	4,3
10	148,52	3,95	360	230,16	3,55
20	153,09	2,83	1.440	238,73	5,74
30	167,55	5,16	2.880	256,21	1,23
40	172,97	5,4	10.080	310,56	1,94
50	190,03	1,85	11.520	312,88	4,95
60	203,1	3,43	12.960	320,22	5,15
120	212,44	2,82	14.400	323,21	4,87
180	215,49	4,54	20.160	357,13	5,44
240	216,79	2,33	30.240	367,61	6,27
300	219,25	1,53	40.320	390,4	3,24

Tabla 8. Datos de cinética de liberación de timol (100.000 ppm)

- 10 En la tabla 9, se determinó que en un periodo de 48 h (2.880 min.) la concentración de carvacrol liberada en un medio acuoso fue de 1.004,25 ppm. La concentración máxima liberada en 1 mes (40.320 min) fue de 1.443,59 ppm.

Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E.	Tiempo (min)	[ppm] Carvacrol	D.E.
0	181,09	22,96	360	833,89	11
10	532,19	23,25	1.440	892,09	13,78
20	547,66	33,74	2.880	1004,25	14,39
30	604,49	22,21	10.080	1146,46	33,85
40	637,02	11,4	11.520	1155,72	1,48
50	694,45	14,8	12.960	1184,12	1,19
60	749,01	13,12	14.400	1206,24	6,11
120	776,57	1,3	20.160	1328,09	18,88
180	796,48	24,12	30.240	1389,43	27,27
240	800,16	21,85	40.320	1443,59	16,75
330	828,89	2,77			

Tabla 9. Datos de cinética de liberación de carvacrol (100.000 ppm).

- 15 Si se traza un gráfico de la cinética de liberación de timol y carvacrol en concentraciones microencapsuladas iguales, en las figuras 10 a 13 puede observarse que ha habido siempre una liberación más rápida de carvacrol que la de timol, ya que en agentes activos de microencapsulación en estado líquido, su liberación es mucho más rápida en el tiempo que en uno sólido cristalino, como es el caso de timol.

Segundo estudio de la cinética de liberación de microcápsulas de timol y carvacrol con goma arábiga como material de encapsulación

- 20 Se logró la producción de microcápsulas mediante una técnica de emulsión a partir de un tipo de emulsión de aceite en agua. Para hacerlo, se preparó una fase acuosa disolviendo 15 g de goma arábiga y 2 g de Tween 20 en 100 ml de agua destilada. Se añadió lentamente la goma arábiga al agua destilada, con agitación continua durante 5 minutos por medio de un agitador magnético a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de esta disolución a un valor de 6 añadiendo 10 ml de NaOH.

Se preparó la fase de aceite mediante una disolución de 1.000 y 3.000 ppm de agente antimicrobiano natural (timol o

carvacrol) disuelto en 4,3 g de aceite de soja o vaselina. Se sometió esta mezcla a agitación manual suave durante dos minutos a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo el estudio de liberación controlada de agentes antimicrobianos microencapsulados mediante la evaluación de la velocidad a la que se liberaron en una disolución metanólica.

Combinación de niveles de los factores experimentales			
Experimentos	Tipo de agente antimicrobiano	Concentración de agente antimicrobiano	Medio de dispersión
1	Timol	1.000	Aceite
2	Timol	1.000	Vaselina
3	Timol	3.000	Aceite
4	Timol	3.000	Vaselina
5	Carvacrol	1.000	Aceite
6	Carvacrol	1.000	Vaselina
7	Carvacrol	3.000	Aceite
8	Carvacrol	3.000	Vaselina

- 5 Tabla 10. Combinación de niveles con los factores experimentales para el estudio de la liberación controlada y el efecto antimicrobiano.

Para llevar a cabo este experimento, se tomó una disolución de 20 ml de microcápsulas y se sometió a centrifugación durante 6 minutos a 30 rpm, luego se recogió el sobrenadante (microcápsula) y se sometió a un lavado con 10 ml de hexano, repitiendo este procedimiento dos veces más. Posteriormente, de la disolución de microcápsulas lavadas, se tomó un volumen de 70 μ l y se suspendió en un vial que contenía 2 ml de metanol. Entonces, se evaluó la concentración de agente antimicrobiano en el medio metanólico en función del tiempo. Se tomaron muestras a las 0, 0,17, 0,3, 0,5, 1, 2, 4, 8, 48, 96, 192 y 384 horas, y se filtraron usando microfiltros de 0,45 μ m. Finalmente, se inyectaron 2 μ l de esta disolución filtrada en el cromatógrafo de gases.

Cuantificación de timol y carvacrol

- 15 Para determinar la cantidad de timol y carvacrol que se liberó en la disolución metanólica, se diseñaron dos curvas patrón para cada agente antimicrobiano puro en función del área en cromatografía y la concentración de agente antimicrobiano. Basándose en estas curvas y con el área de las muestras inyectadas, se calculó el valor para la concentración de agente antimicrobiano liberada desde el interior de la microcápsula al medio metanólico.

En este procedimiento, se usó un cromatógrafo equipado con un detector de tipo FID (ionización de llama) y una columna capilar de sílice fundida (30 m x 0,32 mm de D.I., 0,25 μ m de grosor). Se llevó a cabo la inyección de muestras mediante el inyector automático del cromatógrafo, y se programó la temperatura de la columna de la siguiente manera: se inició a 100°C, luego tuvo una velocidad de calentamiento de 20°C por minuto para llegar hasta 180°C, aumentándose de nuevo hasta 5°C por minuto para llegar finalmente hasta una temperatura de 250°C.

Liberación de timol y carvacrol

- 25 Se determinó la liberación de agente antimicrobiano microencapsulado en el tiempo para los diferentes experimentos mediante la velocidad de liberación en un medio metabólico.

Trazando un gráfico de todos los experimentos, se observa una tendencia logarítmica en función del tiempo, y se obtuvo una ecuación para la curva, que proporciona la constante de velocidad de liberación de agente antimicrobiano para cada condición. En las figuras 15 y 16, se muestra la concentración de timol y carvacrol, respectivamente, como liberada desde las microcápsulas en el medio metanólico modelo.

La última etapa de este procedimiento comprende la incorporación de las microcápsulas en polímeros, que es necesario tratarlos previamente para reducir su tensión superficial (tratamiento corona), que supone la ionización superficial de la matriz de plástico, sedimentándose las microcápsulas sobre la película, y dejar que se sequen en un horno a temperatura controlada.

- 35 Tercer estudio: Determinación de la capacidad antimicrobiana de película de plástico mediante la incorporación de microcápsulas

Según lo que se mostró en la figura 16, se determinó el efecto antimicrobiano de un envase activo con concentraciones de 50.000 ppm de timol y 50.000 ppm de carvacrol en las microcápsulas. Para hacerlo, se determinó el halo de inhibición del crecimiento para diferentes microorganismos alrededor de la película, que era de 11,26 mm para *Staphylococcus aureus*, de 8,76 mm para *Listeria innocua*, de 9,00 mm para *Escherichia coli* y de 4,26 mm para *Saccharomyces cerevisiae*.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener una película que se compone de la incorporación de agentes antimicrobianos obtenidos de fuentes naturales en una estructura polimérica para desarrollar envases para aumentar el término de caducidad de carne refrigerada, preferentemente salmón fresco refrigerado, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
5 a) obtener microcápsulas de un agente antimicrobiano obtenido de fuentes naturales en un medio envolvente, que comprende las etapas de:
a1) producir una fase acuosa disolviendo goma arábica y Tween 20 en agua destilada;
a2) producir una fase de aceite a través de una disolución del agente antimicrobiano obtenido de
10 fuentes naturales con una mezcla de timol y carvacrol;
a3) preparar una emulsión que incorpora la fase acuosa sobre la fase de aceite;
b) incorporar las microcápsulas en polímeros, tratándolos previamente para reducir su tensión superficial mediante tratamiento corona, sedimentando las microcápsulas sobre la película, y dejando que se sequen en un horno a temperatura controlada.
- 15 2. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que dicha fase acuosa de la etapa a1) se obtiene disolviendo 15 g de goma arábica con 2 g de Tween 20 en 100 ml de agua destilada.
3. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 2, en el que dicha goma arábica se añadió lentamente sobre el agua destilada, con agitación continua durante 5 minutos por medio de un agitador magnético a temperatura ambiente.
- 20 4. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 3, en el que éste comprende ajustar el pH de la disolución a un valor de 6 añadiendo 10 ml de NaOH.
5. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que en la etapa a2) la concentración de timol y carvacrol en ppm es de 1.000 de timol y de 3.000 de carvacrol.
6. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que en la etapa a2) la
25 concentración de timol y carvacrol en ppm es de 10.000 de timol y de 10.000 de carvacrol.
7. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que en la etapa a2) la concentración de timol y carvacrol en ppm es de 20.000 de timol y de 20.000 de carvacrol.
8. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que en la etapa a2) la concentración de timol y carvacrol en ppm es de 50.000 de timol y de 50.000 de carvacrol.
- 30 9. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 1, en el que en la etapa a2) la concentración de timol y carvacrol en ppm es de 100.000 de timol y de 100.000 de carvacrol.
10. Procedimiento para obtener una película, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que en la etapa a2) se disuelven timol y carvacrol en 4,3 g de aceite de soja.
11. Procedimiento para obtener una película, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que en la
35 etapa a2) se disuelven timol y carvacrol en 4,3 g de vaselina.
12. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 10 u 11, en el que en la etapa a2) la mezcla se somete a agitación manual suave durante dos minutos a temperatura ambiente.
13. Procedimiento para obtener una película, según la reivindicación 12, en el que en la etapa a3) la
40 homogeneización se realiza a una velocidad creciente de 0 hasta 10.000 rpm, acelerando desde 1.100 rpm cada 20 segundos durante 3 minutos a temperatura ambiente.

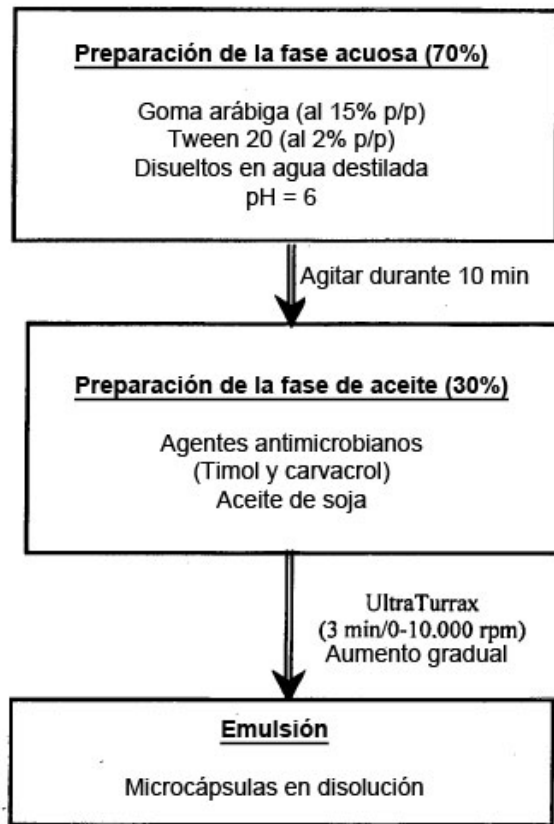


FIG. 1

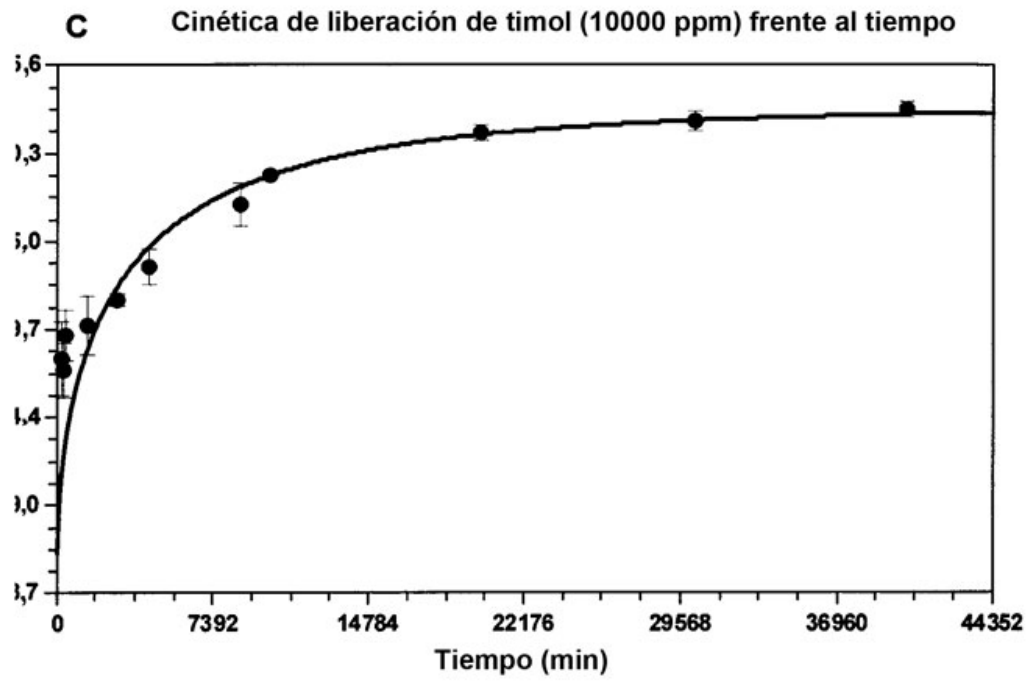


FIG. 2

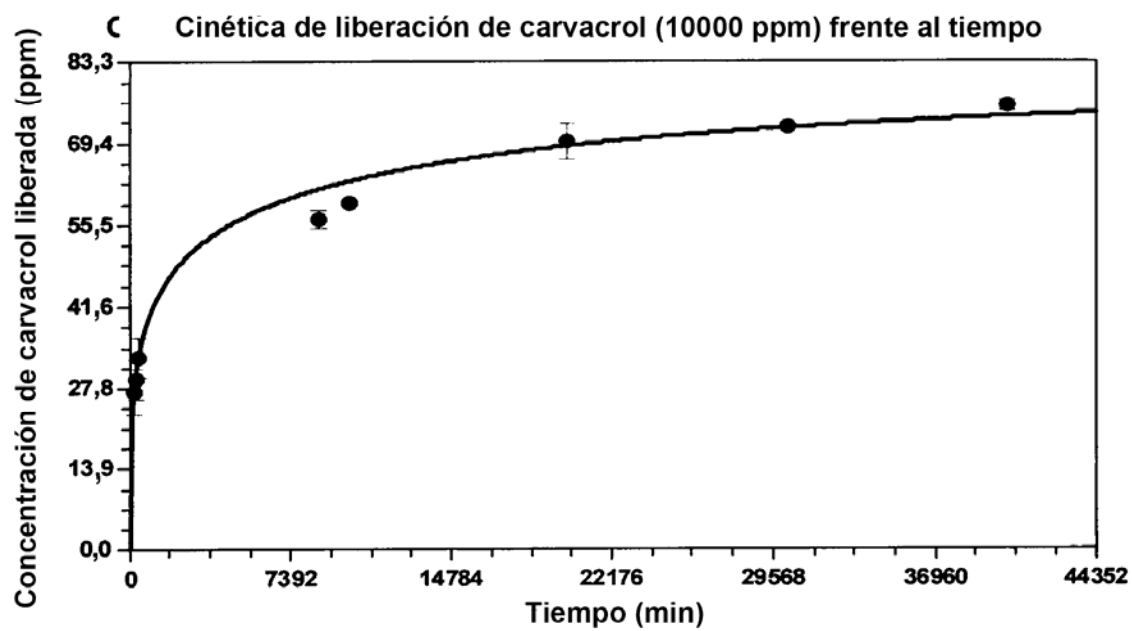


FIG. 3

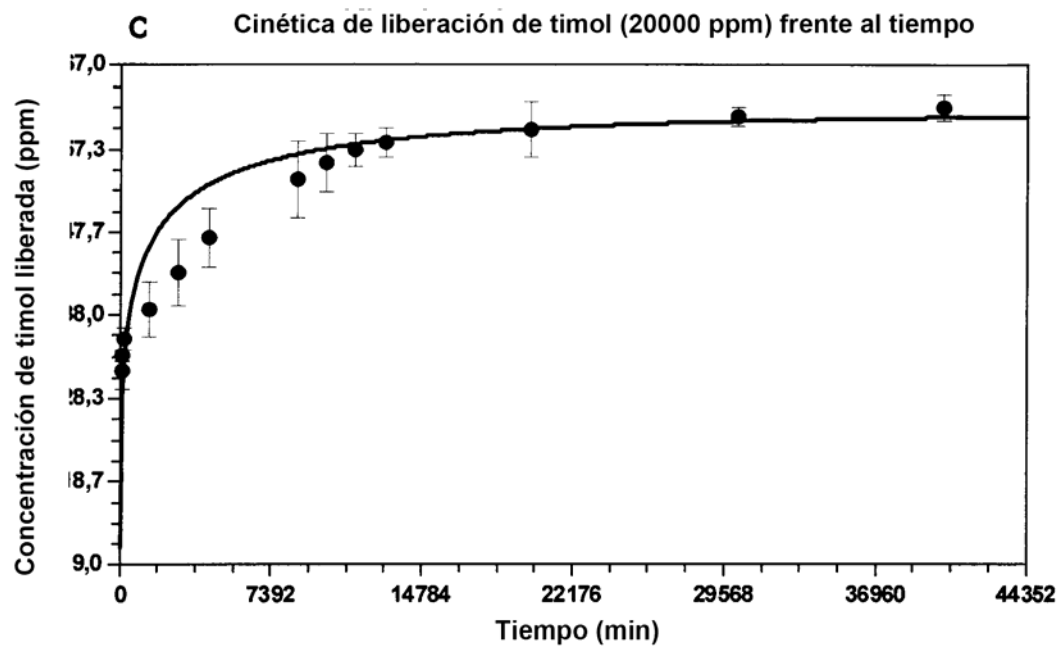
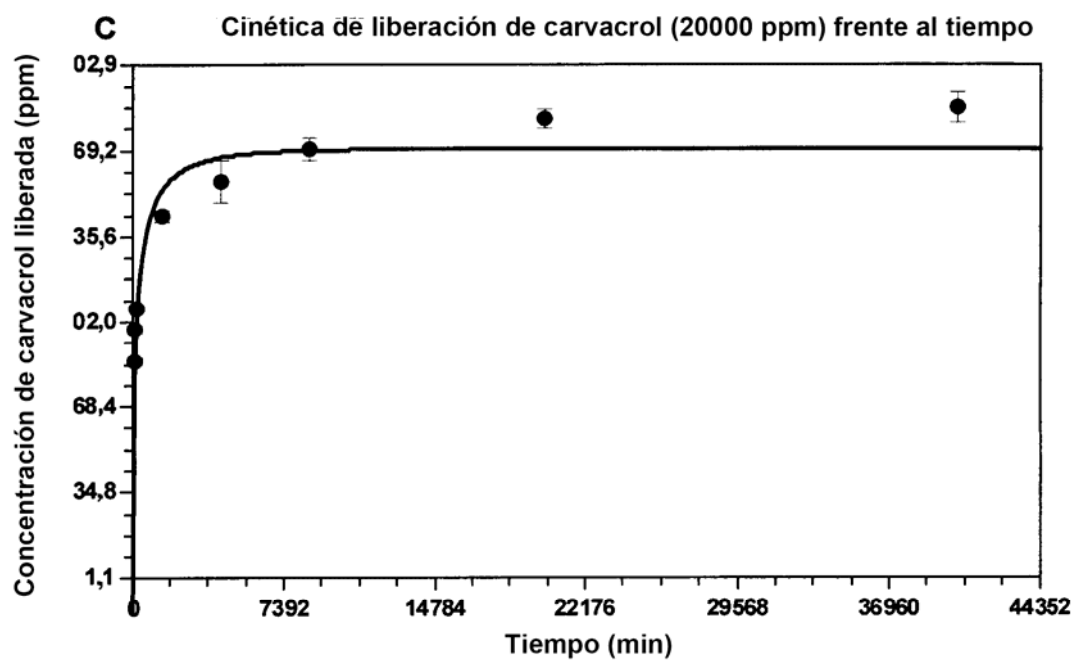


FIG. 4



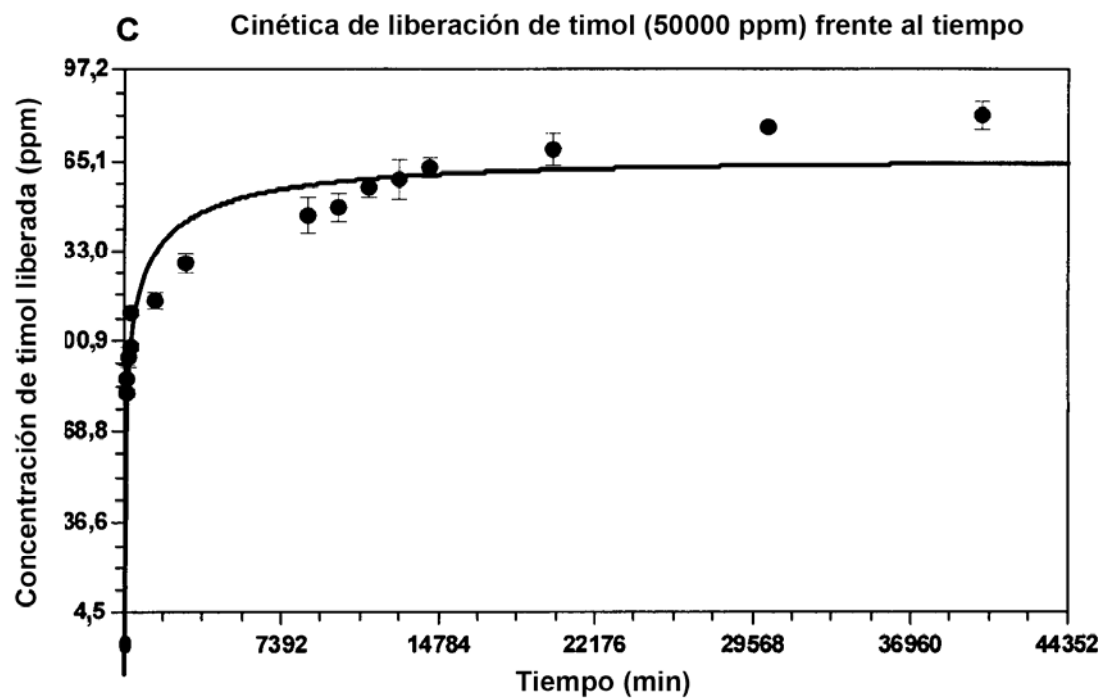


FIG. 6

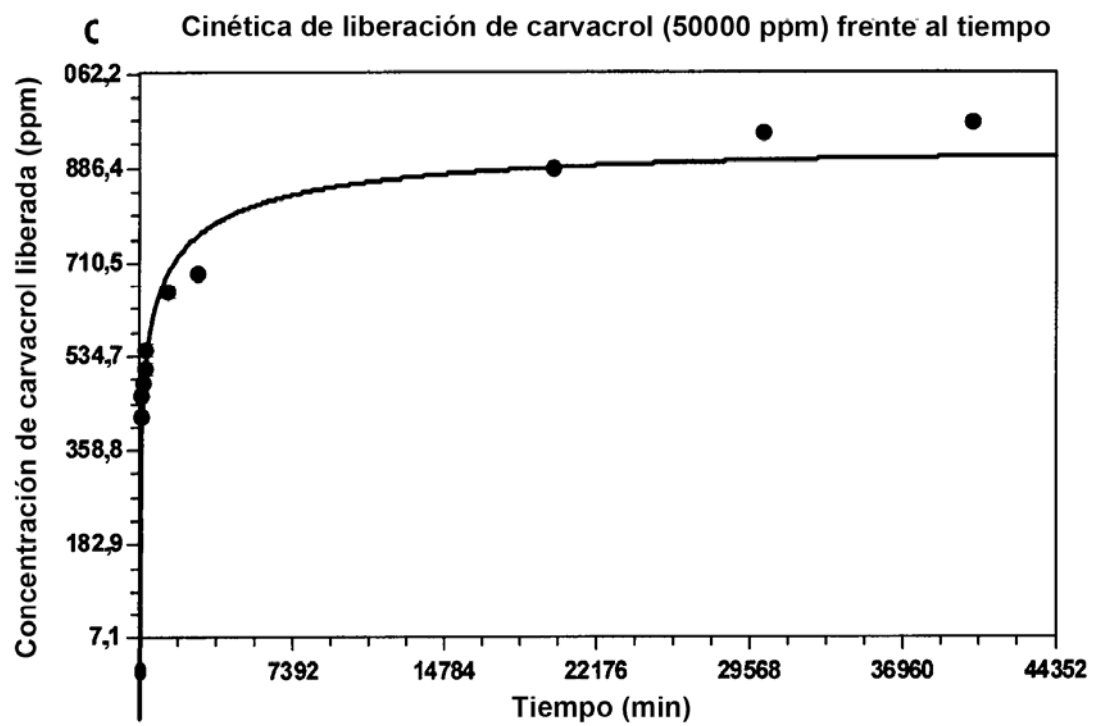


FIG. 7

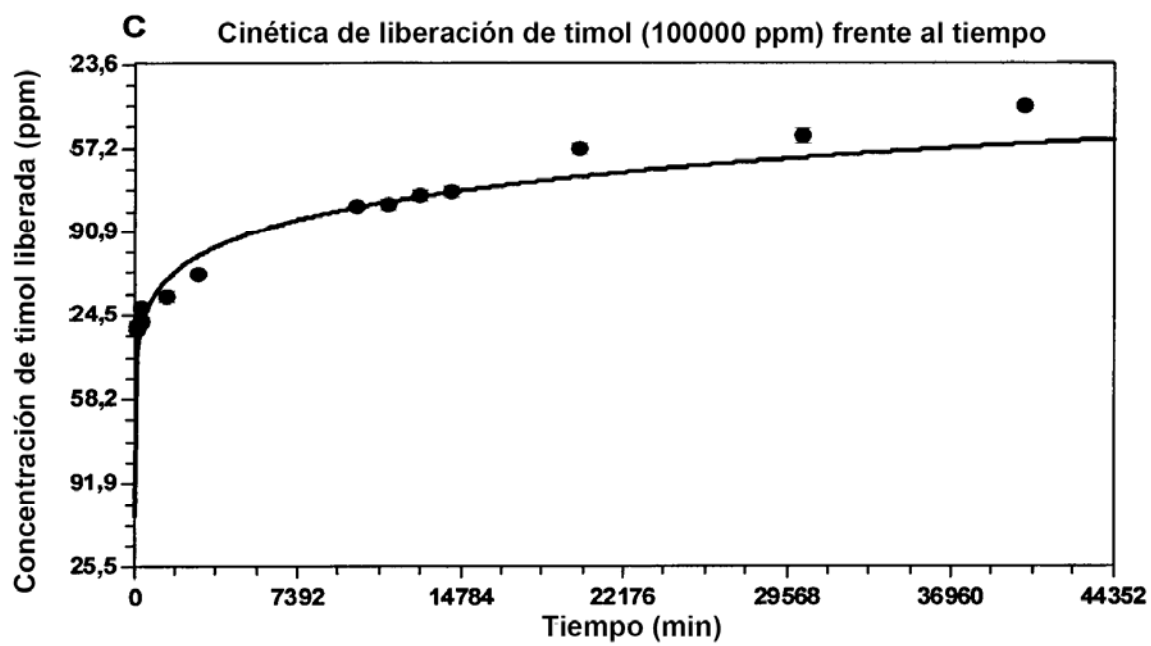


FIG. 8

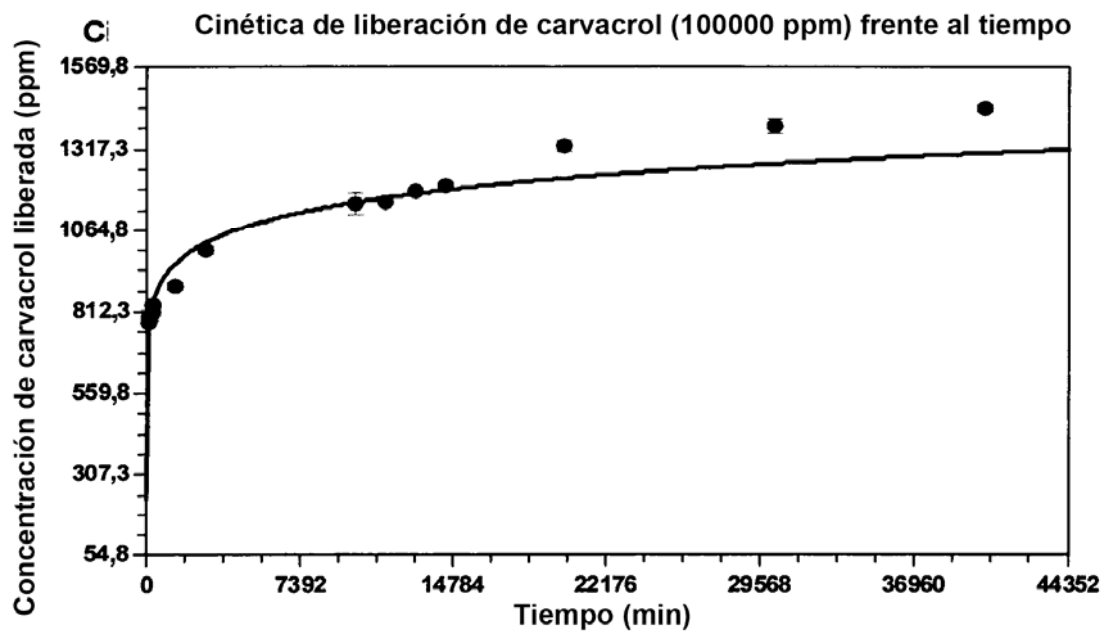


FIG. 9

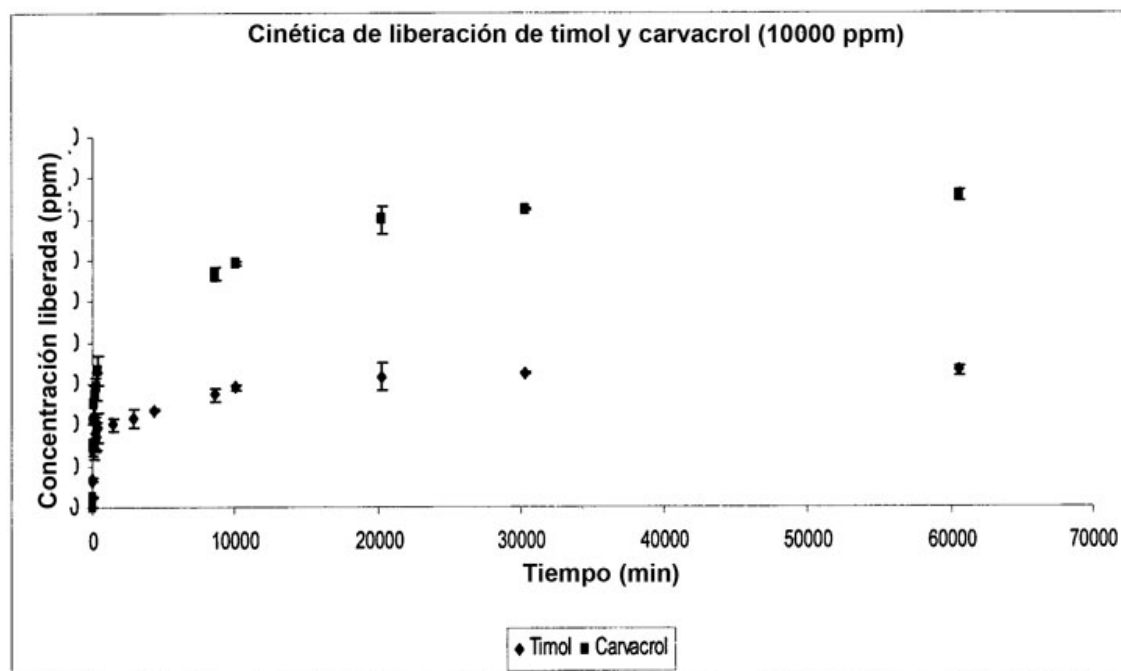


FIG. 10

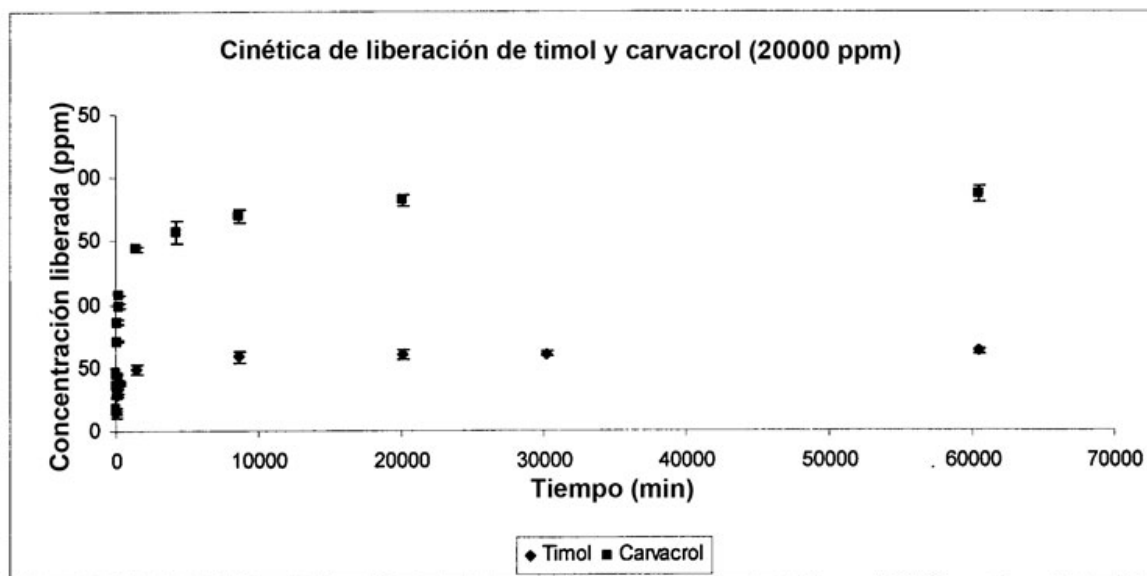


FIG. 11

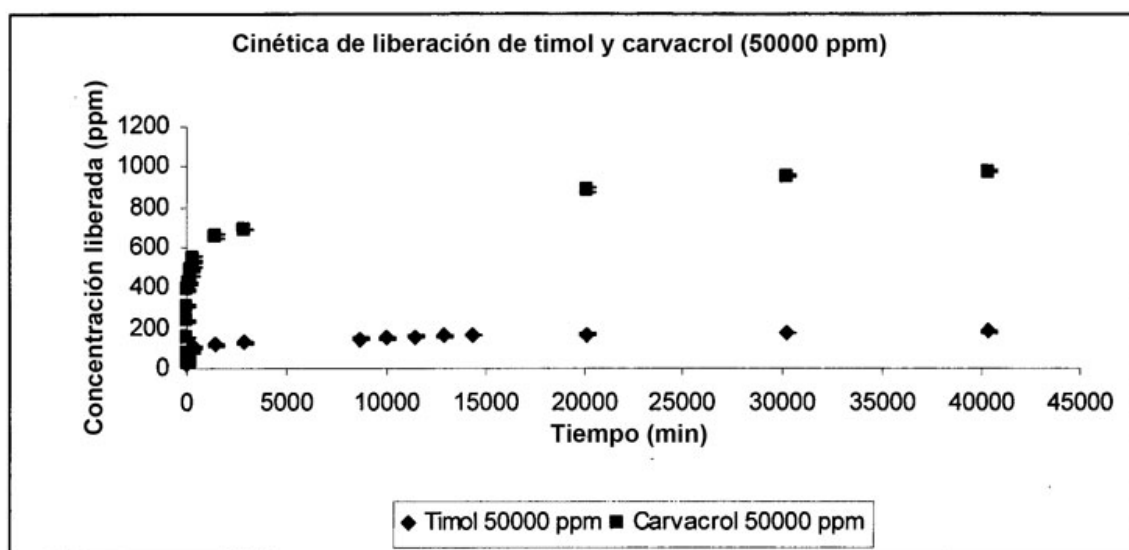


FIG. 12

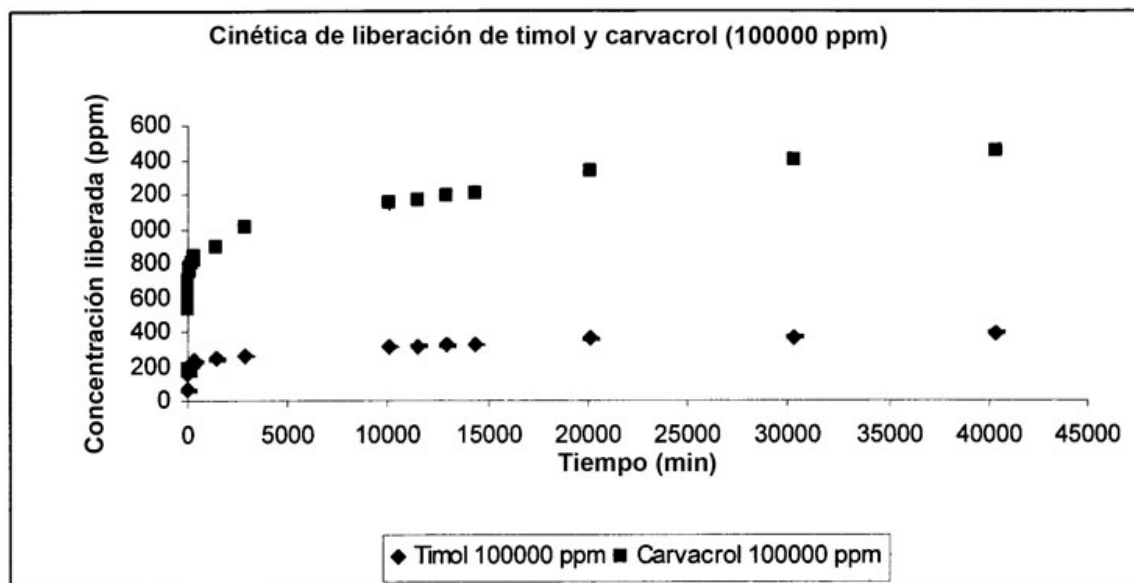


FIG. 13

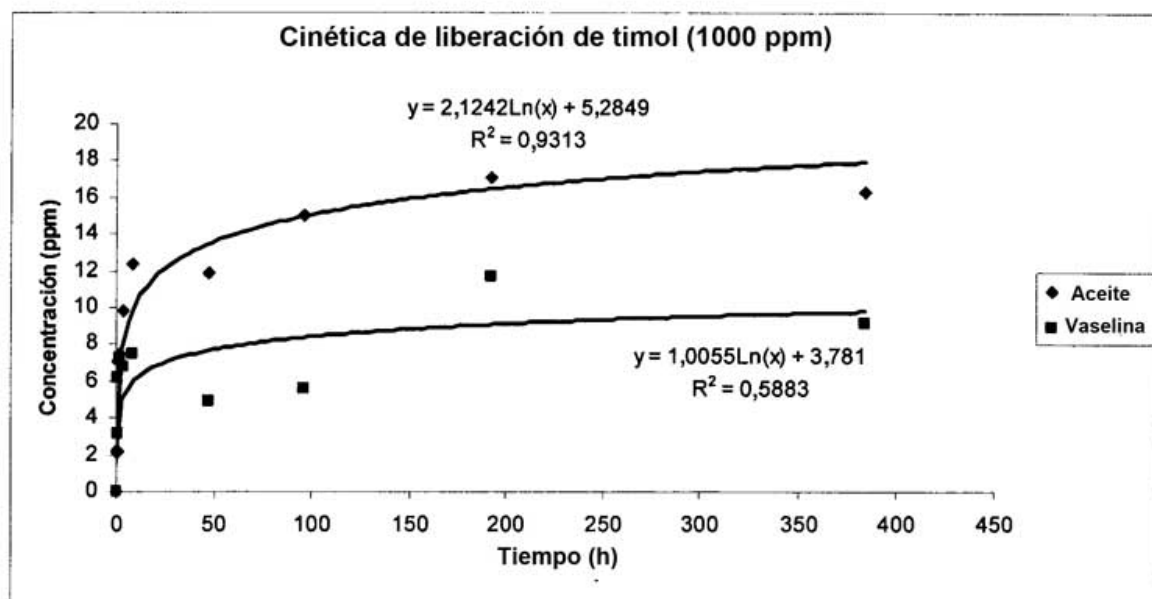


FIG. 14

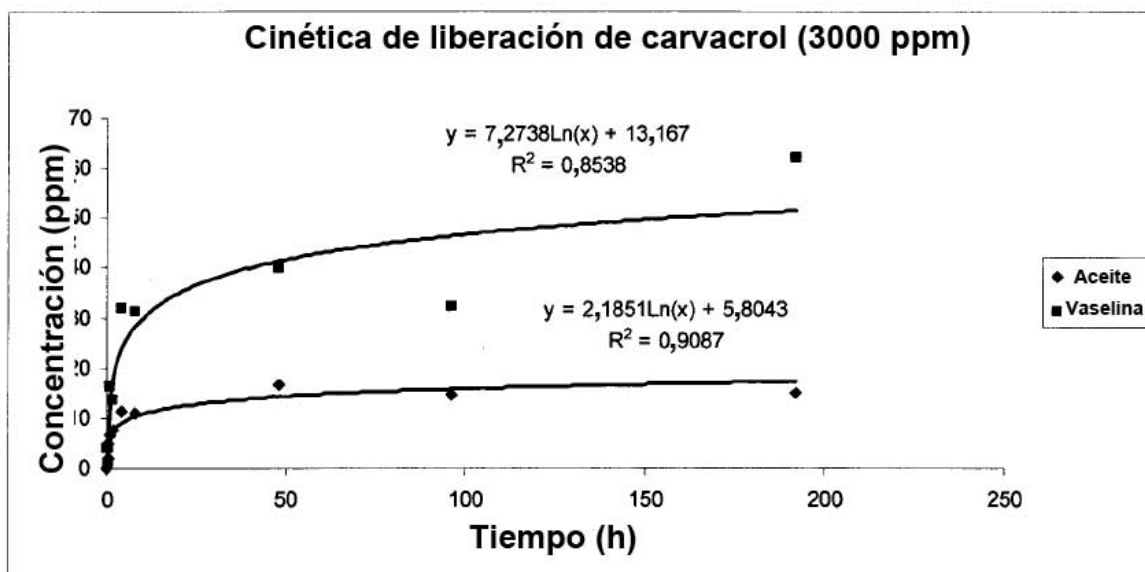


FIG. 15

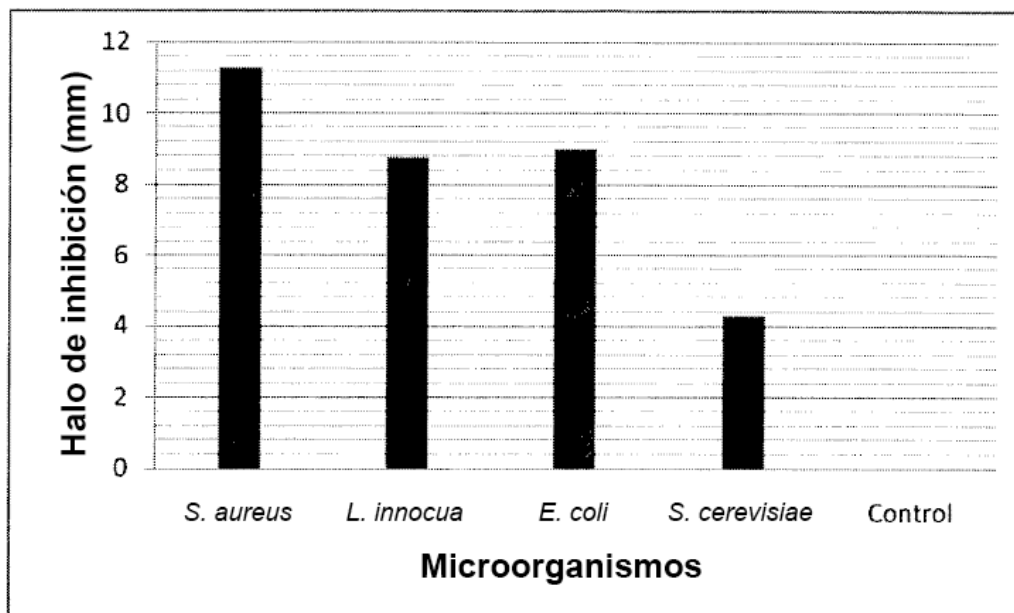


FIG. 16