

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE PELÍCULAS
COMESTIBLES BASADAS EN WPI Y EXTRACTO DE HINOJO MARINO
(*Crithmum maritimum*)**

presentado por

MAIALEN IRISARRI URARTE (e)k

aurkeztua

**GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS
GRADUA ELIKAGAIEN PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZA**

Junio, 2018 / 2018, Ekaina

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto fue elaborar películas comestibles a base de suero lácteo (WPI) con extracto de hinojo marino (*Crithmum maritimum*) como agente activo con el fin de determinar si posee capacidad antimicrobiana y/o antioxidante. Para ello, se elaboraron discos de películas comestibles a base de WPI con extracto de hinojo marino a concentraciones 0, 0,5, 1 y 2%. La capacidad antioxidante fue determinada por difusión de discos en reacción de ABTS y la capacidad antimicrobiana fue determinada por difusión de discos en las bacterias *Aeromonas hydrophyla*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria innocua*.

En primer lugar, se puso a punto el método de elaboración de películas comestibles basadas en proteínas de suero lácteo con los extractos vegetales estudiados, ya que hubo problemas en la formación de películas con el método tradicional. A continuación, se realizaron los ensayos de capacidad antioxidante y antimicrobiana. Los resultados indican que los extractos de hinojo marino presentan capacidad antioxidante gracias a sus compuestos fenólicos, pero menor de lo esperado probablemente por la reducida difusión de los componentes en las películas de proteínas de suero. Por otro lado, se determinó que estas películas no poseen capacidad antimicrobiana, probablemente también debido a la lenta difusividad de los compuestos. Aunque, si el extracto es aplicado directamente sobre la superficie si se observa una leve capacidad antimicrobiana frente a *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*.

Palabras clave: hinojo marino, película comestible, aislado de proteína de suero lácteo (WPI), capacidad antioxidante, capacidad antimicrobiana.

ABSTRACT

The aim of this Project was to produce edible films based on Whey Protein Isolated (WPI) with sea fennel extract (*Crithmum maritimum*), as an active agent, in order to determine whether it has antimicrobial and/or antioxidant capacity. WPI based edible film discs were made with sea fennel at 0, 0,5, 1, and 2% concentrations. The antioxidant capacity was determined by disc diffusion in ABTS reaction and the antimicrobial capacity was determined by disc diffusion in the bacteria *Aeromonas hidrophyla*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua*.

In the first place, the elaboration method of edible films based on whey proteins with the vegetal extracts studied was developed, since there were problems in the formation of the films with the traditional method. Then, tests of antioxidant and antimicrobial capacity were carried out. The results indicate that the extracts of sea fennel have antioxidant capacity thanks to their phenolic compounds, but lower than expected probably due to the reduced diffusion of the components in the whey proteins films. On the other hand, it was determines that these films do nor posees antimicrobial capacity, probably also due to the slow diffusivity of the compounds. Although, if the extract is applied directly on the surface it was observed that it has a slight antimicrobial capacity against *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens*.

Keywords: sea fennel, edible film, whey protein isolated (WPI), antioxidant capacity, antimicrobial capacity.

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades | 1 |
| 1.2 Películas comestibles | 2 |
| 1.3 Películas y recubrimientos comestibles a base de proteína de suero lácteo (WPI) 3 | |
| 1.4 Películas o recubrimientos comestibles bioactivos | 4 |
| 1.5 Plantas halófilas | 5 |
| 1.5.1 Propiedades antioxidantes | 6 |
| 1.5.2 Propiedades antimicrobianas | 7 |
| 1.6 Compuesto activo. Hinojo marino (<i>Crithmun maritimum</i>) | 7 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 Objetivo general | 11 |
| 2.2 Objetivos específicos | 11 |
| 3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 11 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 13 |
| 4.1 Materiales | 13 |
| 4.2 Métodos | 15 |
| 4.2.1 Método de liofilización | 15 |
| 4.2.2 Método de extracción | 17 |
| 4.2.3 Elaboración de películas comestibles de proteína de suero lácteo (WPI) | 20 |
| 4.2.4 Ensayo de capacidad antioxidante | 22 |
| 4.2.5 Ensayo de capacidad antimicrobiana | 23 |
| 4.2.6 Análisis estadísticos | 27 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 5.1 Resultados preliminares | 29 |
| 5.2 Resultados finales | 29 |
| 5.2.1 Ensayo de capacidad antioxidante | 29 |
| | 33 |
| 5.2.2 Ensayo de capacidad antimicrobiana | 33 |
| 6. CONCLUSIÓN | 39 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 41 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

La organización de las naciones unidas estimó que para el año 2050 habrá una superpoblación de aproximadamente 9000 millones de habitantes (Caldwell, 2004). La causa de este incremento poblacional se debe al avance tecnológico y científico. En otras palabras, la población aumenta a gran velocidad porque los avances en la medicina de los países del primer mundo cada vez consiguen aumentar más la esperanza de vida, creando un desequilibrio demográfico. Esto generaría un grave problema, puesto que para poder alimentar a toda la población habría que incrementar los cultivos mundiales en un 50%. Actualmente, la producción agrícola está en el límite y no sería suficiente para la demanda mundial (Zubero, 2015).



Figura 1.- Referencia a la superpoblación mundial (Urquijo, 2016)

Entre las estrategias planteadas para conseguir solucionar este problema, se baraja el aumento del rendimiento de las producciones existentes de los cultivos vegetales principales, como pueden ser el trigo, el maíz, la patata, etc (Riechmann, 2005).

Al mismo tiempo de aumentar la producción agrícola se deben establecer herramientas tecnológicas para aumentar la vida útil de los alimentos y garantizar su calidad e inocuidad. La vida útil es el tiempo que dura un alimento en perfectas condiciones para ser consumido. De esta manera, al conseguir aumentar la calidad de los alimentos durante su fase de almacenamiento se lograría tener mayor cantidad de reservas y poder abastecer la demanda de los consumidores. Durante el almacenamiento de los productos procesados, los envases deben estar diseñados para cumplir importantes funciones, como el de barreras para prevenir las alteraciones físicas, químicas y biológicas de los alimentos (López Cervantes, 2003).



Figura 1.- Envases empelados en la industria alimentaria (PlassPack, 2015)

Los envases tienen una gran importancia, ya que ayudan a la conservación de los alimentos evitando su contaminación. El envase debe ser el adecuado y estar específicamente diseñado para cada alimento. Dependiendo del alimento que se quiera envasar se utilizará una técnica de envasado y un material de envasado diferente para cada caso. Su función es contener el producto, conferir protección y portar la información del producto, ayudando a llevar una buena trazabilidad del alimento (López Cervantes, 2003).

Además, en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de conservación para conseguir aumentar la vida útil de los alimentos, asegurando una buena calidad del producto y una buena seguridad alimentaria para el consumidor. Se ha desarrollado una nueva gama de envases conocida como envases activos. Estos envases aprovechan las interacciones que se producen habitualmente entre el envase y el producto (migración y absorción de componentes de los materiales del envase en el producto) convirtiendo una característica negativa en positiva. Dicho de otra forma, se le incorporan al envase compuestos activos (antimicrobianos, y antioxidantes), ya sean sintéticos o naturales, con el propósito de que migren al alimento aumentando su vida útil y calidad. También, se pueden realizar envases activos modificando la atmósfera del interior del envase (tecnología MAP), por ejemplo disminuyendo la cantidad de oxígeno (López Cervantes, 2003).

El compuesto activo de los envases puede añadirse directamente sobre el material del envasado o sobre algún material incluido en el envase. Generalmente, se conocen tres tipos de envasados activos. En el más desarrollado se utilizan bolsitas que contienen el producto activo, las cuales son introducidas en el envase. Estas bolsitas están hechas con un material permeable, permitiendo la actividad de los compuestos sobre el producto, pero evitando que entren en contacto con el alimento. Otro método de realizar un envase activo es la incorporación de indicadores, por ejemplo de temperatura, en las etiquetas del envase. El tercer y último método utilizado es añadir los compuestos activos en las películas del envase. Estas películas pueden ser sintéticas y comestibles (López Cervantes, 2003). Actualmente, se está extendiendo el uso de películas comestibles, ya que migran compuestos al producto que no producen toxicidad para la salud del consumidor (Montalvo, López Malo, & Palou, 2012).



Figura 3.- Envase activo (etiqueta indicadora)
(Hispack & Mbalaje, 2012)

1.2 Películas comestibles

Las películas comestibles se definen como una matriz delgada formada por un polímero que se aplica directamente en el alimento, ya sea en forma de recubrimiento o formando parte de la composición del alimento. Pueden ser formadas a partir de biopolímeros como polisacáridos, proteínas o lípidos. Dependiendo del biopolímero empleado para formar la película se obtendrán unas propiedades u otras. Es muy importante conocer las propiedades que tiene cada tipo de película, ya que dependiendo de estas propiedades, serán apropiadas para ser empleados en un tipo de alimento u otro (Montalvo et al., 2012).

Las películas comestibles generalmente se forman dispersando previamente el biopolímero utilizado (polisacáridos, proteínas o lípidos) y disolviéndolo en un disolvente, habitualmente se utiliza agua, para después verter esta solución en una placa de vidrio y secarla en las condiciones que se desee (Montalvo et al., 2012).



Figura 4.- Solución formadora de películas siendo vertida en una placa de vidrio (Parzanese, 2006)

Actualmente, debido a la globalización se están buscando nuevas maneras de envasar alimentos para poder reducir el consumo de plástico. De esta manera, no solo se consigue reducir la cantidad de residuos y desechos generados por la industria alimentaria si no que se consigue aumentar la vida útil de los alimentos. Estas matrices que se aplican directamente sobre el alimento poseen propiedades que ayudan a mejorar la calidad y retrasar el deterioro del alimento aumentando su vida útil, es decir, actúan como barrera selectiva contra los gases y la humedad (Montalvo et al., 2012).

Por un lado, las propiedades de barrera son muy importantes para controlar o disminuir el intercambio gaseoso de alimentos con la atmósfera externa. Existen muchos alimentos frescos que se oxidan con facilidad cuando entran en contacto con el oxígeno, esto es, se producen procesos de degradación como la oxidación lipídica, el oscurecimiento enzimático, la pérdida de vitaminas, etc. Por lo que, las propiedades de barrera que presentan los recubrimientos comestibles retrasan que el oxígeno entre en contacto con el alimento retrasando esos procesos de degradación. Por otro lado, las propiedades de barrera ayudan a controlar o disminuir el intercambio de humedad con la atmósfera, ayudando a evitar o retrasar que los alimentos pierdan humedad. La pérdida de humedad en un alimento conlleva pérdida de peso, produciendo senescencia y menor turgencia (Montalvo et al., 2012).

Cabe destacar que los recubrimientos comestibles fabricados a partir de proteína del suero de la leche (WPI) son los que mejores propiedades de barrera y mecánicas presentan, aunque sufren de ciertas limitaciones (Ramos, Fernandes, Silva, Pintado, & Malcata, 2014).

1.3 Películas y recubrimientos comestibles a base de proteína de suero lácteo (WPI)

Las películas formadas a partir de proteína son las más efectivas, ya que gracias a los enlaces intermoleculares que se forman, los films a base de este biopolímero presentan propiedades con un gran potencial. Por ejemplo, son las que mejores propiedades de barrera al oxígeno presentan. Además, son altamente biodegradables y pueden suplementar el valor nutritivo de los alimentos (Montalvo et al., 2012).

Dependiendo de la naturaleza de las proteínas, hidrofóbicas o hidrofílicas, las propiedades de la matriz varían. También, existen otros factores que influyen en las propiedades como el uso de plastificantes, las condiciones de formado y las sustancias bioactivas que puedan añadirse (Montalvo et al., 2012).

Las proteínas derivadas de la leche, en concreto el WPI no tienen olor, no tienen sabor y son transparentes. De la misma forma se caracterizan por poseer unas buenas propiedades de barrera al oxígeno, a los lípidos y a los aromas (Montalvo et al., 2012). Son muy sensibles a la humedad y no muy flexibles, por lo que para mejorar estas limitaciones se les suele añadir un plastificante (agente de bajo peso molecular que disminuye la transición vítrea de los polímeros), normalmente glicerol, de manera que las propiedades de barrera a la humedad mejoran y la extensibilidad y flexibilidad de los films aumenta considerablemente (Ramos et al., 2014).

El WPI, es una proteína globular, por lo que para poder formar las películas hay que desnaturalizarlas aumentando la temperatura. En primer lugar, se solubilizan las proteínas en un disolvente, habitualmente agua, alcohol, ácido acético y/o sus mezclas. En segundo lugar, se aumenta la temperatura de la solución de proteínas para desnaturalizar y extender las cadenas. En tercer lugar, se vierte la solución formadora de películas en una base plana y se deja secar, para eliminar el disolvente (el disolvente se puede eliminar en condiciones controladas de temperatura o de humedad relativa), dando lugar a la formación de los films. En este proceso lo que ocurre es que las cadenas extendidas interaccionan entre ellas formando nuevos enlaces (Montalvo et al., 2012).

Cabe destacar que al aplicarse directamente sobre la superficie de los alimentos las propiedades de barrera ayudan a evitar que se pierda la humedad del alimento y que el oxígeno acelere la descomposición del producto. Asimismo, el material con el que se fabrica el film puede contener ciertos compuestos que ayudan a la extensión de la vida útil del alimento. Igualmente, se les puede añadir compuestos activos, ya sean sintéticos o naturales que aporten propiedades antimicrobianas o antioxidantes (Ramos et al., 2014).

1.4 Películas o recubrimientos comestibles bioactivos

Las películas comestibles además de tener propiedades de barrera, contra la humedad, gases y solutos, poseen un alto potencial para portar componentes activos o funcionales. Estos componentes pueden aportar nuevas propiedades como antimicrobianas y antioxidantes (Fernández-Pan, Royo, & Ignacio Maté, 2012). Es decir, son usadas como un medio de transporte de sustancias activas que pueden producir beneficios en el alimento en el que son aplicadas, aumentando su vida útil. Por lo general, estas sustancias se liberan lentamente sobre el alimento, proveyéndole esas propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Montalvo et al., 2012).

Estos recubrimientos activos al ponerse en contacto con el alimento comienzan a liberar los compuestos activos que poseen. La difusividad de los compuestos sobre el alimento será más rápida o más lenta, dependiendo del biopolímero con el que se hayan realizado esas películas comestibles. En el caso de los films realizados a partir de proteína de suero de la leche la difusividad será lenta, ya que las propiedades de barrera que posee dificultan esa migración. Por lo que, la actividad que confieren esos compuestos activos antimicrobiana y antioxidante registrada en películas hechas a base de este biopolímero es menor que usando otro biopolímero con unas propiedades de barrera menores (Fernández-Pan et al., 2012).

Los compuestos activos que se añaden a estos recubrimientos pueden ser de origen sintético y de origen natural. Actualmente, se está aumentando el uso de compuestos de origen natural, puesto que los compuestos de origen sintético tienden a causar toxicidad y efectos secundarios como carcinogenicidad. Entre los compuestos activos de origen natural más extendidos se encuentran los aceites esenciales de las algas halófilas (Rodriguez et al., 2015). Los aceites esenciales poseen compuestos fenólicos y ácidos orgánicos que les confieren esas

propiedades antioxidantes y antimicrobianas, respectivamente (Iturriaga, Olabarrieta, & de Marañón, 2012).

1.5 Plantas halófilas

Hay un creciente interés en la industria alimentaria de emplear compuestos naturales para aumentar la vida útil de los alimentos. Cada vez es más habitual obtener esos componentes naturales de plantas (Meot-Duros, Le Floch, & Magné, 2008).

Las plantas halófilas presentan una importante actividad biológica, en concreto propiedades antimicrobianas y antioxidantes, gracias a los compuestos que poseen, por lo que, son unas plantas de gran interés para emplear en la industria alimentaria (Meot-Duros et al., 2008). Son plantas tolerantes a la sal y capaces de crecer en hábitats extremos como pueden ser altas temperaturas y condiciones de salinidad (Rodrigues et al., 2015). Generalmente crecen en zonas arenosas cerca del mar (Meot-Duros et al., 2008).

Presentan propiedades diuréticas, antiescorbúticas y digestivas (Meot-Duros et al., 2008). Igualmente, contribuyen a la mejora de la salud y de la nutrición y a la sostenibilidad ecológica. Estas plantas son ricas en oligoelementos, minerales y vitaminas, por lo que, al introducir su consumo combinado con los alimentos básicos se consigue una dieta equilibrada y saludable (Romojaro, Botella, Obón, & Pretel, 2013).

En las culturas modernas se está extendiendo su consumo, puesto que aportan nuevos sabores, olores, sabores y texturas a los platos tradicionales. Además, poseen un gran potencial para ser utilizadas en la dieta diaria, ya que poseen compuestos bioactivos que las convierten en comida funcional. Normalmente, son consumidas como una verdura habitual de la dieta, pero también pueden ser consumidas como snack, como ingrediente en ensaladas, en sopas, en salsas... (Romojaro et al., 2013)



Figura 5.- Planta halófila encurtida (Montes, 2017)

Hay estudios que demuestran que estas plantas poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas que provienen de los aceites esenciales (Meot-Duros et al., 2008). Estos aceites esenciales pueden ser usados como aditivos de origen natural. Actualmente, se está extendiendo el consumo de aditivos de origen natural en vez de sintéticos, convirtiendo los ácidos esenciales de las plantas halófilas en compuestos de gran interés para la industria agroalimentaria (Romojaro et al., 2013). Es más, la mayoría de los vegetales de esta familia posee compuestos que las convierten en alimentos funcionales, siendo unas candidatas muy válidas para ser aplicadas en la industria alimentaria como ingrediente de un plato o como aditivo (Romojaro et al., 2013).

1.5.1 Propiedades antioxidantes

Los radicales libres se generan durante las reacciones metabólicas producidas en la cadena respiratoria mitocondrial. Se conocen como radicales libres las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Es muy importante mantener el equilibrio de radicales libres en el organismo, ya que si hay una cantidad mayor de radicales libres que de antioxidantes se producen daños en el organismo del ser vivo (Rodrigues et al., 2015).

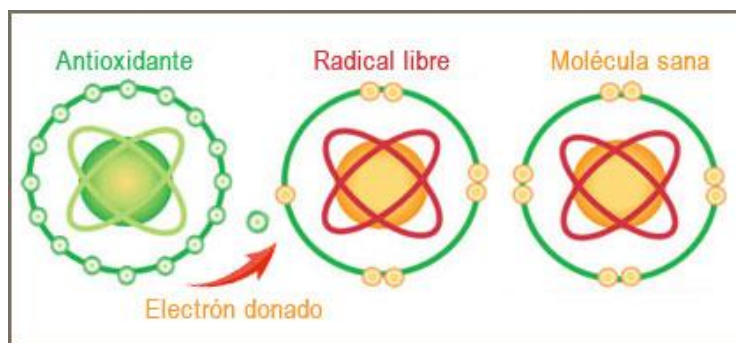


Figura 6.- Acción de los antioxidantes frente a radicales libres (B., 2016)

El consumo de compuestos antioxidantes en la dieta ayuda a equilibrar la cantidad de radicales libres del organismo, disminuyendo las posibilidades de padecer algunas enfermedades producidas por el estrés oxidativo como pueden ser el cáncer, la diabetes, los desórdenes cardiovasculares... (Rodrigues et al., 2015)

Los compuestos fenólicos son unos conocidos antioxidantes de origen natural (metabolitos secundarios de las plantas) y están clasificados en dos grupos: ácidos fenólicos y flavonoides. Está demostrado que ayudan a equilibrar la cantidad de radicales libres del cuerpo. Se está impulsando el uso de antioxidantes de origen natural, ya que los de origen sintético tienden a tener una mayor toxicidad y a producir mayor cantidad de efectos secundarios (Rodrigues et al., 2015).

Una de las fuentes naturales de las que se pueden conseguir estos compuestos fenólicos es de los aceites esenciales de las plantas halófilas. La cantidad de compuestos fenólicos que posea cada planta dependerá de la especie a la que pertenecen y de las condiciones de crecimiento. Estas condiciones se ven influenciadas por la temperatura y la salinidad del hábitat en el que se encuentran (Meot-Duros et al., 2008). Las diferentes cantidades de compuestos fenólicos que posea la planta tendrán influencia en sus capacidades antioxidantes, ya que a más cantidad mayor capacidad antioxidante presentará (Rodrigues et al., 2015).

También, es importante conocer que la cantidad de compuestos fenólicos varía dependiendo del órgano de la planta, siendo las flores las que mayor cantidad poseen y las hojas las que menos. Por ejemplo, las flores contienen una alta cantidad de flavonoides a diferencia de los otros órganos (Rodrigues et al., 2015).

1.5.2 Propiedades antimicrobianas

Los aceites esenciales de las plantas halófilas pueden ser aplicados como aditivos con propiedades antimicrobianas naturales, ayudando a luchar contra los patógenos que deterioran los productos alimentarios y como consecuencia aumentando su vida útil (Fernández-Pan et al., 2012). Los compuestos fenólicos y los ácidos orgánicos que poseen estos vegetales son los que confieren las propiedades antimicrobianas frente a algunos microorganismos (Iturriaga et al., 2012).

Los ácidos orgánicos son el compuesto que mayor capacidad antimicrobiana presenta. Existe una evidencia científica que demuestra que los ácidos orgánicos actúan a nivel de la membrana citoplasmática de los microorganismos (Luís, Silva, Sousa, Duarte, & Domingues, 2013). Estos entran dentro de la célula y debido al alto pH del interior de la célula se disocian. Las células bacterianas tienden a mantener su pH interior neutro, por lo que si los ácidos orgánicos se disocian el pH se altera y las células corrigen esa acidificación generando energía para expulsar esos ácidos. Finalmente, se genera tanta energía que se produce un agotamiento de la energía celular (Singh, ho Lee, Park, Shin, & Lee, 2016).

Las diferentes especies de plantas halófilas presentan propiedades antimicrobianas frente a distintos microorganismos, ya que como se ha mencionado con anterioridad dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento estarán compuestas por unos compuestos o por otros ácidos orgánicos y a distintas concentraciones. Tras varios estudios de distintas plantas frente a distintos microorganismos, se ha demostrado que las bacterias gram-positivas presentan una mayor sensibilidad a los compuestos presentes en los aceites esenciales, causando la inhibición de estas bacterias. Sin embargo, las bacterias gram-negativas son menos susceptibles a estos compuestos. Se cree que esta diferencia se debe a que las gram-negativas tienen una estructura de la pared celular diferente a la de las gram-positivas, oponiendo mayor resistencia a la entrada de los ácidos orgánicos en su interior (Iturriaga et al., 2012).

1.6 Compuesto activo. Hinojo marino (*Crithmun maritimum*)

El *Crithmun maritimum* es una planta halófila de la familia *Apiaceae*, también conocida como hinojo marino, hinojo de mar, perejil de mar y cresta marina. Es una planta típica del ecosistema de la costa, es decir, crece en ambientes salinos (Renna, Gonnella, Caretto, Mita, & Serio, 2017). Habitualmente en zonas rocosas, acantilados y en playas de arena. Suele crecer entre las grietas de las rocas y las playas de las costas del mar Mediterráneo y mar negro (Atia, Barhoumi, Mokded, Abdely, & Smaoui, 2011). Aunque, también crecen en algunas costas del océano Atlántico por Europa y el norte de África (Guerreiro Pereira et al., 2017).



Figura 7.- Hinojo marino en su hábitat natural (Renna et al., 2017)

Es una planta perenne altamente ramificada que puede llegar a alcanzar una altura de entre 30 y 60 cm. Además, tiene una raíz fuerte, gruesa y nudosa y unas hojas carnosas. Las hojas tienen de 2 a 5 cm de largo y 0,6 cm de ancho (Atia et al., 2011).



Figura 8.- Hinojo marino (Renna et al., 2017)



Figura 9.- Hinojo marino hojas (Atia et al., 2011)

Las plantas halófilas presentan beneficios para la salud como se ha descrito anteriormente. Antiguamente fueron empleadas como hierbas medicinales debido a los compuestos que poseen (Atia et al., 2011). Actualmente, son empleadas con propósitos nutricionales y medicinales, puesto que presenta propiedades antiescorbúticas, diuréticas, digestivas y purgativas (Nabet et al., 2017). El hinojo marino, también, se utiliza en la industria alimentaria como condimentos para ensaladas, sopas y salsas, como si fuese un pepinillo (en vinagre) o como especia. Presenta un sabor ligeramente salado y algo ácido (Guerreiro Pereira et al., 2017).

Las hojas de *C.maritimum* son ricas en vitamina C, carotenoides, flavonoides y sustancias bioactivas. Asimismo, los lípidos extraídos de esta planta poseen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, omega 3 y 6. Estos aceites son importantes para el metabolismo del ser humano, ya que poseen efectos beneficiosos frente a enfermedades coronarias. Es una planta rica en lípidos, el 44% del peso seco son lípidos, siendo el ácido oleico el componente mayoritario (78,6% del contenido total de ácidos grasos). También, contiene algunos ácidos orgánicos y minerales como fosfato, calcio, yodo, bromo y azufre (Atia et al., 2011).

C. maritimum presenta actividad antioxidante debido a los compuestos fenólicos que posee (Nabet et al., 2017). Según un análisis cuantitativo de flavonoides, taninos y polifenoles totales las hojas poseen entre 0,08 y 0,42% de flavonoides, entre 0,10 y 2,65% de taninos y de

4,72 a 9,48% de polifenoles. El mayor contenido de estos compuestos se encuentra cuando las plantas todavía no han florecido o están a punto de florecer (Atia et al., 2011).

Además, la parte aporlar del extracto presenta propiedades antimicrobianas frente a *Micrococcus luteus*, *Salmonella arizonae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aureginosa*, *P. marginalis*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans* (Atia et al., 2011).

El hinojo marino es una planta prometedora para su uso en la industria alimentaria debido a las sustancias bioactivas que posee, las cuales pueden ser útiles para producir alimentos nuceuticos y como suplemento para aumentar la vida útil de los alimentos (Nabet et al., 2017).

La finalidad de este proyecto es realizar películas comestibles activas a base de WPI enriquecidos con extracto de hinojo marino como agente antioxidante y antimicrobiano. Se evaluarán las propiedades antioxidantes, por reacción de ABTS, y las antimicrobianas, por difusión de discos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo principal de este proyecto es elaborar películas comestibles basadas en WPI enriquecidas con extracto de hinojo marino como agente antimicrobiano y antioxidante para mejorar la calidad de los alimentos frescos.

2.2 Objetivos específicos

El proyecto consta de tres objetivos específicos:

1. Evaluar la compatibilidad del extracto de hinojo marino con proteína de suero lácteo.
2. Evaluar las propiedades antioxidantes del hinojo marino.
3. Evaluar las propiedades antimicrobianas del hinojo marino.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluaron las capacidades antimicrobianas y antioxidantes del extracto de hinojo marino a distintas concentraciones. Para ello, se empleó una matriz de WPI donde se añadieron las diferentes concentraciones de extracto.

Extracciones:

Se realizaron extracciones del extracto de hinojo marino por liofilización de *Crithmum maritimum*.

Formulaciones:

El porcentaje de extracto de hinojo marino se realiza sobre la solución formadora de películas comestibles a base de WPI.

- Película comestible de WPI con 0% de extracto de hinojo marino.
- Película comestible de WPI con 0,5% de extracto de hinojo marino.
- Película comestible de WPI con 1% de extracto de hinojo marino.
- Película comestible de WPI con 2% de extracto de hinojo marino.

Ensayo de capacidad antioxidante:

- Discos con 0% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 0,5% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 1% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 2% de extracto: 5 replicas.

Ensayo de capacidad antimicrobiana:

Aeromonas hydrophila

- Discos con 0% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 0,5% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 1% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 2% de extracto: 5 replicas.

Shewanella putrefaciens

- Discos con 0% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 0,5% de extracto: 5 replicas.

- Discos con 1% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 2% de extracto: 5 replicas.

Pseudomonas fluorescens

- Discos con 0% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 0,5% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 1% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 2% de extracto: 5 replicas.

Listeria innocua

- Discos con 0% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 0,5% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 1% de extracto: 5 replicas.
- Discos con 2% de extracto: 5 replicas.

Nota: a todas las bacterias se les hicieron reducciones decimales, hasta la 10^{-9} , y se sembraron 2 placas de Petri por cada reducción decimal, desde la 10^{-3} hasta la 10^{-9} , donde se sembraron 14 placas por bacteria. Esto se realizó para determinar cuántas bacterias se inocularon por placa en el ensayo de actividad antimicrobiana.

Adición directa de extracto de hinojo marino (prueba antimicrobiana)

- *Aeromonas hydrophyla*: 3 replicas
- *Shewanella putrefaciens*: 3 replicas
- *Pseudomonas fluorescens*: 3 replicas
- *Listeria innocua*: 3 replicas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Los materiales utilizados a lo largo de la fase experimental fueron los siguientes:

Materiales

Secado de la planta halófila

- Hinojo marino (*C. maritimum*), suministrado por Porto-Muiños S.L (A Coruña, España), embalado en cajas térmicas y en refrigeración.
- Nitrógeno líquido
- Mortero
- Liofilizador semi industrial Lyobeta 25
- Licuadora KENWOOD 450W
- Envasadora a vacío SAMMIC V-640 S
- Campanas desecadoras
- Sales de silicagel OPPAC
- Bolsas de polietileno
- Balanza de humedad ST-H50 gram

Extracciones

- Hinojo marino (*C. maritimum*), previamente tratado.
- Etanol absoluto OPPAC
- Agua destilada
- Vaso de precipitados de 1000 mL
- Probetas de 30 y 400 mL
- Hielo picado
- Balanza Mettler Toledo PB302
- Platos de aluminio
- Ultraturrax T25 basic IKA-WERKE
- Ultrasonidos UP400S hielscher
- Centrifuga MR 1822 Jouan
- Tubos de centrifuga de 50 mL PPCO
- Rotavapor Buchi R-200
- Matraz redondo 500 mL
- Kitasato
- Buchner
- Módulo de vacío
- Congelador a -80°C
- Liofilizador semi industrial Lyobeta 25

Preparación de films

- Proteína de suero de la leche (Whey Protein Isolated), proporcionada por Davisco Food International (Le Seur, MN, EEUU)
- Glicerol bidistilado 99,5%, proporcionado por VWR CHEMICALS
- Agua destilada
- Extracto de hinojo marino (*C. maritimum*)
- Vaso de precipitados de 50 mL y 250 mL

- Balanza METTLER TOLEDO PB302
- Placa agitadora magnética Velp Scientific Multistirrer 15
- Pipeta Pasteur
- Baño térmico con sistemas de agitación P-SELECTA UNITRONIC OR
- pH-ímetro CRISON BASIC 20
- Hidróxido de sodio 1mol/l (1N) PANREAC
- Pipeta FINNIPIPETTE®F2 de 20 mL
- Puntas de 20 mL
- Cámara climática
- Pinzas
- Cuchillo
- Martillo
- Sacabocados

Ensayo antioxidante

- Placa calefactora IKAMAG PCT RCT
- Erlenmeyer 1000 mL
- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), SIGMA ALDRICH
- Persulfato potásico, VWR CHEMICALS
- Agar técnico, Panreac AppliChem
- Placas de Petri (92/16 mm)
- Films de WPI con extracto de hinojo marino (*C. maritimum*) al 0%; 0,4%; 0,8% y 1,6%
- Matraz aforado de 100 mL
- Pipeta de 10 mL, Mettler Toledo LTS 2-20mL
- Puntas de 10 mL, Mettler Toledo LTS 10-20MI
- Balanza de precisión Fisher Scientific PAS214C
- Micrómetro digital, modelo ID-F125, Mitutoyo Corp., (Tokio, Japón)

Ensayo antimicrobiano

- Puntas de 100 µL, 10 mL y 1 mL
- Pipeta de 10 mL FINNIPIPETTE®F2 1-10 mL
- Micropipeta FINNIPIPETTE®F2 10-100 µL
- Asas de siembra
- Perlas
- Tubos Falcon 15 mL
- Frascos de rosca Pyrex 1000 mL y 100 mL
- Placas de Petri (92/16 mm)
- Pinzas estériles
- Cámara de flujo laminar INDELAB, España
- Vórtex URA TECHNIC New ZX
- Discos de WPI con extracto de hinojo marino (*C. maritimum*) al 0%; 0,4%; 0,8% y 1,6%
- Placa magnética agitadora Multistirrer 15, Magnetic Stirrer, Velp Scientifica
- Autoclave PRESOCLAVE-II, P SELECTA
- Balanza Mettler Toledo PB302
- Estufa P SELECTA
- Estufa Heraeus I-42

- Se evaluaron cuatro grupos de bacterias patógenas que fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia:
 - *Aeromonas hydrophila* (CECT 839)
 - *Shewanella putrefaciens* (CECT 5346)
 - *Pseudomonas fluorescens*(CECT 378)
 - *Listeria innocua* (CECT 910)

Medios de cultivo:

- Tryptic soy broth (TSB), VWR CHEMICAL PROLABO
- Brain Heart Infusion (BHI), Panreac AppliChem
- Nutrient broth (ISO, APHA), VWR CHEMICAL PROLABO
- Extracto de levadura, bacteriológico (Ultra Puro), VWR LIFE SCIENCE
- Cloruro de sodio, VWR CHEMICAL PROLABO
- Agar bacteriológico, VWR CHEMICAL PROLABO
- Agua de peptona, VWR CHEMICALS PROLABO

4.2 Métodos

4.2.1 Método de liofilización

La liofilización consistió en realizar un secado a bajas temperaturas para no destruir los compuestos de la materia prima a secar, en este caso el hinojo marino. Durante la liofilización se eliminó el agua de la materia prima por ultracongelación y se sublimó el hielo en condiciones de vacío. El método de liofilización fue el definido por Cortés Lainez (2017).

Se liofilizó en varias tandas, ya que todo el hinojo marino debía estar en contacto con la superficie de la bandeja del liofilizador. En cada tanda se liofilizaron entre 1,5 y 2 Kg. Primero, se pesaron las plantas. Seguidamente, se congelaron con nitrógeno líquido (-180°C) y se trituraron con un mortero. Posteriormente, se esparcieron en bandejas metálicas y se introdujeron en el liofilizador durante 24 horas.



Figura 10.- Ultracongelación de hinojo marino mediante nitrógeno líquido



Figura 11.- Trituración de hinojo marino mediante mortero



Figura 12.- Césped de hinojo marino sobre placas antes de ser liofilizado

El proceso de liofilización consistió en dos etapas:

- Etapa 1: se bajó la temperatura a -45°C durante dos horas y se disminuyó la presión hasta 0,25 mbar. Una vez que el liofilizador alcanzó estas condiciones, se mantuvieron durante 11 horas.
- Etapa 2: se subió la temperatura a 25°C en una hora y se mantuvo a esa temperatura durante 11 horas.



Figura 13.- Liofilizador semiindustrial Lyobeta 25



Figura 14.- Hinojo marino liofilizado

Una vez finalizado el ciclo de liofilización, se recogió la planta deshidratada, se midió su humedad (Tabla 1) y se pulverizó. Finalmente, se envasó al vacío y se guardó en campanas de vidrio acondicionadas a 0% de humedad relativa.

Tabla 1.- Humedad de hinojo marino fresco y liofilizado

| Humedad (%) | Hinojo marino fresco | Hinojo marino liofilizado |
|-------------|----------------------|---------------------------|
| Media | 77,33 \pm 2,52 | 4,50 \pm 0,24 |
| CV (%) | 0,03 | 0,05 |

4.2.2 Método de extracción

El método empleado para realizar las extracciones del alga se basó en el descrito por Pérez-Jimenez & Saura-Calixto (2015) que fue modificado por Cortés Lainez (2017).

- La extracción comienza tras el triturado de la planta halófila secada por liofilización



Figura 15.- Hinojo marino triturado y envasado al vacío

- Se preparó en un vaso de precipitados de 1000 mL una mezcla de etanol y agua al 75:25, ya que en el proyecto anteriormente mencionado se observó que con esta proporción la extracción de polifenoles del alga era mayor, por lo que, se mezclan 300 mL de etanol y 100 mL de agua destilada.
- A continuación, se añadieron 20 gramos de hinojo marino y se homogenizó la muestra en el Ultraturrax durante 5 minutos a 21500 rpm. Se homogenizó, por segunda vez, mediante sonicación durante 8 ciclos de dos minutos con un minuto de descanso de un ciclo a otro.

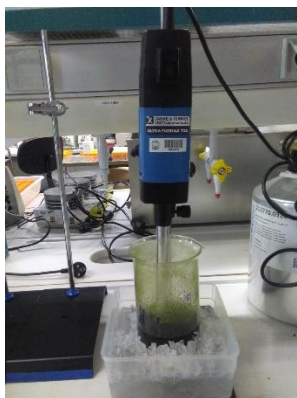


Figura 16.- Homogenización del hinojo marino mediante Ultraturrax T25 basic IKA



Figura 17.- Homogenización de hinojo marino por Ultrasonidos UP400S hielscher

- Seguidamente, se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se introdujo en el rotavapor hasta la sequedad total (aproximadamente este proceso suele tardar unas dos horas).



Figura 18.- Centrifugación del hinojo marino mediante Centrifuga MR 1822 Jouan



Figura 19.- Secado de hinojo marino mediante Rotavapor Buchi R-200

- Finalmente, se suspendió el contenido total en 30 mL de agua destilada y se filtró al vacío para eliminar las partículas en suspensión que podrían alterar los resultados.



Figura 20.- Filtración a vacío de las extracciones resuspendidas en 30 mL de agua destilada



Figura 21.- Extracto filtrado a vacío

- Los extractos fueron congelados a -80°C .
- Una vez obtenida la cantidad suficiente de extracto se realizó la siguiente liofilización durante 48 horas. Esta liofilización consistió de dos etapas:
 - En la primera etapa se bajó la temperatura a -10°C durante 50 minutos y se estableció vacío hasta una presión de 0,016 mbar, una vez conseguidas estas dos condiciones se mantuvieron la presión y la temperatura durante 23 horas y 30 minutos.
 - En la segunda etapa se subió la temperatura a 25°C durante una hora con una presión de 0,016 mbar. Una vez alcanzadas estas condiciones se mantuvieron durante 23 horas.
- Finalmente, se obtuvo el extracto en forma de polvo, listo para ser usado.



Figura 22.- Extracto de hinojo marino liofilizado mediante Liofilizador semiindustrial Lyobeta 25

4.2.3 Elaboración de películas comestibles de proteína de suero lácteo (WPI)

La elaboración de films consistió en preparar una disolución a base WPI con agua destilada. Una vez realizada la solución se aumentó su temperatura a 90°C para desnaturalizar las proteínas y poder formar los films.

Se elaboraron 4 formulaciones diferentes de recubrimientos con 0%, 0,5%, 1% y 2% de extracto de hinojo marino.

4.2.3.1 Elaboración de películas comestibles a base de WPI sin extracto de hinojo marino

El protocolo usado para la realización de la solución formadora de películas (SFP) fue el descrito por X. Carrión Granda, Fernández Pan, Rovira, & Maté (2018) que consistió en mezclar en un vaso de precipitados de 250 mL, 8 gramos de WPI con 4 gramos de glicerol y 88 mL de agua destilada. Se mezcló y se diluyó.

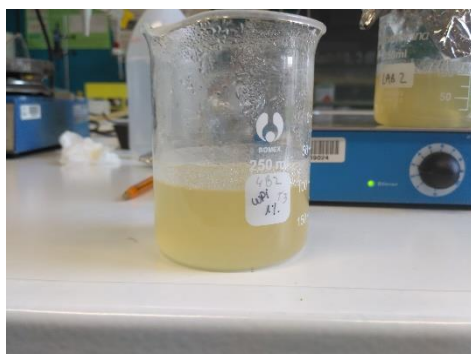


Figura 23.- Solución formadora de películas comestibles a base de suero lácteo

A continuación, se introdujo en el baño térmico a 90°C durante media hora para que las proteínas se desnaturalizaran y pudiesen formar los recubrimientos. Una vez pasada la media hora se dejó enfriar la SFP, aproximadamente hasta 40°C, y se añadieron 16 gramos en cada placa de vidrio.

Finalmente, se homogenizó la SFP, haciendo que cubriese toda la placa de vidrio y se almacenó durante 18 horas a 45% de humedad relativa y a 40°C en una cámara climática.

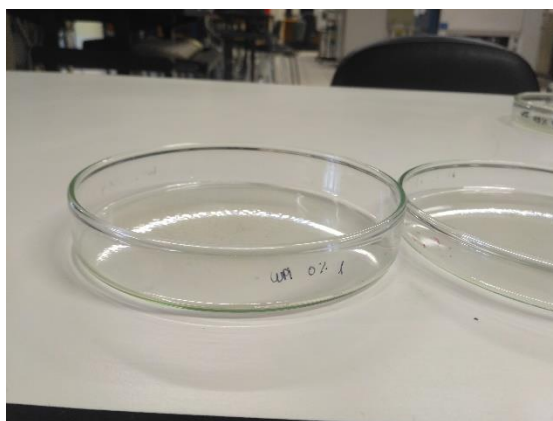


Figura 24.- Película comestible a base de suero lácteo con 0% de hinojo marino

Las películas fueron extraídas al día siguiente de las placas de vidrio y se formaron los discos con un diámetro de 17 mm, donde el espesor fue $100 \pm 5 \mu\text{m}$, que luego fueron empleados en los ensayos de capacidad antioxidante y capacidad antimicrobiana.



Figura 25.- Película comestible extraída de la placa de vidrio



Figura 26.- Discos de película comestible de suero lácteo

4.2.3.2 Elaboración de películas comestibles a base de WPI con extracto de hinojo marino

La elaboración de películas con extracto no difirió mucho a la elaboración de películas sin extracto, se utilizó la misma metodología. Sin embargo, a la hora de preparar la SFP hubo que tener en cuenta que cantidad de extracto había que añadir en cada formulación, teniendo en cuenta que la solución tenía que ser de 100 gramos en todos los casos, por lo que varió la cantidad de agua de unas concentraciones a otras.

Las formulaciones con extracto de hinojo marino a distintas concentraciones fueron las siguientes:

- Formulación 0,5%: 8 gramos de proteína, 4 gramos de glicerol, 0,4 gramos de extracto de Hinojo Marino y 87,6 gramos de agua destilada.
- Formulación 1%: 8 gramos de proteína, 4 gramos de glicerol, 0,8 gramos de extracto de Hinojo Marino y 87,2 gramos de agua destilada.
- Formulación 2%: 8 gramos de proteína, 4 gramos de glicerol, 1,6 gramos de extracto de Hinojo Marino y 86,4 gramos de agua destilada.

Al comienzo de la elaboración, en todas las formulaciones se retiraron 5 mL de agua para posteriormente diluir el extracto de hinojo marino y neutralizar el pH. A continuación, se siguió el procedimiento explicado en el apartado anterior, pero teniendo en cuenta las cantidades correspondientes de cada formulación.

Mientras se calentaron las SFP a 90°C se pesó el extracto correspondiente para cada formulación y se diluyó en los 5 mL de agua destilada que no fueron añadidos a la SFP al principio del proceso. A continuación, se le aumentó el pH hasta pH neutro con unas gotas de hidróxido de sodio (entre 3 y 6 gotas). Una vez que la solución se sacó del baño térmico, se enfrió hasta 40°C (temperatura máxima para que no se pierdan los polifenoles del extracto). Cuando la solución llegó a 40°C se le añadió el extracto correspondiente a cada SFP.

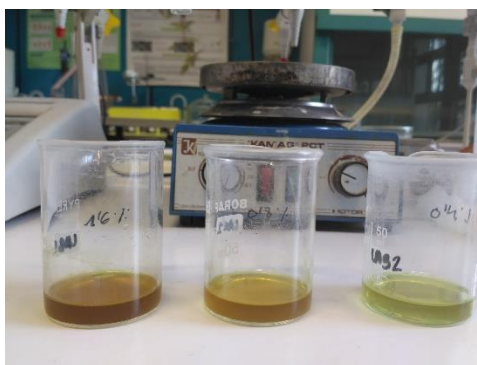


Figura 27.- Extracto de hinojo marino diluido en 5 mL de agua destilada con 2-3 gotas de NaOH para aumentar el pH

Finalmente, se añadieron 16 gramos de la mezcla en una placa de vidrio para cada recubrimiento formado, se homogenizaron y se almacenaron en las mismas condiciones que las películas que no poseían extracto de hinojo marino. También, fueron extraídos y convertidos en discos (diámetro 17 mm), con un espesor de $100 \pm 5 \mu\text{m}$, de la misma forma que los descritos en el apartado anterior.



Figura 28.- Películas comestibles de suero lácteo con hinojo marino a concentraciones 0,5, 1 y 2%

4.2.4 Ensayo de capacidad antioxidante

El protocolo empleado para la realización de este ensayo fue el descrito por Urrutia Larraz (2010). El ensayo de capacidad antioxidante se realizó en dos etapas:

- Etapa 1: Preparación de la reacción de ABTS

En esta etapa se disolvieron 0,384 gramos de ABTS 7mM (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) junto a 0,0663 gramos de persulfato 2,45 mM en 100 mL de agua destilada. Se agitó hasta homogenizar y se almacenó en oscuridad entre 12 y 16 horas.

- Etapa 2: Preparación del medio sólido

Se diluyó agar técnico en una proporción de 1,5% (p/v) en agua destilada, añadiendo 6 gramos de agar técnico en 400 mL de agua destilada. Se elevó la temperatura hasta que llegó al punto de ebullición. A continuación, se mezcló con la reacción de ABTS preparada con anterioridad, añadiendo el 20% de la reacción de ABTS al volumen total de la dilución de agar técnico, en este caso se añadieron 80 mL de ABTS a los 400 mL de la dilución de agar técnico.

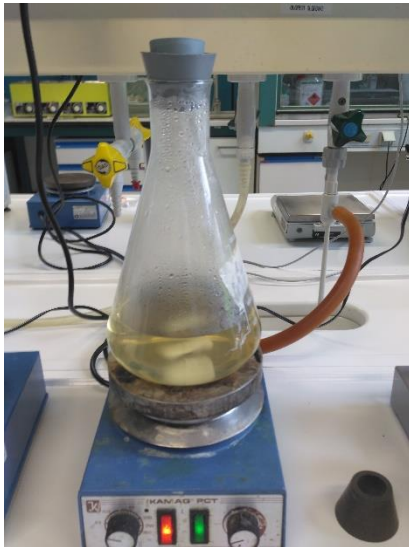


Figura 29.- Solución de agar técnico

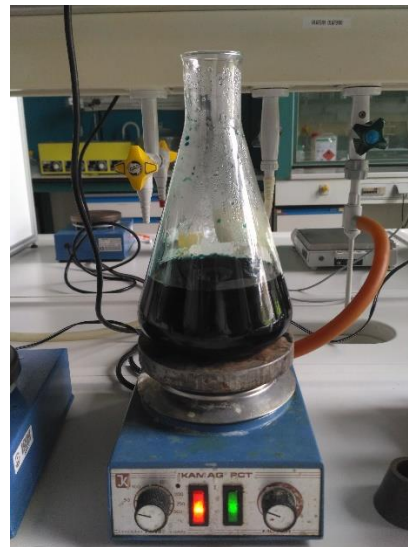


Figura 30.- Solución de agar técnico mezclada con el 20% de la reacción de ABTS preparada

Posteriormente, se vertieron 8 mL en cada placa de Petri y se dejó solidificar. Una vez solidificado se depositaron los discos de las películas comestibles con las distintas concentraciones de extracto de hinojo marino. Seguidamente, se realizaron las mediciones del diámetro del halo durante 0, 10, 60, 120, 180 y 240 minutos de reacción (reducción del ABTS por presencia del disco con y sin compuesto activo).



Figura 31.- Placa para ensayo de capacidad antioxidante

4.2.5 Ensayo de capacidad antimicrobiana

El ensayo de actividad antimicrobiana se basó en el método seguido por Ximena Carrión Granda (2015). Se realizó para ver qué capacidad tienen los recubrimientos comestibles de WPI, con distintas concentraciones de extracto de hinojo marino, de inhibir el crecimiento de las bacterias estudiadas. Las condiciones óptimas de crecimiento de las cuatro bacterias patógenas evaluadas se indican en la Tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones de crecimiento óptimas para cada bacteria

| Bacteria | <i>Aeromonas hydrophila</i> | <i>Shewanella putrefaciens</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Listeria innocua</i> |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Medio de cultivo líquido | TSB | TSB | NB2 | BHI |
| Medio de cultivo sólido | TSA | TSA | NB2 | BHI |
| Temperatura de incubación (°C) | 30 | 30 | 30 | 37 |

El ensayo comenzó con la preparación de los medios de cultivo de cada bacteria. Por un lado, se prepararon los medios de cultivo líquidos para inocular las bacterias, y por otro lado, se prepararon los medios de cultivo sólidos para la formación de las placas de Petri, placas en las que luego se realizó la siembra de cada bacteria. Cabe destacar que la única diferencia que hay entre los medios líquidos y sólidos es que el medio sólido contiene agar bacteriológico para que una vez frío se gelifique.

Se prepararon 2 botes de 80 mL de medio de cultivo líquido para cada bacteria. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

- Se adquirieron todos los materiales necesarios: medio TSB, medio BHI, medio NB1, extracto de levadura, cloruro de sodio y 8 botes de pirex de 100 mL. Seguido, se realizaron los cálculos para determinar cuánto medio había que añadir para la preparación del medio líquido. Tras la realización de los cálculos, se prepararon para las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Shewanella putrefaciens*, que necesitan de un medio TSB para crecer, 4 botes de TSB en los que cada bote llevaba 2,4 g de medio TSB y 80 mL de agua destilada. Para la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, que necesita de un medio NB2 para crecer, se prepararon 2 botes de 80 mL en los que cada bote contuvo 0,64 g de medio NB1, 0,16 g de extracto de levadura y 0,4 g de cloruro de sodio. Finalmente, para la *Listeria innocua*, que necesita de un medio BHI para crecer, se prepararon dos botes de 80 mL con 2,96 g de medio BHI cada uno.
- Se pesaron todos los medios en los botes de pirex correspondientes y se les añadió a cada uno de ellos los 80 mL de agua destilada y se homogenizaron.
- Se autoclavaron a 121°C durante 45 minutos y se dejaron enfriar. Una vez fríos se guardaron en el frigorífico.

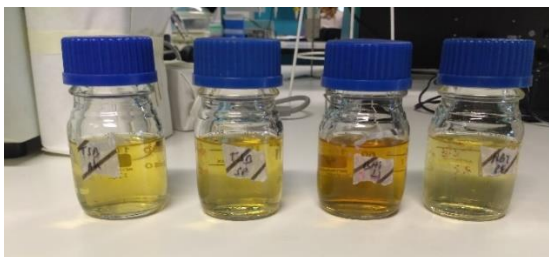


Figura 32.- Medios de cultivo líquidos para cada bacteria

Para preparar los medios de cultivo sólido lo único que cambió fueron las cantidades de medio y se les añadió agar bacteriológico para que se solidificaran. Para su preparación se siguieron los siguientes pasos:

- Se adquirieron todos los materiales necesarios: medio TSB, medio BHI, medio NB1, extracto de levadura, cloruro de sodio y 8 botes de pirex de 500 mL. Seguido, se realizaron los cálculos para determinar cuánto medio había que añadir para la preparación de medio sólido. Se tuvo en cuenta que todos los medios debían contener agar bacteriológico para que una vez fríos se pudiesen gelificar, de manera que si en 1L de agua destilada se añaden 15 gramos en 400 mL hay que añadir 6 g y en 300 mL hay que añadir 4,5 g. Tras la realización de los cálculos, se prepararon para las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Shewanella putrefaciens*, que necesitan de un medio TSB para crecer, 2 botes de TSA de 400 mL donde se añadieron 12 g de medio TSB y 6 g de agar bacteriológico y 2 botes de TSA de 300 mL donde se añadieron 9 g de medio TSB y 4,5 g de agar bacteriológico. Para la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, que necesita de un medio NB2 para crecer, por un lado, se preparó un bote de 400 mL que contuvo 3,2 g de medio NB1, 0,8 g de extracto de levadura, 2 g de cloruro de sodio y 6 g de agar bacteriológico, y por otro lado, se preparó un bote de 300 mL que contuvo 2,4 g de medio NB1, 0,6 g de extracto de levadura, 1,5 g de cloruro de sodio y 4,5 g de agar bacteriológico. Finalmente, para *Listeria innocua*, que necesita de un medio BHI para crecer, se preparó un bote de 400 mL con 14,8 g de medio BHI y 6 g de agar bacteriológico, y otro bote de 300 mL con 11,1 g de medio BHI y 4,5 g de agar bacteriológico.
- Se pesaron todos los medios y se introdujeron en los botes pirex correspondientes donde fueron diluidos con agua destilada y homogenizados.
- Se autoclavaron durante 45 minutos a 121°C.
- Se dejaron enfriar hasta unos 50°C aproximadamente y se vertieron uno 20-30 mL de medio en cada placa de Petri. Para cada bacteria se prepararon 34 placas de Petri (las placas fueron rotuladas mientras los medios estaban en el autoclave).
- Se dejaron enfriar las placas de Petri y se guardaron en el frigorífico.



Figura 33.- Placas de Petri preparadas para la inoculación de los microorganismos

Por otro lado, se preparó agua de peptona para poder determinar la cantidad de bacterias que se inocularon en las placas preparadas para hacer el ensayo de capacidad antimicrobiana. Se necesitaron 8 g de agua de peptona y 400 mL de agua destilada.

Una vez preparados todos los materiales necesarios para el ensayo, se inocularon las bacterias en el medio de cultivo líquido correspondiente y se incubaron durante 24 horas para que las bacterias crecieran. Todas las bacterias menos *L.innocua* se incubaron a 30°C mientras que *L.innocua* se incubó a 37°C.

Tras 24 horas se realizó el ensayo de capacidad antimicrobiana. Este ensayo estuvo dividido en dos etapas.

- Etapa 1: se sembraron las bacterias con asas formando un césped. Posteriormente, se situaron los discos de suero lácteo con las distintas concentraciones de extracto de hinojo marino y las placas se sellaron para asegurar la inocuidad de las placas.
- Etapa 2: se hicieron las diluciones de bacterias desde la -1 hasta la -9 en el agua de peptona. A partir de la dilución -3 se sembraron 2 placas de Petri por cada reducción logarítmica mediante perlas. Las placas también fueron selladas.

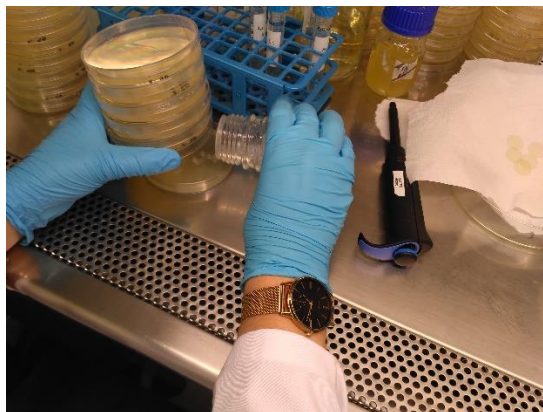


Figura 34.- Siembra de las diluciones para el recuento de microorganismos

Cada bacteria fue tratada por separado, es decir, estas dos etapas se realizaron primero con una bacteria y tras esto se desinfectaba la cámara de flujo laminar. Después, se realizaba con otra y así sucesivamente hasta haber realizado la siembra de las 34 placas de cada bacteria.

Estas placas se incubaron durante 24 horas. De la misma manera, se incubaron a 30°C todas las bacterias menos *L.innocua* que fue incubada a 37°C. Pasadas las 24 horas se observó el crecimiento microbiano y se hicieron los recuentos para poder determinar que se inocularon de 10^7 hasta 10^9 ufc/mL bacterias por placa.

Además, se realizó un ensayo donde el extracto de hinojo marino fue añadido directamente mediante unos discos de papel. Se añadieron 100 µL de extracto de hinojo marino en cada disco de papel.

Para la elaboración del ensayo, se siguieron los mismos pasos que en el caso de los discos a base de WPI, es decir, se prepararon los mismos medios de cultivo, se utilizaron las mismas bacterias y fueron incubadas en las mismas condiciones.

4.2.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics 22. Se observó la existencia de diferencias significativas entre las películas comestibles de WPI en las distintas concentraciones de hinojo marino. Para ello, se realizaron análisis de varianza simple (ANOVA). El primer análisis se realizó para observar si existían diferencias entre la capacidad antioxidante o antimicrobiana a las distintas concentraciones de hinojo marino, y el segundo, se realizó, solo en el caso del ensayo antioxidante, para observar las posibles diferencias en la capacidad antioxidantes a lo largo de los 240 minutos donde se realizaron 6 medidas del diámetro del halo.

El análisis de varianza simple indica que con una significación menos de 0,05 existen diferencias entre las muestras. También, se realizó un análisis Tukey de los resultados, donde su función fue agrupar los grupos en subconjuntos homogéneos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados preliminares

Se realizaron pruebas para determinar que el compuesto activo era compatible con los films hechos a base de WPI. Para ello, se siguió el protocolo habitual para hacer los films y se le añadió extracto de hinojo marino a distintas concentraciones, 0%, 0,5%, 1% y 2%.

En esta etapa se encontraron complicaciones, ya que se observó que al añadir el extracto del alga a la solución de proteína preparada para la elaboración de films se gelificaba.



Figura 35.- Solución formadora de películas comestibles gelificada al añadir el extracto de hinojo marino

La hipótesis planteada para dar sentido a este problema fue que el compuesto activo empleado poseía un pH ácido, por lo que al añadirlo a la solución de proteína este pH ácido hacía que la proteína llegaría a su punto isoeléctrico produciendo la gelificación. Las soluciones que se plantearon fueron disminuir la concentración de proteína y aumentar el pH ácido del hinojo a pH neutro.

Primero, se intentó solucionar disminuyendo la concentración de proteína y se observó que al añadir poco porcentaje de extracto funcionaba, pero al añadir el extracto en mayores concentraciones la solución se gelificaba igualmente. Asimismo, se decidió a parte de disminuir la concentración de proteína empleada aumentar el pH ácido a neutro. De esta manera se consiguió que la solución no gelificara, pudiendo elaborar las películas comestibles.

La disminución de concentración de proteína manteniendo los ratios de la solución formadora de películas comestibles, conllevó que en vez 0, 0,5, 1 y 2 gramos sobre 100 mL de agua destilada se añadieran 0, 0,4, 0,8 y 1,6 gramos de extracto de hinojo marino. De esta manera, se mantuvieron las proporciones.

5.2 Resultados finales

5.2.1 Ensayo de capacidad antioxidante

En la Figura 36 se muestran los resultados sobre el estudio de la capacidad antioxidante que presentó el extracto de hinojo marino a lo largo de 4 horas. En los cuatro tratamientos se observa actividad antioxidante. Esta actividad presenta una tendencia a ir incrementando en el

transcurso del tiempo. En la formulación con 0% de extracto de hinojo marino también se observa una leve actividad antioxidante, aunque no es significativo. Esta capacidad de la muestra control está justificada, ya que el WPI contiene un aminoácido esencial, fenilalanina, que se encarga de la síntesis de fenoles en las plantas superiores pudiendo haber reaccionado con el ABTS (Parra Huertas, 2009). Todas las formulaciones con extracto de hinojo marino presentaron una mayor capacidad antioxidante en relación al grupo control. Aunque, los tratamientos no fueron diferentes entre ellos, se observó una tendencia a una mayor capacidad antioxidante de las muestras con concentración del compuesto activo al 2%. Debido a los resultados obtenidos se corroboran los datos que se obtuvieron en el trabajo de Cortés Lainez (2017) quien evaluó la capacidad antioxidante de los extractos de hinojo marino, determinado un alto contenido de compuestos fenólicos.

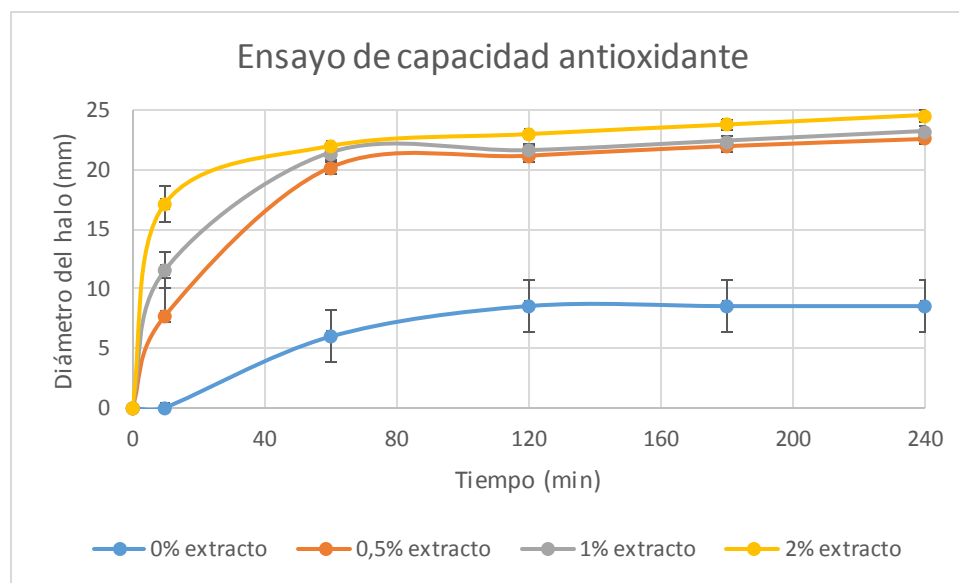


Figura 36.- Evolución de la capacidad antioxidante durante el tiempo de las 4 formulaciones estudiadas

En las Tablas 3 y 4 se presentan los análisis estadísticos realizados en el ensayo de actividad antioxidante. Por un lado, se observan diferencias significativas en las películas enriquecidas con extractos de hinojo marino ($p < 0,05$) en contraste a las películas sin extracto, es decir, se demuestra que el hinojo marino tiene propiedades antioxidantes gracias a los compuestos activos que posee. Sin embargo, no se observa significación entre las formulaciones con extracto, siendo irrelevante la cantidad de hinojo que se añade a la SFP para que muestre capacidad antioxidante. Por ello, los costes que pueden acarrear la elaboración de estas películas comestibles pueden ser bajos debido a que al añadir un 0,5% o un 2% del compuesto activo no influye en el grado de actividad antioxidante. Aunque, como se ha mencionado con anterioridad existe una tendencia al aumento de la actividad en la formulación con mayor cantidad de extracto de hinojo marino. Por otro lado, existen diferencias significativas en la medida del diámetro tomada a los 10 minutos, destacando la capacidad de la concentración al 2% del extracto. Los resultados expuestos indican que se produjo una reducción instantánea del compuesto activo produciéndose la reducción del reactivo ABTS, independientemente de la formulación. El método evaluado de actividad antioxidante fue efectivo, Urrutia Larraz (2010) obtuvo resultados similares al evaluar la actividad antioxidantes a través de ABTS de películas comestibles a base de caseínas enriquecidas con aceites esenciales. Por otro lado, Houta, Akrou, Najja, Neffati, & Amri (2015)

determinaron que los extractos de hinojo marino poseen capacidad antioxidantes por medio de reacción de ABTS.

Tabla 3.- Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo de capacidad antioxidante (tratamiento)

| Tratamientos | Subconjunto para $\alpha=0,05$ | |
|--------------|--------------------------------|--------------------|
| | a | b |
| 0% | 5,300 \pm 1,467 | - |
| 0,5% | - | 15,633 \pm 0,800 |
| 1% | - | 16,700 \pm 0,567 |
| 2% | - | 18,433 \pm 0,400 |

Tabla 4.- Resultados estadísticos obtenidos en el ensayo de capacidad antioxidante (tiempo)

| Tiempo | Subconjunto para $\alpha=0,05$ | | |
|--------|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| | a | b | c |
| 0 | 0,000 \pm 0,000 | - | - |
| 10 | - | 9,150 \pm 0,140 | - |
| 60 | - | - | 17,400 \pm 0,135 |
| 120 | - | - | 18,600 \pm 0,163 |
| 180 | - | - | 19,200 \pm 0,149 |
| 240 | - | - | 19,750 \pm 0,178 |

Es importante conocer, que debido a las propiedades de barrera de los recubrimientos y películas comestibles a base de WPI la difusión del compuesto activo fue muy lenta. La difusión presentada fue similar para todos los casos de las formulaciones que poseían el compuesto activo. Por tanto, en caso de utilizar otra matriz de recubrimiento puede que la difusión del compuesto activo sea mayor y se observe aún más capacidad antioxidante (Fernández-Pan et al., 2012).

En las siguientes fotos se observa como fue la evolución de la reacción de ABTS en el tiempo para las cuatro formulaciones estudiadas:

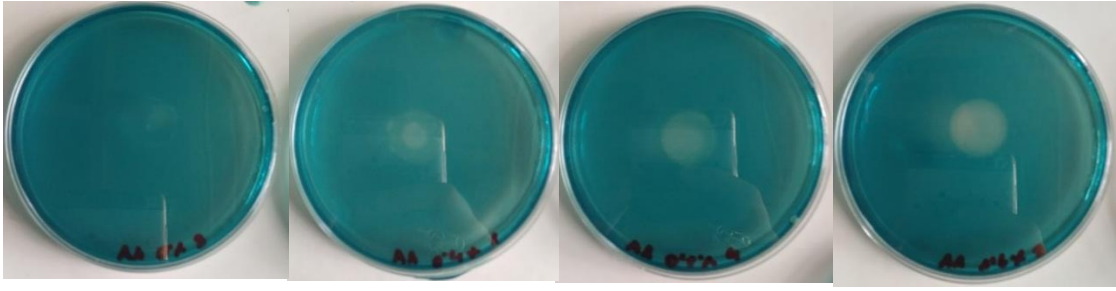


Figura 37.- Capacidad antioxidante en el minuto 10 (de izquierda a derecha- 0, 0,5, 1 y 2%)

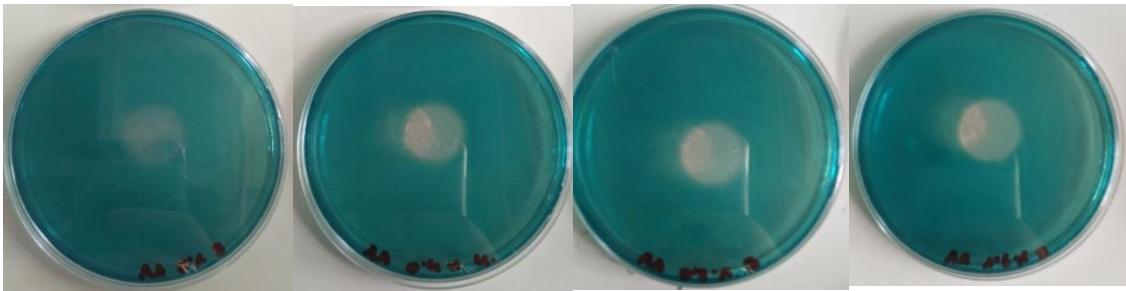


Figura 38.- Capacidad antioxidante en el minuto 60 (de izquierda a derecha- 0, 0,5, 1 y 2%)

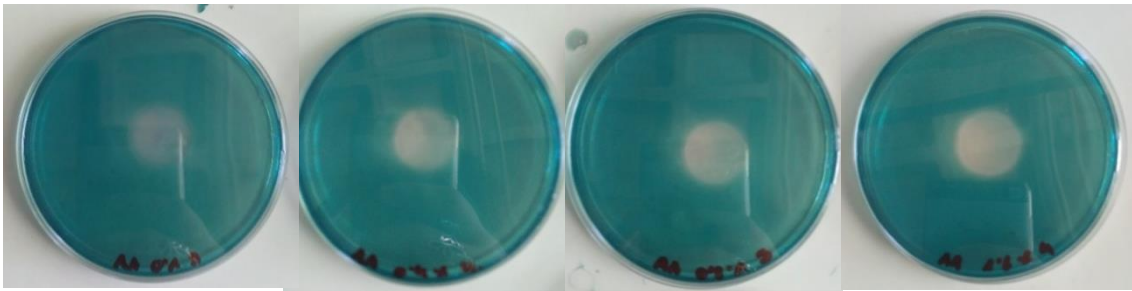


Figura 39.- Capacidad antioxidante en el minuto 120 (de izquierda a derecha- 0, 0,5, 1 y 2%)

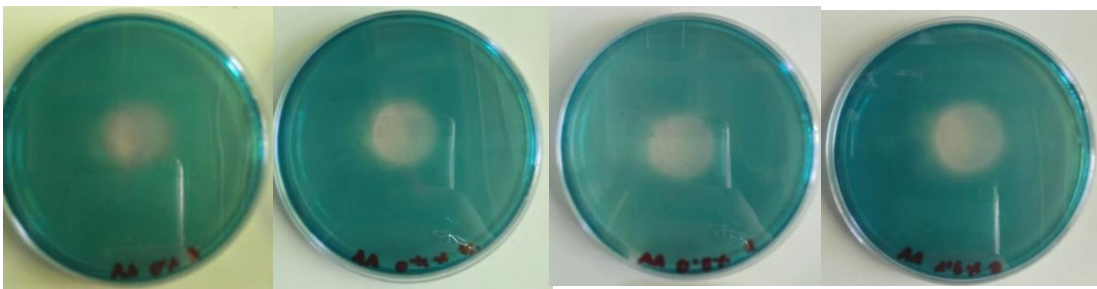


Figura 40.- Capacidad antioxidante en el minuto 180 (de izquierda a derecha- 0, 0,5, 1 y 2%)

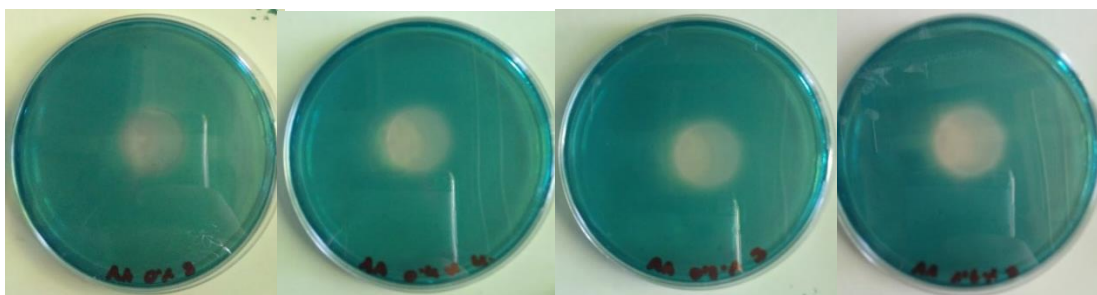


Figura 41.- Capacidad antioxidante en el minuto 240 (de izquierda a derecha- 0, 0,5, 1 y 2%)

5.2.2 Ensayo de capacidad antimicrobiana

En el ensayo de capacidad antimicrobiana no se observó actividad antimicrobiana para ninguno de los tratamientos evaluados (Tabla 5), es decir, no hubo presencia de halos en ninguna de las placas cultivadas.

Tabla 5.- Resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antimicrobiana

| Microorganismo | Tratamiento | | | |
|--------------------------------|-------------|------|----|----|
| | 0% | 0,5% | 1% | 2% |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | NA | NA | NA | NA |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> | NA | NA | NA | NA |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | NA | NA | NA | NA |
| <i>Listeria innocua</i> | NA | NA | NA | NA |

*NA: No Actividad

Existen estudios que demuestran que *Listeria innocua* es el microorganismo más sensible a los aceites esenciales de las plantas halófilas y, por el contrario, *Pseudomonas fluorescens* la más resistente. Esto se debe a que al ser gram-positiva y gram-negativa, respectivamente, los aceites esenciales no afectan igual a su estructura, ya que por lo general las gram-negativas son más resistentes gracias a la estructura de su pared celular (Iturriaga et al., 2012). Sin embargo, el hinojo marino no ha mostrado actividad antimicrobiana frente a las bacterias del estudio realizado en este trabajo de fin de grado.

La hipótesis planteada a este estudio es que el aumento del pH ácido del vegetal hasta pH neutro ha podido afectar a los resultados, es decir, se cree que este aumento de pH haya podido inhibir algún ácido orgánico de la planta afectando su capacidad antimicrobiana. Como explican Singh, ho Lee, Park, Shin, & Lee (2016) en su artículo científico, los ácidos orgánicos que hay presentes en esta clase de plantas son los responsables de esa capacidad antimicrobiana, ya que al

introducirse en las células de los microorganismos se disocian produciendo una sobreproducción de ATP para expulsar estos ácidos, mecanismo de protección de los microorganismos. En consecuencia, al producirse un agotamiento de la energía celular se consigue la inhibición de los microorganismos. Otro limitante sería que las películas comestibles a base de WPI difunden muy lentamente los compuestos activos que poseen (Fernández-Pan et al., 2012), es decir, puede que los microorganismos crezcan más rápido de lo que se difunde el compuesto activo.

En las siguientes imágenes se observan los resultados obtenidos en el caso de cada bacteria estudiada para las diferentes formulaciones:

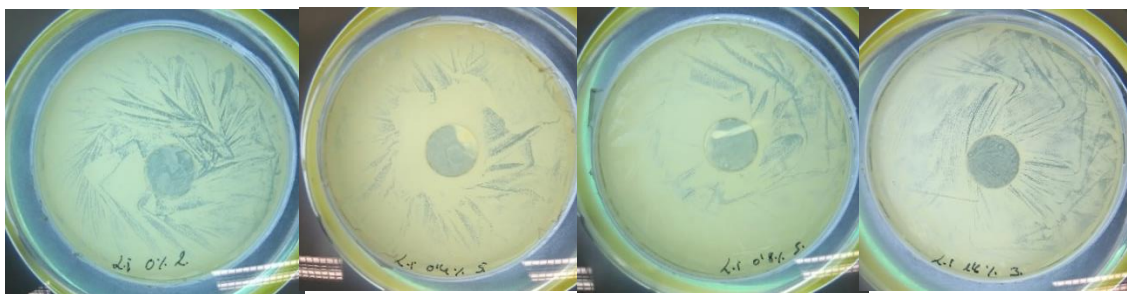


Figura 42.-Capacidad antimicrobiana para *Listeria innocua* (de izquierda a derecha 0, 0,5, 1 y 2%)

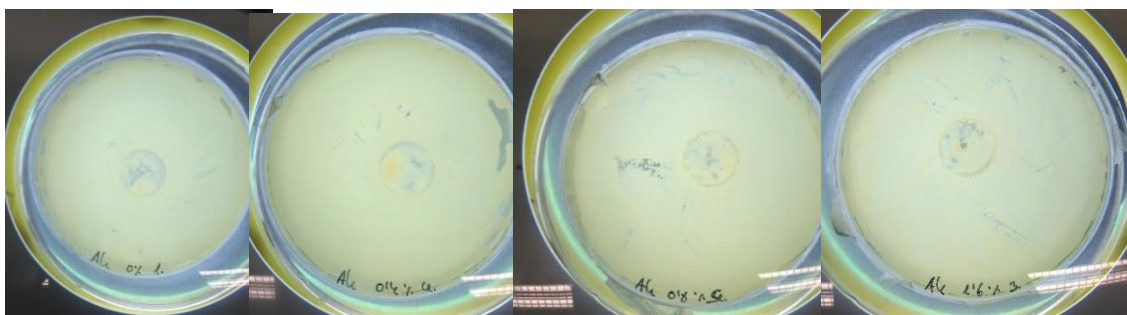


Figura 43.- Capacidad antimicrobiana para *Aeromonas hydrophyla* (de izquierda a derecha 0, 0,5, 1 y 2%)

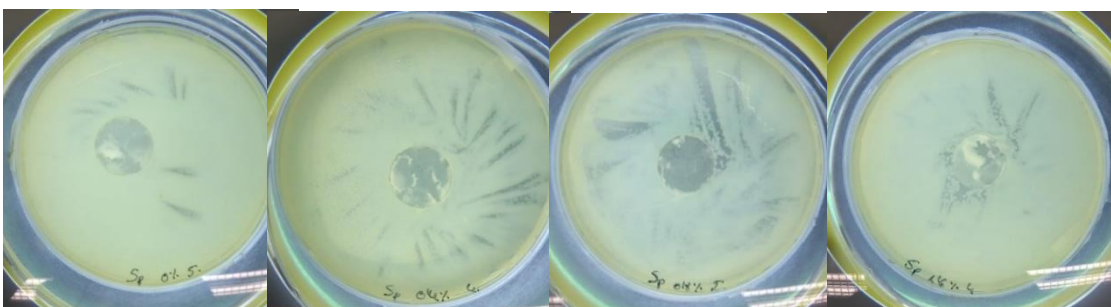


Figura 44.- Capacidad antimicrobiana para *Shewanella putrefaciens* (de izquierda a derecha 0, 0,5, 1 y 2%)

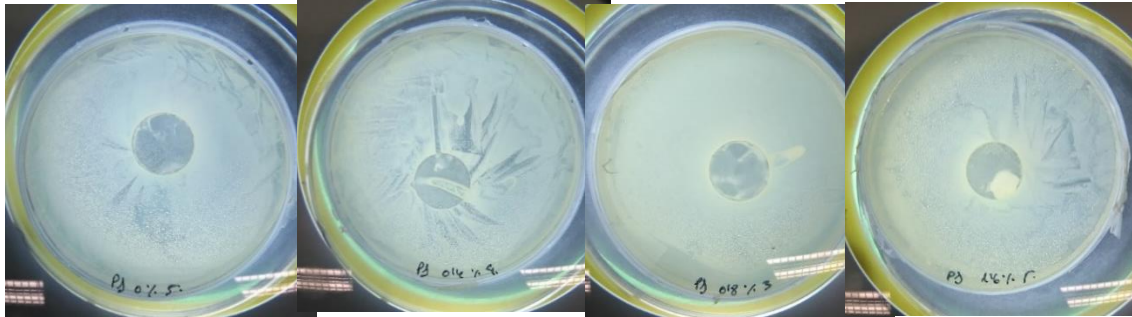


Figura 45.- Capacidad antimicrobiana para *Pseudomonas fluorescens* (de izquierda a derecha 0, 0,5, 1 y 2%)

Además, se corroboró que la neutralización del pH del extracto de hinojo marino y las propiedades de la película comestible a base de WPI si influyen en la actividad antimicrobiana del extracto de hinojo marino. La aplicación directa del compuesto activo en la superficie de las placas mostró una mínima capacidad antimicrobiana en las bacterias *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* (Tabla 6). De esta manera, se determina que el hinojo marino posee una leve actividad antimicrobiana y que se ve influenciada por la neutralización del pH del compuesto activo, ya que los ácidos orgánicos que confieren esta propiedad a esta planta halófila pueden inhibirse debido al cambio de pH, y de las propiedades de barrera de la película comestible. Las propiedades de barrera de las películas comestibles a base de WPI son muy elevadas, siendo la difusividad de los compuestos muy lenta, por lo que se determina que las bacterias crecen más rápido de lo que se difunden los compuestos del extracto a través de la superficie.

Tabla 6.- Actividad antimicrobiana mediante la adición directa del extracto de hinojo marino

| Microorganismos | <i>Aeromonas hydrophyla</i> | <i>Shewanella putrefaciens</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Listeria innocua</i> |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Diámetro del halo (mm) | NA | 18,33 ± 0,58 | 18,00 ± 0,00 | NA |

En las siguientes imágenes se observan los resultados obtenidos para cada bacteria estudiada:

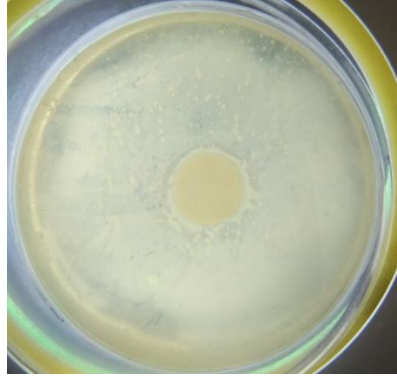


Figura 46.- Actividad antimicrobiana observada en Listeria innocua con la adición directa de extracto de hinojo marino

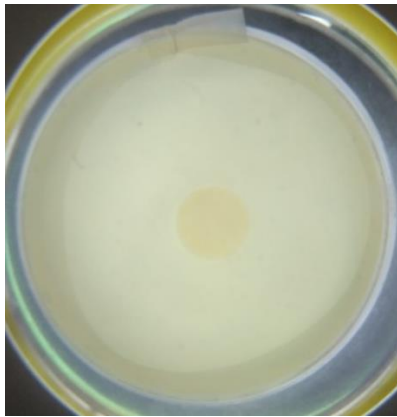


Figura 47.- Actividad antimicrobiana observada en Aeromonas hydrophyla con la adición directa de extracto de hinojo marino



Figura 48.- Actividad antimicrobiana observada en Shewanella putrefaciens con la adición directa de extracto de hinojo marino

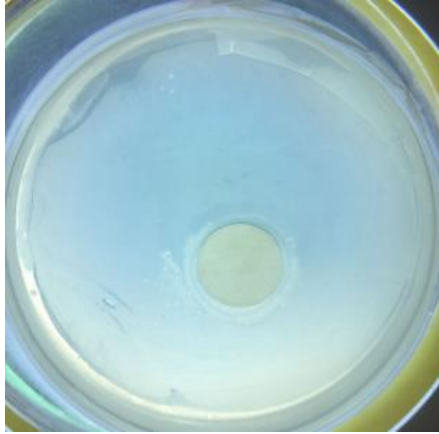


Figura 49.-Actividad antimicrobiana observada en Pseudomonas fluorescens con la adición directa de extracto de hinojo marino

6. CONCLUSIÓN

Se consiguieron películas comestibles de proteína de suero lácteo con extracto de hinojo marino mediante el control del pH, ya que el pH ácido que presenta el compuesto activo producía la gelificación de la solución formadora de películas antes de verterla en las placas de vidrio.

Las películas comestibles obtenidas fueron caracterizadas por tener una pobre capacidad antioxidante. Además, no presentaron capacidad antimicrobiana frente a las bacterias estudiadas. Los factores que pudieron incidir fueron los siguientes:

- El cambio de pH que se produjo para que la SFP no se gelificara.
- Las altas propiedades de barrera que presenta esta matriz, obteniendo una difusión de los compuestos lenta.

Se determinó que esta matriz no es compatible con el compuesto activo empleado por las problemáticas presentadas en la formación de películas comestibles y por la baja difusión de compuestos. Habría que estudiar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del hinojo marino en otra matriz que no presente problemas (sin aumento de pH) y con unas propiedades de barrera menos elevada, consiguiendo unos resultados más reales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Atia, A., Barhoumi, Z., Mokded, R., Abdely, C., & Smaoui, A. (2011). Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3564-3571.
- B., S. (2016). ¿Por qué hablamos tanto de los antioxidantes? Recuperado a partir de <https://www.cebanatural.com/¿por-que-hablamostanto-los-antioxidantes-blog-335.html>
- Caldwell, J. C. (2004). Demographic theory: A long view. *Population and development review*, 30, 297-316.
- Carrión Granda, X. (2015, octubre). *Development of active edible coatings to improve the microbiological quality and safety of fish and seafood products*. Universidad Pública de Navarra.
- Carrión Granda, X., Fernández Pan, I., Rovira, J., & Maté, J. I. (2018). Effects of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stores Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets, 2018, 12.
- Cortés Lainez, N. (2017, junio). *Estudio y evaluación de la extracción de compuestos fenólicos de hinojo marino (Crithmum maritimum)*. Universidad Pública de Navarra.
- Fernández-Pan, I., Royo, M., & Ignacio Maté, J. (2012). Antimicrobial Activity of Whey Protein Isolate Edible Films with Essential Oils against Food Spoilers and Foodborne Pathogens. *Journal of Food Science*, 77(7). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02752.x>
- Guerreiro Pereira, C., Barreira, L., Neng, N. da R., Florêncio Nogueira, J. M., Marques, C., Santos, T. F., ... Custódio, L. (2017). Searching for new sources of innovative products for the food industry within halophyte aromatic plants: In vitro antioxidant activity and phenolic and mineral contents of infusions and decoctions of *Crithmum maritimum* L.
- Hispack, S. I. del E., & Mbalaje. (2012). El envase inteligente de nuestros días. Recuperado a partir de <http://www.packaging.enfasis.com/articulos/65647-el-envase-inteligente-nuestros-dias>
- Houta, O., Akrou, A., Najja, H., Neffati, M., & Amri, H. (2015). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil from *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1459-1466. <http://doi.org/10.1080/0972060X.2013.764209>
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & de Marañón, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 58-64. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.001>
- López Cervantes, J. (2003, abril). *Estudio de la interacción envase-alimento: identificación y caracterización de sustancias de partida y aditivos en envases de uso en alimentos*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Lúis, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2013). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic and chlorogenic acids, 69-79.
- Meot-Duros, L., Le Floch, G., & Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 258-

262. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.024>

- Montalvo, C., López Malo, A., & Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína : características , propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 32-46. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.042>
- Montes, A. (2017). Plantas halófilas. Recuperado a partir de <https://www.gourmets.net/plantas-halofilas>
- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., ... Larbat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts.
- Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967-4982. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>
- Parzanese, M. (2006). Tecnologías para la Industria Alimentaria - PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*, 1-11.
- Pérez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)*, 315-323.
- PlassPack. (2015). Envases para alimentos desechables. Recuperado a partir de <http://plasspack.com/envases-para-alimentos-desechables>
- Ramos, Ó. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2014). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties.
- Renna, M., Gonnella, M., Caretto, S., Mita, G., & Serio, F. (2017). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): from underutilized crop to new dried product for food use. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(1), 205-216. <http://doi.org/10.1007/s10722-016-0472-2>
- Riechmann, J. (2005). Agricultura de verdad sostenible para el siglo XXI (diez tesis). *Agroalimentación para políticas de la tierra*.
- Rodrigues, M. J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., ... Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products*, 77, 315-322. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.061>
- Romero, A., Botella, M. Á., Obón, C., & Pretel, M. T. (2013). Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 944-952. <http://doi.org/10.3109/09637486.2013.821695>
- Singh, S., ho Lee, M., Park, Insik, Shin, Y., & Lee, Y. S. (2016). Antimicrobial seafood packaging: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2505-2518. <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2216-x>
- Urquijo, J. (2016). La superpoblación, el problema del siglo XXI. Recuperado a partir de <http://www.juditurquijo.com/blog/superpoblacion-problema-siglo-xxi/>

Urrutia Larraz, R. (2010, junio). *Estudio de la actividad antioxidante de films comestibles basados en zeína de maíz*. Universidad Pública de Navarra.

Zubero, I. (2015). ¿superpoblación o sobreconsumo? Malthusianismo práctico, exclusión global y población sobrante. *Scripta Nova*, 19.