



Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa **IS-FOOD**

Research Institute for Innovation & Sustainable Development in Food Chain

## **Desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles antimicrobianos para la conservación de productos derivados de la pesca**

### **Tesis Doctoral**

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Presentada por:

**Víctor Oswaldo Otero Tuárez**

Dirigida por:

**Dr. Juan I. Maté Caballero**

**Dra. Idoya Fernández Pan**

Pamplona, febrero de 2019



**Dr. Juan Ignacio Maté Caballero**, Catedrático de la Universidad Pública de Navarra, Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, y

**Dra. Idoya Fernández Pan**, Coordinadora de innovación del Basque Culinary Center.

### **INFORMAN**

Que la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles antimicrobianos para la conservación de productos derivados de la pesca” elaborada por **Víctor Oswaldo Otero Tuárez**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que cumple con las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar por el grado de Doctor.

**Dr. Juan I. Maté Caballero**

**Dra. Idoya Fernández Pan**



V.O-Tuárez

## Dedicada a

---

*A mi familia (madre, hijo, hermana, sobrinos y sobrinas)  
Mi esfuerzo por ustedes y para ustedes.*

**VO**



## Agradecimientos

---

Al Dr. Juan I. Maté Caballero, por Dirigir mi trabajo de Tesis, por confiar y creer en mí durante estos cinco años de trabajo de investigación. Gracias por acogerme y formar parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Idoya Fernández Pan, por todas las indicaciones y sugerencias dadas durante los ensayos experimentales. A la Dra. Ximena Carrión Granda, por apoyarme en mis inicios durante mi fase de formación investigadora. Por la paciencia durante los primeros ensayos experimentales, me dejaste encaminado para proseguir con mis objetivos.

Al equipo de investigación de la Línea de Recubrimientos Comestibles: Iñaki, Nerea, Uxue, y al grupo de Doctorandos del área de Tecnología de Alimentos: Sofía, Arantza, Carmenza. A pesar del poco tiempo, me han brindado su amistad, apoyo y ánimo para concluir con la memoria de Tesis Doctoral.

A los profesores: Montserrat Navarro, Cristina Arroqui, Carmen Barba, por las sugerencias y recomendaciones dadas cuando se las pedía. A todos los profesores del Máster Universitario en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias, por las enseñanzas impartidas que fueron parte de este proceso de formación investigadora.

A mis compañeros del Máster: Antonio Cirilo, Leticia Tomás y Sandy López, mis amigos inolvidables que durante esta fase fueron de gran apoyo.

Al Dr. Khalid Ziani, quien fue el promotor para que haya realizado la Tesis Doctoral. Dándome ánimo para buscar una beca y recomendarme una excelente universidad.

Al Sr. Cristóbal Véliz Salavarría y Sra. Riquilda Sabando Guerrero, por hacerme sentir parte de su familia, no dejarme solo y por estar conmigo durante estos años, y a cada una de las personas que hicieron posible mi estancia en la UPNA.

Finalmente, a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, por otorgarme la excedencia por el tiempo de duración de los estudios de Doctorado.

Gracias por todo

**VO**





Esta Tesis Doctoral fue realizada gracias a la financiación aportada por las siguientes instituciones:

Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) del Gobierno del Ecuador, que adjudicó una beca a **Víctor Oswaldo Otero Tuárez** en el Programa de Becas para Doctorado (PhD) para Docentes de Universidades y Escuelas Politécnicas, para iniciar un proceso de formación como investigador en el programa de Doctorado en Agroalimentación en la Universidad Pública de Navarra. En Pamplona, Navarra-España.

Grupo de investigación de Tecnología, Control y Seguridad Alimentaria (ALITEC) e Instituto de Investigación para la Innovación y el Desarrollo Sustentable en la Cadena Alimentaria (IS-FOOD) de la Universidad Pública de Navarra.

Proyecto AGL2014-52825-R “Aprovechamiento de plantas halófilas del litoral y descartes de la pesca para el diseño y desarrollo de productos pesqueros funcionales” del Ministerio de Ciencia, en colaboración con el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) y la Universidad Pública de Navarra.



## Resumen

---

Con el fin de mejorar la calidad microbiana y aumentar la vida útil de productos de pescado fresco, se propone el uso de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos como una tecnología emergente para complementar los procedimientos tradicionales de conservación empleados por la industria alimentaria.

En primer lugar, se combinaron dos estrategias distintas para conservar medallones de merluza (*Merluccius merluccius*) en refrigeración: i) la aplicación de un recubrimiento antimicrobiano con aceite esencial de orégano o carvacrol y ii) la reducción de la carga microbiana inicial mediante buenas prácticas de manejo y un tratamiento superficial mediante hipoclorito de sodio. El uso de ambas estrategias combinadas dio lugar a una reducción de los recuentos de todos los grupos bacterianos después de 12 días de almacenamiento que osciló entre 1.5 log y 8 log en *Pseudomonas* y en bacterias sulfito reductoras, respectivamente.

Por otra parte, nuevos agentes antimicrobianos fueron estudiados a nivel *in vitro*, incorporados en diferentes matrices formadoras de recubrimientos: proteína aislada de suero lácteo (WPI) y gelatina de pescado (GP). El arginato láurico (LAE) fue incorporado en las películas de GP en varias concentraciones. El LAE afectó al pH y la tensión superficial de la solución formadora de películas. La incorporación del LAE no afectó a las propiedades ópticas, ni a la humedad de las películas; pero sí a la solubilidad de las películas en agua. También afectó a las propiedades mecánicas de las películas, pero no a la permeabilidad al vapor de agua. Estas películas antimicrobianas, fueron más efectivas frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las bacterias Gram-negativas.

Otro agente estudiado fue el extracto de hinojo marino. Se evaluaron la capacidad antioxidante (CA) y el contenido total de polifenoles presentes en los extractos y su efecto en la incorporación en películas comestibles a base de WPI y GP. Para la obtención de los extractos se evaluaron dos métodos de secado: convencional mediante aire caliente y por liofilización. Las plantas deshidratadas fueron tratadas con dos concentraciones de etanol. Los extractos obtenidos mediante liofilización y alta concentración de etanol presentaron mayor concentración de polifenoles y alta CA. Se elaboraron películas activas con varias concentraciones de extracto y se evaluaron sus propiedades físicas, antioxidantes y antimicrobianas. El extracto agregado afectó a las propiedades físicas y mecánicas de las películas activas. Se observó CA de las películas mediante el método ABTS, pero no se presenció actividad antimicrobiana.



## Abstract

---

In order to improve the microbial quality increase the shelf-life of fresh fish products, antimicrobial edible films and coatings are proposed as an emerging technology with a high potential to complement the present conservation procedures used by the food industry.

Two distinct strategies were combined to preserve fresh fish (*Merluccius merluccius*) under refrigeration: i) the application of an antimicrobial edible coating enriched with oregano essential oil or carvacrol and ii) the reduction of initial microbial load by good handling practices and a superficial treatment with sodium hypochlorite. The use of both combined strategies resulted in a reduction of the counts of all bacterial groups after 12 days of storage, which ranged from 1.5 log and 8 log in *Pseudomonas* and H<sub>2</sub>S producing bacteria, respectively.

On the other hand, new antimicrobial agents were studied in vitro, incorporated in different coating matrices: whey protein isolated (WPI) and fish gelatin (FG). Lauric arginate (LAE) was incorporated into FG films in several concentrations. The LAE affected pH and surface tension of the film-forming solution. The films were not affected in their optical properties by the incorporation of this antimicrobial agent was not affected moisture of the films. The increase in LAE concentration, but the solubility in water was. Its mechanical properties of the films were affected, but the water vapor permeability. These active films were more effective against Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria.

Another agent studied were the extracts of marine fennel. Antioxidant capacity (AC) and total content of polyphenols present in the extracts were evaluated, and their effect on the incorporation into edible films based on WPI and FG. To obtain the extracts two drying methods were evaluated: conventional hot air drying and by freeze drying. The dehydrated plants were treated with two concentrations of ethanol. The extracts obtained by freeze drying and high level of ethanol presented higher concentration of polyphenols and higher AC. Active films were prepared with different level of extracts and the physical, antioxidant and antimicrobial properties were evaluated. The added extract affected the physical and mechanical properties of the active films. AC of the films was quantified by ABTS but no antimicrobial activity was observed.



## Presentación del trabajo desarrollado

---

En la memoria de Tesis Doctoral se presentan los trabajos de investigación desarrollados en los diferentes ensayos experimentales, que contribuyeron a la obtención de los objetivos generales planteados en esta Tesis y de esta manera aportar al desarrollo de nuevas películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos como técnica emergente para mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco.

La memoria de tesis doctoral se compone de cuatro capítulos. El capítulo primero consiste de una exhaustiva revisión bibliográfica actualizada de los principales trabajos de investigación relacionados con el desarrollo y las aplicaciones de películas y recubrimientos comestibles (PRC) y como portadoras de agentes antimicrobianos, centrados en asegurar la calidad microbiológica en el pescado fresco almacenado en refrigeración.

Los capítulos segundo, tercero y cuarto constituyen la parte experimental de la tesis. Este trabajo de investigación, consistió en primer lugar (capítulo dos) en la aplicación *in situ* de un recubrimiento comestible antimicrobiano sobre medallones frescos de merluza para mejorar su calidad microbiológica. En el tercero y cuarto capítulo, se evaluaron a nivel *in vitro* nuevos agentes antimicrobianos incorporados en dos biopolímeros diferentes, empleados como portadores de agentes antimicrobianos.

En el capítulo segundo, se combinaron dos estrategias distintas para mejorar la calidad microbiológica de medallones frescos de merluza. Estas estrategias consistieron en la aplicación de un recubrimiento comestible basado en proteína aislada de suero lácteo (WPI) incorporando aceite esencial de orégano (AEO) o carvacrol (CV), y la reducción de la carga microbiana inicial mediante buenas prácticas de manejo y la aplicación de un tratamiento superficial con hipoclorito de sodio (NaClO). Se llevaron a cabo tres ensayos experimentales con

pescado fresco y manipulado durante su procesamiento en diferentes condiciones de asepsia, dando lugar por tanto a tres diferentes cargas microbianas iniciales.

En los tres ensayos experimentales, los medallones de merluza fueron sumergidos en una solución formadora de película (SFP) que contenía AEO o CV. Para determinar el efecto de las estrategias aplicadas, se evaluó la evolución del crecimiento bacteriano durante 12 días a temperatura de refrigeración (4 °C), tanto para el grupo control (sin recubrimiento) como para los medallones recubiertos.

Se demostró que la efectividad de los recubrimientos antimicrobianos fue mucho mayor cuando la superficie del pescado tenía una carga microbiana inicial muy baja, lo que implicaba un efecto sinérgico entre ambas tecnologías. Se pudo concluir que, para asegurar un aumento en la vida comercial del pescado fresco a través de recubrimientos comestibles antimicrobianos, el pescado debió ser manipulado higiénicamente antes del tratamiento y/o debe ser sometido a un proceso de desinfección superficial.

En el capítulo tercero, se empleó gelatina de pescado (GP) como biopolímero estructural para el desarrollo de las PRC y como agente antimicrobiano se incorporó etil lauroil arginato (LAE). Las condiciones de los ensayos fueron optimizadas para evaluar el efecto del LAE sobre las propiedades tecnológicas y antimicrobianas de las mismas.

La incorporación del LAE en las películas comestibles a base de GP afectó sus características físicas y mecánicas y le atribuyó propiedades antimicrobianas. El LAE fue efectivo frente a tres de las cuatro cepas bacterianas ensayadas a partir de una concentración al 0.5 % (p/p). Por tanto, las películas comestibles antimicrobianas a base de GP con LAE, podrían aplicarse en la industria pesquera con el objeto de mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco.

Finalmente, en el capítulo cuarto, se diseñaron nuevas películas comestibles antimicrobianas, utilizando WPI y GP como biopolímeros estructurales para



el desarrollo de las películas comestibles activas, incorporando extracto de hinojo marino como agente antimicrobiano. Se evaluó el efecto del tipo de deshidratación de las plantas de hinojo marino y del tipo de solvente utilizado sobre las propiedades del extracto obtenido. Se determinó el rendimiento de la extracción, mediante la cuantificación del contenido total de polifenoles presentes en los extractos y de su capacidad antioxidante. Por último, se evaluó el efecto del contenido de extracto de hinojo marino sobre las propiedades tecnológicas de películas basadas en WPI y GP.

Las plantas de hinojo marino liofilizadas conservaron en mayor grado sus compuestos fenólicos volátiles. La incorporación de los extractos de hinojo marino afectó a la estabilidad de la SFP a base de WPI, pero no así de la SFP a base de GP. Durante la actividad antioxidante, la liberación de compuestos activos fue más rápida en las películas de GP a los 10 minutos. No se observó capacidad antibacteriana frente a las bacterias ensayadas (*L. innocua*, *A. hydrophila*, *S. putrefaciens* y *P. fluorescens*). Posiblemente se debió a las bajas concentraciones utilizadas en las películas comestibles. De acuerdo a los resultados observados, y debido al efecto considerable de los extractos de hinojo marino sobre la SFP a base de WPI, las películas comestibles basadas en GP serían las más adecuadas para ser utilizadas como matriz de recubrimiento incorporando extracto de hinojo marino.

## Índice

---

Resumen.....	I
Abstract .....	III
Presentación del trabajo desarrollado .....	V
Índice .....	VIII
Índice de Tablas.....	XII
Índice de Figuras.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XVII
<b>Capítulo 1.</b> Películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos para mejorar la calidad y seguridad microbiológica del pescado fresco.....	1
Resumen.....	3
1.1. Introducción.....	3
1.1.1. Deterioro causado por microorganismos en productos de pescado fresco .....	5
1.1.2. Manejo y conservación del pescado fresco.....	7
1.2. Formulación básica de las películas y recubrimientos comestibles.....	8
1.3. Películas y recubrimientos comestibles como portadoras de agentes antimicrobianos.....	12
1.4. Eficacia de los recubrimientos comestibles como portadores de agentes antimicrobianos.....	17
1.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana .....	20
1.6. Antimicrobianos usados en películas y recubrimientos comestibles .....	22
1.7. Aceites esenciales.....	23
1.8. Extractos de plantas (halófitas) .....	31
1.9. Etil lauroil arginato.....	35
1.10. Ácidos y sales orgánicas.....	41
1.11. Nisina.....	46
1.12. Otros antimicrobianos .....	50
Conclusiones.....	51
Referencias.....	52
<b>Chapter 2.</b> Combined effect of antimicrobial edible coatings with reduction of initial microbial load on the shelf-life of fresh hake ( <i>Merluccius merluccius</i> ) medallions .....	73
Abstract .....	75
2.1. Introduction .....	75
2.2. Materials y methods.....	78
2.2.1. Materials .....	78

2.2.2	Preparation of hake medallions.....	78
2.2.3	Preparation of the antimicrobial film-forming solutions (FFS).....	79
2.2.4	Preparation of coated samples.....	80
2.2.5	Microbiological analysis.....	80
2.2.6	Data Analysis .....	81
2.3.	Results y discussion .....	81
2.3.1.	Microbiological quality of fresh fish .....	81
2.3.2.	Shelf-life of uncoated samples .....	83
2.3.3.	Shelf-life of coated samples.....	85
	Conclusions.....	93
	References .....	93
	<b>Capítulo 3.</b> Efecto de la presencia de etil lauroil arginato en las propiedades tecnológicas de películas comestibles basadas en gelatina de pescado.....	97
	Resumen.....	99
3.1.	Introducción.....	99
3.1.	Materiales y métodos .....	102
3.1.1.	Materiales.....	102
3.1.2.	Protocolo de preparación de las películas comestibles con y sin LAE.....	103
3.1.3.	Caracterización de la solución formadora de película (SFP).....	104
3.1.4.	pH.....	104
3.1.5.	Turbidez .....	104
3.1.6.	Tensión superficial .....	105
3.1.7.	Espesor de las películas comestibles.....	105
3.1.8.	Color .....	105
3.1.9.	Transparencia .....	106
3.1.10.	Contenido de humedad .....	107
3.1.11.	Solubilidad en agua .....	107
3.1.12.	Propiedades mecánicas.....	108
3.1.13.	Permeabilidad al vapor de agua (WVP).....	109
3.1.14.	Propiedades antimicrobianas de las películas comestibles .....	110
3.1.15.	Análisis estadístico .....	111
3.2.	Resultados y discusión .....	112
3.2.1.	Características físicas de las soluciones formadoras de películas.....	112
3.2.1.1.	Apariencia, turbidez, pH y tensión superficial .....	112
3.2.2.	Características físicas de las películas comestibles .....	114
3.2.2.1.	Espesor, color y transparencia .....	114
3.2.2.2.	Contenido de humedad .....	116
3.2.2.3.	Solubilidad en agua .....	118

3.2.2.4. Permeabilidad al vapor de agua .....	120
3.2.2.5. Propiedades mecánicas de las películas comestibles.....	122
3.2.2.6. Capacidad antimicrobiana de las películas comestibles .....	129
Conclusiones.....	135
Referencias.....	136
<b>Capítulo 4.</b> Caracterización tecnológica de extractos de hinojo marino ( <i>Crithmum maritimum</i> ) y el efecto de su incorporación en las propiedades de las películas comestibles.....	141
Resumen.....	143
4.1. Introducción.....	143
4.1. Materiales y métodos .....	147
4.1.1. Materiales.....	147
4.1.2. Secado convencional.....	149
4.1.3. Liofilización .....	149
4.1.4. Actividad de agua .....	150
4.1.5. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) .....	150
4.1.6. Protocolo de obtención de los extractos .....	151
4.1.7. Color .....	153
4.1.8. Contenido total de polifenoles de los extractos.....	153
4.1.9. Capacidad antioxidante de los extractos.....	154
4.1.10. Protocolo de elaboración de películas comestibles basadas en WPI y extracto de hinojo marino.....	155
4.1.11. Protocolo de elaboración de películas comestibles basadas en gelatina de pescado más extracto de hinojo marino.....	156
4.1.12. Espesor de las películas comestibles.....	157
4.1.13. Contenido de humedad de las películas comestibles.....	157
4.1.14. Solubilidad en agua de las películas comestibles.....	158
4.1.15. Propiedades mecánicas de las películas comestibles.....	158
4.1.16. Permeabilidad al vapor de agua (WVP).....	160
4.1.17. Capacidad antioxidante de las películas comestibles activas.....	161
4.1.18. Propiedades antimicrobianas de las películas comestibles activas.....	162
4.1.19. Análisis estadístico .....	163
4.2. Resultados y discusión .....	164
4.2.1. Caracterización de las plantas de hinojo marino deshidratadas.....	164
4.2.2. Caracterización fitoquímica de la planta de hinojo marino .....	167
4.2.3. Color de los extractos de hinojo marino.....	170
4.2.4. Contenido total de polifenoles de los extractos.....	172

4.2.5.	Capacidad antioxidante de los extractos.....	175
4.2.6.	Efecto de los extractos sobre el pH de las soluciones formadoras de películas activas.....	177
4.2.7.	Apariencia y espesor de las películas activas .....	180
4.2.8.	Contenido de húmeda de las películas activas .....	182
4.2.9.	Solubilidad en agua de las películas activas .....	184
4.2.10.	Propiedades mecánicas de las películas comestibles activas.....	187
4.2.11.	Permeabilidad al vapor de agua .....	193
4.2.12.	Capacidad antioxidante de las películas comestibles .....	195
4.2.13.	Capacidad antimicrobiana de las películas comestibles .....	199
	Conclusiones.....	203
	Referencias.....	204
	<b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	213
	Conclusiones finales .....	215

## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.1.</b> Principales materiales utilizados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles.....	10
<b>Tabla 1.2.</b> Estudios realizados sobre la aplicación de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos en pescado.....	14
<b>Tabla 1.3.</b> Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de pescado.....	24
<b>Tabla 1.4.</b> Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de pescado.....	33
<b>Tabla 1.5.</b> Estudios de la eficacia antimicrobiana del LAE, solo, combinado e incluido en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos frescos y procesados.....	37
<b>Table 2.1.</b> Microorganisms associated with fish spoilage and culture conditions.....	81
<b>Tabla 3.1.</b> Condiciones de cultivo para los microorganismos seleccionados. ...	111
<b>Tabla 3.2.</b> Propiedades físicas de las soluciones formadoras de películas. ....	112
<b>Tabla 3.3.</b> Determinación de color ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ) y transparencia de las películas comestibles.....	115
<b>Tabla 4.1.</b> Condiciones de cultivo para los microorganismos seleccionados. ...	163
<b>Tabla 4.2.</b> Composición fitoquímica del hinojo marino.....	168
<b>Tabla 4.3.</b> pH de las soluciones formadoras de películas.....	179
<b>Tabla 4.4.</b> Actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de GP y de WPI.....	201

## Índice de Figuras

<b>Figure 2.1.</b> Total microorganism counts (log CFU g <sup>-1</sup> ) associated with fish spoilage in samples of fresh uncoated hake (control group) during 12 days at 4 °C. Test A, fish filleted at the fish market. Test B, fish filleted in laboratory. Test C, fish eviscerated y filleted in laboratory. Different letters (a, b and c) indicate significant differences in each bacterial group. ND: non-detectable. ....	84
<b>Figure 2.2.</b> Total mesophilic and psychrotrophic bacteria counts (tests: A, B y C), during 12 days of refrigeration at 4 °C. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI y OEO; WPI + CV: coating with WPI y CV. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Oregano essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ✕-WPI+CV. ....	86
<b>Figure 2.3.</b> Total <i>Pseudomonas</i> spp., and Enterobacteriaceae counts (tests: A, B and C) for 12 days of refrigeration at 4 °C. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI and OEO; WPI + CV: coating with WPI and CV. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Oregano essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ✕-WPI+CV. ND: non-detectable. ....	88
<b>Figure 2 4.</b> Total Lactic acid bacteria and H <sub>2</sub> S producing bacteria counts (tests: A, B and C) for 12 days of cooling at 4 °C. Test C, is not included in the figure of Lactic acid bacteria, because no bacterial growth was detected in the samples. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI and OEO; WPI + CV: coating with WPI and CV. Different letters (a, b) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Oregano essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ✕-WPI+CV. ND: non-detectable. ....	90
<b>Figura 3.1.</b> Apariencia de la solución formadora de película (SFP) con diferentes concentraciones de etil louroil arginato (LAE). ....	113
<b>Figura 3.2.</b> Películas comestibles a base de gelatina de pescado con diferentes concentraciones de etil louroil arginato (LAE). ....	116
<b>Figura 3.3.</b> Contenido de humedad de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR. ....	118

<b>Figura 3.4.</b> Contenido de solubilidad de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúsculas (a, b) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR....	119
<b>Figura 3 5.</b> Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas comestibles a base de gelatina de pescado y diversos niveles de etil louroil arginato (LAE). Letras iguales en minúsculas (a) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos.....	121
<b>Figura 3 6.</b> Tensión máxima de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE; Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.....	123
<b>Figura 3 7.</b> Representación gráfica de las propiedades mecánicas de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE) acondicionadas al 57 % y 75 % de HR, respectivamente. ....	124
<b>Figura 3 8.</b> Elongación relativa de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR. ....	126
<b>Figura 3 9.</b> Módulo de Young de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR. ....	128
<b>Figura 3 10.</b> Actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de GP con LAE frente a <i>A. hydrophila</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. putrfaciens</i> y <i>L. innocua</i> . Letras distintas en minúsculas (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre concentraciones de etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en mayúscula (A, B, C, D) indican diferencias significativas entre microorganismos.....	130
<b>Figura 4.1.</b> Hinojo marino fresco utilizado para el desarrollo del trabajo. ....	148
<b>Figura 4.2.</b> Plantas de hinojo marino congeladas con nitrógeno líquido.....	150
<b>Figura 4.3.</b> Curva de calibrado del método Folin-Ciocaltau.....	154
<b>Figura 4.4.</b> Plantas de hinojo marino deshidratadas y envasadas al vacío. PL: planta deshidratada mediante liofilización, PC: planta deshidratada por medio convencional. ....	166



- Figura 4.5.** Cromatografía GC – MS de las plantas de hinojo marino. 6) sabineno, 12) p-cymeno, 14)  $\beta$ -cis-ocimeno, 16)  $\gamma$ -terpineno, 29) timol metil éter. 30) carvacrol metil éter, 44) miristicina, 47) apiol, 48) Dill apiol..... 170
- Figura 4.6.** Parámetros de color de extractos de hinojo marino deshidratados. Conv-50 y Conv-75: secado convencional; Liof-50 y Liof-75: secado mediante liofilización (50:50 y 75:25)-etanol:agua. Letras diferentes (a, b, c) indican diferencia significativa entre concentraciones de solvente..... 171
- Figura 4.7.** Concentración de polifenoles presentes en las muestras de extracto seco de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre muestras de extracto. Letras iguales en mayúsculas (A) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos de secado... 173
- Figura 4.8.** Capacidad antioxidante de los extractos de hinojo marino. Letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas entre las muestras de extracto. Letras iguales en mayúsculas (A) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos de secado. .... 176
- Figura 4.9.** Solución formadora de película basada en WPI con extracto de hinojo marino sin pH modificado..... 179
- Figura 4.10.** Secado de películas basadas en proteína aislada de suero lácteo y gelatina de pescado con o sin extracto, respectivamente..... 181
- Figura 4.11.** Espesor de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo..... 182
- Figura 4.12.** Contenido de humedad de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo. .... 183
- Figura 4.13.** Solubilidad en agua de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo..... 185
- Figura 4.14.** Tensión máxima de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c)

indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo..... 188

**Figura 4.15.** Elongación relativa de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo. .... 190

**Figura 4.16.** Módulo de Young de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína de suero aislado de leche.....191

**Figura 4.17.** Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína de suero aislado de leche.....194

**Figura 4.18.** Actividad antioxidante de las películas comestibles activas. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre tratamientos..... 197

**Figura 4.19.** Actividad antioxidante de las películas comestibles activas basadas en proteína aislada de suero lácteo (WPI). De izquierda a derecha, concentraciones de extracto de hinojo marino: 0 %, 0.5 %, 1 % y 2%, incubadas durante 240 min..... 198

## Lista de abreviaturas

---

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AEO	Aceite esencial de orégano
AO	Ácidos orgánicos
$a_w$	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
BSR	Bacterias sulfito reductoras
CA	Capacidad antioxidante
CTP	Contenido total de polifenoles
CV	Carvacrol
GP	Gelatina de pescado
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
HR	Humedad relativa
LAE	Etil lauroil arginato
NaClO	Hipoclorito de sodio
PRC	Películas y recubrimientos comestibles
SFP	Solución formadora de película
SPI	Proteína aislada de soja
UFC	Unidades formadoras de colonia
WPI	Proteína aislada de suero lácteo
WVP	Permeabilidad al vapor de agua

# **Capítulo 1. Películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos para mejorar la calidad y seguridad microbiológica del pescado fresco**

---



## Resumen

---

Con el fin de aumentar tanto la seguridad alimentaria como la calidad microbiológica del pescado fresco, se proponen películas y recubrimientos comestibles (PRC) antimicrobianos como una tecnología consolidada para complementar los procedimientos reales de conservación empleados por la industria pesquera. Estas PRC pueden actuar como portadoras de diferentes tipos de antimicrobianos que ofrecen migración controlada a los productos, manteniendo dosis efectivas en la superficie del pescado. Su efectividad depende de la naturaleza y el tipo de hidrocoloide utilizado como matriz estructural, la calidad microbiológica del pescado fresco y la interacción entre el recubrimiento y el producto. Esta revisión actualiza los principales trabajos relacionados con el desarrollo y las aplicaciones de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos para mejorar la calidad microbiológica de los productos de pescado fresco y extender su vida útil.

### 1.1. Introducción

---

La seguridad y calidad de los productos de pescado fresco es una prioridad para la industria alimentaria y para los consumidores de todo el mundo, porque son altamente perecederos debido a su rico contenido de nutrientes. Los productos pesqueros son susceptibles a la colonización y al desarrollo de una gran cantidad y variedad de microorganismos asociados al deterioro y patogenicidad, que luego son transmitidos por los alimentos a los consumidores. La microbiota inicial del pescado (flora microbiana al comienzo de la vida útil del producto) consiste en la microbiota nativa y exógena. La microbiota nativa se refiere a las poblaciones bacterianas naturales que se pueden encontrar en la piel, las branquias y el tracto digestivo y están relacionadas con las aguas en que viven los peces (Boziaris y Parlapani, 2017).

La microbiota exógena se origina a partir de la contaminación del producto con microorganismos del medio ambiente terrestre, superficies de contacto con alimentos, trabajadores, entre otras causas durante la manipulación del producto. Solo una parte de la microbiota nativa prevalece bajo el almacenamiento aplicado (temperatura, atmósfera) y condiciones de procesamiento (salazón, acidificación, tratamientos térmicos, ahumado, envases antimicrobianos, otros.), crece más rápido que el resto de microorganismos y se convierte en la microbiota de deterioro dominante (Gram y Huss, 1996). La fracción de la microbiota dominante que presenta el potencial de deterioro (capacidad cualitativa para producir malos olores) y la actividad de deterioro (capacidad cuantitativa para producir metabolitos) se conocen como organismos de deterioro específicos (Gram y Dalgaard, 2002).

Los peces vivos y sanos no contienen microorganismos en su carne. Los microorganismos solo se pueden encontrar en la piel, las branquias y el tracto digestivo (Parlapani *et al.*, 2015). Solo después de la muerte de los peces, los microorganismos colonizan la carne. La microbiota inicial de la carne de pescado se caracteriza por su baja abundancia y alta diversidad. Numerosos trabajos han llegado a la conclusión de que los recuentos totales viables de la carne de pescado suelen estar en el rango de  $10^2$  a  $10^5$  log UFC g<sup>-1</sup> (ICMSF, 2005) mientras que su diversidad es bastante alta. La microbiota inicial consta de varios géneros como: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Photobacterium* y *Aeromonas* que son bacterias Gram-negativas, mientras que las bacterias ácido lácticas (BAL), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vagococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* son los géneros Gram-positivos más comunes de la microbiota inicial (Gram *et al.*, 1990; Gram y Huss, 1996; Gennari *et al.*, 1999; Gram, 2009; Svanevik y Lunestad, 2011; Parlapani *et al.*, 2015). Las *Enterobacteriaceae*, *Estafilococos*, *Listeria* y otros microorganismos

también se pueden encontrar en la población microbiana inicial, principalmente como microbiota de contaminación (Huss *et al.*, 2000).

La presencia de estos microorganismos pueden causar importantes problemas de seguridad alimentaria que afectarían a los consumidores, industrias y economías enteras (Lampila y McMillin, 2012). Por lo tanto, es esencial implementar tecnologías de conservación apropiadas ya que la prevalencia de patógenos transmitidos por el pescado y el número de brotes detectados anualmente en todo el mundo son altos. Esto probablemente se deba al reciente aumento en el consumo de productos preparados, que son vulnerables a la contaminación durante el manejo (Calo *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Además de importantes problemas de seguridad, el crecimiento de microorganismos que alteran los productos de pescado fresco es responsable de los cambios en el sabor, el olor y la apariencia; que limitan su calidad y vida útil, causando pérdidas económicas sustanciales en la industria. Así, es esencial para la industria aumentar la vida útil de los productos de pescado fresco, mediante los avances en las prácticas consolidadas de las tecnologías de conservación y envasado (Leceta *et al.*, 2014; Etxabide *et al.*, 2017). Aunque el deterioro del pescado fresco puede acelerarse mediante la proteólisis, la lipólisis de la fracción grasa o la oxidación de los lípidos, el factor más importante que determina el mantenimiento de la calidad de los productos de pescado fresco es el crecimiento microbiano.

### **1.1.1. Deterioro causado por microorganismos en productos de pescado fresco**

Los consumidores exigen filetes frescos o descongelados, generalmente envasados en atmósfera, así como el pescado envasado al vacío procesado en una atmósfera controlada, que no ha sido expuesto a ningún otro tratamiento que no



sea la refrigeración para garantizar su conservación (Nosedá *et al.*, 2012). El pescado fresco tiene una alta actividad de agua y altas concentraciones de nutrientes fácilmente disponibles; por lo tanto, es susceptible al crecimiento microbiano. La descomposición del pescado fresco se entiende como el proceso por el cual el alimento se deteriora hasta el punto en que los humanos lo consideran no comestibles o se reduce su calidad, lo que lo hace indeseable, no apto para la venta o el consumo. Esto generalmente resulta de la actividad metabólica de una variedad de microorganismos (Boziaris y Parlapani, 2016).

Aunque la microbiota de pescado inicialmente consiste en una amplia gama de géneros bacterianos, las condiciones impuestas de procesamiento y almacenamiento, así como otros factores implícitos causan la selección de pocos microorganismos que, a medida que crecen superan a los otros y finalmente dominan el producto (microbiota de deterioro). Por lo tanto, la composición de la microbiota de deterioro depende de la diversidad de la microbiota inicial y de los factores extrínsecos, intrínsecos e implícitos que afectan el crecimiento de microorganismos en los alimentos. La microbiota de deterioro está conectada a la microbiota inicial del pescado, las condiciones de procesamiento, la temperatura de almacenamiento y la atmósfera, así como a cualquier interacción microbiana.

En el pescado refrigerado almacenado bajo condiciones aeróbicas, la microbiota del deterioro contiene géneros que pueden crecer rápidamente de forma aeróbica a bajas temperaturas como: las *Pseudomonas* y *Shewanella*, mientras que con oxígeno reducido y dióxido de carbono elevado (envasado en atmósfera modificada/MAP) las *Photobacterium*, *BAL*, y *Brochothrix thermosphacta* suelen dominar (Parlapani *et al.*, 2014, 2015; Boziaris y Parlapani, 2017). Por lo tanto, durante el almacenamiento, el deterioro se produce por el crecimiento de bacterias y su metabolismo; produciendo malos olores, sabores extraños, cambios de textura y formación de secreción. Las condiciones ambientales de almacenamiento

como la temperatura (es el factor más importante que influye en la tasa de deterioro del pescado y su seguridad), atmósfera gaseosa (aire, vacío, uso de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) y pH interactúan para afectar el crecimiento bacteriano, determinando la vida útil del pescado fresco (entendido como el período de tiempo durante el cual la calidad definida del pescado sigue siendo aceptable en las condiciones de distribución, almacenamiento y consumo esperados o especificados).

### 1.1.2. Manejo y conservación del pescado fresco

Las industrias pesqueras tienen interés continuo en el desarrollo de tecnologías para prolongar la vida útil y mejorar la aceptación de los productos de origen marino por parte de los consumidores, a la vez que se mantiene la calidad nutricional y se garantiza la seguridad de los alimentos. La prolongación de la vida útil del pescado fresco se puede lograr utilizando varios enfoques: almacenamiento refrigerado, MAP o envasado al vacío. Dado que la demanda de los consumidores de alimentos mínimamente procesados está aumentando, la tecnología más empleada en la industria del pescado es el envasado en MAP y el envasado al vacío (ICMSF, 2011).

Las nuevas tecnologías para la conservación de pescado fresco son técnicas de desactivación microbiana no térmica. Los más importantes son la alta presión hidrostática (Günlü *et al.*, 2014), biopreservación (Angiolillo *et al.*, 2018), el uso de aditivos naturales y nuevos sistemas de envasado como MAP, y al vacío (Carrión-Granda *et al.*, 2018) y envases activos (Adilah *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Además, la conservación de los alimentos puede implicar la combinación de diferentes procesos antimicrobianos para que puedan alcanzar objetivos específicos en términos de calidad microbiológica.

Las PRC se utilizan en pescado fresco y procesado para mejorar su calidad y aumentar la vida útil al retrasar la pérdida de humedad, reducir la oxidación de lípidos, mejorar la calidad microbiológica y la apariencia del producto (Ramos *et al.*, 2012; Carrión-Granda *et al.*, 2016a,b, 2017, 2018; Dehghani *et al.*, 2018). Como tal, las PRC se han propuesto como tecnologías ya consolidadas para mejorar la seguridad y prolongar la vida útil de los sistemas alimentarios, retrasando el crecimiento microbiano en las superficies de los alimentos; actuando como portadoras de los mismos antimicrobianos utilizados actualmente para los productos de pescado fresco y optimizando y administrando dosis efectivas.

El objetivo de esta revisión es presentar una descripción detallada del desarrollo y la eficacia de las PRC aplicadas en la superficie del pescado como portadoras de antimicrobianos para mejorar la seguridad del producto y prolongar la vida útil. Se discuten las películas comestibles y las formulaciones de recubrimiento, los antimicrobianos empleados con más frecuencia, las técnicas utilizadas para determinar la eficacia antimicrobiana y la determinación de la liberación controlada.

## **1.2. Formulación básica de las películas y recubrimientos comestibles**

Una película o recubrimiento comestible se puede definir como una capa fina continua de material comestible que se extiende sobre la superficie de un alimento o como varias capas separadas de un sistema alimentario para mejorar su calidad y/o extender su vida útil. Entre las razones específicas clásicas para usar esta tecnología se encuentran: controlar la transferencia de masa, las condiciones de la superficie, la protección física y mecánica, el transporte y la dosificación, así como también mejorar las experiencias sensoriales (Fernández-Pan y Maté Caballero, 2011).

La formulación básica de una película o recubrimiento comestible, está compuesta por al menos un componente capaz de formar una matriz estructural. Los principales materiales utilizados son hidrocoloides (proteínas o carbohidratos), lípidos y/o compuestos (Tabla 1.1). En resumen, las principales proteínas actualmente utilizadas en la elaboración de PRC son: colágeno y gelatina, gluten de maíz, gluten de trigo, proteína de soja, caseína y proteína aislada de suero lácteo (WPI). Entre ellos, el colágeno puede destacarse como la película de proteína comestible comercialmente más exitosa, ya que el colágeno se ha utilizado tradicionalmente para la producción de tripas de salchichas comestibles, que reemplazan los intestinos naturales de los animales, y también en la producción de fuente de gelatina tanto de origen bovino, porcino y marino. Otras fuentes de proteínas son: el cacahuete, el arroz, el guisante, la albúmina de huevo, la kafirina de sorgo y proteínas miofibrilares que también se usan en el desarrollo de PRC, pero en menor cantidad. Entre los polisacáridos más empleados en el desarrollo de PRC, se pueden encontrar derivados de celulosa y almidones. Los extractos de plantas, las pectinas y las gomas también se emplean para formar PRC (Fernández-Pan y Maté Caballero, 2011; Pereira *et al.*, 2017). El quitosano, obtenido a partir de la desacetilación alcalina de la quitina; es ahora uno de los polisacáridos más investigados para sus posibles aplicaciones alimentarias y su estudio está en continuo aumento (Ziani *et al.*, 2010), pero su uso como ingrediente para formar PRC está seriamente limitado debido a su estado no aprobado, en la actualidad es tema de discusión en los Estados Unidos y Europa.

**Tabla 1.1.** Principales materiales utilizados para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles.

<b>Formulación básica de películas y recubrimientos comestibles</b>			
<b>Matriz estructural</b>			
<b>Hidrocoloides</b>		<b>Lípidos</b>	<b>Mixtos/Compuestos</b>
<b>Proteínas</b>	<b>Polisacáridos</b>		
Colágeno, gelatina, maíz, zeína, gluten de trigo, soja, caseína, suero	Derivados de celulosa, almidones, extractos de plantas, quitosano, pectina, gomas	Ceras, triglicéridos, ácidos grasos, resinas	<b>Hidrocoloides+lípidos:</b> Emulsiones/multicapa <b>Mezcla de hidrocoloides:</b> Proteína+lípidos Proteína+polisacáridos Polisacáridos+polisacáridos
<b>Aditivos</b>			
<b>Para mejorar la cohesión, adhesión y estabilidad</b>			
Plastificantes: glicerol, sorbitol, propilenglicol, polietilenglicol, Surfactantes: lecitina, tweens, span			
<b>Conferir o mejorar funcionalidad</b>			
Antimicrobianos, antioxidantes, mejorar textura, nutraceuticos, probióticos, sabores, aromas, precursores, colorantes			

Las características fisicoquímicas del hidrocoloide seleccionado para hacer PRC, determinan definitivamente sus propiedades funcionales. Tanto las proteínas como los hidratos de carbono pueden considerarse buenos formadores de película, con muy buenas propiedades de barrera contra el oxígeno, los olores y los lípidos a baja humedad relativa (HR). Sin embargo, generalmente tienen una pobre propiedad de barrera contra la humedad. Por otro lado, los lípidos generalmente se caracterizan por ser excelentes barreras contra la humedad, aunque debido a su naturaleza no polimérica generalmente no forman películas independientes cohesivas para aplicaciones prácticas, por lo que se prefiere su uso como revestimientos formados directamente sobre la superficie de los alimentos. Se han usado diferentes compuestos lipídicos para desarrollar recubrimientos que incluyen principalmente: ceras, triglicéridos, ácidos grasos y resinas (Han y Aristippos, 2005; Chiralt *et al.*, 2018).

Con el objetivo de mejorar las características generales de una PRC, se han desarrollado películas compuestas (Tablas 1.1) basadas en la combinación de hidrocoloides y lípidos. En este caso, los lípidos proporcionan resistencia al vapor de agua y los hidrocoloides proporcionan la estabilidad estructural y la cohesión (Pérez-Gago y Krochta, 2005; Osés *et al.*, 2009; Maftoonazad y Shahamirian, 2013). Más recientemente, se han desarrollado películas compuestas basadas en diferentes hidrocoloides (Maftoonazad y Shahamirian, 2013; Galus y Kadzińska, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2015; Gross, 2018) cuando se desea una propiedad específica o funcional de un material, como el quitosano que es un polisacárido con actividad antifúngica natural (Ziani *et al.*, 2010; Fernández-Pan *et al.*, 2015; Doğan y İzci, 2017).

Además, los componentes de la matriz estructural en la formulación de las PRC incluyen diferentes aditivos con dos objetivos básicos: i) mejorar las propiedades tecnológicas de la película y ii) conferir/mejorar su funcionalidad en el sistema alimentario. De esta forma, es importante enfatizar que todos los componentes de la película, incluidos los aditivos funcionales, deben ser de grado alimenticio o GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) y utilizarse dentro de las limitaciones especificadas por el sistema legal en particular. Los principales aditivos tecnológicos incluyen plastificantes y surfactantes. Actualmente, los plastificantes se utilizan para modificar las propiedades mecánicas y dar flexibilidad y manejabilidad (Rodríguez *et al.*, 2006; Chiralt *et al.*, 2018). Los surfactantes se usan para mejorar la estabilidad de las emulsiones y mejorar la humectabilidad de las soluciones con el fin de formar recubrimientos adecuados sobre los tipos de superficies extremadamente diferentes de los sistemas alimentarios (Ziani *et al.*, 2008). Además, y de acuerdo con el objetivo de la presente revisión, los compuestos activos se pueden utilizar para conferir o mejorar la funcionalidad de las PRC en los productos alimenticios, como antimicrobianos y/o antioxidantes (Cook *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2018).

Para desarrollar la película o el recubrimiento apropiado, se necesita una idea clara de su función relativa al producto; en el caso de la conservación de productos pesqueros frescos, el factor más importante a tener en cuenta es el crecimiento microbiano y sus consecuencias directamente relacionadas durante el almacenamiento. A tal efecto, la aplicación más adecuada e innovadora de las PRC es su desempeño como portadoras de agentes antimicrobianos.

### **1.3. Películas y recubrimientos comestibles como portadoras de agentes antimicrobianos**

Una de las formas tradicionales de controlar el crecimiento y desarrollo de microorganismos asociados al deterioro de alimentos y de patógenos transmitidos por esos alimentos descompuestos, es la aplicación de agentes antimicrobianos; ya sea por inmersión o por pulverización en sus superficies (Han y Aristippos, 2005; Thaker *et al.*, 2017; Tayel *et al.*, 2018). Sin embargo, en estas aplicaciones la efectividad de los antimicrobianos es limitada durante el almacenamiento debido a dos factores principales: migración incontrolada al alimento e inactivación parcial debido a la interacción con otros componentes del alimento. Como tales, las PRC antimicrobianas son tecnologías consolidadas porque su eficacia se basa en la liberación controlada de los compuestos activos retenidos en la matriz estructural. Estos compuestos migran selectiva y gradualmente de la matriz a la superficie del alimento con un objetivo principal durante todo el almacenamiento: mantener concentraciones efectivas de los agentes antimicrobianos en la superficie del alimento, cuando se necesitan y durante una exposición prolongada (Quintavalla y Vicini, 2002; Fernández-Pan *et al.*, 2014). Como se puede observar a través de la variedad y el número de informes publicados en los últimos años que se muestran en la Tabla 1.2, la investigación sobre las PRC como portadoras

de antimicrobianos para mejorar la calidad microbiológica en pescado fresco; se ha incrementado notablemente debido en parte a la complejidad del tema y su amplia gama de posibilidades, así como sus beneficios potenciales para la industria alimentaria. Recientemente Carrión-Granda *et al.* (2017, 2018) informaron sobre la utilidad de un recubrimiento comestible a base de WPI enriquecido con aceite esencial de orégano (AEO) y carvacrol (CV) sobre el retraso en el crecimiento de los principales microorganismos implicados en la descomposición del pescado fresco. La velocidad de liberación de los agentes antimicrobianos tiene una influencia definida en la efectividad de las PRC antimicrobianas. Por consiguiente, tanto una evaluación en profundidad de la velocidad de liberación, como una evaluación de la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo respaldarán el desarrollo y la optimización de una PRC antimicrobiana efectiva (Fernández-Pan *et al.*, 2014).



**Tabla 1.2.** Estudios realizados sobre la aplicación de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos en pescado.

Matriz	Agente activo	Especie	Efecto	Referencia
Quitosano	Quitosano	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	Reducción de <i>Pseudomonas</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2019
Quitosano	Lisozima	Corvina amarilla ( <i>Larimichthys crocea</i> )	Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i>	Wu <i>et al.</i> , 2018
GP y quitosano	AE de clavo	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	Efecto frente a, BAL, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , bacterias sulfito reductoras (BSR)	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2018b
Quitosano	AE de tomillo	Atún ( <i>Thunnus</i> sp.) y pez espada ( <i>Xiphias gladius</i> )	Inhibición <i>Shewanella baltica</i>	Grande-Tovar <i>et al.</i> , 2018
Agar e hidrolizado de proteínas de pescado	AE de clavo	Lenguado ( <i>Paralichthys orbignyanus</i> )	Efecto frente a <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>	Da Rocha <i>et al.</i> , 2018a
Alginato sódico	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	<i>Pseudomonas</i>	Angiolillo <i>et al.</i> , 2018
Película a base de ácido poliláctico	Bacteriosina	Pangasius ( <i>Pangasius hypophthalmus</i> )	Inhibición <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	Woraprayote <i>et al.</i> , 2018
Quitosano	Extracto de semilla de uva-CV	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	Reducción de bacterias mesófilas, psicrótrofas y <i>Pseudomonas</i>	Alves <i>et al.</i> , 2018
WPI	AEO y tomillo	Merluza ( <i>Merluccius merluccius</i> )	Efectivo frente a <i>Enterobacteriaceae</i> y BSR	Carrión-Granda <i>et al.</i> , 2018

**Tabla 1.2 (cont).** Estudios realizados sobre la aplicación de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos en pescado.

Matriz	Agente activo	Especie	Efecto	Referencia
Proteína de soja y montmorillonita	AE de clavo de olor	Atún rojo ( <i>Thunnus thynnus</i> )	Efectivo frente a <i>Pseudomonas</i>	Echeverría <i>et al.</i> , 2018
Caseinato de calcio	AE de romero	Carpa plateada ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	Reducción psicrótrofas, BAL, <i>Vibrio</i> spp., <i>Salmonella</i> spp, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i>	Abdeldaïem <i>et al.</i> , 2018
WPI	AE de romero	Atún ( <i>Thunnus alalunga</i> )	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Carrión-Granda <i>et al.</i> , 2017
GP	Extracto de hoja de olivo	Salmón ahumado ( <i>Salmo salar</i> )	Inhibición <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella enteritidis</i>	Albertos <i>et al.</i> , 2017
Quitosano	Extracto de cáscara de granada	Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Reducción de aerobios mesófilos y psicrótrofos	Alsaggaf <i>et al.</i> , 2017
Quitosano	AE de jengibre	Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> )	Reducción aerobios mesófilos, <i>Pseudomonas</i> , BAL. Inhibición <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Remya <i>et al.</i> , 2017a
Almidón y gelatina	LAE	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	Inhibición <i>L. innocua</i> , reducción aerobios mesófilos	Moreno <i>et al.</i> , 2017b
Carboximetilcelulosa	Extracto de satureja <i>Satureja thymbra</i> L.	Dorada ( <i>Sparus aurata</i> )	Reducción de aerobios mesófilos, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Choulitoudi <i>et al.</i> , 2016
GP	Quitosano, AE de clavo y pimienta	Sardinias pequeñas ( <i>Sardinella gibbosa</i> )	Inhibición <i>S. aureus</i> , <i>A. hydrophila</i> y <i>L. monocytogenes</i>	Shakila <i>et al.</i> , 2016

**Tabla 1.2 (cont).** Estudios realizados sobre la aplicación de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos en pescado.

Matriz	Agente activo	Especie	Efecto	Referencia
Quitosano	Ácidos orgánicos	Anchoa seca ( <i>Stolephorus indicus</i> )	Reducción de aerobios mesófilos	Vimaladevi et al., 2015
GP y alginato	AEO	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Reducción aerobios mesófilos, psicrótrofos, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> y BAL	Kazemi y Rezaei, 2015
GP+ Quitosano	AEO, canela y anís	Carpa plateada ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	Inhibición <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus enteritidis</i> y <i>Shigabacillus</i> y reducción aerobios mesófilos	Wu et al., 2014
Quitosano	Quitosano	Merluza ( <i>M. merluccius</i> )	Reducción aerobios mesófilos, psicrótrofos, <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, BSR y <i>L. monocytogenes</i> .	Fernández-Saiz et al., 2013
WPI	AE canela, clavo, anís, cúrcuma, hoja de guayaba, nuez moscada y limón	Pescado seco ( <i>Decapterus maruadsi</i> )	Reducción mohos ( <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium sp</i> ) y bacterias ( <i>S. aureus</i> )	Matan, 2012
GP	AE hierba de limón	Lubina ( <i>Latescalcarifer</i> )	Reducción <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, BSR, psicrótrofos	Ahmad et al., 2012
Gelatina y quitosano	AE clavo	Bacalao ( <i>Gadus morhua</i> )	Reducción <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL	Gómez-Estaca et al., 2010

#### 1.4. Eficacia de los recubrimientos comestibles como portadores de agentes antimicrobianos

La eficacia funcional de las PRC depende en gran medida de: i) la naturaleza y el tipo de hidrocoloide utilizado en la matriz estructural, ii) los compuestos antimicrobianos seleccionados, iii) la carga microbiana inicial presente en el alimento fresco y sus características físico-químicas y, iv) todas sus propias interacciones (Carrión-Granda *et al.*, 2018). Consecuentemente, tanto la naturaleza de los componentes de la matriz estructural como sus estructuras físicas afectan definitivamente la tasa de migración de los compuestos antimicrobianos, y muchos tipos de hidrocoloides con características físicas específicas y propiedades químicas, como el WPI (Royo *et al.*, 2010; Nejadmansouri *et al.*, 2016), gelatina de pescado y gelatina bovina (Gómez-Estaca *et al.*, 2011; Etxabide *et al.*, 2015), aislado de proteína de soja (Atarés *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2018b), alginato (Rojas-Graü *et al.*, 2007; Fabra *et al.*, 2018), almidón (Murad *et al.*, 2008; Carissimi *et al.*, 2018) y quitosano (Ziani *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2018) han sido empleados en el desarrollo de PRC antimicrobianos (Tablas 1.2). Es importante señalar que el hidrocoloide que forma la matriz estructural no solo es útil como portador de antimicrobianos, sino que también proporciona beneficios complementarios como: prevención de la pérdida de humedad durante el almacenamiento, reducción de la oxidación de lípidos y transferencia de aroma limitada (Quintavalla y Vicini, 2002; Ganiari *et al.*, 2017).

La liberación-migración del antimicrobiano de las PRC, es una función que depende de diferentes factores, que incluyen: i) interacciones electrostáticas entre las moléculas del compuesto antimicrobiano y la matriz de recubrimiento, ii) ósmosis inducida por iones y cambios estructurales causados por la presencia de antimicrobianos, iii) características del alimento (como actividad del agua, pH y

contenido de grasa), y iv) condiciones de almacenamiento ambiental (temperatura, HR y tiempo) (Quintavalla y Vicini, 2002; Durango *et al.*, 2006; Saputra *et al.*, 2018). Existen varios trabajos que se centran en la caracterización de la liberación controlada de compuestos antimicrobianos incluidos en las formulaciones de PRC. Así, Del Nobile *et al.* (2008) desarrollaron películas comestibles basadas en zeína de maíz, como sistemas que podían controlar la liberación de timol como un reconocido antimicrobiano y/o antioxidante. La cinética de liberación de timol a 25 °C fue consistente con la segunda ley de Fick y tenía un coeficiente de difusión casi independiente de la concentración inicial contenida en la película de zeína. Mastromatteo *et al.* (2009) también desarrollaron películas de zeína simples y compuestas. En ambos casos, la velocidad de liberación del timol aumentó a medida que disminuía el grosor de las películas.

Durango *et al.* (2006) informaron que la velocidad de liberación de los antimicrobianos, podría variar tanto en función de la fuerza de la interacción de la cadena del polímero antimicrobiano (aunque el antimicrobiano está presente en altas concentraciones), como en función de la composición del alimento sobre el que se extiende la PRC. Muchos de los trabajos citados han sido experimentados en productos cárnicos. Así, Giovanna *et al.* (2009) desarrollaron películas comestibles basadas en WPI incorporando nisina como agente antimicrobiano. Estudiaron la capacidad antimicrobiana de las películas activas frente a *B. thermosphacta* en productos cárnicos y observaron que la velocidad de liberación de nisina se aceleraba en películas más delgadas (112  $\mu\text{m}$ ) cuando se exponían a condiciones ácidas (pH 4) a 5 °C. Además, la absorción de agua de la superficie de los productos cárnicos puede dar como resultado la hidratación y expansión de las PRC (Peppas y Brannon-Peppas, 1994). Como resultado, la difusión de los agentes antimicrobianos desde la matriz estructural hacia la superficie en productos cárnicos será el resultado del contenido de agua y la hidrofobicidad del medio externo (Millette

*et al.*, 2007; Iturriaga *et al.*, 2012). Por lo tanto, la diseminación de agentes antimicrobianos de las PRC no es simplemente gradual sino también selectiva. Corrales *et al.* (2009) desarrollaron PRC a base de almidón enriquecidos con extractos de semilla de uva. El efecto de la reducción en el crecimiento bacteriano se demostró con una mayor migración de los compuestos antimicrobianos. La fuerte actividad antimicrobiana, que se detectó durante los ensayos *in vitro* con técnicas de difusión en agar, no se observó en un sistema real (carne). Correlacionaron la inhibición bacteriana alta o baja con la liberación selectiva de partículas, que depende directamente de la naturaleza, estructura y características de los polímeros formados por las películas. Oussalah *et al.* (2007) evaluaron el complejo fenómeno de la liberación de compuestos activos en diferentes aceites esenciales de la matriz hacia el alimento. Entre las interacciones que pueden influir en la diseminación del aceite desde el polímero a la superficie de los productos cárnicos, se notaron diferencias en la velocidad de migración; debido a la ganancia de agua en la matriz polimérica de los productos cárnicos, y también debido a las características inherentes (composición y polaridad) de cada tipo de aceite esencial probado, debido a su composición estructural y sus grupos funcionales. La hidrofobicidad y la solubilidad de estos compuestos podrían tener una influencia significativa sobre su velocidad de migración. Además, la composición del alimento afectó a los mecanismos de migración del agente antimicrobiano. Los compuestos activos de los aceites esenciales son sustancias extremadamente hidrofóbicas, y su difusión dentro del producto puede estar influenciada por el contenido de grasa del alimento (Oussalah *et al.*, 2007).

### 1.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Existe una amplia variedad de métodos actualmente utilizados para probar y evaluar la eficacia antimicrobiana de las PRC activas. La bibliografía proporciona ejemplos de la variedad en los diversos ensayos que incluyen métodos tales como la difusión en agar, el método de disco Kirby-Bauer, manchas en césped entre otros, generalmente utilizados para determinar la resistencia/sensibilidad patógena transmitida por los alimentos. Mediante el uso de otros métodos además de la prueba estándar de matraz agitado, se pueden determinar las condiciones de crecimiento y los tiempos de contacto del sustrato para reducir la variabilidad asociada con las respectivas fases de crecimiento.

Como se puede observar en la Tabla 1.2, hay una gran cantidad de información disponible sobre el efecto de las PRC antimicrobianas, desarrolladas para la inhibición de especies patógenas transmitidas por los alimentos y un aumento en la seguridad alimentaria, en comparación con la cantidad de información disponible sobre el efecto bacteriostático sobre la microflora alterante, que se desarrolla en los productos alimenticios almacenados y el aumento en la vida útil. Debido a la importancia de garantizar la seguridad de los alimentos frescos.

En las pruebas que se centran en aumentar la inocuidad de los alimentos, los patógenos *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. aureus* se utilizan generalmente como objetivos microbianos porque son los responsables de los mayores desastres relacionados con la seguridad de los alimentos. La evaluación de su efectividad normalmente se realiza en 2 etapas: la primera etapa, usando pruebas *in vitro* que verifica la eficacia de las películas y recubrimientos desarrollados, contra los patógenos que se aíslan usando diferentes métodos de detección como el método de difusión en agar (Royo *et al.*,

2010; Fernández-Pan *et al.*, 2012). En la segunda fase, su eficacia se prueba inoculando las bacterias en un sistema alimentario real que generalmente se esteriliza previamente mediante radiación superficial. Normalmente, la eficacia de las PRC antimicrobianas se verifica a través de las diferencias en los recuentos bacterianos expresados como un logaritmo (UFC g<sup>-1</sup>) en comparación con las muestras no inoculadas durante todo el período de almacenamiento (Oussalah *et al.*, 2006, 2007).

Las películas comestibles antimicrobianas también pueden ofrecer protección contra la contaminación que se produce después del procesamiento, al actuar como una barrera antimicrobiana. Para evaluar esta posibilidad, Vásconez *et al.* (2009) utilizaron películas antimicrobianas basadas en una mezcla de almidón de quitosano y tapioca, en medios semisólidos recubiertos y contaminación simulada mediante inoculación de *Lactobacillus spp.*, y *Zygosaccharomyces bailii*. Después de recuperar los discos incubados y el recuento por diluciones en serie, identificaron el efecto de barrera antimicrobiana de las películas. El número de pruebas destinadas a mantener la calidad y aumentar la vida útil es mucho menor. Los principales microorganismos utilizados pertenecen a *Pseudomonas spp.*, que son las causantes de contaminación más comunes en productos cárnicos y pescado almacenados a bajas temperaturas. Las BAL también es un objetivo comúnmente utilizado, ya que se sabe que es resistente y predominante en productos refrigerados envasados al vacío (Emiroğlu *et al.*, 2010). Los ensayos de eficacia antimicrobiana de las PRC se llevan a cabo normalmente utilizando una evaluación cuantitativa y cualitativa de la microbiota que se desarrolla durante el almacenamiento de productos cárnicos, pollo o pescado recubiertos en comparación con muestras no tratadas (Fernández-Pan *et al.*, 2014; Carrión-Granda *et al.*, 2017, 2018). Debido a una serie de factores, como la composición de los alimentos, los ingredientes o las condiciones de almacenamiento, los agentes activos incorporados en las PRC pueden ejercer una actividad antimicrobiana que no



demostraría efectos antimicrobianos similares, cuando se prueban en alimentos reales en comparación con los observados en medios cultivados en el laboratorio (Min y Oh, 2009). En general, se necesita una mayor concentración del agente antimicrobiano para lograr el mismo efecto antimicrobiano en muestras reales de alimentos, como los efectos observados a nivel *in vitro*.

### **1.6. Antimicrobianos utilizados en películas y recubrimientos comestibles**

Los antimicrobianos se emplean en la conservación de alimentos para controlar los procesos de deterioro natural y en la inocuidad de los alimentos para prevenir/controlar el crecimiento de patógenos (Tajkarimi *et al.*, 2010; Aziz y Karboune, 2018). Al seleccionar el agente antimicrobiano que se incorporará en la formulación de una PRC, se debe considerar primero su eficacia contra los microorganismos diana. Pero, es igualmente importante tener en cuenta su interacción potencial con la matriz formadora de película (hidrocoloide) y con los componentes de los alimentos sobre los que actuará. Como se muestra en la Tabla 1.2 existe una gran variedad de antimicrobianos que se pueden agregar a una PRC, para minimizar el riesgo de contaminación transmitida por alimentos con patógenos e inhibir el desarrollo de microorganismos (Campos *et al.*, 2011; Fernández-Pan *et al.*, 2012, 2013; Alves-Silva *et al.*, 2018; Carrión-Granda *et al.*, 2018). Las PRC antimicrobianas más comúnmente utilizadas en pescado fresco, son: ciertos aceites esenciales, extractos de plantas, ésteres de ácidos grasos, ácidos orgánicos, nisinas y rara vez otros antimicrobianos.

### 1.7. Aceites esenciales

Los aceites esenciales se definen como una mezcla de sustancias volátiles insolubles en agua, que se destilan o se extraen del material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutas y raíces vegetales). Aunque, a los aceites esenciales se les han identificado propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas durante mucho tiempo, su uso en la industria alimentaria como antimicrobianos naturales es relativamente reciente (Burt, 2004) y en la actualidad se encuentran entre los antimicrobianos naturales más demandados.

Existe abundante evidencia científica sobre la eficacia de diferentes fracciones de los aceites esenciales de muchas especies de plantas como antimicrobianos y antifúngicos (Burt, 2004; Tomar *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2019). Varios trabajos han evaluado la actividad antimicrobiana a nivel *in vitro* de los aceites esenciales (Tabla 1.3) con la finalidad de mejorar y asegurar la calidad microbiológica del pescado fresco y/o procesado; estudiando varias concentraciones, solas o adicionadas en las matrices de PRC. Entre los trabajos recientes podemos citar a Grande-Tovar *et al.* (2018) que estudiaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Thymus capitatus* a diferentes concentraciones (0.5 %, 1 % y 1.5 % p/p) en películas comestibles de quitosano. La actividad antimicrobiana de las películas se evaluó frente a microorganismos deteriorantes aislados de atún y pez espada (*S. baltica*, *Shewanella morhuae*, *S. putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Serratia spp.*, *Aeromonas molluscorum*, y una *Acinetobacter radioresistens*) y *S. putrefaciens* ATCC 49138. Las películas ejercieron actividad antimicrobiana contra todas las cepas analizadas. La *S. baltica* fue la especie más sensible y la inhibición fue estable después de 72 h. Estos resultados sugieren películas de quitosano enriquecidas con aceite esencial de *T. capitatus* como un tratamiento alternativo para inhibir el crecimiento de bacterias degradativas con posible aplicación en la industria del pescado.

**Tabla 1.3.** Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de pescado.

Aceite esencial	Matriz	Método	Efecto	Referencia
AE de canela	GP	Difusión en agar	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. typhimurium</i> .	Kim <i>et al.</i> , 2018
AE de tomillo	Quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>Shewanella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> y <i>Acinetobacter</i> .	Grande-Tovar <i>et al.</i> , 2018
AE de clavo	Agar e hidrolizado de proteína de pescado	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. aureus</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> y <i>L. innocua</i> .	Da Rocha <i>et al.</i> , 2018a
AE de menta, manzanilla, comino, estragón, eneldo y canela	Agar	Difusión en agar	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	Abdollahzadeh <i>et al.</i> , 2018
Cinamaldehído, eugenol, timol, citral, <i>Cymbopogon citratus</i> y <i>Litsea cubeba</i>	No incluidos en PRC	Difusión en agar	Efecto frente a <i>Shewanella spp</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>Aeromonas sobria</i> .	Meng <i>et al.</i> , 2018
CV	Soluciones de nanofibras de GP	Difusión en agar	Efecto frente a <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	Liu <i>et al.</i> , 2018
AEO, salvia, ajo y romero	Solas y en WPI	Difusión en agar	Efecto frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. putrefaciens</i> .	Carrión-Granda <i>et al.</i> , 2017
AE de clavo y pimienta	GP y quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. aureus</i> , <i>A. hydrophila</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	Shakila <i>et al.</i> , 2016
AE de jengibre	Quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	Remya <i>et al.</i> , 2016
AE de clavo, cilantro, alcaravea, mejorana, canela y comino	Nanocompuestos de alginato/arcilla	Difusión en agar	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> .	Alboofetileh <i>et al.</i> , 2016

**Tabla 1.3 (cont).** Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de pescado.

Aceite esencial	Matriz	Método	Efecto	Referencia
AEO	No incluidos en PRC	Difusión en agar	Efecto frente a <i>E. coli</i> .	Evangelista-Barreto <i>et al.</i> , 2018
AEO	Nano compuestos de GP y quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enteritidis</i> y <i>E. coli</i> .	Hosseini <i>et al.</i> , 2015, 2016
AE de menta y citronela	GP	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	Yanwong y Threepopnatkul, 2015
AEO, ajo y clavo	GP	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. putrefaciens</i> .	Teixeira <i>et al.</i> , 2014
AEO	GP y quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus enteritidis</i> y <i>Shigabacillus</i> .	Wu <i>et al.</i> , 2014
AE de canela, clavo, anís, cúrcuma, hoja de guayaba, nuez moscada y lima	WPI	Difusión en agar	Efecto frente a mohos ( <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium sp.</i> ) y bacterias ( <i>S. aureus</i> ).	Matan, 2012
AEO, timol	No incluidos en PRC	Difusión en agar	Efecto frente a <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila/caviae</i> y <i>L. innocua</i> .	Iturriaga <i>et al.</i> , 2012
AE de clavo, hinojo, ciprés tomillo, hierba de la cruz, pino y romero	Solas e incluidas en gelatina y quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>P. fluorescens</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>E. coli</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 1.3 (cont).** Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en PRC para la conservación de pescado.

Aceite esencial	Matriz	Método	Efecto	Referencia
AEO y tomillo	Proteína aislada de soja	Difusión en agar	Efecto frente a <i>E. coli</i> O157: H7, <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>	Emiroğlu <i>et al.</i> , 2010
AE de clavo	GP y quitosano	Difusión en agar	Efecto frente a <i>L. acidophilus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>L. innocua</i> y <i>E. coli</i> .	Gómez-Estaca <i>et al.</i> , 2009
AEO	Almidón	Difusión en agar	Efecto frente a <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. enteritidis</i>	Pelissari <i>et al.</i> , 2009
AEO	GP	Difusión en agar	Efecto frente a <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> O157: H7	Min y Oh, 2009

Como se demuestra en la literatura revisada, los aceites esenciales y sus componentes tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana en el que la composición específica, la estructura y los grupos funcionales de sus ingredientes desempeñan un papel fundamental en su grado de efectividad. La composición química de los aceites esenciales es realmente compleja y depende, en su mayor parte, del procedimiento de extracción, de la planta seleccionada para la extracción, del momento de la recolección y de su origen geográfico. En general, los aceites esenciales están presentes como una mezcla de varios componentes, donde el principal elemento puede constituir hasta el 85 % del aceite esencial, mientras que otros componentes están presentes solo como trazas (Burt, 2004).

La composición específica de cada aceite esencial, así como la estructura y los grupos funcionales de sus componentes juegan un papel clave en su grado de efectividad. Los principales componentes de los aceites esenciales con efectos antimicrobianos incluyen compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Tiwari

*et al.*, 2009). Así, componentes principales como: carvacrol, timol, linalol, 1,8-cineol, eugenol y sus precursores (Bakkali *et al.*, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010). Los aceites esenciales con altos niveles de carvacrol (orégano, tomillo) o eugenol (canela, clavo, pimienta) generalmente se caracterizan por tener una fuerte actividad antimicrobiana con un amplio espectro de acción (Lambert *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2009; Tajkarimi *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha informado que otros ingredientes menores también tienen una influencia crítica en la actividad antimicrobiana y antioxidante, actuando en sinergia con otros componentes (Nakatsu *et al.*, 2000; van Vuuren y Viljoen, 2007).

Muchos de los estudios que han investigado la actividad de los aceites esenciales contra la alteración de microorganismos y patógenos alimentarios concuerdan en que, en general, las bacterias Gram-positivas son más sensibles al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales que las bacterias Gram-negativas (Burt, 2004; Zivanovic *et al.*, 2005; Coma, 2008; Pelissari *et al.*, 2009). Esta diferencia en la sensibilidad se relaciona con las diferencias en la estructura y composición de la pared celular entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Burt, 2004). El componente principal de la pared celular de las bacterias Gram-positivas es el peptidoglicano y un poco de proteína. Mientras que, la pared celular de bacterias Gram negativas es más delgada, pero más compleja, y tiene diferentes contenidos de polisacáridos, proteínas y lípidos además del peptidoglicano (Pranoto *et al.*, 2005). El efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos de los aceites esenciales reside en el ataque a la integridad del componente fosfolípido de la membrana celular, que provoca un aumento de su permeabilidad provocando la liberación de los constituyentes celulares, una disminución en el nivel de producción de adenosina trifosfato (ATP) en las células y una disminución en el pH intracelular (Zivanovic *et al.*, 2005; Oussalah *et al.*, 2006). La resistencia de las

bacterias Gram-negativas a los aceites esenciales es probablemente debido al papel protector de su lipopolisacárido en la pared celular que restringe la difusión de los compuestos hidrófobos de los aceites esenciales.

A pesar de su actividad antimicrobiana y/o antioxidante, los aceites esenciales muestran algunas desventajas, como su relativa inestabilidad biológica y química, su insolubilidad en el agua y su distribución potencialmente pobre en la matriz alimentaria. Uno de los problemas encontrados al usar la aplicación directa de estos aceites esenciales es que para lograr los efectos inhibidores de estos antimicrobianos naturales, deben usarse altas concentraciones, lo que podría alterar las características sensoriales de los productos sobre los que se aplican (Ntzimani *et al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2011; Petrou *et al.*, 2012). Esta limitación puede superarse potencialmente mediante la disminución de la dosis del aceite esencial y el control de su liberación a partir de una matriz biopolimérica que esté diseñada adecuadamente como un recubrimiento comestible. Adicionalmente a los trabajos citados, existe una amplia lista de aceites esenciales analizados para determinar la actividad antimicrobiana cuando se incorporan a las PRC (Tabla 1.3).

Debido a su alto nivel demostrado de actividad antimicrobiana y su amplio espectro de acción, el AEO ha sido ampliamente estudiado en diferentes matrices de polímeros y en muchos casos se ha convertido en el aceite esencial de referencia contra diferentes microorganismos y patógenos de los alimentos (Tabla 1.3). Recientemente, Carrión-Granda *et al.* (2018) demostraron el efecto de los recubrimientos comestibles a base de WPI enriquecidos con dos aceites esenciales (orégano y timol) combinado con MAP para mejorar la calidad microbiológica de los filetes de merluza fresca. Los filetes frescos se revistieron con diferentes formulaciones de recubrimientos basados en WPI-aceite esencial y se envasaron en condiciones de aire y MAP (50 % de CO<sub>2</sub>, 45 % de N<sub>2</sub>, y 5 % de O<sub>2</sub>). Cuando las películas de WPI antimicrobianas se aplicaron con o sin la presencia de MAP sobre

filetes de merluza con una población microbiana inicialmente alta, se observó un efecto limitado pero significativo sobre el crecimiento microbiano. Este efecto fue más intenso en *Enterobacteriaceae* y en bacterias sulfito reductoras (BSR). Cuando se trataron filetes de merluza con recuentos microbianos iniciales más bajos, se observó un efecto antimicrobiano más intenso y se detectó un efecto sinérgico entre los recubrimientos WPI-aceite esencial y MAP. Se observó un retraso significativo en el crecimiento bacteriano, principalmente, en los recuentos viables totales y BSR duplicando la vida útil de los filetes en fase de refrigeración a 4 °C. Concluyeron, que la carga microbiana inicial del pescado fresco resultó ser un factor clave que influye en la efectividad del tratamiento. Los resultados obtenidos demostraron la efectividad de esta estrategia combinada como una alternativa prometedora para mejorar la calidad microbiana de los productos de pescado durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración.

Después de verificar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante pruebas *in vitro*, muchos de ellos se han aplicado solos o combinados en sistemas alimentarios como en productos de pescado fresco. (Tabla 1.3). Después de revisar estos estudios, se puede resumir que las diferencias en los efectos inhibitorios de las PRC antimicrobianas pueden atribuirse a la susceptibilidad de cada objetivo bacteriano, a los componentes biológicos activos de los aceites, a sus concentraciones y a las interacciones con el producto que afectan la difusividad de los compuestos activos y por tanto de la actividad antimicrobiana final.

Tanto el tipo como la concentración de los aceites esenciales seleccionados, tienen una influencia decisiva en la efectividad obtenida a través de las PRC. Los aceites esenciales más repetitivos reportados en la literatura como efectivos son el orégano, el tomillo, la canela y el clavo. Por lo tanto, la tendencia general que se observa es que los aceites esenciales con alto contenido de carvacrol, cinaldehído o eugenol incorporadas en las PRC son las formulaciones más efectivas para mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco. Se destaca que los tres



compuestos mencionados, son generalmente reconocidos como fuertes antioxidantes y, por lo tanto, pueden ayudar en la prevención de la oxidación lipídica del pescado, que es el segundo factor que limita su calidad después del deterioro microbiano (Teixeira *et al.*, 2013, 2014).

Además, y según lo expuesto por Fernández-Pan *et al.* (2012) se debe resaltar que la composición química principal de los aceites esenciales no se ha especificado generalmente en la literatura y, en consecuencia, los parámetros críticos como la concentración de compuesto activo agregado en las formulaciones, no se han tenido en cuenta en el análisis de datos correspondiente. La disponibilidad de esta información en la literatura ayudaría a seleccionar nuevas formulaciones y optimizar las formulaciones ya desarrolladas por otros autores. Finalmente, se remarcaría que, según la literatura relacionada, se pueden desarrollar PRC antimicrobianas efectivas utilizando concentraciones relativamente bajas de aceites esenciales.

Sin embargo, sería necesario tener en cuenta que su aplicación puede exceder los niveles aceptables organolépticos estándar y su aplicación requiere un estudio sensorial intensivo. Para reducir el impacto sensorial de los aceites esenciales, se debería considerar emplear los compuestos aislados responsables principalmente de la actividad antimicrobiana para la microbiota dirigida. Por lo tanto, las formulaciones con una concentración similar de un antimicrobiano efectivo deben desarrollarse con el objetivo de disminuir la concentración final del aceite esencial en las PRC. Como desventaja de la última propuesta, se debe señalar la posible pérdida de efectividad debido a la falta de efecto sinérgico con otros compuestos menores (por ejemplo, 1,8-cineol con alcanfor) y que, en general, los compuestos más activos también son principalmente responsables del olor y sabor característico del aceite esencial original.

### 1.8. Extractos de plantas (halófitas)

Los extractos son fracciones solubles que se pueden obtener a partir de materiales vegetales, solubilizando los componentes de interés en una fase acuosa, de alcohol, de lípidos, de solvente o de CO<sub>2</sub> supercrítico (Brewer, 2011). Numerosos extractos de plantas han sido probados por sus propiedades antimicrobianas contra varios microorganismos transmitidos por los alimentos (Hsieh *et al.*, 2001; Burt, 2004; Pezeshk *et al.*, 2015). Se ha demostrado que algunas plantas y vegetales poseen valiosos componentes activos de gran valor nutricional y terapéutico (Burt, 2004). Los compuestos fenólicos se encuentran comúnmente en las plantas, y se ha reportado que tienen una amplia gama de actividades biológicas, incluidas propiedades antioxidantes y antimicrobianas que contribuyen directa o indirectamente a la inhibición del crecimiento bacteriano, así como a la supresión de procesos de oxidación (Pezeshk *et al.*, 2015; Ngahang Kamte *et al.*, 2018).

Desde la antigüedad, el *Crithmum maritimum* (*Apiaceae*) o hinojo de mar se ha utilizado en prácticas culinarias y en medicina popular, pero en los últimos años ha tomado importancia por sus compuestos activos que posee (Meot-Duros *et al.*, 2008, 2010; Meot-Duros y Magné, 2009). Los compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos naturales como suplementos nutricionales han adquirido una importancia creciente en los últimos años, debido a su estado GRAS. Las plantas halófitas se consideran como un importante depósito de moléculas bioactivas con múltiples aplicaciones biotecnológicas, incluido el antioxidante. Se han realizado diferentes estudios sobre las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del hinojo marino (Tabla 1.4). Así, Generalić Mekinić *et al.* (2016, 2018) estudiaron la composición química (polifenoles totales, flavonoides, no flavonoides y ácidos fenólicos individuales) y capacidad antioxidante (CA). Además, determinaron el

contenido total de polifenoles para extractos etanólicos. Los resultados demostraron el impacto potencial de los compuestos dominantes en el extracto sobre las propiedades funcionales del hinojo marino.

En otro estudio, Houta *et al.* (2011) estudiaron la composición química y las actividades biológicas de los aceites esenciales de diferentes partes de la *C. maritimum* L. Estos aceites fueron aislados por hidrodestilación y analizados mediante cromatografía de gases/masas. La CA se evaluó mediante el método de secuestro de radicales libres ABTS y la actividad antibacteriana se evaluó utilizando el método de difusión. Se obtuvieron aceites amarillos, con rendimientos de CA que oscilaron entre 0.28 % y 3.60 %. Los resultados mostraron que los aceites esenciales de diferentes partes de la planta, estaban compuestos principalmente por: dillapiole (2.39 % a 41.35 %), timil metil éter (20.13 % a 34.75 %), *p*-cimeno (4.83 % a 22.08 %) y  $\gamma$ -terpineno (22.54 % a 43.29 %). La evaluación de la CA mostró que los aceites esenciales de flores exhibían los potenciales más altos, en comparación a los aceites esenciales de las hojas y semillas, y fueron los más activos frente *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *S. epidermidis*, respectivamente. El aceite esencial de semillas fue el más activo contra *S. aureus* con un diámetro de zona de inhibición de  $18 \pm 0.5$  mm<sup>2</sup>. Este estudio puede contribuir a proporcionar datos útiles para comprender el impacto del cultivo de la *C. maritimum* en la composición química y los efectos biológicos de su aceite esencial y se deben realizar más estudios para lograr este objetivo.

**Tabla 1.4.** Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de pescado.

Extracción	Método de extracción	Método de determinación	Efecto antimicrobiano	Referencia
Polifenoles totales, flavonoides, no flavonoides, ácidos fenólicos individuales	Extracciones etanólicas	Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).	No determinado	Generalić Mekinić <i>et al.</i> , 2016, 2018
Compuestos fenólicos, AE	Extracción metanólica	HPLC-DAD-ESI-MS. Extracción del AE por hidrodestilación.	Efecto frente a <i>Cyida albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> .	Nabet <i>et al.</i> , 2017
Compuestos fenólicos	Extracción por infusión y decocción	Cromatografía líquida y de alto rendimiento y detección de matriz de diodos (HPLC - DAD)	No determinado	Pereira <i>et al.</i> , 2017
Compuestos fenólicos	Extracción metanólica	Cromatografía líquida y de alto rendimiento y detección de matriz de diodos (HPLC - DAD)	No determinado	Rodrigues <i>et al.</i> , 2015
Compuestos fenólicos, AE	Extracción metanólica	Extracción del AE por hidrodestilación	Efecto frente a <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , y <i>S. epidermidis</i>	Houta <i>et al.</i> , 2011, 2015
Compuestos fenólicos Aceite esencial	Extracción acetónica	Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Extracción del AE por hidrodestilación.	Efecto frente a <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i>	Jallali <i>et al.</i> , 2012, 2014

**Tabla 1.4 (cont).** Estudios de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales, solos o incluidos en PRC para la conservación de pescado.

Extracción	Método de extracción	Método de determinación	Efecto antimicrobiano	Referencia
Ácidos orgánicos: oxálico, cítrico, málico	Extracción polar (solo agua)	HPLC	No determinado	Romojaro <i>et al.</i> , 2013
Ácidos orgánicos, compuestos fenólicos	Extracciones clorofórmicas y metanólicas	HPLC	Efecto frente a <i>Micrococcus luteus</i> y <i>B. cereus</i> y <i>L. monocytogenes</i>	(Meot-Duros <i>et al.</i> , 2008, 2010; Meot-Duros y Magné, 2009)

Como se puede observar, los compuestos activos de los extractos de plantas halófitas han sido ampliamente estudiados y parece que la mayoría de estas plantas, poseen en mayor o menor grado una gran variedad de compuestos que pueden ser aprovechadas en la industria alimentaria. Como se ha descrito, los extractos de plantas muestran efectos antimicrobianos particularmente contra bacterias, hongos filamentosos, levaduras y virus. Los componentes fenólicos de los extractos de plantas podrían ser utilizados como compuestos antioxidantes y/o antimicrobiano natural. Estos componentes pueden retrasar los cambios químicos, retardar el crecimiento microbiano, mantener las características sensoriales y prolongar la vida útil de los alimentos durante el almacenamiento. Los extractos de plantas se pueden utilizar como métodos seguros para la conservación de pescados y mariscos (Alsaggaf *et al.*, 2017).

### 1.9. Etil lauroil arginato

El desarrollo de nuevas estrategias para reducir los niveles iniciales de contaminación e inhibir el crecimiento bacteriano en los productos pesqueros es esencial. Los envases antimicrobianos que contienen etil lauroil arginato (LAE) son una alternativa para enfrentar este problema, ya que se ha demostrado con éxito que el LAE es eficaz para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos (Moreno *et al.*, 2016, 2017b). El LAE, es un agente tensioactivo catiónico, es un derivado del ácido láurico, L-arginina y etanol (Ruckman *et al.*, 2004; Asker *et al.*, 2009; Ziani *et al.*, 2011). El LAE es un agente antimicrobiano GRAS, se ha informado que muestra una eficacia antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras (Bai *et al.*, 2018). En la Tabla 1.5 se presenta un resumen de los diversos estudios realizados a nivel *in vitro*, que han evaluado la efectividad del LAE frente a microorganismos asociados al deterioro de los alimentos, así como, su utilización dentro de las formulaciones de PRC y su aplicación en carnes, aves, pescado y otros alimentos. Un estudio reciente de Pattanayaiying *et al.* (2019) con el fin de controlar patógenos transmitidos por los alimentos de productos del mar, elaboraron una película antimicrobiana basadas en almidón termoplástico TPS/PBAT recubiertos con gelatina incorporando LAE (0.8 mg cm<sup>-2</sup>) y nisina (69.4 AU cm<sup>-2</sup>), para producir películas LAE-Gelatina-TPS/PBAT y Nisina-LAE-Gelatina-TPS/PBAT, respectivamente. Ambas películas fueron efectivas frente a *Vibrio parahaemolyticus* y *S. typhimurium* en rebanadas de pargo patudo (*Lutjanus lineolatus*) y rodajas de langostino tigre (*Penaeus monodon*) a largo plazo (28 días), refrigeradas (4 °C; refrigeradas) y congeladas (-20 °C) almacenamiento hasta 90 días. Los resultados obtenidos de este estudio indican que las películas antimicrobianas mostraron una excelente inhibición contra *S. typhimurium* y *V. parahaemolyticus* en mariscos refrigerados y congelados.

En otro trabajo realizado por Deng *et al.* (2018) elaboraron películas nanofibras compuestas de quitosano/poli-óxido de etileno (PEO)/LAE. Estas películas mostraron una actividad antimicrobiana dependiente de la concentración de LAE (0.1 %, 0.25 % y 0.5 %) contra *E. coli* y *S. aureus*, lo que sugiere una actividad antimicrobiana mejorada. Los experimentos de tinción fluorescente demostraron que el mecanismo antimicrobiano era el daño de la membrana celular. Moreno *et al.* (2017a) prepararon películas activas biodegradables por fundición, utilizaron almidón de maíz, con diferente grado de oxidación, gelatina bovina, glicerol como plastificante y LAE como compuesto antimicrobiano. Las películas con LAE mostraron un efecto bactericida contra *L. innocua* y *E. coli*. Así, las películas antimicrobianas con LAE se presentan como materiales prometedores para aplicaciones de envasado de alimentos dirigidos a mejorar la calidad microbiológica de productos de origen marino.

**Tabla 1.5.** Estudios de la eficacia antimicrobiana del LAE, solo, combinado e incluido en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos frescos y procesados.

Agente activo	Matriz	Alimento	Efecto	Referencia
LAE y nisina	Almidón de yuca termoplásticas y gelatina	Mariscos: pargo patudo ( <i>Lutjanus lineolatus</i> ) y rodajas de langostino tigre ( <i>Penaeus monodon</i> )	Reducción <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>S. typhimurium</i> .	Pattanayaiying <i>et al.</i> , 2019
LAE	Quitosano y PEO	No aplicado	Efecto frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	Deng <i>et al.</i> , 2018
LAE	Almidón de maíz y gelatina	Filetes de pechuga de pollo	Reducción aerobios mesófilos, psicrótrofos, BAL, coliformes totales y <i>E. coli</i> .	Moreno <i>et al.</i> , 2018
LAE	No incluida en PRC	Leche y queso	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> .	Kozak <i>et al.</i> , 2018a,b
LAE	Pectina-alginato	Cáscaras de huevo	Efecto frente a <i>S. enteritidis</i> .	Leo <i>et al.</i> , 2018
LAE	Almidón de maíz oxidado y gelatina	Salmón marinado	Efecto frente a <i>L. innocua</i> y <i>E. coli</i> .	Moreno <i>et al.</i> , 2017a,b
LAE	Almidón de maíz oxidado y cera de abeja	No aplicado	Efecto frente a <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Salmonella Saintpaul</i> .	Ochoa <i>et al.</i> , 2017
LAE	No incluida en PRC	No aplicado	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> .	Kozak <i>et al.</i> , 2017



**Tabla 1.5 (cont).** Estudios de la eficacia antimicrobiana del LAE, solo, combinado e incluido en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos frescos y procesados.

Agente activo	Matriz	Alimento	Efecto	Referencia
LAE y eugenol	No incluida en PRC	No aplicado	Efecto frente a <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> K12 y <i>P. fluorescens</i> .	Manrique <i>et al.</i> , 2017
LAE e isotiocianato de alilo	Goma de maíz de biofibra y quitosano	Carne y frescas	Efecto frente a <i>L. innocua</i> .	Guo <i>et al.</i> , 2017
LAE	No incluida en PRC	Carne de pollo molido	Efecto frente a <i>Salmonella</i> Heidelberg (S. H.) y <i>Campylobacter jejuni</i> . Reducción de aerobios mesófilos.	Moore <i>et al.</i> , 2017
LAE	No incluida en PRC	Pechugas de pollo	Efecto frente a 3 cepas de <i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19113, ATCC 19115 y ATCC 13932).	Yang <i>et al.</i> , 2017
LAE	No incluida en PRC	Superficie de los subprimales de res	Reducción de 8 cepas de <i>E. coli</i> (O26:H11, O45:H2, O103:H2, O104:H4, O111:H-, O121:H19, O145:NM y O157:H7).	Stella <i>et al.</i> , 2017
LAE	Zeína	No aplicado	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> .	Kashiri <i>et al.</i> , 2016
LAE	No incluida en PRC	Carne de pollo	Efecto frente a <i>S. typhimurium</i> ATCC 53647.	Hawkins <i>et al.</i> , 2016
LAE, AE de canela, EDTA	Quitosano	No aplicado	Efecto frente a <i>L. monocytogenes</i> tan, <i>S. enteritidis</i> y <i>E. coli</i> O157:H7.	Ma <i>et al.</i> , 2016a,b,c
LAE, AE de canela y Tween 80	No incluida en PRC	Leche	Efecto frente a <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i> O157: H7 y <i>L. monocytogenes</i>	Hilbig <i>et al.</i> , 2016
LAE	No incluida en PRC	No aplicado	Efecto frente a <i>Y. enterocolitica</i> y <i>L. plantarum</i>	Coronel-León <i>et al.</i> , 2016

**Tabla 1.5 (cont).** Estudios de la eficacia antimicrobiana del LAE, solo, combinado e incluido en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos frescos y procesados.

Agente activo	Matriz	Alimento	Efecto	Referencia
LAE, nisina y ácido láctico	Almidón de maíz	No aplicado	Efecto frente a <i>B. thermosphacta</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>M. luteus</i>	Sánchez-Ortega <i>et al.</i> , 2016
LAE	No incluida en PRC	Jamón procesado	Reducción de <i>L. monocytogenes</i>	Lavierei <i>et al.</i> , 2014; Terjung <i>et al.</i> , 2014b, 2016; Luchansky <i>et al.</i> , 2016
LAE y AE de tomillo	No incluida en PRC	No aplicado	Efecto frente a levadura <i>Z. bailii</i> .	Chang <i>et al.</i> , 2015
LAE	No incluida en PRC	Carne picada	Reducción aerobios mesófilos, coliformes totales y BAL.	Magrinyà <i>et al.</i> , 2015
LAE y nisina	Pululano	Rebanadas de pechuga de pavo	Reducción <i>S. typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> .	Pattanayaiying <i>et al.</i> , 2014, 2015a,b
LAE y cloruro de cetilpiridinio	No incluida en PRC	Filetes de pechuga y piel de pollo	Reducción de <i>S. typhimurium</i> , <i>Salmonella</i> . Heidelberg y <i>S. enteritidis</i> .	Sukumaran <i>et al.</i> , 2015
LAE y $\epsilon$ -polilisina	No incluida en PRC	Canales de pollo	Reducción de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> y psicrótrofos.	Benli <i>et al.</i> , 2011, 2015
LAE, AE de mostaza, ácido cítrico, extracto de oliva y nisina	No incluida en PRC	No aplicado	Efecto frente a <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> .	Techathuvanan <i>et al.</i> , 2014

**Tabla 1.5 (cont).** Estudios de la eficacia antimicrobiana del LAE, solo, combinado e incluido en películas y recubrimientos comestibles para la conservación de alimentos frescos y procesados.

Agente activo	Matriz	Alimento	Efecto	Referencia
LAE y AE de orégano	Películas activas: PP y PET	Queso	Efectivas frente a <i>E. coli</i> O157: H7	Otero <i>et al.</i> , 2014
LAE y nisina	Quitosano	Carne “ready-to-eat”	Reducción de <i>L. inocua</i>	Guo <i>et al.</i> , 2014a,b
LAE	No incluida en PRC	Caldo y filetes de pechuga de pollo	Efectiva frente a <i>C. jejuni</i> . Reducción aerobios mesófilos y psicrótrofos	Nair <i>et al.</i> , 2014
LAE y nisina	No incluida en PRC	Queso fresco y salmón ahumado en frío	Reducción <i>L. monocytogenes</i>	Soni <i>et al.</i> , 2012, 2014
LAE, AE de canela, timol y eugenol	No incluida en PRC	Leche baja en grasa	Efectiva frente a <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enteritidis</i> y <i>E.coli</i>	Ma <i>et al.</i> , 2013
LAE	Quitosano	Pollo fresco	Reducción aerobios mesófilos, psicrótrofos, <i>Pseudomonas</i> , coliformes totales, BAL, BSR,	Higueras <i>et al.</i> , 2013
LAE, isotiocianato de alilo	Quitosano	Camarones congelados “ready-to-eat”	Efecto frente a <i>L. inocua</i>	Guo <i>et al.</i> , 2013
LAE	No incluida en PRC	Carne de pollo molido	Reducción <i>Salmonella</i> spp. aerobios mesófilos	Sharma <i>et al.</i> , 2013a,b
LAE, nisina, isotiocianato de alilo	Quitosano	Cáscaras de huevo	Efectiva frente a <i>S. enteritidis</i>	Jin <i>et al.</i> , 2013
LAE, carvacrol	No incluida en PRC	Carne de pavo molido	Efectiva frente a <i>Salmonella</i> sp.	Oladunjoye <i>et al.</i> , 2013
LAE	Películas activas de PLA	Jamón curado cocido	Efectiva frente a <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enteritidis</i>	Theinsathid <i>et al.</i> , 2012

Como se puede observar en todos los estudios citados, el LAE posee un amplio espectro de acción contra bacterias, levaduras y mohos. Las altas propiedades antimicrobianas de LAE se han atribuido a su acción sobre las membranas celulares de los microorganismos (Becerril *et al.*, 2011, 2013). Además, el LAE se ha clasificado como no tóxico (GRAS) y su uso potencial como agente antimicrobiano puede incluir una amplia gama de alimentos. Además, varios estudios se han relacionado con la aplicación de LAE en sistemas de envasado antimicrobiano, que muestran un gran potencial para mejorar la seguridad y la calidad de los productos alimenticios envasados (Muriel-Galet *et al.*, 2012a,b, 2014, 2015, 2016; Nerin *et al.*, 2016).

### 1.10. Ácidos y sales orgánicas

Los ácidos orgánicos (AO) se obtienen de forma natural de plantas y productos fermentados, aunque también pueden obtenerse mediante síntesis química. Los ácidos orgánicos como los ácidos lácticos (E-270), acético (E-260), tartárico (E-334), málico (E-296) y cítrico (E-330), entre otros, se utilizan ampliamente para la conservación de alimentos (Tabla 1.4). El ácido sórbico y sus sales son ampliamente utilizados como conservantes en la industria alimentaria. La buena solubilidad, la estabilidad y el proceso de fabricación, hacen del sorbato de potasio la forma más utilizada de incorporar ácido sórbico en los sistemas alimentarios. Es un eficaz agente antifúngico.

La actividad antimicrobiana de los AO, se basa en el hecho de que los ácidos protonados son solubles en la membrana y pueden ingresar al citoplasma bacteriano por difusión simple. Como resultado, se logra la depresión del pH interno de la célula microbiana debido a la ionización de las moléculas de ácido no diso-

ciadas, la interrupción del transporte del sustrato por la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, o la reducción de la fuerza motora de los protones (Eswaranandam *et al.*, 2004; Gadang *et al.*, 2008). Desde el punto de vista de la eficacia antimicrobiana, los AO tienen diferentes efectos en función del tipo de ácido, su concentración, las condiciones ambientales y el microorganismo objetivo. Además, las mezclas de AO presentan un espectro antimicrobiano más amplio y una actividad más fuerte que un solo ácido orgánico (Han y Aristippos, 2005; Dehghani *et al.*, 2018).

Varios estudios han demostrado que la vida útil de productos de carne y pescado fresco también puede prolongarse mediante el uso de AO. El papel clásico de los AO en formulaciones de PRC antimicrobianas, es su función como acidulantes. En varios casos, y para formar la película o el revestimiento, es necesaria una interacción hidrocoloide modificada para obtener su dispersión completa en el disolvente, por lo que el pH de la solución formadora de película (SFP) debe ajustarse con el acidulante correspondiente. Como ejemplo de este caso, se puede citar el quitosano, que para lograr su completa disolución acuosa para formar la SFP, debe estar fuertemente protonado en agua acidificada. Además, en base a la composición y estructura química, la investigación sobre el efecto del tipo y cantidad de acidulante puede brindar oportunidades para lograr propiedades mecánicas y de barrera deseadas (Rubilar *et al.*, 2013). Por lo tanto, al desarrollar formulaciones de PRC, se debe considerar que la adición de AO debe alterar definitivamente las propiedades mecánicas y de barrera de las PRC finales. Esta tendencia está parcialmente relacionada con el hecho de que los ácidos pueden ejercer un efecto plastificante en las películas, ya que poseen grupos hidroxilo que pueden participar en las interacciones polímero-polímero al desarrollar enlaces de hidrógeno. Los cambios inducidos por AO han sido ampliamente estudiados y reportados con PRC (Cagri *et al.*, 2001; Eswaranandam *et al.*, 2004; Chevalier *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2018a). Además, los AO también se usan con frecuencia en combinación con

otros agentes antimicrobianos como el quitosano, LAE o la nisina (Tablas 1.2 y 1.5) que son más efectivos en condiciones ácidas (Jin *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2014).

Centrándose en la función de las PRC como portadoras de AO como antimicrobianos, en busca de su migración o liberación, diferentes trabajos han informado sobre la incorporación y el éxito de diferentes formulaciones basadas en AO para obtener una mejora en la seguridad y extensión de la vida útil de los alimentos. Con la utilización de los AO se ha obtenido el resultado del control efectivo del crecimiento de patógenos tales como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella gaminara*. La incorporación de ácidos láctico y málico en las películas comestibles provocó una reducción en la población de *S. gaminara* en 3 unidades logarítmicas. De manera similar, el ácido cítrico también fue efectivo, pero en menor grado, logrando una reducción de 1 unidad logarítmica. Las diferencias en la eficacia, se atribuyeron a la mayor facilidad de penetración de los ácidos málico y láctico en el citoplasma celular debido a su menor peso molecular en comparación con el del ácido cítrico (Eswaranandam *et al.*, 2004). Pintado *et al.* (2009) desarrollaron películas comestibles basados en WPI que incorporaron ácidos cítrico y málico al 3 % (p/p), con los cuales obtuvieron mayor actividad frente a la *L. monocytogenes* que con películas de ácido láctico. Esto se debió principalmente a la menor pKa de los ácidos cítrico y málico que lograron una mayor acidificación del medio.

Da Rocha *et al.* (2018b) utilizaron películas biodegradables a base de gelatina de pescado con la incorporación de ácidos orgánicos, como el ácido sórbico (SA) y el ácido benzoico (BA) con varias concentraciones (0 %, 0.50 %, 0.75 % y 1.50 %) para minimizar el crecimiento de *A. flavus* y *Rhizopus oryzae*. Observaron las influencias de la concentración de SA o BA en la actividad antifúngica. La mayor eficacia se obtuvo para las películas que contienen SA contra *R. oryzae* en com-

paración con los tratamientos con BA. En conclusión, las películas basadas en gelatina de pescado tendrían efecto antifúngico mediante la incorporación de estos ácidos orgánicos.

Al aplicar la PRC sobre los productos cárnicos, Siragusa y Dickson (1992) observaron que los AO fueron más efectivos en la reducción de los contenidos en *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E. coli* O157: H7 en canales de carne vacuno, cuando se incorporaron a través de geles de alginato en lugar de ser aplicado directamente. Zinoviadou *et al.* (2010) desarrollaron películas antimicrobianas basadas en WPI que contenían 2 % de lactato de sodio como antimicrobiano para reducir la microbiota de la carne que se echaba a perder durante su almacenamiento a 5 °C. Las películas, aplicadas como envoltorios, inhibieron significativamente el desarrollo de *Pseudomonas* spp., y la microbiota total, aunque solo hubo un efecto muy pequeño contra las BAL.

Quattara *et al.* (2000) evaluaron la posibilidad de usar ácido acético o propiónico incluido en una matriz de quitosano diseñada para liberar lentamente el inhibidor bacteriano. Este sistema se estudió para mejorar la conservación de las carnes procesadas envasadas al vacío durante el almacenamiento refrigerado. Observaron que el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y *Serratia loquefaciens* se retrasó o inhibió completamente como resultado de la aplicación de la película.

Cagri *et al.* (2001) desarrollaron películas antimicrobianas basadas en WPI que contenían ácido sórbico o ácido p-aminobenzoico. En ambos casos, las películas inhibieron *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7 y *S. typhimurium*. Estas películas se probaron posteriormente en sistemas alimentarios reales (carne) que fueron inoculados con los mismos patógenos (Cagri *et al.*, 2002). Después de 21 días de almacenamiento refrigerado y en condiciones aeróbicas, las películas lograron una reducción significativa en las poblaciones de ambos microorganismos. En la prueba de las películas sobre la carne vacuno, fueron eficaces en la inhibición

del desarrollo de bacterias aerobias mesófilas, BAL, mohos y levaduras. Los mismos autores desarrollaron cubiertas de WPI termoselladas que contenían ácido sórbico, ácido p-aminobenzoico y una combinación de los dos en una proporción de 1:1 para la producción de perros calientes (Cagri *et al.*, 2003). Las películas de WPI con ácido p-aminobenzoico inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* que se había inoculado en los perros calientes durante 42 días de almacenamiento refrigerado. Como tales, estos recubrimientos se presentaron como una alternativa viable en el proceso de post-pasteurización de “hot dogs” para minimizar el riesgo de listeriosis.

Como se puede observar, existen numerosos estudios sobre la actividad antimicrobiana de las formulaciones de PRC con AO. Es necesario resaltar, la alta variación en la eficiencia de formulaciones obtenidas por los compuestos incluidos en la matriz, la propia matriz, los microorganismos de prueba y los productos. Por lo tanto, todos los factores e interacciones explicados anteriormente, para aquellas formulaciones que contienen aceites esenciales, podrían tener aplicación directa aquí. Sin embargo, para desarrollar nuevas formulaciones dirigidas a productos cárnicos o pescado, se deben destacar tres ventajas principales en comparación con el aceite esencial:

- i) Solubilidad en agua: la alta solubilidad en agua de los AO debería dar como resultado una mayor estabilidad para las matrices y una mejor distribución de los antimicrobianos cuando se liberan al producto. En este sentido, con las formulaciones de AO, la tasa de liberación debe verse muy influenciada por el tipo de producto, en el supuesto de que, al aplicar las películas comestibles sobre superficies secas, la liberación será más lenta.
- ii) No volatilidad: la liberación y migración de AO siempre ocurre hacia la superficie del producto. No habrá pérdidas de eficiencia debido a la migración de compuestos volátiles como ocurre con los aceites esenciales.



- iii) Menor impacto sensorial de los AO en comparación con los aceites esenciales.

### 1.11. Nisina

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos producidos por BAL. Estos agentes antimicrobianos son generalmente termoestables, aparentemente hipoa-lergénicos y se degradan fácilmente por enzimas proteolíticas en el tracto intestinal humano (Coma, 2008; Martínez *et al.*, 2019). Las bacteriocinas son producidas por varias bacterias, por lo que se han caracterizado numerosas bacteriocinas que muestran diferentes formas de actividad, espectros antimicrobianos y propiedades químicas. La bacteriocina más conocida es la nisina (Pattanayaiying *et al.*, 2019) reconocida como GRAS y se usa comúnmente como aditivo en la conservación del queso (E-234) (European, 2008).

La nisina es un polipéptido anfifílico natural producido por bacterias de *Lactococcus lactis* subsp. El grupo lactis es la bacteriocina más importante comercialmente debido a su amplio historial de uso seguro y eficacia documentada frente a importantes patógenos Gram-positivos transmitidos por los alimentos y agentes de deterioro. Es capaz de inhibir un amplio espectro de bacterias Gram-positivas como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Coma, 2008; Pattanayaiying *et al.*, 2019). La nisina actúa destruyendo la integridad de la membrana citoplásmica a través de la formación de poros que provocan la pérdida de pequeños compuestos y cambian la fuerza motora de los protones, que son necesarios para la producción de energía y la síntesis de ácido nucleico y proteínas (Pintado *et al.*, 2009; Molloy *et al.*, 2011). Al igual que con otros agentes antimicrobianos, la nisina es más efectiva en condiciones ácidas debido a su mayor estabilidad, solubilidad y menor actividad de pH (Pintado *et al.*, 2009). Los efectos inhibidores de la nisina se pueden

expandir al grupo de bacterias Gram-negativas gracias a su combinación con agentes quelantes, como EDTA o lisozima, que pueden alterar la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias (Gadang *et al.*, 2008). Los efectos de la nisina se han probado en mariscos (Pattanayaiying *et al.*, 2019), en productos cárnicos (Hu *et al.*, 2019), en productos lácteos (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2018) y en diferentes vegetales (McManamon *et al.*, 2019).

La nisina se ha incorporado como un agente antimicrobiano en varias matrices de PRC como en: gelatina (Pattanayaiying *et al.*, 2019), pululano (Pattanayaiying *et al.*, 2015b), quitosano (Divsalar *et al.*, 2018), WPI (Gadang *et al.*, 2008; Murillo-Martínez *et al.*, 2013), alginato (Concha-Meyer *et al.*, 2011), celulosa (Imran *et al.*, 2010) caseinato de sodio (Kristo *et al.*, 2008), zeína de maíz (Ku y Song, 2007; Hager *et al.*, 2018), almidón de tapioca (Sanjurjo *et al.*, 2006; Utami *et al.*, 2018), glucomanano (Li *et al.*, 2006), proteína de soja (Eswaranandam *et al.*, 2004).

La actividad antimicrobiana de la nisina, incorporada en las PRC es muy sensible a la formulación final del sistema. Como tales, las películas comestibles basadas en hidroxipropilmetilcelulosa que contienen nisina, son más efectivas contra los patógenos *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Coma *et al.*, 2001). En estas películas, el uso de ácido esteárico destinado a mejorar sus cualidades de barrera (específicamente vapor de agua) dañó la actividad inhibidora de la nisina frente a los dos patógenos. La eficacia de la nisina se puede aumentar combinándola con otros agentes antimicrobianos (Tablas 1.2 y 1.5). Así, Sánchez-Ortega *et al.* (2016) diseñaron y caracterizaron una nanoemulsión de ácido oleico, como parte de suspensiones de recubrimiento comestible a base de almidón, incorporadas con una mezcla de tres antimicrobianos naturales: ácido láctico (ALA), nisina y LAE. El recubrimiento comestible antimicrobiano se probó para inhibir a la *B. thermosphacta*, *L. monocytogenes* Scott A y *M. luteus* ATCC 11509. A partir de un diseño de mezcla de experimentos, la combinación óptima de agentes antimicrobianos fue

de 3.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de NIS, 0.0625  $\text{mg mL}^{-1}$  de LAE y 17.5  $\text{mg mL}^{-1}$  de ALA, que incorporados en las suspensiones del recubrimiento comestible produjeron un efecto antimicrobiano similar.

Pattanayaiying *et al.* (2014, 2015a,b) investigaron en películas de pululano que contenían LAE y nisina Z (producidas por *L. lactis* subsp. *Lactis* I8-7-3 y aisladas del intestino de bagre), solo o en combinación, para controlar patógenos transmitidos por los alimentos frescos. La *S. typhimurium* y *S. enteritidis* presentes en rebanadas de pechuga de pavo crudas, envueltas con una película que contenía LAE o la combinación de LAE con nisina Z se redujeron a lo largo del experimento en un rango de 2.5 a 4.5 log UFC  $\text{cm}^{-2}$  y 3.5 a 5.1 log UFC  $\text{cm}^{-2}$ , respectivamente. La película que contenía una combinación de LAE con nisina Z redujo *S. aureus* y *L. monocytogenes* Scott A, inoculada en superficies de jamón en aproximadamente 5.53 y 5.62 log UFC  $\text{cm}^{-2}$ , respectivamente, durante el almacenamiento refrigerado. La *E. coli* O157: H7, O111 y O26 también se redujo en  $> 4$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  en rebanadas de carne cruda después del tratamiento con la combinación de película y en almacenamiento refrigerado. Los resultados obtenidos de este estudio indican que las películas de pululano que contienen LAE y LAE-nisina Z mostraron una excelente inhibición contra patógenos transmitidos por los alimentos frescos y procesados.

La efectividad de los recubrimientos comestibles antimicrobianos con nisina también se ha estudiado en pescado (Tablas 1.1 y 1.5). Por ejemplo, Utami *et al.* (2018) evaluaron el efecto del recubrimiento comestible a base de tapioca enriquecido con nisina para preservar la calidad del filete de pescado panga (*Pangasius hypophthalmus*). Informaron que el enriquecimiento de películas comestibles a base de tapioca con nisina (2000 UI) en una solución podría mantener la calidad de los filetes panga durante 16 días almacenados a 4 °C. Abdollahzadeh *et al.*, (2018) prepararon películas antimicrobianas incorporando nisina (100 UA) en una película basada en agar y se probaron frente siete cepas de *L. monocytogenes*.

Las películas con nisina inhibieron significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes*. La capacidad antibacteriana de las películas activas es un método prometedor para mejorar la seguridad alimentaria. Hager *et al.* (2018) evaluaron la actividad antimicrobiana de los recubrimientos comestibles a base de zeína incorporados con nisina frente a *L. monocytogenes*. Los recubrimientos comestibles a base de zeína de maíz son un portador eficaz para la nisina y fueron efectivas frente *L. monocytogenes* con una reducción total de 3.5 log.

Soni *et al.* (2012, 2014) evaluaron tres antimicrobianos GRAS: LAE (200 ppm), bacteriófago P100 (fago P100) y bacteriocina nisina (500 ppm), individualmente o en combinaciones para la reducción de la carga inicial de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío (CSS). La supervivencia de *L. monocytogenes* en presencia de fago P100, nisina y LAE mostró una reducción notable en 24 h, tanto a 4 °C como a 30 °C en caldo. El tratamiento de CSS que contenía 3.5 log UFC cm<sup>-2</sup> de *L. monocytogenes* con el fago P100 (108 PFU ml<sup>-1</sup>), nisina y LAE mostró una fuerte acción listericidal y redujo la *L. monocytogenes* en 2-3 log después de 24 h. Entre los tratamientos combinados, el fago P100 + LAE o nisina + LAE exhibieron la acción más listericidal en la que las células de *L. monocytogenes* se redujeron a un nivel indetectable dentro de las 24 h.

Las formulaciones de las PRC más nisina, y de las combinaciones expuestas en los estudios revisados, se puede afirmar que los factores más importantes que influyen en su eficacia antimicrobiana son los relacionados con la concentración de nisina y el objetivo microbiano, pero es importante destacar la influencia decisiva que tienen los aditivos actuales en la matriz de las PRC, para producir el éxito final de las formulaciones.

### 1.12. Otros antimicrobianos

Otros antimicrobianos empleados en menor medida en las PRC para aumentar la seguridad y mantener la calidad de los productos cárnicos, son: extractos vegetales (Corrales *et al.*, 2009), lisozima (Güçbilmez *et al.*, 2007), lactoferrina (Brown *et al.*, 2008), ovotransferrina (Seol *et al.*, 2009) y sistema de lactoperoxidasa (LPS) (Yener *et al.*, 2009), entre otros. Como ejemplos se puede citar los trabajos reportados por Min y Oh (2009) que incorporan diferentes concentraciones de LPS en películas de WPI que mostraron una fuerte actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Penicillium commune*.

Existe escasa información actualizada sobre la aplicación de otros compuestos antimicrobianos. Entre los trabajos que podemos citar es el realizado por Benli *et al.* (2011, 2015) que evaluaron los efectos de las aplicaciones secuenciales de los aerosoles de  $\epsilon$ -polilisina (EPL) o LAE, seguidos de un aerosol de sulfato ácido de calcio (ACS) en carcasas de pollos, para reducir la presencia de *Salmonella*. Se estudiaron las reducciones de la microflora presentes en canales de pollo. El tratamiento de las carcasas inoculadas con *Salmonella*, con 300 mg L<sup>-1</sup> de EPL seguido de 30 % de aerosoles ACS, se redujo el conteo de *Salmonella*, de *E. coli* y psicrotrofos. Indicaron que estos tratamientos podrían tener el potencial de aumentar la vida útil de las canales de aves de corral.

En otros trabajos, Corrales *et al.* (2009) desarrollaron películas comestibles a base de almidón de arveja enriquecidas con extractos de semilla de uva. El efecto de estas películas comestibles se evaluó contra el crecimiento de *B. thermosphacta* inoculado en lomos de cerdo envasados al vacío. Lograron una reducción de 1.3 log UFC mL<sup>-1</sup> durante los primeros cuatro días de almacenamiento. Seol *et*

al. (2009) desarrollaron películas comestibles basadas en  $\kappa$ -carragenan, que incorporaron la ovotransferrina como agente antimicrobiano combinado con EDTA, para aumentar la vida útil de pechuga de pollo fresca. Después de 7 días de almacenamiento a 5 °C, las pechugas de pollo envueltas en las películas mostraron una reducción de *E. coli* con respecto a las pechugas de pollo no tratadas. Zinoviadou *et al.* (2010) desarrollaron películas antimicrobianas basadas en WPI que contenían  $\epsilon$ -polilisina contra la microflora de la carne que se echaba a perder a lo largo de su almacenamiento a 5 °C. Los crecimientos de microorganismos viables totales y *Pseudomonas* spp. se redujeron significativamente utilizando 0.75 % de  $\epsilon$ -polilisina.

## Conclusiones

---

La alta composición de nutrientes de los productos pesqueros, lo convierte en un entorno ideal para el crecimiento y desarrollo de microorganismos. Las películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos representan una tecnología innovadora efectiva para mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco, al tiempo que prolongan la vida útil y garantizan la seguridad de los productos al inhibir el crecimiento de los microorganismos y los patógenos transmitidos por los alimentos. Si bien las PRC antimicrobianos ofrecen muchas ventajas, no pueden reemplazar las buenas prácticas de higiene y manejo y los sistemas actuales de conservación de productos frescos, pero su uso en conjunto con otros medios de procesamiento que se utilizan actualmente en las industrias alimentaria (MAP y refrigeración) ofrece nuevas oportunidades y desafía tanto a los científicos como a los fabricantes para satisfacer las demandas de los consumidores de productos mínimamente procesados.

## Referencias

---

- Abdeldaiem, M.H., Mohammad, H.G. & Ramadan, M.F. (2018). Improving the Quality of Silver Carp Fish Fillets by Gamma Irradiation and Coatings Containing Rosemary Oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **27**, 568–579.
- Abdollahzadeh, E., Mahmoodzadeh Hosseini, H. & Imani Fooladi, A.A.A.A. (2018). Antibacterial activity of agar-based films containing nisin, cinnamon EO, and ZnO nanoparticles. *Journal of Food Safety*, **38**, e12440.
- Adilah, A.N., Jamilah, B., Noranizan, M.A. & Hanani, Z.A.N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, **16**, 1–7.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P. & Nirmal, N.P. (2012). Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, **155**, 171–178.
- Albertos, I., Avena-Bustillos, R.J., Martín-Diana, A.B., Du, W.-X., Rico, D. & McHugh, T.H. (2017). Antimicrobial Olive Leaf Gelatin films for enhancing the quality of cold-smoked Salmon. *Food Packaging and Shelf Life*, **13**, 49–55.
- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H. & Abdollahi, M. (2016). Efficacy of activated alginate-based nanocomposite films to control *Listeria monocytogenes* and spoilage flora in rainbow trout slice. *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 521–530.
- Alsaggaf, M.S., Moussa, S.H. & Tayel, A.A. (2017). Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia fillets. *International Journal of Biological Macromolecules*, **99**, 499–505.
- Alves-Silva, J., Catarino, M., Fernandes, R., Salgueiro, L., Cardoso, S. & Henriques, M. (2018). *Edible whey protein coatings with antimicrobial and antioxidant activity: Development, properties and efficacy in meat products. Edible Films and Coatings: Advances in Research and Applications.*
- Alves, V.L.C.D., Rico, B.P.M., Cruz, R.M.S., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. & Vieira, M.C. (2018). Preparation and characterization of a chitosan film with grape seed extract-carvacrol microcapsules and its effect on the shelf-life of refrigerated Salmon (*Salmo salar*). *LWT - Food Science and Technology*, **89**, 525–534.
- Angiolillo, L., Conte, A. & Nobile, M.A. Del. (2018). A new method to bio-preserve sea bass fillets. *International Journal of Food Microbiology*, **271**, 60–66.
- Asker, D., Weiss, J. & McClements, D.J. (2009). Analysis of the Interactions of a Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with an Anionic Biopolymer (Pectin): Isothermal Titration Calorimetry, Light Scattering, and Microelectrophoresis. *Langmuir*, **25**, 116–122.
- Atarés, L., Bonilla, J. & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-

- based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, **100**, 678–687.
- Aziz, M. & Karboune, S. (2018). Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58**, 486–511.
- Bai, L., Xiang, W., Huan, S. & Rojas, O.J. (2018). Formulation and Stabilization of Concentrated Edible Oil-in-Water Emulsions Based on Electrostatic Complexes of a Food-Grade Cationic Surfactant (Ethyl Lauroyl Arginate) and Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules*, **19**, 1674–1685.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- Becerril, R., Gómez-Lus, R. & Nerín, C. (2011). Antimicrobial activity of decaffeinated green tea extract, green tea antioxidant extract and lauramide argine ethyl ester. *Italian Journal of Food Science*, **23**, 174–177.
- Becerril, R., Manso, S., Nerin, C. & Gómez-Lus, R. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, **32**, 404–408.
- Benli, H., Sanchez-Plata, M.X., Ilhak, O.I., Núñez De González, M.T. & Keeton, J.T. (2015). Evaluation of antimicrobial activities of sequential spray applications of decontamination treatments on chicken carcasses. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **28**, 405–410.
- Benli, H., Sánchez-Plata, M.X. & Keeton, J.T. (2011). Efficacy of  $\epsilon$ -Polylysine, Lauric Arginate, or Acidic Calcium Sulfate Applied Sequentially for Salmonella Reduction on Membrane Filters and Chicken Carcasses. *Journal of Food Protection*, **74**, 743–750.
- Bozaris, I.S. & Parlapani, F.F. (2016). *Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Elsevier Ltd.
- Bozaris, I.S. & Parlapani, F.F. (2017). Chapter 3 - Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In: *The Microbiological Quality of Food*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition (edited by A. Bevilacqua, M.R. Corbo & M. Sinigaglia). Pp. 61–98. Woodhead Publishing.
- Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10**, 221–247.
- Brown, C.A., Wang, B. & Oh, J.-H. (2008). Antimicrobial activity of lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria incorporated into edible chitosan film. *Journal of Food Protection*, **71**, 319–324.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology*, **94**, 223–53.
- Cagri, A., Ustunol, Z., Osburn, W. & Ryser, E.T. (2003). Inhibition of *Listeria*



- monocytogenes on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casings. *Journal of Food Science*, **68**, 291–299.
- Cagri, A., Ustunol, Z. & Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, **66**, 865–870.
- Cagri, A., Ustunol, Z. & Ryser, E.T. (2002). Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *Journal of Food Science*, **67**, 2317–2324.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. & Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, **54**, 111–119.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N. & Flores, S.K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, **4**, 849–875.
- Carissimi, M., Flôres, S.H. & Rech, R. (2018). Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. *Algal Research*, **32**, 201–209.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Jaime, I., Rovira, J. & Maté, J.I. (2016a). Improvement of the microbiological quality of ready-to-eat peeled shrimps (*Penaeus vannamei*) by the use of chitosan coatings. *International Journal of Food Microbiology*, **232**, 144–149.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I. & Maté, J.I. (2016b). *Antimicrobial edible films and coatings. Edible Films and Coatings: Fundamentals and Applications*.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Mezquita, S., Rovira, J. & Maté, J.I. (2017). Development of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Rosemary Extracts to Improve the Microbiological Quality of Fresh Tuna. *MOJ Food Processing & Technology*, **5**, 1–8.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Rovira, J. & Maté, J.I. (2018). Effect of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stored Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets. *Journal of Food Quality*, 1–12.
- Chang, Y., McLandsborough, L. & McClements, D.J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (thyme oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, **172**, 298–304.
- Chen, W.E.I., Golden, D.A., Critzer, F.J. & Davidson, P.M. (2015). Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde, Carvacrol, and Lauric Arginate against *Salmonella* Tennessee in a Glycerol-Sucrose Model and Peanut Paste at Different Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, **78**, 1488–1495.
- Chevalier, E., Chaabani, A., Assezat, G., Prochazka, F. & Oulahal, N. (2018). Casein/wax blend extrusion for production of edible films as carriers of potassium sorbate—A comparative study of waxes and potassium sorbate effect. *Food Packaging and Shelf Life*, **16**, 41–50.

- Chiralt, A., González-Martínez, C., Vargas, M. & Atarés, L. (2018). Edible films and coatings from proteins. In: *Proteins in Food Processing*. Pp. 477–500. Elsevier.
- Choulitoudi, E., Bravou, K., Bimpilas, A., Tsironi, T., Tsimogiannis, D. & Oreopoulou, V. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of *Satureja thymbra* in gilthead seabream fillets edible coating. *Food and Bioprocesses Processing*, **100**, 570–577.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, **78**, 90–103.
- Coma, V., Sebti, I., Pardon, P., Deschamps, A. & Pichavant, F.H. (2001). Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, **64**, 470–475.
- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C. & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, **22**, 485–489.
- Cook, S.L., Methven, L., Parker, J.K. & Khutoryanskiy, V. V. (2018). Polysaccharide food matrices for controlling the release, retention and perception of flavours. *Food Hydrocolloids*, **79**, 253–261.
- Coronel-León, J., López, A., Espuny, M.J., Beltran, M.T., Molinos-Gómez, A., Rocabayera, X. & Manresa, A. (2016). Assessment of antimicrobial activity of Na<sup>+</sup>-lauroyl arginate ethylester (LAE®) against *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus plantarum* by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food Control*, **63**, 1–10.
- Corrales, M., Han, J.H. & Tauscher, B. (2009). Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. *International Journal of Food Science & Technology*, **44**, 425–433.
- Dehghani, S., Vali, S. & Regenstein, J.M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation : A review. *Food Chemistry*, **240**, 505–513.
- Deng, L., Taxipalati, M., Zhang, A., Que, F., Wei, H., Feng, F. & Zhang, H. (2018). Electrospun Chitosan/Poly(ethylene oxide)/Lauric Arginate Nanofibrous Film with Enhanced Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 6219–6226.
- Divsalar, E., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Lotfi, M. & Kuswandi, B. (2018). Characterization of cellulosic paper coated with chitosan-zinc oxide nanocomposite containing nisin and its application in packaging of UF cheese. *International Journal of Biological Macromolecules*, **109**, 1311–1318.
- Doğan, G. & İzci, L. (2017). Effects on quality properties of smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, **41**.
- Durango, A.M., Soares, N.F. & Andrade, N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food*

- Control*, **17**, 336–341.
- Echeverría, I., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Mauri, A.N. & Montero, M.P. (2018). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, **266**, 142–149.
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K. & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, **86**, 283–288.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N.S. & Jhonson, M. (2004). Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-incorporated Soy Protein Film Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, **69**, FMS79-FMS84.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & la Caba, K. de. (2015). Improvement of barrier properties of fish gelatin films promoted by gelatin glycation with lactose at high temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, **63**, 315–321.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & la Caba, K. de. (2017). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, **68**, 192–198.
- European, C. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council, 16–33.
- Evangelista-Barreto, N.S., Costa Júnior, P.S.P. & Vieira, B.B. (2018). Control of psychrotrophic bacteria and *escherichia coli* in frescal type fish sausage using oregano essential oil | Controle de bacterias psicrótróficas e *escherichia coli* em linguiça de peixe tipo frescal adicionada de óleo essencial de orégano. *Boletim do Instituto de Pesca*, **44**, 68–73.
- Fabra, M.J., Falcó, I., Randazzo, W., Sánchez, G. & López-Rubio, A. (2018). Antiviral and antioxidant properties of active alginate edible films containing phenolic extracts. *Food Hydrocolloids*, **81**, 96–103.
- Fernández-Pan, I., Carrión-Granda, X. & Maté, J.I. (2014). Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, **36**, 69–75.
- Fernández-Pan, I. & Maté Caballero, J.I. (2011). Biopolymers for Edible Films and Coatings in Food Applications. In: *Biopolymers - New Materials for Sustainable Films and Coatings*. Pp. 233–254.
- Fernández-Pan, I., Maté, J.I., Gardrat, C. & Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hydrocolloids*, **51**, 60–68.
- Fernández-Pan, I., Mendoza, M. & Maté, J.I. (2013). Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of

- poultry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 2986–2994.
- 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**, M383-90.
- Fernández-Saiz, P., Sánchez, G., Soler, C., Lagaron, J.M. & Ocio, M.J. (2013). Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control*, **34**, 61–68.
- Gadang, V.P.P., Hettiarachchy, N.S.S., Johnson, M.G.G. & Owens, C. (2008). Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. *Journal of Food Science*, **73**.
- Galus, S. & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, **45**, 273–283.
- Ganiari, S., Choulitoudi, E. & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science and Technology*.
- Generalić Mekinić, I., Blažević, I., Mudnić, I., Burčul, F., Grga, M., Skroza, D., Jerčić, I., Ljubenkov, I., Boban, M., Miloš, M. & Katalinić, V. (2016). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 3104–3112.
- Generalić Mekinić, I., Šimat, V., Ljubenkov, I., Burčul, F., Grga, M., Mihajlovski, M., Lončar, R., Katalinić, V. & Skroza, D. (2018). Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, **124**, 947–953.
- Gennari, M., Tomaselli, S. & Cotrona, V. (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) Sea and stored in ice. *Food Microbiology*, **16**, 15–28.
- Giovanna, R., H, H.J., Blanca, G., Eduardo, C. & Carlos, R. (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 2492–2497.
- Gómez-Estaca, J., Alemán, A., López-Caballero, M.E., Baccan, G.C., Montero, P. & Gómez-Guillén, M.C. (2019). Bioaccessibility and antimicrobial properties of a shrimp demineralization extract blended with chitosan as wrapping material in ready-to-eat raw salmon. *Food Chemistry*, **276**, 342–349.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1461–1469.
- Gómez-Estaca, J., López-Caballero, M.E.M.E., Martínez-Bartolomé, M.Á.M.Á., Lacey,

- A.M.L.A.M.L. de, Gómez-Guillen, M.C.M.C.M.C. & Montero, M.P.M.P.M.P. (2018). The effect of the combined use of high pressure treatment and antimicrobial edible film on the quality of salmon carpaccio. *International Journal of Food Microbiology*, **283**, 28–36.
- Gómez-Estaca, J., López De Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E. & Montero, P. (2009). Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 46–52.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, **27**, 889–896.
- Gram, L. (2009). Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products BT - Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. In: (edited by W.H. Sperber & M.P. Doyle). Pp. 87–119. New York, NY: Springer New York.
- Gram, L. & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 262–266.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 121–137.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. & Huss, H.H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, **10**, 303–316.
- Grande-Tovar, C.D., Serio, A., Delgado-Ospina, J., Paparella, A., Rossi, C. & Chaves-López, C. (2018). Chitosan films incorporated with *Thymus capitatus* essential oil: mechanical properties and antimicrobial activity against degradative bacterial species isolated from tuna (*Thunnus* sp.) and swordfish (*Xiphias gladius*). *Journal of Food Science and Technology*, **55**, 4256–4265.
- Gross, D.A. (2018). *Edible films and coatings: Advances in research and applications*. *Edible Films and Coatings: Advances in Research and Applications*.
- Güçbilmez, C.M., Yemenicioğlu, A. & Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, **40**, 80–91.
- Günlü, A., Sipahioğlu, S. & Alpas, H. (2014). The effect of chitosan-based edible film and high hydrostatic pressure process on the microbiological and chemical quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fillets during cold storage (4±1°C). *High Pressure Research*, **34**, 110–121.
- Guo, M., Jin, T.Z., Scullen, O.J. & Sommers, C.H. (2013). Effects of antimicrobial coatings and cryogenic freezing on survival and growth of *listeria innocua*

- on frozen ready-to-eat shrimp during thawing. *Journal of Food Science*, **78**.
- Guo, M., Jin, T.Z., Wang, L., Scullen, O.J. & Sommers, C.H. (2014a). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, **40**, 64–70.
- Guo, M., Jin, T.Z. & Yang, R. (2014b). Antimicrobial Polylactic Acid Packaging Films against *Listeria* and *Salmonella* in Culture Medium and on Ready-to-Eat Meat. *Food and Bioprocess Technology*, **7**, 3293–3307.
- Guo, M., Yadav, M.P. & Jin, T.Z. (2017). Antimicrobial edible coatings and films from micro-emulsions and their food applications. *International Journal of Food Microbiology*, **263**, 9–16.
- Gutiérrez, T.J., Tapia, M.S., Pérez, E. & Famá, L. (2015). Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloids*, **45**, 211–217.
- Hager, J. V., Rawles, S.D., Xiong, Y.L., Newman, M.C., Thompson, K.R. & Webster, C.D. (2018). *Listeria monocytogenes* is inhibited on fillets of cold-smoked sunshine bass, *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, with an edible corn zein-based coating incorporated with lemongrass essential oil or nisin. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1–18.
- Han, J.H. & Aristippos, G. (2005). Edible films and coatings: a review. In: *Innovations in Food Packaging*. Pp. 239–262. Elsevier.
- Hawkins, J.L., Vimini, B., Schwarz, J.G., Nichols, P. & Parveen, S. (2016). Application of Antimicrobial Agents via Commercial Spray Cabinet To Inactivate *Salmonella* on Skinless Chicken Meat. *Journal of Food Protection*, **79**, 569–573.
- Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. & Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl- $\alpha$ -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, **165**, 339–345.
- Hilbig, J., Ma, Q., Davidson, P.M., Weiss, J. & Zhong, Q. (2016). Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, **233**, 52–59.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M. & Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, **67**, 403–413.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M. & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chemistry*, **194**, 1266–1274.
- 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**, 1459–1466.
- Houta, O., Akrou, A., Neffati, M. & Amri, H. (2011). Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia Arid Zones. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, **1**, 138–143.
- Hsieh, P.-C., Mau, J.-L. & Huang, S.-H. (2001). Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, **18**, 35–43.
- Hu, Z.Y., Balay, D., Hu, Y., McMullen, L.M. & Gänzle, M.G. (2019). Effect of chitosan, and bacteriocin – Producing *Carnobacterium maltaromaticum* on survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* on beef. *International Journal of Food Microbiology*, **290**, 68–75.
- Huss, H.H., Reilly, A. & Karim Ben Embarek, P. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, **11**, 149–156.
- Ibarra-Sánchez, L.A., Tassell, M.L. Van & Miller, M.J. (2018). Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiology*, **72**, 128–134.
- ICMSF. (2005). *Microorganisms in food 6: microbial ecology of food commodities*. Segunda ed. New York: 2005 by Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- ICMSF. (2011). *Microorganisms in Foods 8*. New York: Springer.
- Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.-M. & Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 219–225.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I. & Marañón, I.M. de. (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**, 58–64.
- Jallali, I., Megdiche, W., M’Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdely, C. & Ksouri, R. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. With physiological stage and extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 1451–1459.
- Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdely, C. & Ksouri, R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*, **145**, 1031–1038.
- Jin, T.Z.T.Z., Gutler, J.B., Li, S.-Q., Gurtler, J.B. & Li, S.-Q. (2013). Development of Antimicrobial Coatings for Improving the Microbiological Safety and Quality of Shell Eggs. *Journal of Food Protection*, **76**, 779–785.
- Kang, J., Stasiewicz, M.J., Murray, D., Boor, K.J., Wiedmann, M. & Bergholz, T.M. (2014). Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon.

- International Journal of Food Microbiology*, **179**, 1–9.
- Kashiri, M., Cerisuelo, J.P., Domínguez, I., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P. & Gavara, R. (2016). Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). *Food Hydrocolloids*, **61**, 547–554.
- Kazemi, S.M. & Rezaei, M. (2015). Antimicrobial Effectiveness of Gelatin-Alginate Film Containing Oregano Essential Oil for Fish Preservation. *Journal of Food Safety*, **35**, 482–490.
- Kim, H., Beak, S.-E. & Song, K. Bin. (2018). Development of a hagfish skin gelatin film containing cinnamon bark essential oil. *LWT*, **96**, 583–588.
- Kozak, S.M., Bobak, Y. & D'Amico, D.J. (2018a). Efficacy of Antimicrobials Applied Individually and in Combination for Controlling *Listeria monocytogenes* as Surface Contaminants on Queso Fresco. *Journal of Food Protection*, **81**, 46–53.
- Kozak, S.M., Brown, S.R.B., Bobak, Y. & D'Amico, D.J. (2018b). Control of *Listeria monocytogenes* in whole milk using antimicrobials applied individually and in combination. *Journal of Dairy Science*, **101**, 1889–1900.
- Kozak, S.M., Margison, K.M. & D'amico, D.J. (2017). Synergistic Antimicrobial Combinations Inhibit and Inactivate *Listeria monocytogenes* in Neutral and Acidic Broth Systems. *Journal of Food Protection*, **80**, 1266–1272.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K.P. & Biliaderis, C.G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, **22**, 373–386.
- Ku, K. & Song, K.B. (2007). Physical properties of nisin-incorporated gelatin and corn zein films and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 520–523.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. & Nychas, G.-J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453–462.
- Lampila, L.E. & McMillin, K.W. (2012). Major microbial hazards associated with packaged seafood. In: *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. Pp. 59–85. Elsevier.
- Leceta, I., Etxabide, A., Cabezudo, S., La Caba, K. De & Guerrero, P. (2014). Bio-based films prepared with by-products and wastes: Environmental assessment. *Journal of Cleaner Production*, **64**, 218–227.
- Leo, R. De, Quartieri, A., Haghghi, H., Gigliano, S., Bedin, E. & Pulvirenti, A. (2018). Application of pectin-alginate and pectin-alginate-laurolyl arginate ethyl coatings to eliminate *Salmonella enteritidis* cross contamination in egg shells. *Journal of Food Safety*, 1–9.
- Li, B., Peng, J., Yie, X. & Xie, B. (2006). Enhancing physical properties and antimicrobial activity of konjac glucomannan edible films by incorporating



- chitosan and nisin. *Journal of Food Science*, **71**.
- Liu, F., Saricaoglu, F.T., Avena-Bustillos, R.J., Bridges, D.F., Takeoka, G.R., Wu, V.C.H., Chiou, B.-S., Wood, D.F., McHugh, T.H. & Zhong, F. (2018). Antimicrobial Carvacrol in Solution Blow-Spun Fish-Skin Gelatin Nanofibers. *Journal of Food Science*, **83**, 984–991.
- Luchansky, J.B., Campano, S.G., Shoyer, B.A. & Porto-Fett, A.C.S. (2016). Viability of *Listeria monocytogenes* on Boneless, Water-Added Hams, Commercially Prepared with and without Food-Grade Chemicals, during Extended Storage at 4 and/or  $-2.2^{\circ}\text{C}$ . *Journal of Food Protection*, **79**, 613–619.
- Ma, Q., Davidson, P.M., Critzer, F. & Zhong, Q. (2016a). Antimicrobial activities of lauric arginate and cinnamon oil combination against foodborne pathogens: Improvement by ethylenediaminetetraacetate and possible mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*, **72**, 9–18.
- Ma, Q., Davidson, P.M. & Zhong, Q. (2013). Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *International Journal of Food Microbiology*, **166**, 77–84.
- Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P.M. & Zhong, Q. (2016b). Quality attributes and microbial survival on whole cantaloupes with antimicrobial coatings containing chitosan, lauric arginate, cinnamon oil and ethylenediaminetetraacetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, **235**, 103–108.
- Ma, Q., Zhang, Y. & Zhong, Q. (2016c). Physical and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with lauric arginate, cinnamon oil, and ethylenediaminetetraacetate. *LWT - Food Science and Technology*, **65**, 173–179.
- Maftoonazad, N. & Shahamirian, F.B. and M. (2013). Recent Innovations in the Area of Edible Films and Coatings. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*.
- Magrinyà, N., Terjung, N., Loeffler, M., Gibis, M., Bou, R. & Weiss, J. (2015). Influence of fat addition on the antimicrobial activity of sodium lactate, lauric arginate and methylparaben in minced meat. *International Journal of Food Microbiology*, **215**, 86–94.
- Manrique, Y., Gibis, M., Schmidt, H. & Weiss, J. (2017). Influence of application sequence and timing of eugenol and lauric arginate (LAE) on survival of spoilage organisms. *Food Microbiology*, **64**, 210–218.
- Martin, E.M., Griffis, C.L., Vaughn, K.L.S., O'Bryan, C.A., Friedly, E.C., Marcy, J.A., Ricke, S.C., Crandall, P.G. & Lary, R.Y. (2009). Control of *Listeria monocytogenes* by lauric arginate on frankfurters formulated with or without lactate/diacetate. *Journal of Food Science*, **74**, 237–241.
- Martínez, B., García, P. & Rodríguez, A. (2019). Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*,

56, 1–6.

- Martins, V.G., Romani, V.P. & Martins, P.C. (2018). *Active compounds incorporated in agro-based films: The efficacy and effect in film properties for food packaging. Food Packaging and Preservation: Techniques, Applications and Technology.*
- Mastromatteo, M., Barbuzzi, G., Conte, A. & Nobile, M.A. Del. (2009). Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **10**, 222–227.
- Matan, N. (2012). Antimicrobial activity of edible film incorporated with essential oils to preserve dried fish (*Decapterus maruadsi*). *International Food Research Journal*, **19**, 1733–1738.
- McManamon, O., Kaupper, T., Scollard, J. & Schmalenberger, A. (2019). Nisin application delays growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut iceberg lettuce in modified atmosphere packaging, while the bacterial community structure changes within one week of storage. *Postharvest Biology and Technology*, **147**, 185–195.
- Meng, Y., Cui, H., Zhao, Q., Li, M., Bian, C., Bai, R. & Ma, Y. (2018). Antimicrobial effects and mechanism of action of essential oils against dominant spoilage bacteria isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) during chilled storage. *Journal of Fisheries of China*, **42**, 1140–1153.
- Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Meur, C. Le, Floch, G. Le & Magné, C. (2010). New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 553–557.
- Meot-Duros, L., Floch, G. Le & Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 258–262.
- Meot-Duros, L. & Magné, C. (2009). Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 37–41.
- Millette, M., Tien, C. Le, Smoragiewicz, W. & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, **18**, 878–884.
- Min, B.J. & Oh, J.-H. (2009). Antimicrobial Activity of Catfish Gelatin Coating Containing *Origanum* ( *Thymus capitatus* ) Oil against Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Science*, **74**, M143–M148.
- Molloy, E.M., Hill, C., Cotter, P.D. & Ross, R.P. (2011). *Bacteriocins. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition.*
- Moore, A., Nannapaneni, R., Kiess, A. & Sharma, C.S. (2017). Evaluation of USDA approved antimicrobials on the reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* in ground chicken frames and their effect on meat quality. *Poultry science*,

- 96**, 2385–2392.
- Moreno, O., Atarés, L., Chiralt, A., Cruz-Romero, M.C. & Kerry, J. (2018). Starch-gelatin antimicrobial packaging materials to extend the shelf life of chicken breast fillets. *LWT*, **97**, 483–490.
- Moreno, O., Cárdenas, J., Atarés, L. & Chiralt, A. (2017a). Influence of starch oxidation on the functionality of starch-gelatin based active films. *Carbohydrate Polymers*, **178**, 147–158.
- Moreno, O., Díaz, R., Atarés, L. & Chiralt, A. (2016). Influence of the processing method and antimicrobial agents on properties of starch-gelatin biodegradable films. *Polymer International*, **65**, 905–914.
- Moreno, O., Gil, Á., Atarés, L. & Chiralt, A. (2017b). Active starch-gelatin films for shelf-life extension of marinated salmon. *LWT - Food Science and Technology*, **84**, 189–195.
- Murad, M., Ariffin, F., Mohd Hani, N. & Abd Karim, A. (2008). Antibacterial activity of modified sago starch-alginate based edible film incorporated with lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil.
- Muriel-Galet, V., Carballo, G.L., Hernández-Muñoz, P. & Gavara, R. (2016). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Usage and Potential in Antimicrobial Packaging. In: *Antimicrobial Food Packaging*. Pp. 313–318. Elsevier.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. (2012a). Active food packaging based on antimicrobial EVOH films containing LAE. In: *18th IAPRI World Packaging Conference*. Pp. 556–560.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. (2012b). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, **157**, 239–244.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. (2015). Antimicrobial Effectiveness of Lauroyl Arginate Incorporated into Ethylene Vinyl Alcohol Copolymers to Extend the Shelf-Life of Chicken Stock and Surimi Sticks. *Food and Bioprocess Technology*, **8**, 208–217.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P. & Gavara, R. (2014). Characterization of ethylene-vinyl alcohol copolymer containing lauril arginate (LAE) as material for active antimicrobial food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, **1**, 10–18.
- Murillo-Martínez, M.M., Tello-Solís, S.R., García-Sánchez, M.A. & Ponce-Alquicira, E. (2013). Antimicrobial Activity and Hydrophobicity of Edible Whey Protein Isolate Films Formulated with Nisin and/or Glucose Oxidase. *Journal of Food Science*, **78**.
- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., Madani, K. & Larbat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, **20**, 1843–

- 1855.
- Nair, D.V.T., Nannapaneni, R., Kiess, A., Mahmoud, B. & Sharma, C.S. (2014). Antimicrobial efficacy of lauric arginate against *Campylobacter jejuni* and spoilage organisms on chicken breast fillets. *Poultry Science*, **93**, 2636–2640.
- Nakatsu, T., Lupo, A.T., Chinn, J.W. & Kang, R.K.L. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, **21**, 571–631.
- Nejadmansouri, M., Hosseini, S.M.H., Niakosari, M., Yousefi, G.H. & Golmakani, M.T. (2016). Physicochemical properties and storage stability of ultrasound-mediated WPI-stabilized fish oil nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, **61**, 801–811.
- Nerin, C., Becerril, R., Manso, S. & Silva, F. (2016). *Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Antimicrobial Activity and Applications in Food Systems*. *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Inc.
- Ngahang Kamte, S.L., Ranjbarian, F., Cianfaglione, K., Sut, S., Dall'Acqua, S., Bruno, M., Afshar, F.H., Iannarelli, R., Benelli, G., Cappellacci, L., Hofer, A., Maggi, F. & Petrelli, R. (2018). Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **156**, 154–165.
- Nobile, M.A. Del, Conte, A., Incoronato, A.L. & Panza, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, **89**, 57–63.
- Nosedá, B., Islam, M.T., Eriksson, M., Heyndrickx, M., Reu, K. De, Langenhove, H. Van & Devlieghere, F. (2012). Microbiological spoilage of vacuum and modified atmosphere packaged Vietnamese *Pangasius hypophthalmus* fillets. *Food Microbiology*, **30**, 408–419.
- Ntzimani, A.G., Giatrakou, V.I. & Savvaidis, I.N. (2011). Combined natural antimicrobial treatments on a ready-to-eat poultry product stored at 4 and 8°C. *Poultry Science*, **90**, 880–888.
- Ochoa, T.A., García-Almendárez, B.E., Reyes, A.A., Pastrana, D.M.R., López, G.F.G., Belloso, O.M. & González, C.R. (2017). Design and Characterization of Corn Starch Edible Films Including Beeswax and Natural Antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, **10**, 103–114.
- Oladunjoye, A., Soni, K.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Silva, J.L., Mikel, B., Bailey, R.H., Mahmoud, B.S.M. & Sharma, C.S. (2013). Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing salmonella in ground Turkey. *Poultry Science*, **92**, 1357–1365.
- Osés, J., Fernández-Pan, I., Mendoza, M. & Maté, J.I. (2009). Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, **23**, 125–131.
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J.A., Rodríguez-Calleja, J.M., Nerín, C. & García-López,

- M.-L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, **42**, 296–302.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A. & Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, **62**, 139–148.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L. & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Food Protection*, **69**, 2364–2369.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L. & Lacroix, M. (2007). Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *Journal of Food Protection*, **70**, 901–908.
- Parlapani, F.F., Kormas, K.A. & Boziaris, I.S. (2015). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 2386–2394.
- Parlapani, F.F., Mallouchos, A., Haroutounian, S. a. & Boziaris, I.S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **189**, 153–163.
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A. & Cutter, C.N. (2014). Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **188**, 135–146.
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A. & Cutter, C.N. (2015a). Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 77–82.
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A. & Cutter, C.N. (2015b). Optimization of formulations for pullulan films containing lauric arginate and nisin Z. *LWT - Food Science and Technology*, **63**, 1110–1120.
- Pattanayaiying, R., Sane, A., Photjanataree, P. & Cutter, C.N. (2019). Thermoplastic starch/polybutylene adipate terephthalate film coated with gelatin containing nisin Z and lauric arginate for control of foodborne pathogens associated with chilled and frozen seafood. *International Journal of Food Microbiology*, **290**, 59–67.
- Pelissari, F.M., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F. & Pined, E.A.G. (2009). Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 7499–7504.

- Peppas, N.A. & Brannon-Peppas, L. (1994). Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. *Journal of Food Engineering*, **22**, 189–210.
- Pereira, C.G., Barreira, L., Rosa Neng, N. da, Nogueira, J.M.F., Marques, C., Santos, T.F., Varela, J. & 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. *Food and Chemical Toxicology*, **107**, 581–589.
- Pérez-Gago, M.B. & Krochta, J.M. (2005). Emulsion and bi-layer edible films. In: *Innovations in Food Packaging*. Pp. 384–402. Elsevier.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V. & Savvaidis, I.N. (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International Journal of Food Microbiology*, **156**, 264–271.
- Pezeshk, S., Ojagh, S.M. & Alishahi, A. (2015). Effect of plant antioxidant and antimicrobial compounds on the shelf-life of seafood - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, **33**, 195–203.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S. & Sousa, I. (2009). Properties of Whey Protein-Based Films Containing Organic Acids and Nisin To Control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **72**, 1891–1896.
- Porto-Fett, A.C.S., Campano, S.G., Smith, J.L., Oser, A., Shoyer, B., Call, J.E. & Luchansky, J.B. (2010). Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC®) delivery method. *Meat Science*, **85**, 312–318.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K. & Salokhe, V.M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, **38**, 859–865.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, **62**, 373–380.
- Ramos, Ó.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 533–552.
- Remya, S., Mohan, C.O., Bindu, J., Sivaraman, G.K., Venkateswarlu, G. & Ravishankar, C.N. (2016). Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 685–693.
- Remya, S., Mohan, C.O.C.O., Venkateswarlu, G., Sivaraman, G.K.G.K.G.K. & Ravishankar, C.N.C.N.C.N. (2017). Combined effect of

- O-scavenger and antimicrobial film on shelf life of fresh cobia (*Rachycentron canadum*) fish steaks stored at 2 °C. *Food Control*, **71**, 71–78.
- Rocha, M. da, Alemán, A., Romani, V.P., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. & Prentice, C. (2018a). Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food Hydrocolloids*, **81**, 351–363.
- Rocha, M. da, Prietto, L., Souza, M.M. de, Furlong, E.B. & Prentice, C. (2018b). Effect of Organic Acids on Physical-Mechanical and Antifungicidal Properties of Anchovy Protein Films. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **27**, 316–326.
- Rodrigues, M.J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L. & 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.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K. & Maté, J.I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, **39**, 840–846.
- Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z. & McHugh, T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, **81**, 634–641.
- Romojaro, 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**, 944–952.
- Royo, M., Fernández-Pan, I. & Maté, J.I. (2010). Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1513–1519.
- Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. & Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, **115**, 466–474.
- Ruckman, S.A., Rocabayera, X., Borzelleca, J.F. & Sandusky, C.B. (2004). Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- $\alpha$ -Lauroyl-l-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food and Chemical Toxicology*, **42**, 245–259.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Cháfer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews*, **3**, 1–16.

- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Reyes-González, L.R. & Regalado, C. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*, **52**, 906–913.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L. & Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, **39**, 749–754.
- Saputra, E., Alamsjah, A. & Abdillah, A.A. (2018). The characterization of edible coating from tilapia surimi as a biodegradable packaging. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. P. 012071.
- Seol, K.-H., Lim, D.-G., Jang, A., Jo, C. & Lee, M. (2009). Antimicrobial effect of  $\kappa$ -carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5 °C. *Meat Science*, **83**, 479–483.
- Shakila, R.J., Jeevithan, E., Arumugam, V. & Jeyasekaran, G. (2016). Suitability of Antimicrobial Grouper Bone Gelatin Films as Edible Coatings for Vacuum-Packaged Fish Steaks. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **25**, 724–734.
- Sharma, C.S., Ates, A., Joseph, P., Nannapaneni, R. & Kiess, A. (2013a). Reduction of salmonella in skinless chicken breast fillets by lauric arginate surface application. *Poultry Science*, **92**, 1419–1424.
- Sharma, C.S., Ates, A., Joseph, P., Soni, K.A., Schilling, M.W. & Kiess, A. (2013b). Evaluation of antimicrobial effects of lauric arginate on reduction of Salmonella spp. in ground chicken. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**, 1410–1415.
- Siragusa, G.R. & Dickson, J.S. (1992). Inhibition of Listeria monocytogenes on Beef Tissue by Application of Organic Acids Immobilized in a Calcium Alginate Gel. *Journal of Food Science*, **57**, 293–296.
- Soni, K.A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F. & Nannapaneni, R. (2012). Reduction of Listeria monocytogenes in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, **155**, 82–88.
- Soni, K.A., Shen, Q. & Nannapaneni, R. (2014). Reduction of Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon by bacteriophage P100, nisin and lauric arginate, singly or in combinations. *International Journal of Food Science and Technology*, **49**, 1918–1924.
- Stella, J.M., Luchansky, J.B., Miller, K., Shoyer, B.A., Shane, L.E., McGeary, L., Osoria, M., Stahler, L.J., Severt, N.J., Phebus, R.K., Thippareddi, H. & Porto-Fett, A.C.S. (2017). Use of an Electrostatic Spraying System or the Sprayed Lethality in Container Method To Deliver Antimicrobial Agents onto the Surface of Beef Subprimals To Control Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. *Journal of Food Protection*, **80**, 1393–1400.
- Stopforth, J.D., Visser, D., Zumbrink, R., Dijk, L. Van & Bontenbal, E.W. (2010).



- Control of *Listeria monocytogenes* on Cooked Cured Ham by Formulation with a Lactate-Diacetate Blend and Surface Treatment with Lauric Arginate. *Journal of Food Protection*, **73**, 552–555.
- Sukumaran, A.T., Nannapaneni, R., Kiess, A. & Sharma, C.S. (2015). Reduction of *Salmonella* on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 8–15.
- Sun, L., Sun, J., Liu, D., Fu, M., Yang, X. & Guo, Y. (2018). The preservative effects of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during cold storage: Correlation between the preservative effects and the active properties of th. *Food Packaging and Shelf Life*, **17**, 1–10.
- Svanevik, C.S. & Lunestad, B.T. (2011). Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Microbiology*, **151**, 164–170.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**, 1199–1218.
- Tayel, A.A., Almabady, N.A., Sorour, N.M. & Diab, A.M. (2018). Application of natural plant extracts as colorants, preservatives, and anti-listerial agents in processed fish products. *Journal of Food Safety*, **38**, 1–7.
- Techathuvanan, C., Reyes, F., David, J.R.D. & Davidson, P.M. (2014). Efficacy of Commercial Natural Antimicrobials Alone and in Combinations against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Protection*, **77**, 269–275.
- Teixeira, B., Marques, A., Pires, C., Ramos, C., Batista, I., Saraiva, J.A. & Nunes, M.L. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT - Food Science and Technology*, **59**, 533–539.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. & Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, **43**, 587–595.
- Terjung, N., Holzwarth, S., Loeffler, M., Gibis, M., Herrmann, K., Hinrichs, J. & Weiss, J. (2016). Antimicrobial efficacy of a spice ferment in emulsion type sausages and restructured ham. *Food Control*, **59**, 139–147.
- Terjung, N., Loeffler, M., Gibis, M., Salminen, H., Hinrichs, J. & Weiss, J. (2014). Impact of Lauric Arginate Application Form on its Antimicrobial Activity in Meat Emulsions. *Food Biophysics*, **9**, 88–98.
- Thaker, M., Hanjabam, M.D., Gudipati, V. & Kannuchamy, N. (2017). Protective Effect of Fish Gelatin-Based Natural Antimicrobial Coatings on Quality of Indian Salmon Fillets during Refrigerated Storage. *Journal of Food Process*

- Engineering*, **40**, 1–10.
- Theinsathid, P., Visessanguan, W., Kruenate, J., Kingcha, Y. & Keeratipibul, S. (2012). Antimicrobial Activity of Lauric Arginate-Coated Polylactic Acid Films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on Cooked Sliced Ham. *Journal of Food Science*, **77**.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. & Cullen, P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 5987–6000.
- Tomar, R.S., Sharma, B., Kaushik, S. & Mishra, R.K. (2018). Potential antifungal activity of essential oils and their application in food preservation. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **11**, 54–57.
- Utami, R., Nursiwi, A. & Wohon, N. (2018). The effect of tapioca-based edible coating enriched with nisin on quality of patin (*Pangasius hypophthalmus*) fillet during cold storage. *Jurnal Teknologi*, **4**, 111–116.
- Vásconez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado, J. & Gerschenson, L.N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, **42**, 762–769.
- Vimaladevi, S., Panda, S.K., Xavier, K.A.M. & Bindu, J. (2015). Packaging performance of organic acid incorporated chitosan films on dried anchovy (*Stolephorus indicus*). *Carbohydrate Polymers*, **127**, 189–194.
- Vuuren, S.F. van & Viljoen, A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 540–544.
- Wei, D., Huo, W., Li, G., Xie, Q. & Jiang, Y. (2018a). The combined effects of lysozyme and ascorbic acid on microstructure and properties of zein-based films. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **26**, 648–656.
- Wei, J., Zhang, Z., Cai, Q. & Peng, B. (2018b). Effects of high hydrostatic pressure on structural and physical properties of nisin-SPI film. *International Journal of Biological Macromolecules*, **111**, 976–982.
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2018). Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. *LWT*, **89**, 427–433.
- Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J. & Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, **2**, 7–16.
- Wu, T., Ge, Y., Li, Y., Xiang, Y., Jiang, Y. & Hu, Y. (2018). Quality enhancement of large yellow croaker treated with edible coatings based on chitosan and lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, **120**, 1072–1079.

- Yang, F., Hu, S., Lu, Y., Yang, H., Zhao, Y. & Li, L. (2015). Effects of Coatings of Polyethyleneimine and Thyme Essential Oil Combined with Chitosan on Sliced Fresh *C. hanna argus* during Refrigerated Storage. *Journal of Food Process Engineering*, **38**, 225–233.
- Yang, S., Sadekuzzaman, M. & Ha, S.-D. (2017). Treatment with lauric arginate ethyl ester and commercial bacteriophage, alone or in combination, inhibits *Listeria monocytogenes* in chicken breast tissue. *Food Control*, **78**, 57–63.
- Yanwong, S. & Threepopnatkul, P. (2015). Effect of peppermint and citronella essential oils on properties of fish skin gelatin edible films. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*.
- Yener, F.Y.G., Korel, F. & Yemenicioğlu, A. (2009). Antimicrobial activity of lactoperoxidase system incorporated into cross-linked alginate films. *Journal of Food Science*, **74**.
- Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L. & McClements, D.J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 6247–6255.
- Ziani, K., Osés, J., Coma, V. & Maté, J.I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 2159–2165.
- Ziani, K., Ursúa, B. & Maté, J.I. (2010). Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, **29**, 853–859.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P. & Biliaderis, C.G. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, **24**, 49–59.
- Zivanovic, S., Chi, S. & Draughon, A.F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, **70**.

## **Chapter 2. Combined effect of antimicrobial edible coatings with reduction of initial microbial load on the shelf-life of fresh hake (*Merluccius merluccius*) medallions**

---

### **Publicado como:**

Otero-Tuárez, V., Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Fernández, T. & Maté, J.I. (2018). Combined effect of antimicrobial edible coatings with reduction of initial microbial load on the shelf-life of fresh hake (*Merluccius merluccius*) medallions. International Journal of Food Science & Technology.

### **Parcialmente presentado como:**

Otero-Tuárez, V., Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I. y Maté, J.I. (2016). Efecto de los recubrimientos comestibles antimicrobianos sobre la evolución de la calidad microbiológica de medallones frescos de merluza refrigerada. XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Acta de publicaciones "Retos y Avances en Microbiología de los Alimentos 2016". León-España. ISBN: 978-84-617-4433-6.



## Abstract

---

Two distinct strategies were combined to preserve fresh fish (*Merluccius merluccius*) under refrigeration at 4 °C for 12 days: i) the application of an antimicrobial edible coating enriched with oregano essential oil (OEO) or carvacrol (CV) and ii) the reduction of initial microbial load by good handling practice y the use of sodium hypochlorite (NaOCl). The action of antimicrobial coatings alone retarded the growth of *Enterobacteriaceae*, lactic acid bacteria (LAB) y H<sub>2</sub>S producing bacteria on fish samples. The reduction of initial microbial load by itself only affected the evolution of LAB, but not the rest of the bacterial groups. When using both techniques combined, edible antimicrobial coatings were significantly more effective with additional y significant delays in the growth of mesophilic, psychrotrophic y *Pseudomonas* bacteria. Thus, the use of both strategies combined resulted in a reduction of the counts of all bacterial groups after 12 days of storage which ranged from 1.5 log y 8 log, in *Pseudomonas* y H<sub>2</sub>S producing bacteria, respectively. Moreover, no significant differences were observed when comparing the microbiological evolution of samples treated with OEO compared to those only treated with CV.

## 2.1. Introduction

---

Fresh fish is a highly perishable food product, thus, increasing its shelf-life is crucial for this industry. The major cause of deterioration is bacterial growth. The fresh fish industry has been applying a number of preservation technologies to reduce the proliferation of microorganisms. Disinfection is one of the strategies employed to reduce the bacterial load on fresh fish. Chlorinated water is widely used for both washing fish y cleaning processing surfaces y is recommended by International Organizations (FAO/WHO, 2008). The most commonly used forms

of chlorine in the fish industry are  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  y  $\text{NaOCl}$ . The bactericidal effect of chlorinated water is based on its strong, penetrating, oxidizing action on the enzyme system of the bacterial cell (Bremer and Osborne, 1998). The concentration of chlorine used in the fish industry depends on the fish species y the target microorganism. Thus, Bremer and Osborne (1998) described that water containing free chlorine at  $200 \text{ mg L}^{-1}$  could eliminate over 99 % of *Listeria monocytogenes* in King Salmon. A similar procedure was reported to control *L. monocytogenes* in shrimp (FAO/WHO, 2008). Other preservation technologies that are commonly used to extend the shelf-life of fresh fish include refrigeration (around  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) along with modified atmosphere packaging (MAP).

The use of edible antimicrobial coatings in fish preservation has been proposed as a new tool to control food microbial growth. Antimicrobial edible coatings are formed directly on the fish product, maintaining a high concentration of the active compounds where they are especially necessary, that is, on the fish surface. Edible coatings are made of a wide variety of raw materials which include polysaccharides, proteins y lipids (Kilincceker *et al.*, 2009). Edible coatings based on whey protein isolate (WPI) are considered to be good barriers to oxygen, lipids, y odors. In addition, WPI is characterized to be an excellent emulsifier which makes it a suitable matrix for hydrophobic compounds including many antimicrobial agents such as select essential oils (Bakkali *et al.*, 2008).

Essential oils are natural mixtures of chemical compounds biosynthesized by plants, such as terpenes, alcohols y ketones (Bakkali *et al.*, 2008). Due to its antimicrobial properties, essential oils have been used to enrich edible films y coatings. Essential oil compounds including CV, thymol y eugenol have been identified to exhibit antibacterial characteristics (Burt, 2004). Gram-negative bacteria are generally less susceptible to essential oils than gram-positive ones. A recent study (Carrión-Granda *et al.*, 2017) evaluated the antimicrobial activity of two major active compounds (thymol y CV) present in the essential oils oregano y thyme

against 12 bacteria related to the spoilage of fish products. The results of this study exhibited a greater efficacy of CV than thymol. On the other hand, the two active compounds had a lower bacterial inhibition capacity compared to their corresponding essential oil, possibly due to a synergistic effect of CV y thymol with some of the other compounds that are part of the Oregano and/or Thyme essential oil extracts. It is essential to assess whether or not these same differences hold true in an *in vitro* situation. Thus, an *in vitro* evaluation is included in the present research.

Antimicrobial edible coatings with essential oils incorporated have been applied to fish for shelf-life studies. Pyrgotou *et al.* (2010) evaluated the effect of OEO combined with MAP on fresh rainbow trout fillets stored at the refrigeration temperature of 4 °C for 21 days. These authors observed *Enterobacteriaceae*, LAB y H<sub>2</sub>S producing bacteria growth inhibition. Hosseini *et al.* (2016) studied the effect of a fish gelatin coating containing OEO on the shelf-life of rainbow trout fillets under refrigeration. A significant delay in the growth of mesophilic bacteria was demonstrated.

Most of these shelf-life studies did not consider the initial microbial load of the fresh fish to be a factor, which could have influenced the results. According to the International Commission on Microbiological Specifications for Foods, most aquatic animals at the time of harvest had microbial counts in the range of 10<sup>2</sup> to 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup> (ICMSF, 2005). Özean and Erkmen (2001) studied the antimicrobial activity of the essential oils of nine plants spices, among them OEO, against ten bacterial strains involved in food spoilage. They concluded that all food products require a very low initial microbial load for increased shelf-life when using essential oils. Another recent study (Carrión-Granda *et al.*, 2018) evaluated the effect of a WPI based coating enriched with oregano or thyme essential oils in combination with MAP technology on the shelf-life of hake fillets. When special hygienic care was taken with the fillets during cleaning y deboning, an initial lower microbial



load was accomplished. This initial reduced microbial load was illustrated to significantly improve the effectiveness of the posterior treatments. Therefore, it is necessary to evaluate the influence on the effectiveness of the coatings when a greater reduction of the initial microbial load is achieved.

Thus, the main objective of this research was to study the effect of an antimicrobial WPI based coating on the shelf-life of fresh hake medallions with various levels of initial microbial loads. A second objective was to compare the two antimicrobial agents, OEO with CV, in order to confirm the possible synergistic effect of the other components constituting OEO on the evolution of the microbiological quality of fresh hake.

## 2.2. Materials y methods

---

### 2.2.1 Materials

Davisco Food International (Le Seur, MN, USA) provided the WPI. Panreac Química S.A. (Barcelona-Spain) provided the glycerol and NaOCl (10 % w/v). Esencias Martínez Lozano S.A. (Murcia-Spain) provided the OEO (*Origanum vulgare*) with the following composition: 72.23 % CV, 2.19 % thymol and 0.02 % Eugenol. Sigma-Aldrich (Madrid-Spain) supplied the CV, the main active compound of OEO.

### 2.2.2 Preparation of hake medallions

Three types of hake medallions (*M. merluccius*) with different microbial loads were used for tests A, B and C. Test A corresponded to the least strict hygienic conditions whereas test C the most intense one. To complete each test, eight hake individuals of an average weight of 0.70 Kg and average length of 35 cm were necessary. In all cases, fresh hake was purchased from a local fishery in Pamplona,

Spain and transported in a cooler filled with ice to our lab. For test A, the hake was eviscerated and filleted at the fish market and medallions were obtained aseptically (inside a laminar flow chamber) in the laboratory. For test B, whole eviscerated hake was purchased then filleted and cut to obtain medallions aseptically in our lab inside a laminar flow chamber. For test C, pieces of whole hake were acquired in the market and taken to the lab where they were first submerged for one minute in 15 liters of cold water (approximately  $4 \pm 2$  °C) containing 250 mg L<sup>-1</sup> of NaOCl; then the pieces of hake were eviscerated and washed with tap water and finally filleted and cut to obtain medallions inside a laminar flow chamber. For the three tests, the medallions employed weighed approximately 25 g each. Three medallions were prepared per sample.

### 2.2.3 Preparation of the antimicrobial film-forming solutions (FFS)

Three hundred millilitres of FFS was prepared for each treatment following the procedure described by Carrión-Granda *et al.* (2018). Firstly, a solution of WPI at 10 % (w/w) and glycerol at 5 % (w/w) in distilled water was prepared. The solution was heated in a water bath at 90 °C for 30 minutes under constant stirring after which it was cooled to room temperature. Then, OEO or CV was added at 3 or 2.16 % (w/w) respectively. The amount of CV corresponded to its concentration in a 3 % OEO solution. Finally, FFS were homogenized by sonication (UP 400, HUT, Germany) using a 7 mm diameter tip for 5 min at 100 % amplitude. During sonication each FFS was maintained in an ice water bath to avoid temperature raises over 30 °C.

#### 2.2.4 Preparation of coated samples

For the coating, each fish medallion was first dipped in 150 mL of FFS for 1 min; the excess FFS was allowed to drip off for 45 s, and samples were then dried for 5 min under an air stream. After this process, the medallions were dipped again in the FFS for 1 min, drained for 45 s and dried again under an air stream for 30 min. The coated fish samples plus controls were packaged in polypropylene trays, heat-sealed and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 12 days.

In each test, three replicates were established for each treatment. Each replicate consisted of one fish medallion. The experimental groups were as follows: 1) Control group (C): uncoated hake medallions; 2) WPI group: hake medallions coated with FFS without OEO or CV; 3) WPI+OEO group: hake medallions coated with FFS enriched with 3 % OEO and 4) WPI+CV group: hake medallions coated with FFS enriched with 2.16 % CV.

#### 2.2.5 Microbiological analysis

At days 0, 4, 8 and 12 of storage, fish samples from the three trials (A, B and C) of each of the treatments were collected for microbiological analysis. Hake medallions were aseptically weighed, placed in sterile plastic bags (BagPage, Interscience-France) and homogenized with 225 mL of buffered peptone water (pH  $7 \pm 0.1$  at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Cultimed, Spain) using a stomacher (Stomacher 400, London-UK) for 2 min. Decimal dilutions were prepared which were then seeded on the surface of culture media (agar) using a spiral planter (Eddy Jet 2 for spiral seeding IUL, USA). Table 2.1 describes the microorganisms that were evaluated for each sample. The results were expressed in  $\log\text{ CFU g}^{-1}$ . The maximum growth ranges

will be in accordance with the European Regulations (EC, 2005). In addition, values  $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$  are considered to have an undetectable concentration of microorganisms.

**Table 2.1.** Microorganisms associated with fish spoilage and culture conditions.

Microorganisms	Culture medium	Incubation
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)	37 °C; 24 h
Mesophilic bacteria	Plate Counting Agar (PCA)	30 °C; 48 h
Psychrotrophic bacteria	Plate Counting Agar (PCA)	5 °C; 7 days
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> Agar (PS Agar)	30 °C; 48 h
Lactic acid bacteria	De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS)	30 °C; 5 days
H <sub>2</sub> S producing bacteria	Iron Agar (IA)	30 °C; 48 h

### 2.2.6 Data Analysis

All tests were performed in triplicate. The statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Duncan's multiple range test was used to observe significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between the means of the variables.

## 2.3. Results y discussion

### 2.3.1. Microbiological quality of fresh fish

The microbiological quality of fresh hake medallions (uncoated control group) was evaluated at time zero in test A, B and C. As shown in Fig. 2.1, the counts of all bacterial groups except LAB, were significantly lower ( $p < 0.05$ ) in test C samples and significantly higher ( $p < 0.05$ ) in the test A samples; in all cases,

intermediate values were found for the samples from test B. In the case of LAB the growth was  $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$  at time zero for the three tests. In addition, for all of the tests the counts of mesophilic bacteria did not exceed the legal limit for marketing ( $6 \log \text{CFU g}^{-1}$ ), according to the current legislation (EC, 2005). However, total counts of *Enterobacteriaceae* in test A ( $4.27 \log \text{CFU}^{-1}\text{g}$ ) and in test B ( $3.19 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) exceeded the maximum legal amount for commercialization ( $3 \log \text{CFU g}^{-1}$ ); this was not the case for test C ( $< 1 \log \text{CFUg}^{-1}$ ). When applying a NaOCl solution as a surface disinfectant (test C), the initial microbiota present on the surface of the fish was considerably reduced, thus, minimizing the contamination of the hake medallions during filleting. Therefore, the bacterial load present on fish skin was demonstrated to be critical for the microbiological quality of fresh medallions.

As is commonly known, live and healthy fish do not contain microorganisms in their flesh. Microorganisms are only located on their skin, gills and digestive track (Boziaris and Parlapani, 2017). Aponte *et al.* (2018) reported microorganism values higher than  $3 \log \text{CFU cm}^{-2}$  on the skin of cod two days after fishing. These authors also quantified how flesh was being contaminated during preparation of fish samples. Thus, if microbial load on the fish surface is reduced, the microbial quality of processed fish would be improved as illustrated in our results.

The total counts of microorganisms in fresh fish from test A at time zero were similar to the results reported by Carrión-Granda *et al.* (2018) who used fresh hake filleted at the fish market. This author reported the presence of mesophilic, psychrotrophic bacteria and *Pseudomonas* spp. at very high levels ( $> 5 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). Ozogul and Uçar (2013) used fresh fish filleted at the fishery to evaluate the antimicrobial activity of different essential oils, and also observed at the beginning of the test for the control group, total counts of mesophilic bacteria and psychrotrophic bacteria  $> 5 \log \text{CFU g}^{-1}$ . In addition, Bensid *et al.* (2014) reported values related to the growth of mesophilic and psychrotrophic bacteria similar to

those reflected in test B; likely and due to the fact that the fresh fish was filleted under laboratory conditions. In test C of the present study, the initial concentrations of mesophilic bacteria ( $3.53 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) and psychrotrophic bacteria ( $3.21 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) were significantly lower than those reported in the previous studies, although similar to the ones reported by Jasour *et al.* (2015). In this research the uncoated fresh fish medallions were immersed in purified water, likely reducing the initial microbial load.

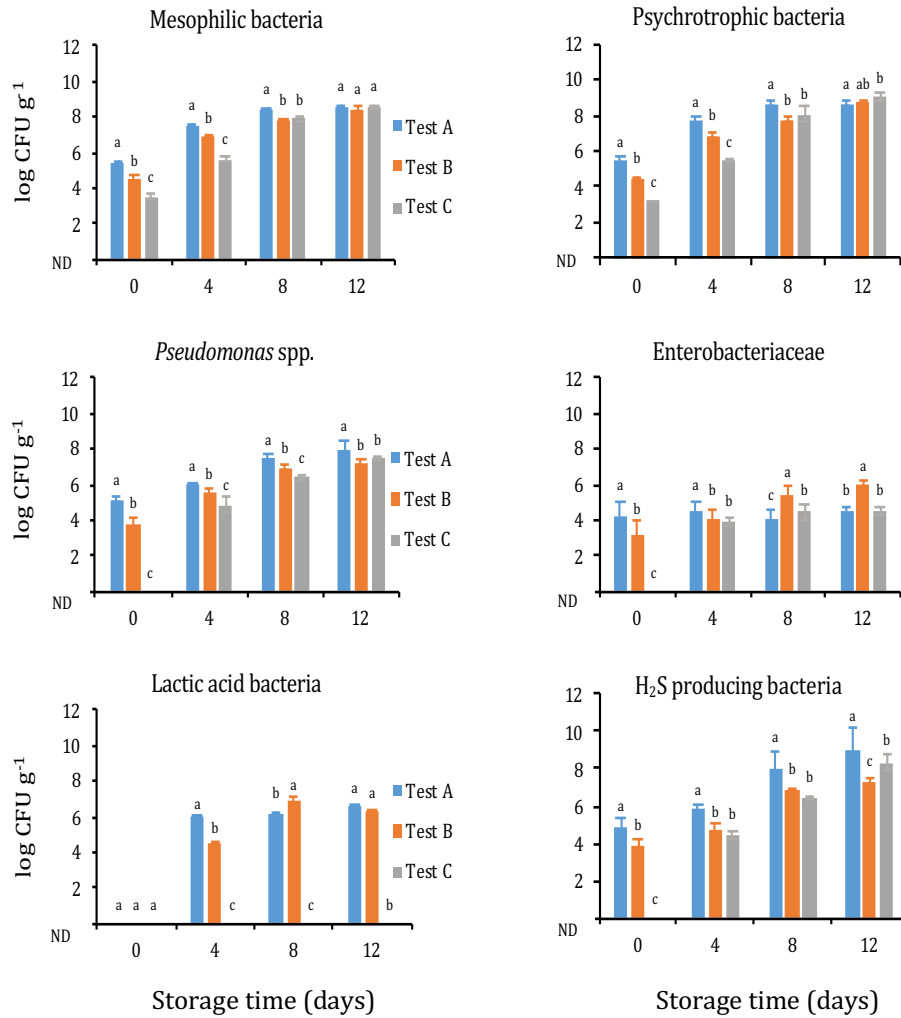
### 2.3.2. Shelf-life of uncoated samples

The evolution of the microbial quality of uncoated fish samples with distinct levels of initial microbial load is shown in Fig. 2.1. In most of the bacterial groups studied (except LAB), the differences in microbial counts observed at time zero among tests were not maintained after 8 or 12 days storage at 4 °C. Therefore, the growth rate of these bacteria groups in test C (most strict starting hygienic conditions) was faster than in samples from test A or B.

The counts for LAB was  $\leq 1 \log$  at time zero for all of the tests. However, the evolution of the LAB growth was significantly different ( $p < 0.05$ ) in test C compared to A or B. In the former there was no detectable bacterial growth during the 12 days of the experiment. In tests A and B there was fast growth during the first 4 days and slower growth thereafter. The microbial concentration after 8 days was in both cases  $\geq 6 \log$  indicating a quite intense contamination.

Thus, the presence of LAB bacterial group could be controlled by implementing an improvement of the hygienic conditions during handling and processing and performing a surface disinfection treatment (with NaOCl solution) on the whole fish. However, this approach was not enough to increase shelf-life longer than 4 days, since it was not effective for the rest of the bacterial groups.

An extra strategy, such as the use of an antimicrobial edible coating, would be needed to control microbial growth in fresh hake medallions and achieve a notable increase in shelf-life.



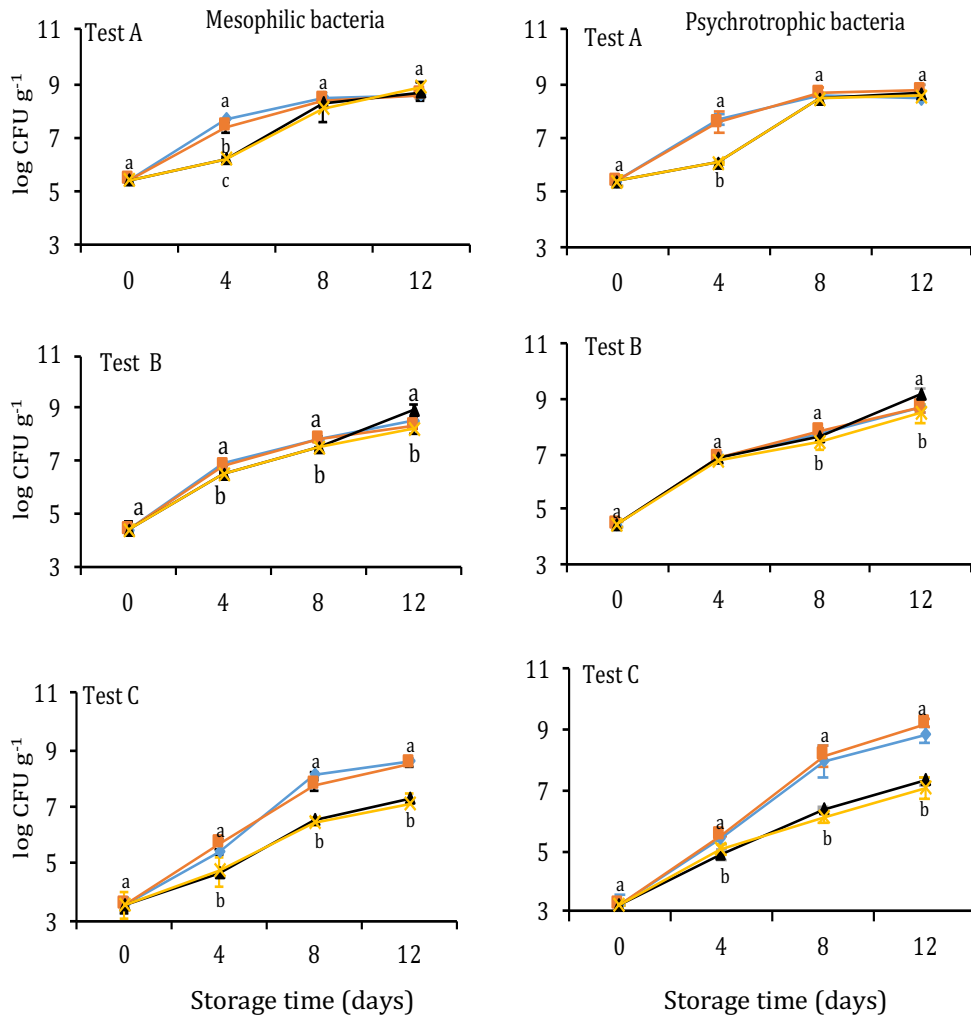
**Figure 2.1.** Total microorganism counts (log CFU g<sup>-1</sup>) associated with fish spoilage in samples of fresh uncoated hake (control group) during 12 days at 4 °C. Test A, fish filleted at the fish market. Test B, fish filleted in laboratory. Test C, fish eviscerated y filleted in laboratory. Different letters (a, b and c) indicate significant differences in each bacterial group. ND: non-detectable.

### 2.3.3. Shelf-life of coated samples

The evolution of the total counts of mesophilic bacteria on coated samples is shown in Fig. 2.2. In test A, during the first 4 days of storage, the proliferation of mesophilic bacteria was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in hake medallions coated with WPI + OEO or WPI + CV ( $> 6 \log \text{CFU g}^{-1}$ ), compared with the control group ( $> 7 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). However, after 8 or 12 days of storage, no differences were observed in the bacterial counts in the different treatments with or without edible coating. In test B, there were not differences between the different treatments (with or without coating) in the evolutions of the microbial counts of mesophilic bacteria. Finally, in test C, a significant ( $p < 0.05$ ) delay of the growth of mesophilic bacteria after 4 days of storage was observed in samples with an antimicrobial coating ( $\geq 4.70 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) compared to the control samples ( $\geq 5.45 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). This significant delay was maintained during the 12 days of storage (Fig 2).

Similar behavior was observed in the growth rate of the psychrotrophic bacteria (Fig 2.2). Thus, for test A after 4 days of storage, total counts in the WPI + OEO and WPI + CV coated medallions were  $> 6 \log \text{CFU g}^{-1}$  and in the control samples  $> 7 \log \text{CFU g}^{-1}$ . After 8 days of storage, there were no differences among samples. In test B, the same growth range was observed in all groups of treated medallions, with and without coating throughout the storage period. However, in test C there was a significant delay in psychrotrophic bacteria growth in fish samples with antimicrobial coatings from day 4 ( $\geq 4.85 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) compared to control samples ( $\geq 5.40 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). This delay was maintained during the 12 days of storage.

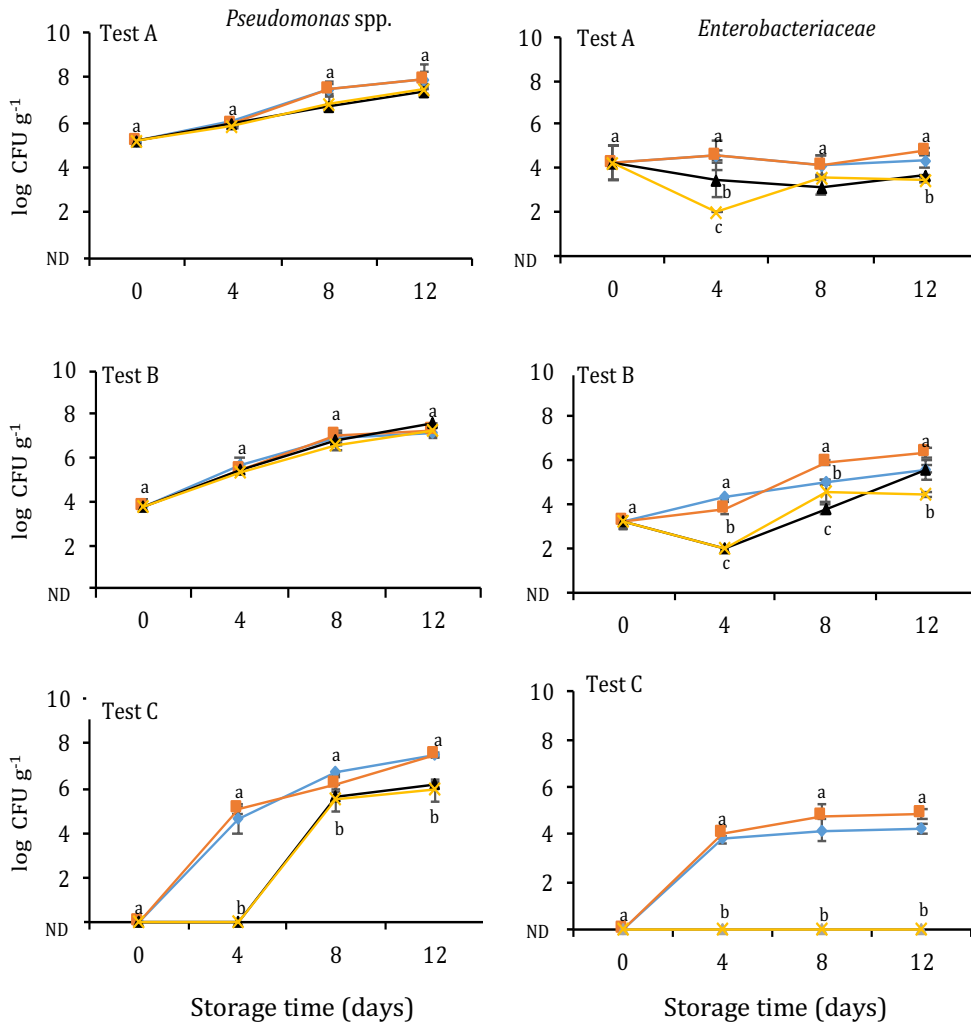




**Figure 2.2.** Total mesophilic and psychrotrophic bacteria counts (tests: A, B y C), during 12 days of refrigeration at 4 °C. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI y OEO; WPI + CV: coating with WPI y CV. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Oregano essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ✕-WPI+CV.

*Pseudomonas* spp. proliferation was considerably high (Fig 2.3) in tests A and B. Antimicrobial edible coatings were not found to significantly affect the growth of *Pseudomonas* spp., when starting from a relatively high initial bacterial population. In test C, with a lower initial microbial load, a significant delay ( $p < 0.05$ ) of *Pseudomonas* growth was observed in coated fish samples ( $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) in contrast to the control samples ( $\geq 4.60 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) after 4 days of storage. This significant delay was maintained until day 12 of storage, although the absolute difference was lower (about  $1.5 \log \text{CFU g}^{-1}$ ).

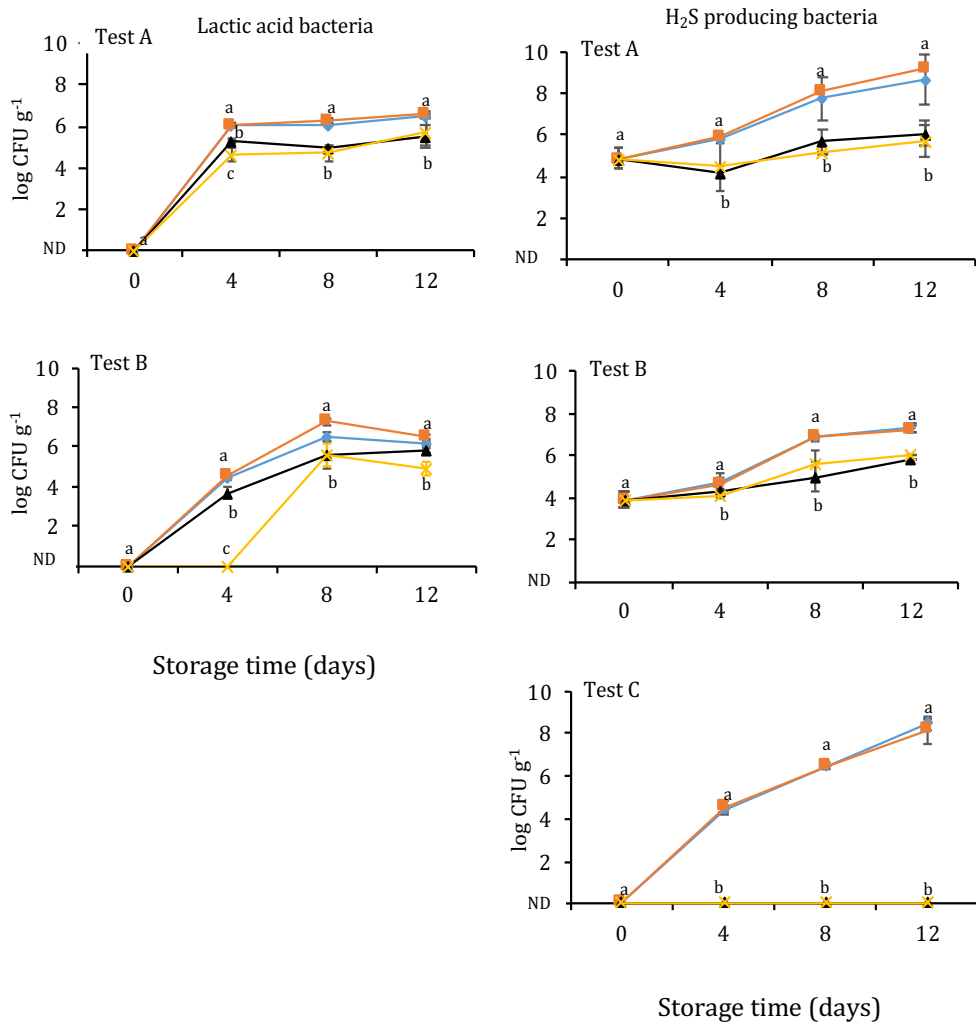
The results of the evolution of *Enterobacteriaceae* population in fish samples are shown in Fig. 2.3. The evolution of bacterial counts was similar for tests A and B. Thus, in both treatments, after 4 days of storage, although there were significant differences among treatments, the microbial quality in all samples was similar and above  $> 3 \log \text{CFU g}^{-1}$ ; thus, no longer suitable for commercialization (EC, 2005). The results for test C showed that at time zero the counts of *Enterobacteriaceae* were very low ( $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) in all samples due to the disinfecting treatment. From day 4 on, the growth of this bacterial group was kept very low ( $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) in samples with an antimicrobial coating treatment. However, counts in Control groups ( $\geq 3.80 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) increased and were significantly higher than the treated samples as observed in Fig 3. Thus, the effect of antimicrobial compounds on this bacterial group in test C was very notable.



**Figure 2.3.** Total *Pseudomonas* spp., and *Enterobacteriaceae* counts (tests: A, B and C) for 12 days of refrigeration at 4 °C. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI and OEO; WPI + CV: coating with WPI and CV. Different letters (a, b, c) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Origanum essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ✕-WPI+CV. ND: non-detectable.

The evolution of LAB counts are presented in Fig. 2.4. In tests A and B, LAB growth after 4 days of storage was statistically lower in fish samples with WPI + CV compared to that obtained in fish samples with WPI + OEO. In both cases the CFU counts were significantly lower than those from the control group. In both A and B this significant delay in samples with edible antimicrobial coatings was extended up to 12 days of storage ( $> 5 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) as compared to the control group samples ( $> 6 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). In test C, LAB growth was  $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$  in both fish samples with and without edible coating during the 12 days of storage. This was likely due to the disinfecting effect the NaOCl treatment had on the initial LAB population on the surface of the fresh fish.

The evolution of  $\text{H}_2\text{S}$  producing bacteria is also shown in Fig. 2.4. In test A, the proliferation of these bacteria on fish samples with antimicrobial coating (with OEO or CV) was significantly lower than that on the control samples. This was the case during the whole 12 days of storage. At day 12, the count difference between the treated and control samples was higher than  $2.5 \log \text{CFU g}^{-1}$ . The evolution of  $\text{H}_2\text{S}$  producing bacteria in test B, with a lower starting microbial population, was similar to test A. After 12 days, the difference in microbial counts between treated and control samples was greater than  $1.5 \log \text{CFU g}^{-1}$ . Finally, in test C a much more intense inhibition occurred than in the other two tests. During the 12 days of storage the  $\text{H}_2\text{S}$  producing bacteria counts on fish samples with antimicrobial edible coatings was  $< 1 \log \text{CFU g}^{-1}$  which was significantly lower than the counts for the control which progressively increased from  $\geq 4.46 \log \text{CFU g}^{-1}$  at the 4th day of storage up to  $\geq 8.11 \log \text{CFU g}^{-1}$  at the 12th day. Thus, in this bacterial group the effect of the initial microbial load on the efficacy of the antimicrobial edible coatings was notable.



**Figure 2.4.** Total Lactic acid bacteria and H<sub>2</sub>S producing bacteria counts (tests: A, B and C) for 12 days of cooling at 4 °C. Test C, is not included in the figure of Lactic acid bacteria, because no bacterial growth was detected in the samples. C: uncoated control; WPI: WPI coating; WPI + OEO: coating with WPI and OEO; WPI + CV: coating with WPI and CV. Different letters (a, b) indicate significant differences between treatments. WPI: Whey Protein Isolate. OEO: Oregano essential Oil. CV: Carvacrol. ◆-C; ■-WPI; ▲-WPI+OEO; ×-WPI+CV. ND: non-detectable.

The overall results presented in herein confirm the potential of edible coatings enriched with OEO and CV to reduce the growth rate of all bacterial groups examined (mesophilic, psychrotrophic, *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, LAB and H<sub>2</sub>S producing bacteria); therefore improving the microbiological quality of fish in cold storage. The extension of that reduction depended on the initial microbial concentration. When using low or intermediate initial microbial quality (tests A and B) there was a reduced impact in the bacterial growth. In the cases of psychrotrophic bacteria and *Pseudomonas* spp. the reduction was not significant, although in LAB and *Enterobacteriaceae* it was. However, in all cases the growth inhibition was much lower than when the initial microbial quantity was high (test C). For test C, results showed that the antimicrobial coatings inhibited the growth of some groups (*Enterobacteriaceae* and H<sub>2</sub>S producing bacteria) and significantly reduced the growth rate of the others. Therefore, the effectiveness of the antimicrobial edible coatings was directly related to the initial bacterial population. Thus, the combined effect of a reduced initial microbial load together with an antimicrobial coating significantly controlled the microbial quality of fresh fish. With the effects of the combination of preservation technologies elucidated in these results the marketable shelf-life of fresh fish could potentially be increased.

Low effectiveness of antimicrobial coatings have been found in the literature, yet these low levels of efficacy could have been related to poor initial microbial quality. Bensid *et al.* (2014) indicated that at day 3 of fish conservation batches treated with OEO, a mesophilic bacteria population of 6.04 log CFU g<sup>-1</sup> exceeding the maximum commercial limit (6 log CFU g<sup>-1</sup>) was detected. The same behavior was observed in psychrotrophic bacteria (6.15 log CFU g<sup>-1</sup>). Iturriaga *et al.* (2012) reported that OEO had no inhibitory effect against two bacteria associated with the deterioration of fish (*Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas hydrophila*) and against *Listeria innocua*. The low initial microbial load present in

fresh fish in this study ( $> 4 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) could have affected the efficacy of the antimicrobial coating treatment. In our lab, Carrión-Granda *et al.* (2018) reported an improvement in the efficiency of antimicrobial edible coatings combined with MAP technology in hake when special care with the fillet hygiene was taken, thus resulting in a reduced initial microbial load.

Results from test C are consistent with the data published by Hosseini *et al.* (2016) which reported that an edible coating enriched with OEO applied to fresh fish significantly delayed bacterial growth during 12 days of storage. The initial bacterial load was  $\geq 3 \log \text{CFU g}^{-1}$  for mesophilic bacteria and  $\geq 2 \log \text{CFU g}^{-1}$  for psychrotrophic bacteria. Jasour *et al.* (2015) significantly reduced initial bacterial load on uncoated samples of fresh fish and reported mesophilic ( $3.43 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) and psychrotrophic bacteria counts ( $3.33 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) similar to test C of our research. They reported that the antimicrobials evaluated had a significant effect during 16 days of storage. It is likely the reduction of the microbial load had a positive effect on these results.

The results of this paper also indicate that there were not significant differences between of the use of OEO and CV as an antimicrobial agent applied on fish through edible coatings. Since the concentration of CV was the same in both OEO and CV coatings, the action of the other compounds present in OEO (6.82 % *p*-cimene, 2.19 % thymol, 0.02 % eugenol) was considered negligible as compared to the action of CV (72.23 %). In addition, the presence of a WPI coating without antimicrobial agent did not have any effect on the evolution of the microbial population. This was expected since WPI does not have any known antimicrobial activity.

## Conclusions

---

In conclusion, a reduction of the microbial load by itself had a limited effect on the evolution of the microbial quality (higher CFU quantities), although it was very effective on the LAB group. In addition, it has been demonstrated that the effectiveness of the antimicrobial coatings was much higher when the surface of the fish had a very low initial microbiological load (experiment C), which implied a synergistic effect between both technologies. It can be concluded that in order to ensure an increase in the commercial life of fresh fish through antimicrobial edible coatings, the fish has to be handled hygienically before the treatment and/or had to be subjected to a superficial disinfection process. Furthermore, no significant differences were found between the antimicrobial effects of coatings with OEO or CV at the same concentrations, demonstrating that the possible synergistic effect of the other components of the OEO had no significant impact.

## References

---

- Aponte, M., Anastasio, A., Marrone, R., Mercogliano, R., Peruzy, M.F. & Murru, N. (2018). Impact of gaseous ozone coupled to passive refrigeration system to maximize shelf-life and quality of four different fresh fish products. *LWT*, **93**, 412–419.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B. & Özogul, F. (2014). Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food chemistry*, **145**, 681–6.
- Bozaris, I.S. & Parlapani, F.F. (2017). Chapter 3 - Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In: *The Microbiological Quality of Food*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition (edited by A. Bevilacqua, M.R. Corbo & M. Sinigaglia). Pp. 61–98. Woodhead Publishing.
- Bremer, P.J. & Osborne, C.M. (1998). Reducing total aerobic counts and *Listeria*



- monocytogenes on the surface of king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Food Protection*, **61**, 849–854.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology*, **94**, 223–53.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Mezquita, S., Rovira, J. & Maté, J.I. (2017). Development of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Rosemary Extracts to Improve the Microbiological Quality of Fresh Tuna. *MOJ Food Processing & Technology*, **5**, 1–8.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Rovira, J. & Maté, J.I. (2018). Effect of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stored Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets. *Journal of Food Quality*, 1–12.
- EC. (2005). Commission Regulation No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Journal of the European Union*, **L322**, 1–19.
- FAO/WHO. (2008). Benefits and risks of the use of chlorine containing disinfectants in food production and food processing (Rep. No. 11357). World Health Organization. Shao., Report of a Joint Expert Meeting, 1–5.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M. & Ghavi, F.F. (2016). Effect of Fish Gelatin Coating Enriched with Oregano Essential Oil on the Quality of Refrigerated Rainbow Trout Fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **25**, 835–842.
- ICMSF. (2005). *Microorganisms in food 6: microbial ecology of food commodities*. Segunda ed. New York: 2005 by Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I. & Marañón, I.M. de. (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**, 58–64.
- Jasour, M.S., Ehsani, A., Mehryar, L. & Naghibi, S.S. (2015). Chitosan coating incorporated with the lactoperoxidase system: an active edible coating for fish preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 1373–1378.
- Kilincceker, O., Dogan, I.S. & Kucukoner, E. (2009). Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 868–873.
- Özean, M. & Erkmen, O. (2001). Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research and Technology*, **212**, 658–660.
- Ozogul, Y. & Uçar, Y. (2013). The Effects of Natural Extracts on the Quality Changes

of Frozen Chub Mackerel (*Scomber japonicus*) Burgers. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 1550–1560.

Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Savvaidis, I.N. (2010). Quality Assessment of Salted, Modified Atmosphere Packaged Rainbow Trout under Treatment with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science*, **75**, M406–M411.



## **Capítulo 3.** Efecto de la presencia de etil lauroil arginato en las propiedades tecnológicas de películas comestibles basadas en gelatina de pescado

---

### **Parcialmente presentado como:**

Otero-Tuárez, V., Fernández-Pan, I. y Maté, J.I. (2017). Technological properties of antimicrobial edible films based on fish gelatin enriched. In: International Conference on Food Innovation-Food Innova. Cesena - Emilia - Romagna - Italy. Dept. de Agronomía, Biotecnología y Alimentación. Universidad Pública de Navarra, Pamplona-España.



## Resumen

---

Se estudiaron las propiedades físicas, químicas y antimicrobianas de las películas comestibles de gelatina de pescado (GP) con diferentes concentraciones de etil lauroil arginato (LAE) (0 %, 0.5 %, 1 %, 5% y 10 %). El LAE afectó el pH y la tensión superficial de la solución formadora de película (SFP), que disminuía con el incremento del LAE. Las propiedades ópticas no fueron afectadas por la incorporación del LAE, se obtuvieron películas transparentes y homogéneas. El incremento de la concentración del LAE en las películas comestibles, no afectaba a la humedad de las películas, pero sí a la solubilidad que incrementaba de forma significativa con la adición del LAE. Por otra parte, la presencia del LAE afectaba las propiedades mecánicas de las películas, pero no a la permeabilidad al vapor de agua. Por último, en la actividad antibacteriana de las películas comestibles con LAE, se observaron considerables áreas de inhibición frente a *Listeria innocua* en comparación a las áreas de inhibición observadas en *Shewanella putrefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*. No se detectó actividad antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila*.

### 3.1. Introducción

---

Actualmente se desarrollan películas comestibles antimicrobianas para mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco, debido a que son una herramienta para contrarrestar el crecimiento de bacterias causantes de su deterioro y de agentes patógenos que afectan a la salud del consumidor. Las películas comestibles a base de proteínas, brindan importantes propiedades para la conservación de los alimentos frescos. Las proteínas que se han utilizado habitualmente en las

formulaciones de películas y recubrimientos comestibles (PRC) incluyen: proteínas de origen vegetal procedentes del maíz, soja, trigo, semilla de algodón, cacahuete y arroz y proteínas de origen animal como la caseína, proteína aislada de suero lácteo (WPI), colágeno, gelatina o la albúmina de huevo, entre otras (Ramos *et al.*, 2012).

Los biopolímeros no solo actúan como barreras para la humedad, el vapor de agua, los gases y solutos, sino que también sirven como portadores de una amplia variedad de aditivos, entre los que se incluyen los agentes antimicrobianos. Las propiedades activas de las películas antimicrobianas están relacionadas con la liberación de estos compuestos capaces de retrasar el deterioro de los alimentos. Las PRC antimicrobianas, son un medio de control de la difusión del compuesto antimicrobiano hacia la superficie del pescado fresco e interacción con compuestos externos (Dehghani *et al.*, 2018). La literatura científica describe varias categorías de compuestos activos que pueden incorporarse potencialmente en PRC, tales como: los aceites esenciales, las bacterias probióticas, las bacteriocinas, los ácidos orgánicos, los polipéptidos y los ésteres de ácidos grasos (Dehghani *et al.*, 2018). El etil lauroil arginato (LAE) es un éster recientemente aprobado en Europa (UE, 2014), Estados Unidos, entre otros países; desarrollado de arginina y ácido láurico (Mirenat®, 2014), capaz de reducir rápidamente la cantidad de microorganismos presentes después de su adición. El LAE es un antimicrobiano anfifílico que se ha demostrado posee actividades antimicrobianas muy altas contra bacterias transmitidas por los alimentos como: *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteérica* (Becerril *et al.*, 2013).

Varios estudios se han realizado para evaluar la eficacia antimicrobiana del LAE solo o en combinación con otros compuestos antimicrobianos. Moreno *et al.* (2017) desarrollaron películas activas basadas en almidón y gelatina de origen bovino con LAE como agente antimicrobiano (1.3 g de LAE/100 g de polímero).

Las películas antimicrobianas inhibieron el crecimiento de *Listeria*. Posteriormente, fueron aplicadas en muestras de salmón marinado, reduciendo los recuentos totales viables hasta después de 45 días de almacenamiento a 5 °C. Fisher *et al.* (2016) evaluaron la eficacia de una solución antimicrobiana hecha con quitosano y LAE contra varias bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Carne fresca inoculada con las bacterias y adobadas con la solución antimicrobiana fue almacenada a 4 °C y evaluadas durante 6, 24 y 48 horas. La solución antimicrobiana retrasó significativamente el crecimiento de todas las bacterias ensayadas. Muriel-Galet *et al.* (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana del LAE (0.5 % y 10 %) incorporado en películas a base de etileno y alcohol vinílico (EVOH) en caldo de pollo y palitos de surimi listo para comer “ready-to eat”. Demostraron un alto impacto del LAE sobre *L. monocytogenes* y *E. coli*, con daños a nivel de membrana celular. Guo *et al.* (2014) estudiaron PRC antimicrobianas a base de ácido poliláctico (PLA) con quitosano mezclado con LAE y nisina, para reducir la contaminación por patógenos en carnes listas para el consumo. Las concentraciones de LAE de 0.388 mg L<sup>-1</sup> en combinación con el quitosano y nisina redujeron hasta 4 log UFC g<sup>-1</sup> de *L. innocua* inoculada. Higuera *et al.* (2013) desarrollaron películas comestibles a base de quitosano combinado con LAE, que fueron aplicadas en filetes de pechuga de pollo almacenados a 4 °C durante 8 días y evaluaron el efecto antimicrobiano. Las películas con quitosano con el 5 % de LAE fueron más efectivas contra la microflora total presente en las muestras de pollo.

El aprovechamiento de recursos renovables como los desechos y subproductos agroindustriales de origen marino, han demostrado una capacidad potencial para ser utilizados para la fabricación de envases que estén en contacto con los alimentos y garanticen su calidad e inocuidad (Etxabide *et al.*, 2017; Leceta *et al.*, 2014). La GP es una alternativa a la gelatina de origen bovino y porcino, debido



a que no está asociada con el riesgo de brotes de encefalopatía espongiforme bovina. Además, posee propiedades que la caracterizan como: la resistencia del gel, la viscosidad, la gelificación y los puntos de fusión (Karim y Bhat, 2009). La GP por ser un hidrocoloide termorreversible y con buenas propiedades de barrera, la convierten en una matriz adecuada para ser utilizada como recubrimiento comestible en alimentos. La GP en su fase acuosa a partir de 40 °C se mezclaría sin dificultad con el LAE, que se disuelve con facilidad a partir de 20 °C (Nerin *et al.*, 2016). Debido a su fuerte capacidad gelificante, estas películas comestibles antimicrobianas pueden ser utilizadas como envases activos para pescado fresco y mejorar la calidad de los productos frescos de la pesca. El presente trabajo, tuvo como objetivo: estudiar la compatibilidad y caracterizar películas comestibles a base de GP con distintas concentraciones de LAE, incluyendo sus propiedades antimicrobianas. Los objetivos específicos fueron: i) evaluar las propiedades físico-químicas de las soluciones formadoras de películas; ii) determinar las propiedades tecnológicas y mecánicas de las películas activas; y iii) evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas activas frente a cuatro cepas bacterianas asociadas al deterioro y patogenicidad del pescado fresco.

## 3.1. Materiales y métodos

---

### 3.1.1. Materiales

Para la elaboración de las películas comestibles con y sin LAE, la GP fue proporcionada por LAPI Gelatine (Empoli, Italia), el glicerol fue suministrado por Sigma (Barcelona, España). El LAE (85 % de pureza) comercializado como Mirenat-P/100 fue suministrado por Vedeqsa Grupo LAMIRSA (Barcelona, España). Para la actividad antibacteriana, se evaluaron cuatro cepas bacterianas: *Listeria innocua* (CECT 910), *Aeromonas hydrophila* (CECT 839), *Shewanella putrefaciens*

(CECT 5346) y *Pseudomonas fluorescens* (CECT 378), que fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. Los medios de cultivo empleados fueron: Brain Heart Infusión (CULTIMED, España); Tryptic Soy Broth proporcionado por Merck (Madrid, España); y Nutrient Broth II (1 g L<sup>-1</sup> extracto de carne; 2 g L<sup>-1</sup> extracto de levadura; 5 g L<sup>-1</sup> peptone; 5 g L<sup>-1</sup> NaCl) suministrado por Panreac Química S.A. (Barcelona-España).

### 3.1.2. Protocolo de preparación de las películas comestibles con y sin LAE

Para la preparación de las soluciones formadoras de películas (SFP) se adaptaron los procesos descritos por Gómez-Estaca *et al.* (2009) y por Tongnuanchan *et al.* (2016). Se prepararon 100 mL de SFP para cada tratamiento.

Para la SFP sin LAE (control), se preparó una mezcla al 10 % (p/p) de GP; como medio plastificante se añadió glicerol al 3 % (p/p). Seguidamente se disolvió la mezcla en agua destilada con agitación constante durante 30 minutos a 70 °C.

Para la preparación de las SFP con LAE, a la formulación control se adicionaron las siguientes cantidades:

- 0.059 g para una concentración final de LAE del 0.5 %
- 0.118 g para una concentración final de LAE del 1 %
- 0.59 g para una concentración final de LAE del 5 %
- 1.18 g para una concentración final de LAE del 10 %.

Las mezclas con LAE fueron disueltas con agua destilada mediante un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos y con agitación constante. Los pesos indicados fueron calculados considerando el 85 % de pureza del LAE Mirenat-P/100 (g de LAE/100 g de gelatina seca).

Para formar las películas comestibles con y sin LAE, se vertieron las SFP en platos de vidrio de 14 cm de diámetro. Las cantidades vertidas en los platos de vidrio por cada tratamiento fueron diferentes, con el objeto de obtener películas

comestibles con espesores homogéneos con y sin LAE. Las cantidades vertidas fueron: Control (SFP sin LAE) 20 mL; SFP con 0.5 % de LAE 19 mL; SFP con 1 % de LAE 18 mL; SFP con 5 % de LAE 13 mL; y SFP con 10 % de LAE 10 mL. Las películas fueron secadas en una cámara climática (Weis Technik, Alemania) a 27 °C y al 75 % de humedad relativa (HR) durante 15 horas. Finalmente, las películas comestibles fueron acondicionadas en un desecador con una solución saturada de bromuro de sodio (al 57 % de HR) durante 24 horas y a temperatura ambiente (22 °C ± 2 °C).

### **3.1.3. Caracterización de la solución formadora de película (SFP)**

Los distintos análisis a las SFP se realizaron a 50 °C, debido a que la gelatina es termorreversible y a temperatura ambiente se encuentra en estado sólido.

### **3.1.4. pH**

El pH fue medido 5 veces para cada SFP con un pH-metro de alta precisión (modelo GLP 22 Crison, Barcelona, España).

### **3.1.5. Turbidez**

La turbidez de las SFP fue medida por triplicado para cada tratamiento. Las medidas fueron realizadas con un nefelómetro modelo Turbiquant 300 IR - 3000 T (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La calibración del equipo se llevó a cabo con un estándar de formazina (Set de calibración Turbiquant 1000 IR) con: 0.02, 10, 100 y 1000 unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

### 3.1.6. Tensión superficial

La tensión superficial de todas las SFP se midió cinco veces para cada uno de los tratamientos, mediante el método del anillo de Du Nouy con ayuda de un tensiómetro digital (K9 Krüss, Alemania). El tensiómetro está equipado con un anillo de platino que se sumergió en la SFP y se elevó a continuación. La máxima fuerza requerida para sacar el anillo a través de la interface correspondió a la tensión superficial expresada en  $\text{mN m}^{-1}$ . Previamente, se usó agua destilada para comprobar la calibración del equipo, cuyo valor debe ser en torno a  $70 \text{ mN m}^{-1}$  a temperatura ambiente.

### 3.1.7. Espesor de las películas comestibles

El espesor fue determinado con un micrómetro digital (modelo ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón) con una precisión de  $1 \mu\text{m}$ , en 10 puntos diferentes de cada película comestible. El espesor se midió después de equilibrar las películas comestibles al 57 % de HR y previamente a la caracterización de sus propiedades tecnológicas.

### 3.1.8. Color

El color se midió por triplicado en cada película comestible mediante un colorímetro CM-2500d Minolta Croma Meter (Konika Minolta, Valencia, España). El colorímetro fue previamente calibrado sobre la superficie de una placa estándar blanca. Los valores de la placa de calibración fueron:  $L^* = 99.34$ ;  $a^* = -0.07$ ; y  $b^* = -0.11$ . Las muestras de las películas comestibles con y sin LAE se colocaron sobre una superficie blanca. Los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se representaron usando el espacio de color CIELAB, con la siguiente escala:  $L^* = 0$  (oscuro) a  $L^* =$

100 (claro);  $-a^* = -100$  (verde) a  $+a^* = +100$  (rojo),  $-b^* = -100$  (azul) a  $+b^* = +100$  (amarillo). La diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de las películas comestibles respecto a las películas sin LAE se calculó con la siguiente fórmula:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3.1)$$

Donde:

$$\Delta L^* = \Delta L^*_{\text{con LAE}} - \Delta L^*_{\text{sin LAE}}$$

$$\Delta a^* = \Delta a^*_{\text{con LAE}} - \Delta a^*_{\text{sin LAE}}$$

$$\Delta b^* = \Delta b^*_{\text{con LAE}} - \Delta b^*_{\text{sin LAE}}$$

Siendo:  $L^*_{\text{sin LAE}}$ ,  $a^*_{\text{sin LAE}}$ ,  $b^*_{\text{sin LAE}}$ , los valores de los parámetros de color de las películas sin LAE y  $L^*_{\text{con LAE}}$ ,  $a^*_{\text{con LAE}}$ ,  $b^*_{\text{con LAE}}$ , los valores de los parámetros de color de las películas con LAE.

### 3.1.9. Transparencia

La transparencia de las películas comestibles con y sin LAE se determinaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, usando un espectrofotómetro UV-visible de doble haz (modelo UH5300, Hitachi, Tokyo, Japón). La transparencia de las películas se calculó mediante la ecuación:

$$T = Abs_{600}/x \quad (3.2)$$

Donde  $Abs_{600}$  es el valor de la absorbancia a 600 nm y  $x$  es el espesor de las películas comestibles ( $150 \pm 22 \mu\text{m}$ ).

### 3.1.10. Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó mediante la pérdida de peso que sufría una película comestible con y sin LAE tras un secado de acuerdo al procedimiento explicado por Rubilar *et al.* (2013). Se equilibraron las películas comestibles durante tres días al 57 % y al 75 % de HR. Posteriormente, las muestras fueron secadas en un horno de convección a 105 °C durante 24 horas y fueron nuevamente pesadas previo enfriamiento de las muestras en una cabina al 0 % de HR para evitar su rehidratación por la humedad ambiental. Se realizaron cinco repeticiones. El contenido de humedad se expresó como porcentaje respecto al peso inicial, con la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_o - P_f}{P_o} \times 100 \quad (3.3)$$

Donde:

$P_o$  = peso inicial, antes del secado en la estufa (g)

$P_f$  = peso final, tras 24 horas de secado (g)

### 3.1.11. Solubilidad en agua

Se determinó la solubilidad de las películas comestibles con y sin LAE de acuerdo al método realizado por Rubilar *et al.* (2013) expresado como el contenido de materia seca solubilizada tras 24 horas en agitación con agua. Se realizaron cinco repeticiones. En primer lugar, se determinó el contenido inicial de materia secando las muestras a 105 °C hasta peso constante ( $M_i$ ). A continuación, se pesaron las películas y se sumergieron en 50 mL de agua destilada. Finalmente, tras 24 horas en agitación se extrajo la muestra no disuelta y se volvió a secar a

105 °C hasta peso constante ( $M_f$ ) para determinar el peso de la materia seca que no solubiliza en el agua. La solubilidad de las películas comestibles se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.1.12. Propiedades mecánicas

Para los análisis de las propiedades mecánicas se cortaron tiras de 25.4 mm de ancho por 8 mm de largo con ayuda de una doble cizalla. Se prepararon 10 tiras para cada formulación equilibradas al 57 % y 75 % de HR durante 3 días. Las propiedades mecánicas de las tiras se determinaron de acuerdo al método ASTM D882 (ASTM, 2000) mediante un test de tracción utilizando un texturómetro. Texture Analyzer TA-XTZi (Surrey, Gran Bretaña) con ayuda del programa de Texture Export (versión 6.1.16) para la extracción de los parámetros relevantes.

Las tiras de las películas se colocaron entre dos pinzas y se realizó el ensayo de tracción. Se fijaron los parámetros: distancia inicial entre pinzas 5 cm, y la velocidad de ensayo  $0.8 \text{ mm s}^{-1}$ . El programa Texture Export analizó los resultados y los representó en una gráfica, representando Fuerza vs Distancia lo que permitió determinar: la tensión máxima ( $\text{N mm}^2$ ), la elongación de rotura (%) y el módulo de Young (MPa). Las dimensiones tomadas antes de realizar el ensayo junto a los datos obtenidos en el ensayo, determinaron los parámetros que caracterizan las propiedades mecánicas de las películas comestibles con y sin LAE. Para los cálculos de las propiedades mecánicas se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\sigma_{max} = \frac{F_{max}}{S} \quad (3.5)$$

Donde:

$\sigma_{max}$  = Tensión máxima de rotura (N mm<sup>-2</sup>)

$F_{mx}$  = Fuerza máxima de rotura (N)

$S$  = Área (mm<sup>2</sup>)

$$\varepsilon (\%) = \frac{L_f - L_o}{L_o} \times 100 \quad (3.6)$$

Donde:

$\varepsilon$  = elongación relativa

$L_o$  = longitud inicial de la muestra

$L_f$  = longitud final de la muestra

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l} \quad (3.7)$$

Donde:

$E$  = Módulo de Young (MPa)

$\sigma$  = Fuerza (N)/Área (mm<sup>2</sup>)

$\varepsilon$  = Deformación

### 3.1.13. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Para el cálculo de WVP se empleó el método ASTM E96-92 (ASTM, 2000) corregido. Es un procedimiento gravimétrico que consistió en precintarse la película a evaluar en una célula de metacrilato conteniendo 6 mL de agua destilada. Seguidamente, las células fueron introducidas en una cabina desecante previamente equilibrada al 0 % de HR. La permeabilidad se midió utilizando un gradiente de humedad al 100 % de HR y a temperatura ambiente (25 °C). El ensayo empezó



con la medida del peso de la célula con el agua y la película a tiempo cero. Seguidamente, se colocaron las células de metacrilato en la cabina desecante (Sanplatec Corp. Japón) equipada con un ventilador (Elco, Milano, Italia), con una velocidad de aire de  $2.5 \text{ m s}^{-1}$ , asegurando una HR homogénea por toda la cabina. Se ensayaron un total de cinco células para cada tipo de película comestible elaborada. Se calculó la permeabilidad de las películas con los cinco valores de peso tomados y el espesor de cada película aplicando las ecuaciones correspondientes.

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{PA1-PA2} = g \cdot h^{-2} \cdot m^{-2} \cdot KPa^{-1} \quad (3.8)$$

$$WVP = \text{permeación} \times \text{espesor} = g \cdot \mu m^{-1} \cdot KPa^{-1} \cdot h^{-2} \cdot m^{-2} \quad (3.9)$$

### 3.1.14. Propiedades antimicrobianas de las películas comestibles

Cuatro cepas bacterianas asociadas a la descomposición y patogenicidad del pescado fresco se utilizaron para evaluar la actividad antibacteriana de las películas comestibles. Previamente a su utilización, las cepas bacterianas fueron liofilizadas para su conservación. Para la recuperación de las cepas bacterianas se siguió el método descrito por Fernández-Pan *et al.* (2012). Antes de la inoculación de las bacterias en placas, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de cada cepa a 100 mL de caldo de cultivo y se incubaron durante 18 horas para obtener células de fase estacionaria temprana, que sirvieron como inóculo inicial en las pruebas de actividad antibacteriana. Las cepas bacterianas seleccionadas son presentadas en la Tabla 3.1. Todas las cepas bacterianas fueron incubadas a  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas, debido a que los discos de gelatina se derretían a una temperatura superior a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , perdiendo la forma del disco y esparciéndose por toda la superficie del agar.

**Tabla 3.1.** Condiciones de cultivo para los microorganismos seleccionados.

Microorganismos	CECT Nº	Carac. Prin.	Medio de cultivo	Incubación
<i>Listeria innocua</i>	910	Gram +	Brain Heart Infusion	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	839	Gram -	Trypticase Soy Broth	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	378	Gram -	Nutrient Broth II	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Shewanella putrefaciens</i>	5346	Gram -	Trypticase Soy Broth	22 ± 2 °C; 48 h

El método de difusión de disco se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de GP con y sin LAE frente a cuatro cepas de bacterias: *L. innocua*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens* y *S. putrefaciens*. Se cortaron discos de 17 mm de diámetro de cada formulación de películas comestibles, usando un punzón y se colocaron en placas de agar inoculadas con una concentración bacteriana de entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de cada cepa. Las placas se incubaron en las condiciones mostradas en la Tabla 3.1 durante 48 horas. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los diámetros de la zona de inhibición se midieron usando un calibre y se expresaron como áreas de inhibición en mm<sup>2</sup> excluyendo el diámetro del disco.

### 3.1.15. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de LAE se determinaron utilizando ANOVA y las pruebas post hoc de rango múltiple de Duncan (nivel de confianza del 95 %).

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Características físicas de las soluciones formadoras de películas

#### 3.2.1.1. Apariencia, turbidez, pH y tensión superficial

El pH de las SFP fue de 5.40 para las películas comestibles sin LAE. Coincidiendo con el mismo nivel de pH reportado por varias investigaciones implicadas con la caracterización de películas comestibles a base de GP (Etxabide *et al.*, 2017b; Kchaou *et al.*, 2018). A medida que se incrementaba la concentración de LAE, el pH bajó significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta un pH 5.17 (10 % de LAE) con respecto al control (Tabla 3.2). Estos valores estuvieron dentro del rango indicado por Nerin *et al.* (2016) quienes expusieron que el LAE provoca una acidificación de la solución acuosa. Higuera *et al.* (2013) indicaron que el LAE es estable entre un pH 3 y 7 manteniendo su actividad antimicrobiana dentro de este rango.

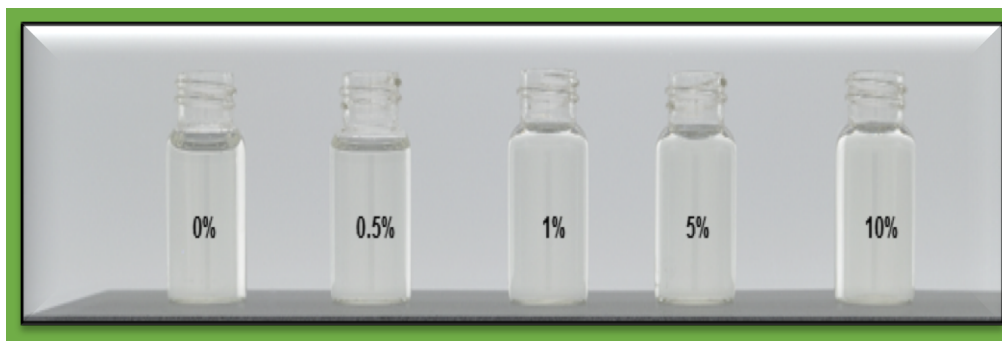
**Tabla 3.2.** Propiedades físicas de las soluciones formadoras de películas.

SFP	pH	Tensión superficial (mN m <sup>-1</sup> )
0 % LAE	5.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	48.74 ± 0.77 <sup>a</sup>
0.5 % LAE	5.38 ± 0.01 <sup>ab</sup>	27.62 ± 0.79 <sup>b</sup>
1 % LAE	5.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	27.24 ± 0.75 <sup>b</sup>
5 % LAE	5.29 ± 0.01 <sup>c</sup>	27.16 ± 0.25 <sup>b</sup>
10 % LAE	5.17 ± 0.01 <sup>d</sup>	26.64 ± 1.24 <sup>b</sup>

Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas entre tratamientos.

Por otro lado, la caracterización de la transparencia de las SFP con y sin LAE, se determinó mediante la medida de la turbidez. Un valor de cero NTU fue obtenido para todas las SFP, mostrando que el LAE fue altamente soluble en la SFP

a base de GP. Todas las SFP presentaron una apariencia muy transparente y homogénea, y también se observó una leve coloración amarilla muy tenue a medida que aumentó la concentración del agente antimicrobiano (Fig. 3.1).



**Figura 3.1.** Apariencia de la solución formadora de película (SFP) con diferentes concentraciones de etil louroil arginato (LAE).

La presencia del LAE disminuyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) la tensión superficial desde  $48.74 \pm 0.77 \text{ mN m}^{-1}$  (control) hasta  $26.64 \pm 1.24 \text{ mN m}^{-1}$  (10 % LAE). En esta variable no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las SFP con las diferentes concentraciones LAE (Tabla 2). Posiblemente las concentraciones del LAE utilizadas estaban todas por encima de la concentración micelar crítica (CMC). De acuerdo con Bonnaud *et al.* (2010) y Asker *et al.* (2009) los biopolímeros catiónicos reducen la CMC efectiva del tensioactivo catiónico mediante interacciones electrostáticas repulsivas, mientras que los biopolímeros aniónicos aumentan la CMC efectiva mediante la unión del tensioactivo a través de interacciones electrostáticas atractivas. Probablemente, las moléculas de la gelatina se saturaron con LAE, afectando a la tensión superficial de la SFP. Ello concuerda con Bai *et al.* (2018) quienes informaron de que la tensión superficial de la solución acuosa disminuye gradualmente con la concentración del LAE (0.001 % a 0.6 %, p/p), debido a su carácter tensioactivo catiónico.

### 3.2.2. Características físicas de las películas comestibles

#### 3.2.2.1. Espesor, color y transparencia

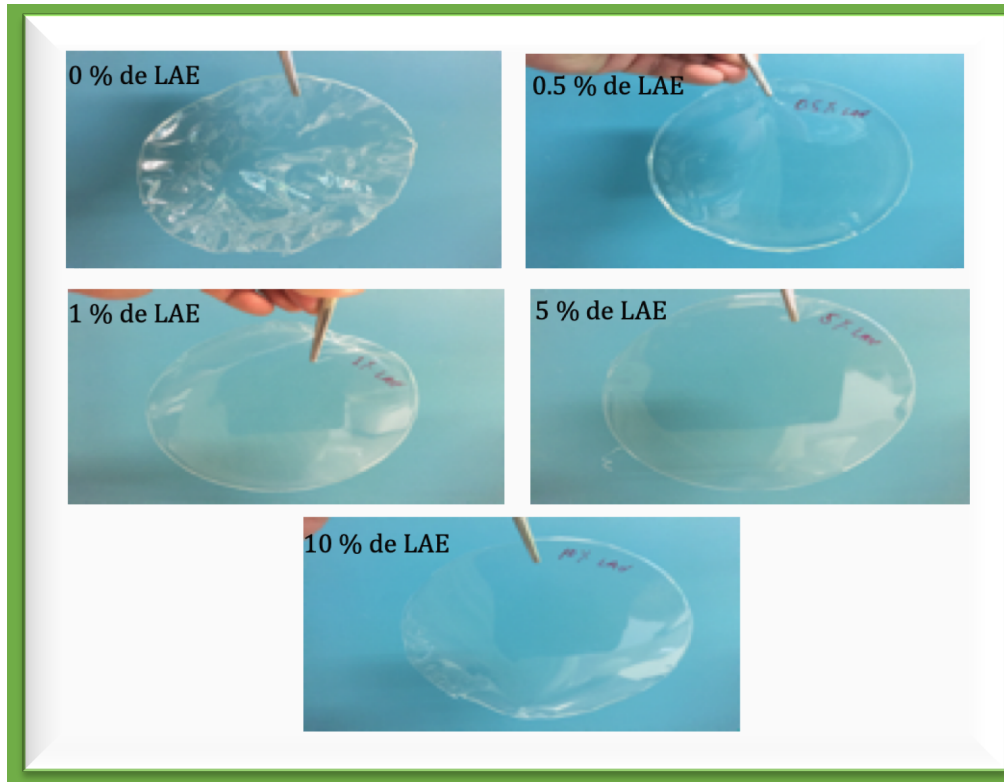
El espesor de las películas comestibles con y sin LAE fue homogéneo para todos los tratamientos. La media obtenida fue  $150 \pm 22 \mu\text{m}$ . El color y la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) de las películas comestibles con y sin LAE son presentadas en la Tabla 3.3. Los valores  $\Delta E^*$  fueron  $< 3$ , lo que significa que la diferencia de color de las películas con LAE en relación a las películas sin LAE no fue visible al ojo humano (Wojciech y Maciej, 2011). Sin embargo, altos valores de  $L^*$  ( $\geq 93.38 \pm 0.35$  en las películas sin LAE) fueron observados en todas las películas comestibles. Los valores más altos se presenciaron en las películas con el 5 y 10 % de LAE ( $94.19 \pm 0.19$  y  $94.35 \pm 0.24$ , respectivamente) que fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) en relación a las películas sin LAE. Valores de  $L^*$  cercanos a 100 indicarían películas comestibles muy claras y brillantes. En los valores de  $a^*$  no se observó ninguna tendencia con el aumento de la concentración de LAE. En los valores de  $b^*$  tampoco se observó ninguna tendencia, a pesar de que las películas comestibles con 1 % de LAE expresaron el valor más alto ( $4.66 \pm 0.31$ ) que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a las demás películas. Estos valores de  $b^*$ , expresaron una ligera tonalidad amarilla en todas las películas comestibles. En contraste, resultados presentados por Moreno *et al.* (2017), que estudiaron películas comestibles de almidón mezclado con gelatina de origen bovino más LAE, destacan que la incorporación del LAE tuvo un ligero efecto sobre el color de las películas, reduciendo la luminosidad ( $L^* = 73.40$ ) y el tono. Estos autores concluyeron, que estos cambios se debieron a la progresión de las reacciones de pardeamiento entre los grupos carbonilo y los grupos amino de la gelatina y el LAE, dando así productos marrones, debido probablemente a la reacción de Maillard.

**Tabla 3.3.** Determinación de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) y transparencia de las películas comestibles.

Películas	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	T (Abs <sub>600nm</sub> )
0 % LAE	93.38 ± 0.35 <sup>a</sup>	-0.43 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.25 <sup>b</sup>		0.36 ± 0.04 <sup>ab</sup>
0.5 % LAE	93.94 ± 0.49 <sup>ab</sup>	-0.44 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.10 ± 0.39 <sup>b</sup>	0.82 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>a</sup>
1 % LAE	93.83 ± 0.29 <sup>ab</sup>	-0.48 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.31 <sup>c</sup>	0.77 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>b</sup>
5 % LAE	94.19 ± 0.19 <sup>bc</sup>	-0.43 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.23 ± 0.29 <sup>b</sup>	0.82 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>a</sup>
10 % LAE	94.35 ± 0.24 <sup>c</sup>	-0.38 ± 0.03 <sup>c</sup>	3.76 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>b</sup>

Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas entre tratamientos.

Visualmente, tanto las películas sin LAE como las películas con las diferentes concentraciones de LAE, resultaron aparentemente muy transparentes, uniformes, con superficies lisas y homogéneas, sin poros ni grietas (Fig. 3.2). Los niveles de transparencia de las películas comestibles con y sin LAE se cuantificaron mediante la absorbancia a 600 nm. Para todos los casos las lecturas de absorbancia fueron inferiores a 1 unidad. Este valor expresa que tanto las películas comestibles con y sin LAE fueron muy transparentes (Tabla 3.3). Estos resultados fueron similares a los reportado por Hosseini *et al.* (2013) que evaluaron las propiedades funcionales de películas comestibles de GP y quitosano. Dichos autores reportaron que la transparencia de las películas comestibles fue inferior a 1 unidad con una absorbancia de 600 nm. Dichos autores, concluyeron que las películas de GP más quitosano eran muy transparentes. En este trabajo, la aplicación del LAE no afectó a las propiedades ópticas de las películas comestibles a base de GP. Estos envases transparentes, además de aportar buenas propiedades mecánicas y de barrera permiten al consumidor observar características importantes en la calidad de los alimentos, como el color y la apariencia.



**Figura 3.2.** Películas comestibles a base de gelatina de pescado con diferentes concentraciones de etil louroil arginato (LAE).

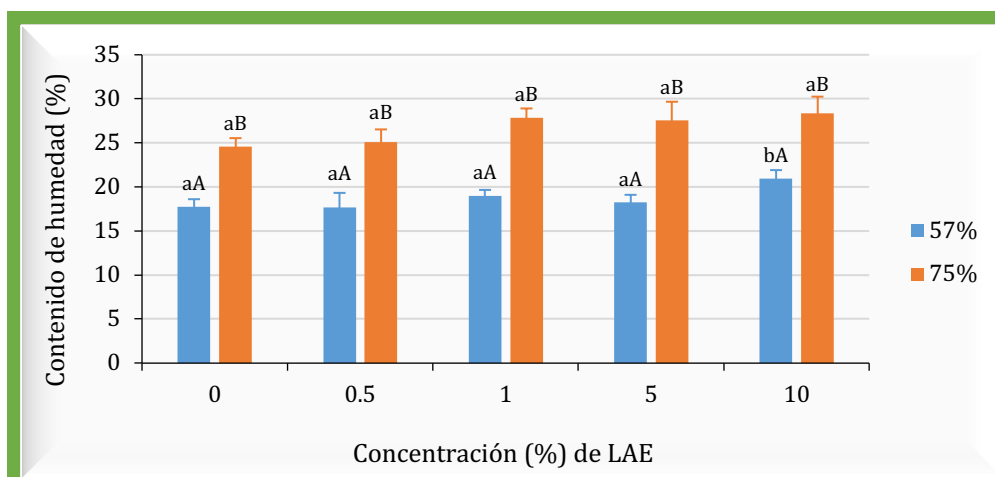
### 3.2.2.2. Contenido de humedad

Los valores del contenido de humedad de las películas comestibles elaboradas con y sin LAE y acondicionadas al 57 % y 75 % de HR son presentadas en la Fig. 3.3. Con el 57 % de HR, se observó que el contenido de humedad de las películas sin LAE fue de 17.78 %. Este porcentaje no fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) al de las películas que contenían el 0.5 %, 1 % y 5 % de LAE. Sin embargo, el mayor contenido de humedad se obtuvo en las películas con el 10 % de LAE (20.95 %) que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al de las demás pe-

lículas con las concentraciones más bajas. Un patrón similar se reportó en las películas comestibles acondicionada al 75 % de HR. A pesar de que no se presenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los niveles de contenido de humedad de las películas, se observó una tendencia al incremento a medida que aumentó la concentración del LAE. Como era lógico, los niveles de humedad de las películas acondicionadas al 75 % de HR fueron significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) que los valores de humedad observados en las películas acondicionadas al 57 % de HR. Ma *et al.* (2016b) reportaron que el contenido de humedad de las películas de quitosano se incrementaba significativamente con el aumento de la concentración de LAE.

Además, Jiang *et al.* (2010) expusieron que el contenido de humedad de las películas comestibles a base de gelatina es aportado por moléculas de agua en las microestructuras de la red de las películas compuestas. En este sentido, el aumento del contenido de humedad en las películas comestibles de GP con LAE, podría explicarse por la interacción de las moléculas de gelatina que es de carácter hidrófilo, con las del LAE. Ello, debido a su naturaleza anfipática con un bajo coeficiente de partición agua – aceite (Asker *et al.*, 2009) aumentaría las propiedades hidrófilas de estas películas comestibles.



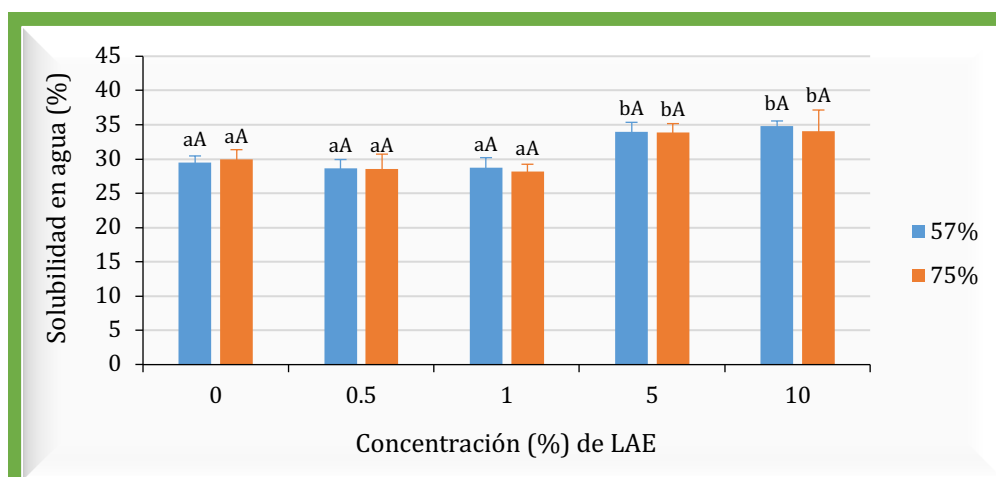


**Figura 3.3.** Contenido de humedad de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.

### 3.2.2.3. Solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las películas de gelatina con y sin LAE acondicionadas al 57 % y 75 % de HR son indicadas en la Fig. 3.4. Se observa que los niveles de solubilidad de las películas con 0 %, 0.5 % y 1 % del conservante estudiado estuvieron dentro del rango de 28 % al 30 %. Estos valores no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre ellos. Sin embargo, con las concentraciones de 5 % y 10 % de conservante se observaron valores significativamente altos de solubilidad ( $p < 0.05$ ) que oscilaron entre el 33.9 % y el 34.8 %, respectivamente; en comparación al rango indicado para las otras películas comestibles con y sin LAE. Con la adición de altas concentraciones de LAE (5 % y 10 %) la solubilidad en agua de las películas comestibles tuvo un aumento considerable, esto posiblemente fue causado por el carácter hidrófilo que posee el LAE y su interacción con las moléculas de la GP.

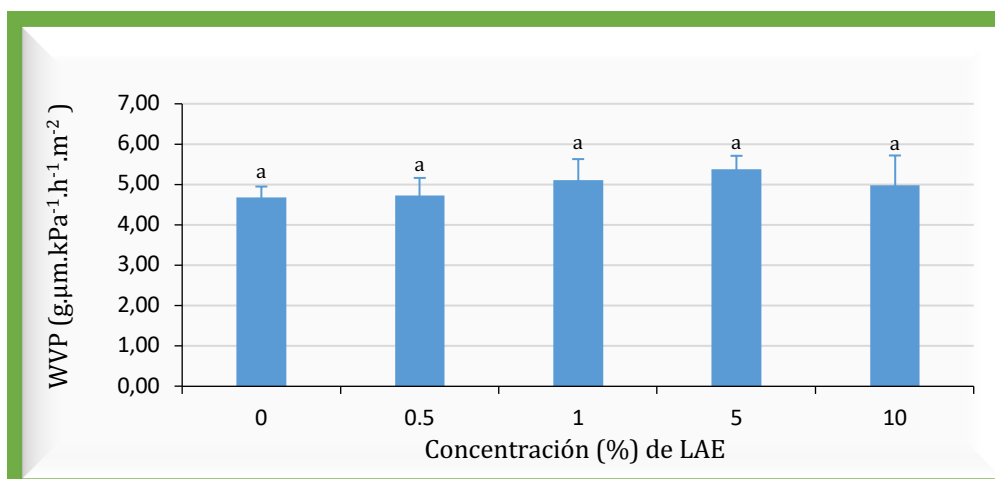
Rubilar *et al.* (2016) informaron que el LAE incrementó el porcentaje de solubilidad de las películas con quitosano debido a su carácter hidrófilo. Nerin *et al.* (2016) reportaron que el LAE es un polvo higroscópico con un peso molecular de  $421.02 \text{ g mol}^{-1}$ , que debido a sus propiedades polares tiene buena solubilidad en agua y un bajo coeficiente de partición de equilibrio agua-aceite ( $Kow < 0.1$ ), lo que significa que tiende a concentrarse en la fase de agua de los alimentos. La solubilidad en agua puede ser un factor importante en la definición de las aplicaciones de estas películas, ya que la GP es muy sensible al agua (Kchaou *et al.*, 2018). Adicionalmente, la buena solubilidad del LAE en agua podría ser el principal factor que explicaría el incremento en solubilidad de las películas comestibles antimicrobianas con concentraciones de 5 % y 10 % de LAE. Además, la dispersión homogénea del LAE en la matriz de recubrimiento debido a su buena solubilidad, permitiría una migración del agente antimicrobiano de manera eficaz sobre el alimento recubierto.



**Figura 3.4.** Contenido de solubilidad de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúsculas (a, b) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.

#### 3.2.2.4. Permeabilidad al vapor de agua

En la Fig. 3.5 se representan los valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas comestibles, con y sin LAE. Los valores alcanzados en WVP fluctuaron entre  $4.69 \text{ g}\cdot\mu\text{m}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (películas sin LAE) y  $5.37 \text{ g}\cdot\mu\text{m}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (películas con LAE). No se presenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. Sin embargo, se observó una tendencia al incremento de la WVP a medida que se aumentó la concentración del LAE. De acuerdo con Etxabide *et al.* (2015) la permeación al vapor de agua en una película conlleva un proceso de dos pasos que incluye la absorción inicial y la posterior difusión del mismo. El aumento en los valores de WVP podría explicarse por los cambios en la estructura de la proteína que favorecerían la etapa de difusión. Además, las películas de GP exhiben una menor WVP (entre 1.65 y 2.84 hasta  $9.75 \text{ g}\cdot\mu\text{m}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) que la gelatina bovina (entre 2.20 y 3.40 hasta  $10.2 \text{ g}\cdot\mu\text{m}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) (Gómez-Estaca *et al.*, 2011; Kaewprachu *et al.*, 2016; Chuaynukul *et al.*, 2018). Parece ser que la parte apolar complementado por el LAE proporcionaría a la gelatina buenas propiedades de barrera al vapor de agua. Así, Gómez-Guillén *et al.* (2007) reportaron que las películas de GP mostraron una menor WVP en comparación con los valores observados para la gelatina de origen bovino. Según Karim y Bhat (2009) los menores valores de WVP de las películas de GP se pueden explicar en términos de la composición de aminoácidos. La GP tiene una hidrofobicidad mucho más alta que la gelatina de origen bovino debido a los bajos contenidos de prolina e hidroxiprolina, ya que el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina normalmente está disponible para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas del agua.



**Figura 3 5.** Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas comestibles a base de gelatina de pescado y diversos niveles de etil louroil arginato (LAE). Letras iguales en minúsculas (a) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos.

Varios estudios se han realizado sobre la WVP en películas comestibles con la finalidad de mejorar la calidad de los alimentos. Así, Ramos *et al.* (2012) en su revisión bibliográfica, informaron que la WVP es una propiedad importante de las PRC basadas en proteína aislada de suero de lácteo (WPI), debido a su efecto sobre el control del transporte de vapor de agua y el balance de agua entre un sistema alimentario y su entorno. Indicaron además, que la naturaleza hidrófila del WPI limita su capacidad para formar películas con buenas propiedades de barrera contra la humedad; por lo tanto, es probable que ocurra una pérdida de peso del alimento debido a la humedad.

Por otro lado, Denavi *et al.* (2009) estudiaron la relación estructura-función de las películas compuestas obtenidas a partir de proteína aislada de soja (SPI) y gelatina de bacalao. Informaron de que los valores de WVP fueron significativamente más bajos para las películas de SPI que para las películas de GP y en las películas compuestas (SPI y GP) la presencia de SPI dio lugar a una reducción de la WVP independientemente de la cantidad agregada. Concluyeron, que este

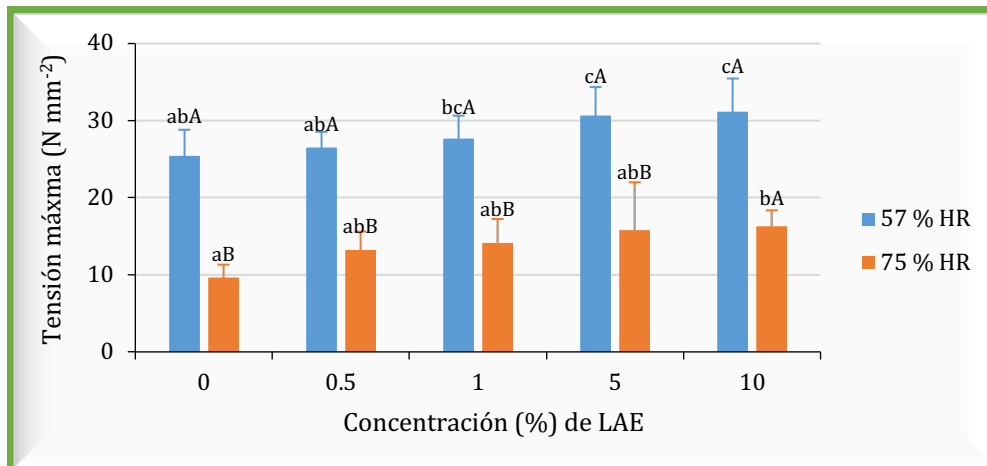
efecto está claramente relacionado con el menor grosor de las películas que contienen SPI, así como con su mayor hidrofobicidad superficial.

En cambio, Ma *et al.* (2016) informaron que el incremento somero en la WVP que presentan las películas comestibles con LAE depende de un mayor espesor del biopolímero. Además, Etxabide *et al.* (2016) reportaron que los valores de WVP aumentan con el incremento del pH, probablemente debido a un mayor grado de desnaturalización de las proteínas y, por lo tanto, a un despliegue mayor que facilitaría la permeación de moléculas de vapor de agua, debido a que con un pH ácido la WVP es más bajo. De esta forma se observa coherencia con los resultados de este trabajo, ya que el LAE afectó significativamente el pH de las películas comestibles, lo que pudo haber influido ligeramente en la tasa de WVP.

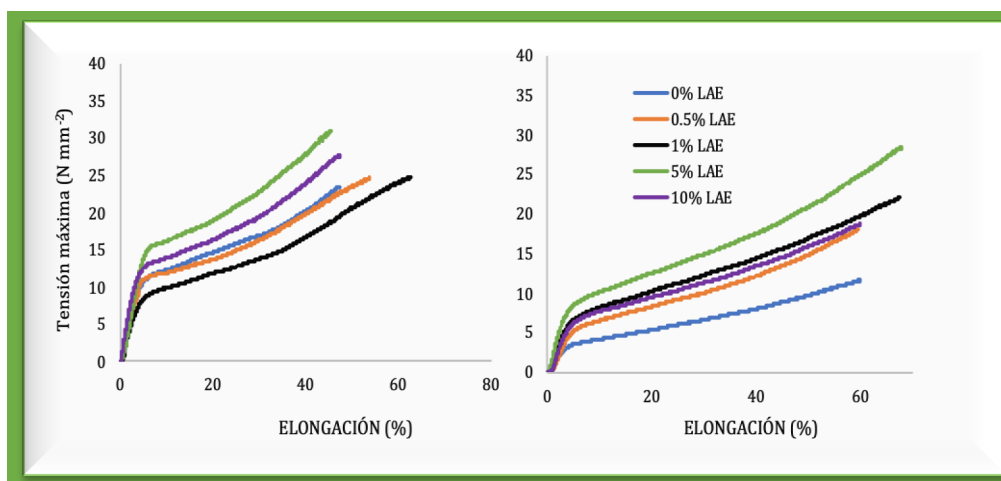
### 3.2.2.5. Propiedades mecánicas de las películas comestibles

La tensión máxima (TM) de las películas comestibles a base de GP con y sin LAE es representada en la Fig. 3.6. La TM de las películas comestibles acondicionadas al 57 % de HR con el 1 % de LAE (27.67 N mm<sup>-2</sup>), con el 5 % de LAE (30.63 N mm<sup>-2</sup>) y con el 10 % de LAE (31.67 N mm<sup>-2</sup>) presentaron los valores más altos y fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con respecto a las películas que contenían el 0.5 % y 0 % de LAE. Un patrón similar, se observó en la TM de las películas comestibles acondicionadas al 75 % de HR. El incremento fue progresivo a medida que se aumentó la concentración de LAE, observándose los valores más altos de TM en las películas comestibles con LAE al 1 %, 5 % 10 % y fueron significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) con respecto a las películas sin LAE (Fig. 3.7). La TM de todas las películas acondicionadas al 57 % de HR fueron significativamente más altas ( $p < 0.05$ ) que las películas comestibles acondicionadas al 75 % de HR. De acuerdo a estos resultados, el LAE aumentó la TM de las pelícu-

las comestibles antimicrobianas. La posible causa se pudo deber a la excelente interacción entre las moléculas de la GP y el LAE. Como se discutió anteriormente, el LAE es un tensioactivo catiónico que puede interactuar con biopolímeros aniónicos a través de interacciones electrostáticas.



**Figura 3 6.** Tensión máxima de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE; Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.



**Figura 3 7.** Representación gráfica de las propiedades mecánicas de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE) acondicionadas al 57 % y 75 % de HR, respectivamente.

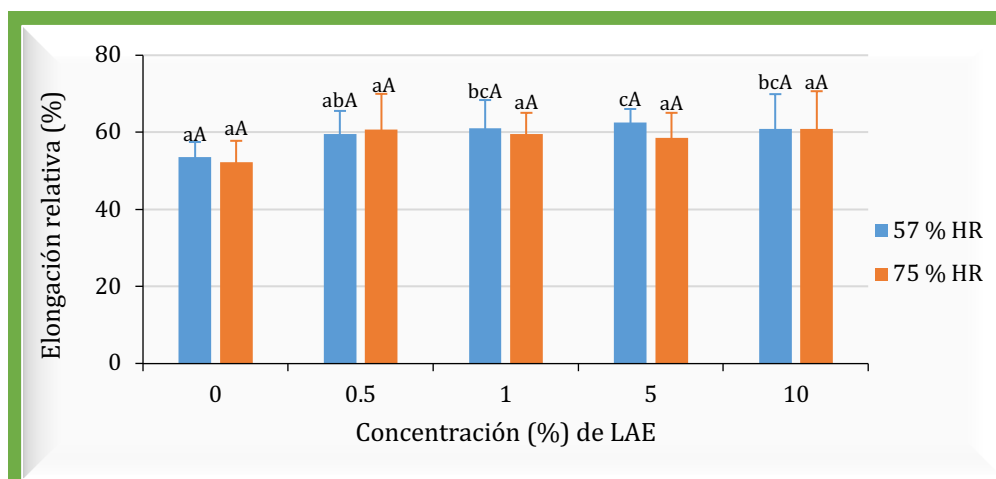
La GP es un polianfólito cargado negativamente (biopolímero aniónico) (Hosseini *et al.*, 2013) con un punto isoeléctrico a pH 6-9 (Karim y Bhat, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Por tanto, puede experimentar interacciones asociativas para formar un complejo de polielectrólito soluble. Tal como indicaron Staszczuk *et al.* (2014) en la formación de películas comestibles antimicrobianas, es importante caracterizar la compatibilidad de sus componentes y las interacciones intermoleculares que pueden ocurrir entre la matriz y el agente antimicrobiano, ya que finalmente afectan la estructura y determinan las propiedades de las películas comestibles. Rubilar *et al.* (2016) demostraron un aumento significativo de la TM para las películas de quitosano con LAE (en niveles altos y bajos), a pesar de que no se encontraron estudios que explicaran este fenómeno. Indicaron que el LAE podría producir algún efecto antiplastificante en la película y esa podría ser la razón del aumento de la TM.

Por otro lado, Gómez-Guillén *et al.* (2011) indicaron que la naturaleza altamente higroscópica de la gelatina es su principal inconveniente cuando se con-

sidera el uso de películas de este material como barreras protectoras, ya que tienden a hincharse o disolverse cuando entran en contacto con la superficie de los alimentos con alto contenido de humedad. La tendencia actual en el diseño de materiales biodegradables a base de gelatina para envasado de alimentos, se centra en la mejora de las propiedades mecánicas y de resistencia al agua, mediante la combinación de la gelatina con otros compuestos.

La adición del compuesto antimicrobiano también influyó sobre la elongación de rotura (ER) de las películas de gelatina acondicionadas tanto al 57 % como al 75 % (Fig. 3.8). En las películas acondicionadas al 57 % de HR, se observó un incremento gradual de la ER a medida que aumentó la concentración de LAE, observándose valores significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) con el 1 % de LAE (61.08 %), con el 5 % de LAE (62.50 %) y con el 10 % de LAE (60.83 %) en contraste a las películas sin LAE (53.50 %). En las películas comestibles acondicionadas con el 75 % de HR, se observó un patrón semejante, y no se presenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) sin embargo, se observó una tendencia al incremento del porcentaje de ER. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las películas acondicionadas al 57 % y al 75 % para ninguna de las concentraciones. Esto posiblemente se debió a que las películas estaban saturadas de plastificante (glicerol más LAE).





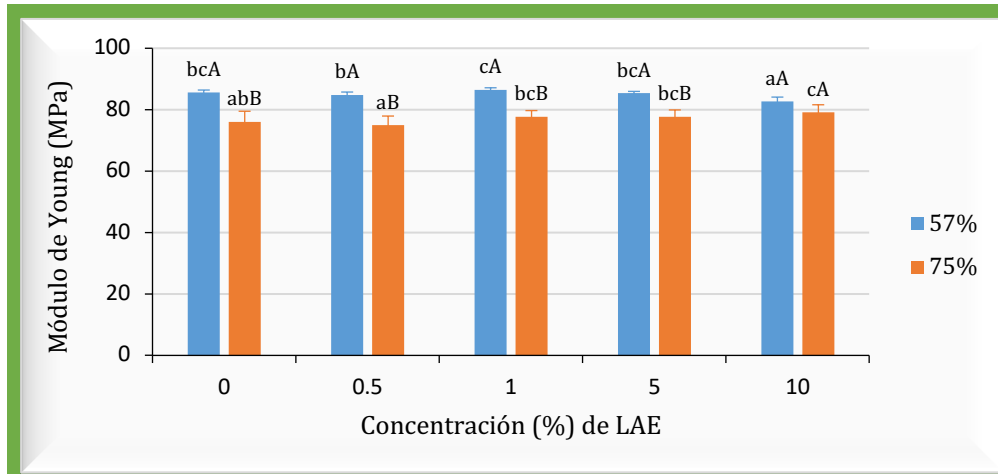
**Figura 3 8.** Elongación relativa de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin LAE. Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.

De acuerdo a estos resultados, se podría indicar que el efecto plastificante del LAE fue limitado, porque no hubo diferencias significativas entre la ER de las películas de gelatina con el 1 %, 5 % y 10 % de LAE. Es muy probable que se hubiese alcanzado la saturación en la plastificación potencial. Esto también se refleja en las películas acondicionadas al 75 % de HR; pese a tener más humedad, la ER no fue mucho mayor que la de las películas acondicionadas al 57 % de HR. Además, aunque hubo una tendencia al alza, la incorporación del LAE no implicó la existencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la ER en las películas acondicionadas al 75 % de HR. Es muy posible que la razón fuera la saturación del plastificante. Se deduce de lo anterior que sea factible que la máxima ER de las películas de gelatina esté en el entorno del 60 %.

La literatura científica reporta rangos variables de ER en películas comestibles de GP. Esta variabilidad depende de las condiciones de extracción a las que ha sido sometido el colágeno para la extracción de la gelatina. Así, Le *et al.* (2015)

investigaron las condiciones óptimas para extraer gelatina y preparar las películas de GP. Evaluaron la temperatura (70 °C, 80 °C y 90 °C) y el tiempo de extracción (15 minutos a 3 horas). A una temperatura de 70 °C obtuvieron una ER en las películas de gelatina de  $46.09 \pm 7.44$  %. En cambio, Jiang *et al.* (2010a) reportaron valores de ER de 68 % en películas de GP obtenidas mediante extracción térmica (55 °C durante 180 minutos). Karim y Bhat (2009) en su revisión bibliográfica indicaron, que el proceso de extracción de la GP puede influir en la longitud de las cadenas polipeptídicas y en las propiedades funcionales de la gelatina. Esto depende de los parámetros de procesamiento como: temperatura, tiempo y pH.

Con respecto al módulo de Young (MY), se determinó la relación entre la tensión y la deformación (elasticidad) en las películas comestibles con y sin LAE en la zona elástica de la deformación en un test de tensión (Fig. 3.9). En las películas comestibles acondicionadas al 57 % de HR, los valores más altos de MY se observaron en las películas con el 1 % de LAE (86.4 MPa), sin LAE (85.6 MPa) y con el 5 % de LAE (85.5 MPa), pero no se observaron diferencias significativas entre estos valores ( $p > 0.05$ ). Con respecto a las películas comestibles acondicionadas al 75 % de HR, el MY aumentó a medida que se incrementó la concentración de LAE. El valor máximo de MY alcanzado fue de 79.1 MPa en películas con el 10 % LAE, que fue significativamente diferente a los 76.1 MPa obtenidos en películas comestibles sin LAE. Estos incrementos del MY, muestran un patrón similar a los resultados obtenido en la TM y a la ER.



**Figura 3 9.** Módulo de Young de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con y sin etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en minúsculas (a, b, c) indican diferencias significativas entre concentraciones de LAE. Letras distintas en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas entre condiciones de HR.

Los resultados demuestran que los efectos producidos por el LAE en las propiedades mecánicas de las películas comestibles a base de GP, dependen de las interacciones moleculares del LAE con la matriz de la película comestible. Como ya se ha discutido recientemente, al aumentar las concentraciones de LAE, posiblemente se produzca una saturación del plastificante, afectando la flexibilidad, fragilidad y la capacidad de estiramiento de las películas comestibles. Ochoa *et al.* (2017) reportaron, que las propiedades mecánicas de las películas comestibles a base de almidón de maíz con LAE dependen de las interacciones moleculares, afectando en menor o mayor grado sus propiedades funcionales.

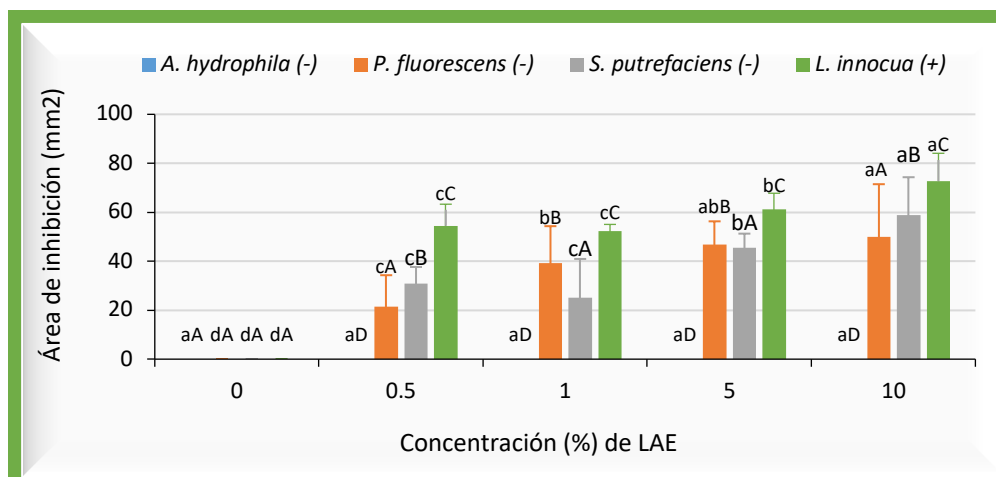
### 3.2.2.6. Capacidad antimicrobiana de las películas comestibles

En la Fig. 3.10 se observa la actividad antimicrobiana de las películas comestibles con y sin LAE frente a las bacterias ensayadas (*Listeria innocua*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Shewanella putrefaciens*). Las películas de GP sin LAE sirvieron como control para determinar el posible efecto antibacteriano intrínseco. Como se esperaba, no se observó área de inhibición frente a las cuatro bacterias ensayadas para las películas de gelatina sin LAE. Por lo tanto, las diferencias en el área de inhibición observadas para las películas que contenían LAE, se pueden atribuir solo al efecto que este agente antimicrobiano tiene sobre cada cepa cuando se difunde en los medios inoculados.

Se observó efecto antimicrobiano de las películas de gelatina con las diferentes concentraciones de LAE frente a tres de las cuatro bacterias ensayadas. Un potente efecto antibacteriano de las películas de gelatina con LAE fue observado frente a *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. putrefaciens*. La actividad antibacteriana de las películas de gelatina que contenían un 10 % de LAE, fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la actividad antibacteriana observada en las películas de gelatina que contenían concentraciones más bajas de LAE. Sin embargo, la actividad antibacteriana de las películas de gelatina fue efectiva desde una concentración de 0.5 % de LAE.

No se detectó actividad antibacteriana frente a *A. hydrophila* en ninguna de las películas de gelatina con las diferentes concentraciones de LAE (Fig. 3.11). Las investigaciones con LAE, no reportan pruebas in vitro frente a *A. hydrophila*, pero hay trabajos que exponen que esta bacteria es muy resistente frente a los agentes antibacterianos. Así, Albertos *et al.*, (2015) informaron que de todas las bacterias ensayadas, *A. hydrophila* fue la única insensible al efecto antimicrobiano de películas comestibles a base de quitosano, mezclado con aceites esenciales.

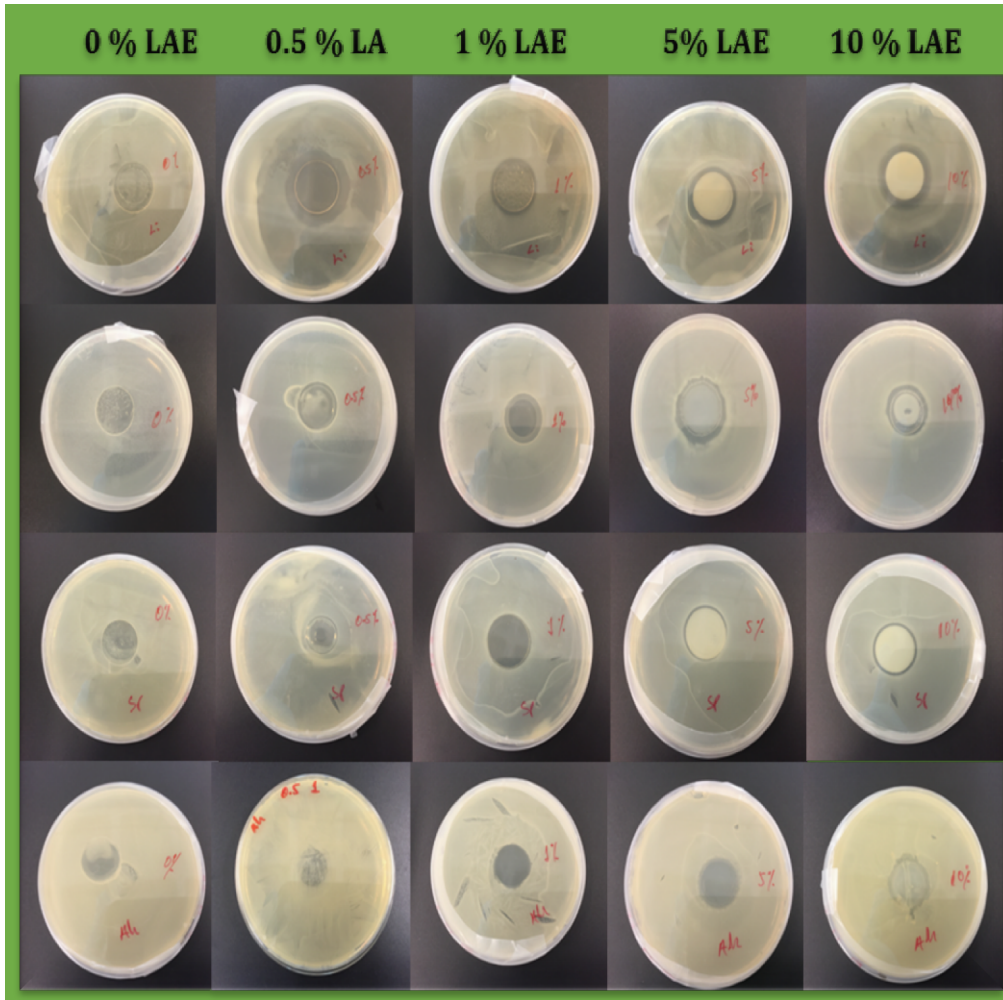
Además, Rodríguez *et al.* (2004) informaron de que el LAE actúa a un nivel diferente y que el efecto celular depende de la estructura de las células bacterianas. Concluyeron que, a pesar que el LAE puede causar alteraciones en el potencial de membrana, no hubo a nivel microscópico ninguna interrupción de las células. Posiblemente, el LAE no afectó la viabilidad celular de *A. hydrophila*, por tanto, no dificultó su crecimiento.



**Figura 3 10.** Actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de GP con LAE frente a *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens* y *L. innocua*. Letras distintas en minúsculas (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre concentraciones de etil louroil arginato (LAE). Letras distintas en mayúscula (A, B, C, D) indican diferencias significativas entre microorganismos.

Como se ha podido demostrar, el efecto antimicrobiano fue más potente frente a *L. innocua* (+) en comparación al efecto producido frente a *S. putrefaciens* (-) y a *P. fluorescens* (-), aumentando de manera gradual desde la concentración de LAE al 0.5 % hasta el 10 %. De acuerdo a estos resultados, las bacterias Gram-positivas tendrían mayor sensibilidad que las bacterias Gram-negativas (Fig. 3.11). Esto podría deberse a diferencias en la estructura de la membrana celular. Se sabe que las bacterias Gram-positivas contienen una capa externa de peptido-

glicano, mientras que las bacterias Gram-negativas contienen una membrana fosfolipídica externa, lo que implica que experimentan diferentes tipos de interacción frente a los agentes antimicrobianos (Bhawana *et al.*, 2011). Esta teoría fue más tarde corroborada por Deng *et al.* (2018) que evaluaron la actividad antibacteriana de las películas de nanofibras compuestas de quitosano/poli óxido de etileno y LAE frente a dos cepas patógenas: una Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y otra Gram-negativa (*E. coli*). Sus resultados mostraron que las áreas de inhibición fueron mayores en las cepas bacterianas Gram-positivas en comparación a las de las cepas bacterianas Gram-negativas, tal y como se reflejó en los resultados de este estudio. Concluyeron que los lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias Gram-negativas probablemente tienen efecto de barrera contra los compuestos antimicrobianos.



**Figura 3.11.** Actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de gelatina de pescado con etil louroil arginato (LAE) frente a *L. innocua* (Fila 1, superior), *P. fluorescens* (Fila 2), *S. putrefaciens* (Fila 3), y *A. hydrophila*, (Fila 4).

Por otra parte, se han realizado diversos estudios para evaluar la actividad antibacteriana del LAE, frente a bacterias asociadas al deterioro de los alimentos frescos y frente a patógenos peligrosos para el consumidor. Sin embargo, como ya se indicó anteriormente; no hay información sobre el efecto antimicrobiano del LAE frente *A. hydrophila* y tampoco frente a *S. putrefaciens*, microorganismos implicados en el deterioro del pescado fresco. Sin embargo, existe una variedad de

resultados de la actividad antibacteriana del LAE frente a especies de los géneros *Listeria* y *Pseudomonas*, que son patógenos que pueden estar presentes en productos frescos y procesados con carnes y pescados. Así, Ma *et al.* (2016a) evaluaron la actividad antimicrobiana del LAE en combinación con aceite esencial de canela. Informaron que con 0.5 % de LAE inhibieron significativamente el crecimiento de *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*. De acuerdo con los resultados expuestos en este trabajo, con una concentración de 0.5 % de LAE en las películas de gelatina se consiguió una inhibición significativa del crecimiento de *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. putrefaciens*.

En otro trabajo realizado por Muriel-Galet *et al.* (2015) también evaluaron la eficacia antimicrobiana del LAE con una concentración del 0.5 % y del 10 % incorporado en películas de copolímeros de etileno vinil alcohol (EVOH) frente a *L. monocytogenes* y *E. coli*. Estos autores, realizaron varios ensayos *in vitro* y también *in vivo* en productos alimenticios listos para comer y demostraron un alto impacto en la viabilidad de las bacterias ensayadas, inhibiendo considerablemente el crecimiento. Los resultados expresados con las concentraciones ensayadas, se asemejan a los obtenidos con las concentraciones que se usaron en este trabajo, dado que también inhibió significativamente el crecimiento de *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. putrefaciens*.

Becerril *et al.* (2013) examinaron la actividad antibacteriana del LAE frente a cinco bacterias transmitidas por los alimentos (*S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. enteritidis*). Empleando una concentración mínima inhibitoria (MIC) mayor a 10 mg L<sup>-1</sup>, dichos autores demostraron que el LAE presentó una fuerte actividad antimicrobiana contra todas las cepas analizadas. Además, indicaron que *P. aeruginosa* fue la bacteria más resistente con una MIC de 4 a 8 veces más alta que la de otras bacterias. Mientras que *E. coli*, *L. innocua* y *S. enterica* mostraron una susceptibilidad similar. Estos resultados son concordantes



con la actividad antibacteriana observada en los ensayos con las películas de gelatina con LAE, debido a que la bacteria más sensible fue *L. innocua* en relación a *P. fluorescens* y *S. putrefaciens*.

Theinsathid *et al.* (2012) informaron de la actividad antibacteriana en un envase fabricado con película de ácido poliláctico (PLA) y LAE frente *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* presentes comúnmente en la contaminación de carne de pavo precocinado y en jamón curado cocido en rodajas. La actividad antibacteriana del LAE se evidenció desde una concentración de 0.07 % (p/p). Guo *et al.* (2014) desarrollaron las mismas películas adicionando concentraciones de LAE al 5 % y al 10 % y expusieron en sus resultados un alto efecto antimicrobiano frente a las bacterias mencionadas.

Recientemente se está incorporando el LAE como agente antimicrobiano en la formulación de PRC basadas en biopolímeros, para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos. En varios estudios se ha adicionado LAE en la elaboración de películas comestibles a base de quitosano (Higueras *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2016b; Deng *et al.*, 2018). Estas películas antimicrobianas fueron efectivas frente a *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Pseudomonas putida* y *S. enteritidis*. Otras películas activas biodegradables se desarrollaron utilizando mezclas de almidón de maíz con LAE como agente antimicrobiano (Moreno *et al.*, 2017; Ochoa *et al.*, 2017). Se mostró en pruebas *in vitro* el efecto antibacteriano de estas películas, frente a *L. innocua* y *Salmonella Saintpaul*. Pattanayaiying *et al.* (2015) informaron sobre las propiedades antimicrobianas de las películas basadas en pululano con LAE y nisina empleadas para controlar patógenos transmitidos por los alimentos frescos. Las películas fueron efectivas frente a: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157: H7.

El objetivo principal de los tensioactivos catiónicos es la envoltura celular de las bacterias. Debido a su estructura química, estos compuestos pueden dañar las membranas de los microorganismos, produciendo la alteración del potencial

de membrana y como consecuencia la propia membrana. Esto da como resultado la pérdida de material citoplasmático y en consecuencia células bacterianas inviables (Rodríguez *et al.*, 2004; Nerin *et al.*, 2016). El LAE es un tensioactivo catiónico y la actividad antimicrobiana de los surfactantes es una consecuencia directa de sus propiedades químicas, que se absorben electrostáticamente en la superficie celular de los microorganismos. El LAE produce cambios importantes en la envoltura celular, lo que indica que las membranas son el objetivo principal, produciendo interrupción e inestabilidad de la membrana plasmática y presentando actividad contra bacterias Gram-positivas y de forma más limitada en bacterias Gram-negativas (Muriel-Galet *et al.*, 2016).

## Conclusiones

---

La incorporación de etil louroil arginato (LAE) en las películas comestibles a base de gelatina de pescado, afectó a sus características físicas y mecánicas y les atribuyó propiedades antimicrobianas. El pH y la tensión superficial de la solución formadora de película (SFP) disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del LAE. La SFP tuvo una apariencia muy transparente y homogénea, al igual que las películas elaboradas con ella. El contenido de humedad de las películas con LAE se incrementó por el aumento de la hidrofiliadad y aumentó también la solubilidad de las películas comestibles. El agente antimicrobiano no afectó la permeabilidad al vapor de agua (WVP), pero sí afectó a las propiedades mecánicas, aumentando la tensión máxima y la elongación relativa de las películas comestibles, lo que resultó en mejores propiedades mecánicas. Finalmente, la presencia de LAE implicó impartir propiedades antimicrobianas a las películas con un efecto más pronunciado frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las bacterias Gram-negativas.

## Referencias

---

- Albertos, I., Rico, D., Diez, A.M., González-Arnáiz, L., García-Casas, M.J. & Jaime, I. (2015). Effect of edible chitosan/clove oil films and high-pressure processing on the microbiological shelf life of trout fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **95**, 2858–2865.
- Asker, D., Weiss, J. & McClements, D.J. (2009). Analysis of the Interactions of a Cationic Surfactant (Lauric Arginate) with an Anionic Biopolymer (Pectin): Isothermal Titration Calorimetry, Light Scattering, and Microelectrophoresis. *Langmuir*, **25**, 116–122.
- ASTM. (2000). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia, PA: ASTM 2000: Annual Book of ASTM Standards.
- Bai, L., Xiang, W., Huan, S. & Rojas, O.J. (2018). Formulation and Stabilization of Concentrated Edible Oil-in-Water Emulsions Based on Electrostatic Complexes of a Food-Grade Cationic Surfactant (Ethyl Lauroyl Arginate) and Cellulose Nanocrystals. *Biomacromolecules*, **19**, 1674–1685.
- Becerril, R., Manso, S., Nerin, C. & Gómez-Lus, R. (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, **32**, 404–408.
- Bhawana, Basniwal, R.K., Buttar, H.S., Jain, V.K. & Jain, N. (2011). Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 2056–2061.
- Bonnaud, M., Weiss, J. & McClements, D.J. (2010). Interaction of a food-grade cationic surfactant (Lauric Arginate) with food-grade biopolymers (pectin, carrageenan, xanthan, alginate, dextran, and chitosan). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 9770–9777.
- Chuaynukul, K., Nagarajan, M., Prodpran, T., Benjakul, S., Songtipya, P. & Songtipya, L. (2018). Comparative Characterization of Bovine and Fish Gelatin Films Fabricated by Compression Molding and Solution Casting Methods. *Journal of Polymers and the Environment*, **26**, 1239–1252.
- Dehghani, S., Vali, S. & Regenstein, J.M. (2018). Edible films and coatings in seafood preservation : A review. *Food Chemistry*, **240**, 505–513.
- Denavi, G.A., Pérez-Mateos, M., Añón, M.C., Montero, P., Mauri, A.N. & Gómez-Guillén, M.C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, **23**, 2094–2101.
- Deng, L., Taxipalati, M., Zhang, A., Que, F., Wei, H., Feng, F. & Zhang, H. (2018). Electrospun Chitosan/Poly(ethylene oxide)/Lauric Arginate Nanofibrous Film with Enhanced Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 6219–6226.

- Etxabide, A., Leceta, I., Cabezudo, S., Guerrero, P. & La Caba, K. De. (2016). Sustainable fish gelatin films: From food processing waste to compost. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **4**, 4626–4634.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & la Caba, K. de. (2015). Improvement of barrier properties of fish gelatin films promoted by gelatin glycation with lactose at high temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, **63**, 315–321.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & la Caba, K. de. (2017a). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, **68**, 192–198.
- Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Gómez-Arriaran, I., la Caba, K. de & Guerrero, P. (2017b). Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films. *Reactive and Functional Polymers*, **117**, 140–146.
- Fakhreddin Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M. & Ghavi, F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, **136**, 1490–1495.
- 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**, M383-90.
- Fisher, K.D., Bratcher, C.L., Jin, T.Z., Bilgili, S.F., Owsley, W.F. & Wang, L. (2016). Evaluation of a novel antimicrobial solution and its potential for control *Escherichia coli* O157: H7, non-O157: H7 shiga toxin-producing *E. coli*, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* on beef. *Food Control*, **64**, 196–201.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1461–1469.
- Gómez-Estaca, J., López De Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E. & Montero, P. (2009). Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 46–52.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. & Montero, M.P. (2011). Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin From. *Food Hydrocolloids*.
- Gómez-Guillén, M.C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A. & Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Hydrocolloids*, **21**, 1133–1143.
- Guo, M., Jin, T.Z., Wang, L., Scullen, O.J. & Sommers, C.H. (2014). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, **40**, 64–70.
- Higuera, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R. & Rollini, M.

- (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl- $N\alpha$ -dodecanoyl-l-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, **165**, 339–345.
- Jiang, M., Liu, S., Du, X. & Wang, Y. (2010a). Physical properties and internal microstructures of films made from catfish skin gelatin and triacetin mixtures. *Food Hydrocolloids*, **24**, 105–110.
- Jiang, Y., Li, Y., Chai, Z. & Leng, X. (2010b). Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5100–5108.
- Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., Tongdeesootorn, W. & Rawdkuen, S. (2016). Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A Comparative Study. *Packaging Technology and Science*, **29**, 77–90.
- Karim, A.A. & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**, 563–576.
- Kchaou, H., Benbettaieb, N., Jridi, M., Abdelhedi, O., Karbowskiak, T., Brachais, C.-H., Léonard, M.-L., Debeaufort, F. & Nasri, M. (2018). Enhancement of structural, functional and antioxidant properties of fish gelatin films using Maillard reactions. *Food Hydrocolloids*, **83**, 326–339.
- Le, T., Maki, H., Takahashi, K., Okazaki, E. & Osako, K. (2015). Properties of Gelatin Film from Horse Mackerel (*Trachurus japonicus*) Scale. *Journal of Food Science*, **80**, E734–E741.
- Leceta, I., Etxabide, A., Cabezudo, S., La Caba, K. De & Guerrero, P. (2014). Bio-based films prepared with by-products and wastes: Environmental assessment. *Journal of Cleaner Production*, **64**, 218–227.
- Ma, Q., Davidson, P.M., Critzer, F. & Zhong, Q. (2016a). Antimicrobial activities of lauric arginate and cinnamon oil combination against foodborne pathogens: Improvement by ethylenediaminetetraacetate and possible mechanisms. *LWT - Food Science and Technology*, **72**, 9–18.
- Ma, Q., Zhang, Y. & Zhong, Q. (2016b). Physical and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with lauric arginate, cinnamon oil, and ethylenediaminetetraacetate. *LWT - Food Science and Technology*, **65**, 173–179.
- Mirenat®, E. 243. (2014). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE), approved in May 2014 by Commission Regulation (EU) No 506/2014 with E-number 243, is a unique preservative for its use in heat treated meat products in Europe.
- Moreno, O., Gil, À., Atarés, L. & Chiralt, A. (2017). Active starch-gelatin films for shelf-life extension of marinated salmon. *LWT - Food Science and Technology*, **84**, 189–195.
- Muriel-Galet, V., Carballo, G.L., Hernández-Muñoz, P. & Gavara, R. (2016). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Usage and Potential in Antimicrobial Packaging. In: *Antimicrobial Food Packaging*. Pp. 313–318. Elsevier.

- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R. & Hernández-Muñoz, P. (2015). Antimicrobial Effectiveness of Lauroyl Arginate Incorporated into Ethylene Vinyl Alcohol Copolymers to Extend the Shelf-Life of Chicken Stock and Surimi Sticks. *Food and Bioprocess Technology*, **8**, 208–217.
- Nerin, C., Becerril, R., Manso, S. & Silva, F. (2016). Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Antimicrobial Activity and Applications in Food Systems. *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier Inc.
- Ochoa, T.A., García-Almendárez, B.E., Reyes, A.A., Pastrana, D.M.R., López, G.F.G., Belloso, O.M. & González, C.R. (2017). Design and Characterization of Corn Starch Edible Films Including Beeswax and Natural Antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, **10**, 103–114.
- Pattanayaiying, R., H-Kittikun, A. & Cutter, C.N. (2015). Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat muscle foods. *International Journal of Food Microbiology*, **207**, 77–82.
- Ramos, Ó.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 533–552.
- Rodríguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X. & Manresa, A. (2004). Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine,  $\alpha$ - lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 903–912.
- Rubilar, J.F., Candia, D., Cobos, A., Díaz, O. & Pedreschi, F. (2016). Effect of nanoclay and ethyl- $\alpha$ -dodecanoyl-l-arginate hydrochloride (LAE) on physico-mechanical properties of chitosan films. *LWT - Food Science and Technology*, **72**, 206–214.
- Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. & Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, **115**, 466–474.
- Staroszczyk, H., Sztuka, K., Wolska, J., Wojtasz-Pajak, A. & Kołodziejska, I. (2014). Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **117**, 707–712.
- Theinsathid, P., Visessanguan, W., Kruenate, J., Kingcha, Y. & Keeratipibul, S. (2012). Antimicrobial Activity of Lauric Arginate-Coated Polylactic Acid Films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on Cooked Sliced Ham. *Journal of Food Science*, **77**.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T., Pisuchpen, S. & Osako, K. (2016). Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. *Food*

Hydrocolloids, **56**, 93–107.

UE, R. (2014). Reglamento (UE) No 506/2014. Por el que se modifican el anexo II del Reglamento (CE) No 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo y el anexo del Reglamento (UE) No 231/2012 de la Comisión por lo que se refiere al uso del etil lauroil arginato. Diario Oficial de la Unión Europea.

Wojciech, M. & Maciej, T. (2011). Color difference Delta E - A survey. Machine Graphics and Vision, **20**, 383–411.

## **Capítulo 4. Caracterización tecnológica de extractos de hinojo marino (*Crithmum maritimum*) y el efecto de su incorporación en las propiedades de las películas comestibles.**

---

### **Parcialmente presentado como:**

Otero-Tuárez, V., Fernández-Pan, I. Fernández T. y Maté, J.I. (2019). Technological characterization of marine fennel (*Crithmum maritimum*) extracts and the effect of its incorporation on the properties of edible films. *In the 20th Gums & Stabilisers for the Food Industry Conference*. San Sebastian, Spain.

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación aportada por el proyecto AGL2014-52825-R “Aprovechamiento de plantas halófilas del litoral y descartes de la pesca para el diseño y desarrollo de productos pesqueros funcionales” del Ministerio de Ciencia, en colaboración con con el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) y la Universidad Pública de Navarra.





## Resumen

---

Este trabajo consistió en estudiar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hinojo marino y su efecto de su incorporación en películas comestibles a base de proteína asilada de suero lácteo (WPI) y gelatina de pescado (GP). Para la obtención de los extractos en primer lugar, se secaron plantas de hinojo marino por dos métodos: secado convencional mediante aire caliente a 50 °C, durante 10 horas y por liofilización durante 24 horas. Las plantas deshidratadas fueron tratadas con dos concentraciones de etanol:agua: 50:50 y 75:25 (v/v) para realizar la extracción propiamente dicha. Los extractos obtenidos mediante liofilización y con etanol al 75 % presentaron la mayor concentración de polifenoles y la más alta capacidad antioxidante. Por lo que se utilizó para la elaboración de películas activas. El extracto agregado incrementó el contenido de humedad y el carácter hidrófilo de las películas. Por otra parte, el extracto disminuyó la tensión máxima, la elongación de rotura y el módulo de Young e incrementó la tasa de permeabilidad. Por último, se observó capacidad antioxidante mediante ABTS, pero no se presenció actividad antimicrobiana frente a las bacterias ensayadas.

### 4.1. Introducción

---

La seguridad en el uso de agentes antioxidantes y antimicrobianos sintéticos para mantener la calidad de los alimentos, ha generado preocupación en los consumidores y ha motivado a la Industria Alimentaria a buscar alternativas naturales. Los compuestos fenólicos de las plantas son una parte esencial de la dieta humana y son de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y/o antibacterianas. Las industrias que procesan productos agrícolas generan cantidades considerables de subproductos ricos en compuestos fenólicos, que podrían ser

valiosas fuentes naturales de agentes antioxidantes y/o antimicrobianos (Hammer *et al.*, 1999; Tajkarimi *et al.*, 2010). Los extractos ricos en compuestos fenólicos y los aceites esenciales han demostrado actividades antioxidantes y antimicrobianas comparables a las de los de compuestos de origen sintéticos tanto *in vitro* como *in vivo* (Pezeshk *et al.*, 2015).

El hinojo marino (*Crithmum maritimum* L.) es una especie halófila perenne típica de los ecosistemas costeros, utilizada en la cocina tradicional y en la medicina popular por sus propiedades sensoriales y saludables (Renna *et al.*, 2017). En la revisión bibliográfica de Atia *et al.* (2011) informaron que el hinojo marino es rico en vitamina C, caratenoides y flavonoides. Además, en otro trabajo (Maleš *et al.*, 2003) reportaron que los análisis cuantitativos realizados en plantas de hinojo marino, mostraron que contienen un nivel de flavonoides entre 0.08 % a 0.42 % p/p seco; el contenido de taninos está entre un 0.10 % y 2.65 % p/p seco, mientras que el contenido de polifenoles totales fluctuó entre 4.72 % y 9.48 % p/p seco.

La cantidad y calidad de los compuestos activos extraídos de un vegetal, dependen del tipo de solvente que se utilice y de la metodología de extracción. Benbassat *et al.* (2014) informaron que el extracto de planta de la *Althaea officinalis* (*Malvaceae*) preparado con agua como disolvente de extracción no poseía actividad antioxidante, mientras que los extractos obtenidos utilizando etanol:agua como agente de extracción, mostraron una actividad antioxidante pronunciada. Además, indicaron que los extractos obtenidos a baja concentración de etanol (50:50 y 70:30, v/v) mostraron una mayor actividad de reducción de radicales de ABTS•+ que el extracto obtenido con la mayor concentración de etanol (90:10, v/v). Estos resultados se correlacionaron muy bien con el contenido fenólico y flavonoide de los extractos.

La deshidratación es una de las técnicas de conservación más difundidas en la industria agrícola y alimentaria. Las ventajas del secado incluyen la prolongación de la vida útil, la conservación de la calidad y mejora del producto, la simplificación de la manipulación y el almacenamiento y su uso como tratamiento previo para procesos posteriores (St. George y Cenkowski, 2009). La eliminación del agua del producto hasta el punto en que la actividad de agua ( $a_w$ ) es lo suficientemente baja garantiza que el producto sea microbiológica y enzimáticamente estable (Wray y Ramaswamy, 2015). El secado al aire es un método tradicional de conservación de alimentos, aunque, el efecto térmico del aire seco durante el procesamiento, a menudo destruye sustancias sensibles al calor y da como resultado una degradación de los compuestos activos del producto (Erbay y Icier, 2009).

En un estudio realizado por Renna *et al.* (2017), secaron hinojo marino utilizando diferentes tratamientos (secado al aire, secado por microondas, secado al aire asistido por microondas y liofilización). En su artículo indicaron, que todos los tratamientos de secado estudiados permitieron obtener una  $a_w$  baja, pero redujeron significativamente el contenido de aceites esenciales y clorofilas. La liofilización y el microondas mantuvieron el color superficial mejor que los otros tratamientos de secado. Estos autores, concluyeron que el microondas y la liofilización son óptimos para preservar la calidad, incluidas las propiedades organolépticas.

El envase antioxidante y/o antimicrobiano es una forma de envase activo diseñado para extender la vida útil del producto y mejorar la seguridad microbiana a los consumidores. Actúa para inhibir o retardar la oxidación y el crecimiento de microorganismos en alimentos envasados (Rooney, 1995). Las películas y recubrimientos comestibles (PRC) activas, son una alternativa a los envases activos convencionales al actuar como portadores de sustancias antioxidantes y/o antimicrobianas (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014). La investigación actual en enva-

sado activo y en PRC activas, se centra en la encapsulación de compuestos bioactivos naturales en materiales de envasado biodegradables o comestibles (Siripatrawan y Noipha, 2012). Este enfoque puede reducir la adición de una gran cantidad de aditivos sintéticos en los alimentos, con sus riesgos potenciales para la salud (Gómez-Estaca *et al.*, 2009).

Los materiales para desarrollar PRC activas pueden formularse incorporando ingredientes funcionales, como antioxidantes y/o antimicrobianos (Rojas-Graü *et al.*, 2009). Se ha utilizado una amplia variedad de proteínas, tanto de origen animal como vegetal, para la formulación de PRC antimicrobianos. Las películas comestibles basadas en proteína aislada de suero lácteo (WPI) y la gelatina de pescado (GP) han sido evaluadas como transportadoras de diferentes antimicrobianos naturales o compuestos antioxidantes (Gómez-Estaca *et al.*, 2011; Fernández-Pan *et al.*, 2012; Carrión-Granda *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Numerosos estudios han demostrado que la eficacia de los agentes antimicrobianos han mejorado cuando se incorpora a PRC, en lugar de aplicarse sobre la superficie mediante una solución de rociado o directamente al producto (Ko *et al.*, 2001; Sebt *et al.*, 2003; Kristo *et al.*, 2008). La aplicación directa de sustancias activas puede no ser muy efectiva debido a las interacciones con los componentes del alimento, la evaporación o la difusión en el producto, lo que resulta en una actividad antimicrobiana reducida y en la necesidad de la aplicación de concentraciones más altas (Ouattara *et al.*, 2000; Quintavalla y Vicini, 2002). La incorporación de agentes antioxidantes y/o antimicrobianos en la formulación de PRC retrasa su liberación, contribuyendo así a mantener una concentración adecuada en la superficie del producto a lo largo del tiempo (Kristo *et al.*, 2008; Fernández-Pan *et al.*, 2013)

Por lo tanto, en el presente capítulo se planteó el siguiente objetivo general: Diseñar nuevas películas comestibles activas basadas en WPI o GP con la incorporación de extractos de plantas de hinojo marino.

Para su desarrollo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i) Optimizar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos de la planta de hinojo marino. Esto incluye el estudio del tipo de secado y condiciones de extracción
- ii) Determinar el rendimiento de la extracción, mediante la cuantificación del contenido total de polifenoles presentes en los extractos y de su capacidad antioxidante.
- iii) Evaluar el efecto del contenido de extracto de hinojo marino, sobre las propiedades tecnológicas de películas basadas en WPI y GP.

## 4.1. Materiales y métodos

---

### 4.1.1. Materiales

El hinojo marino (*Crithmum maritimum*) fresco (Fig. 4.1) fue proporcionado por Porto-Muños S.L. (A Coruña, España). El nitrógeno líquido, fue suministrado por Praxair (Madrid, España). El etanol absoluto (99.89 % de pureza) fue suministrado por Panreac Química S.A. (Barcelona, España).



**Figura 4.1.** Hinojo marino fresco utilizado para el desarrollo del trabajo.

Para la determinación de la capacidad antioxidante: el Folin-ciocaltau, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España), el persulfato potásico por VWR Eurolab (Llinars del Vallès, Barcelona) y el agar técnico por Panreac Química S.A. (Barcelona-España).

Para la elaboración de las películas comestibles: el WPI fue proporcionado por Davisco Food International (Le Seur, MN, USA), la GP fue proporcionada por LAPI Gelatine (Empoli, Italia) y el Glicerol por Panreac Química S.A. (Barcelona-España). Para modificar el pH de la solución formadora de película se utilizó hidróxido de sodio 1 mol L<sup>-1</sup> (1N) que fue proporcionado por Panreac Química S.A. (Barcelona-España).

Para la actividad antibacteriana de las películas bioactivas, se utilizaron cuatro cepas bacterianas: *Listeria innocua* (CECT 910), *Aeromona hydrophila* (CECT 839), *Shewanell putrefaciens* (CECT 5346) y *Pseudomans fluorescens* (CECT 378), que fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia. Los medios de cultivo: Brain Heart Infusion

(CULTIMED, España), Tryptic Soy Broth fue proporcionado por Merck (Madrid, España), Nutrient Broth II (1 g L<sup>-1</sup> extracto de carne; 2 g L<sup>-1</sup> extracto de levadura; 5 g L<sup>-1</sup> peptone; 5 g L<sup>-1</sup> NaCl) fue suministrado por Panreac Química S.A. (Barcelona-España).

#### 4.1.2. Secado convencional

El hinojo marino fue almacenado en una cámara de refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento. Las plantas fueron deshidratadas mediante secado convencional en una estufa equipada con ventiladores para homogeneizar el aire circundante (Kowell, Modelo D4AFY). La temperatura y tiempo de secado fueron establecidas en 55 °C durante 10 horas. Seguidamente, las plantas secas se molieron con una thermomix (Vorwerk TM5. Wuppertal, Alemania) y se envasaron en bolsas selladas al vacío y se almacenaron en un desecador al 0 % de humedad relativa (HR).

#### 4.1.3. Liofilización

Las plantas de hinojo marino frescas fueron congeladas con nitrógeno líquido, seguidamente fueron trituradas en un mortero y colocadas en bandejas de aluminio (Fig. 4.2) e introducidas en el liofilizador. El proceso de liofilización se realizó en dos etapas: una fría y otra caliente en un equipo de liofilización semiindustrial (Lyobeta 25, Torino, Italia). El ciclo de liofilización fue establecido en 24 horas. Los parámetros con los que se realizó la liofilización fueron los siguientes: Primera etapa: i) se redujo la temperatura a -45 °C durante 1 hora, ii) se disminuyó la presión hasta 0.25 mbar, se mantuvo la temperatura a -45 °C durante 11 horas. Segunda etapa: i) se aumentó la temperatura a 25 °C durante 1 hora, ii) se mantuvo la temperatura a 25 °C, con una presión de vacío de 0.25 mbar durante 11 horas. Seguidamente, las plantas liofilizadas se molieron con una thermomix y



se envasaron en bolsas selladas al vacío y se almacenaron en un desecador al 0 % de humedad relativa (HR).



**Figura 4.2.** Plantas de hinojo marino congeladas con nitrógeno líquido.

#### **4.1.4. Actividad de agua**

La actividad de agua ( $a_w$ ) de cada muestra seca tanto por liofilización como por secado convencional se midió por triplicado, con un equipo medidor de  $a_w$  (Novasina, Madrid-España) a 25 °C.

#### **4.1.5. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS)**

El análisis de GC-MS se realizó en el laboratorio de cromatografía del BCC Innovation, Basque Culinary Center. Los compuestos volátiles de la planta de hinojo marino liofilizada se extrajeron utilizando el método de micro extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). Para la extracción, se mezclaron 2 g de planta de hinojo marino molida y 50  $\mu$ L de  $\beta$ -Ionona (100 ppm) en un frasco

hermético con tapas de polipropileno y septo de PTFE/silicona. El vial fue colocado en un baño de agua a 40 °C. La extracción se realizó en una fibra DVB/CAR/PDMS de 50/30 µm que se introdujo en el espacio de cabeza durante 50 minutos. Esta fibra se caracterizó por la alta capacidad de atrapar compuestos volátiles de la planta de hinojo marino. Tras la extracción los compuestos volátiles se desorbieron durante 3 minutos en el inyector de un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con un detector de masas Shimadzu GC-MS QP-5050A. La temperatura del inyector se mantuvo a 230 °C. El sistema GC-MS se equipó con una columna SLB-5ms de 15 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). Se usó helio como gas portador a un caudal de 0.7 mL min<sup>-1</sup> en una relación de división 1:4. Las condiciones de temperaturas utilizadas para la separación de compuestos volátiles de hinojo marino consistió en: (a) temperatura inicial 40 °C, (b) rampa de 2.0 °C min<sup>-1</sup> hasta 145 °C, (b) rampa de 25 °C min<sup>-1</sup> desde 145 a 300 °C con un tiempo total de 1 h 30 minutos. La temperatura del detector fue 320 °C. La identificación de compuestos volátiles se realizó mediante tres métodos diferentes: (a) tiempo de retención, (b) comparación con tiempos de retención de compuestos patrón y por último, c) comparación con espectros de masas de compuestos patrón y colección de la biblioteca espectral NIST05) (Adams, 2007).

#### 4.1.6. Protocolo de obtención de los extractos

Se adaptó el método descrito por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2015). Una muestra de 20 g de polvo de plantas deshidratadas se mezclaron con 400 mL de una solución hidroalcohólica al 50:50 o al 75:25 (etanol:agua, v/v). Las muestras se homogenizaron utilizando una batidora IKA ULTRA-TURRAX® T 25 (Staufen, Alemania) a 20500 rpm durante 5 min. Posteriormente, para completar la dispersión, las muestras fueron sometidas a sonicación mediante un sonicador UP

400 Hielscher Ultrasound Technology (Teltow, Alemania). Para este tratamiento se utilizó una punta de 7 mm de diámetro y se aplicaron 8 ciclos de 2 min al 100 % de potencia, con un descanso de un minuto entre ciclos. Tanto en la fase del batido, como en la fase de sonicación, se sumergió la muestra en hielo para evitar el aumento de la temperatura por encima de 40 °C, por la posible degradación de los compuestos fenólicos. El extracto fue dividido en 8 alícuotas equilibradas y se centrifugaron utilizando una centrífuga (Sigma 3k30) a 12.000 G durante 10 minutos a una temperatura de 5 °C.

El sobrenadante fue vertido en un matraz de fondo redondo y secado en un rotavapor (Rotavapor Buchi R-200). Se fijó la temperatura del baño a 35 °C, con agua fría para la refrigeración y la presión de vacío se estableció en 23 mbar, hasta conseguir la sequedad total. Se resuspendió el contenido total con 30 mL de agua destilada, se filtró al vacío y se congeló a -80 °C.

Finalmente, los extractos congelados fueron liofilizados mediante dos etapas (ciclo establecido de 48 horas). En la primera etapa: se mantuvo la temperatura a -10 °C con una presión de vacío de 0.016 mbar durante 23 h. En la segunda etapa: se elevó la temperatura a 25 °C con una presión de 0.016 mbar durante 23 horas. Los extractos liofilizados fueron almacenados en frascos de vidrios debidamente oscurecidos y almacenados en desecadores al 0 % de HR. Se obtuvieron 4 extractos correspondientes a:

- Extracto CONV-50: secado de plantas mediante método convencional y extracción etanólica al 50 %.
- Extracto CONV-75: secado de plantas mediante método convencional y extracción etanólica al 75 %.
- Extracto LIOF-50: secado de plantas mediante liofilización y extracción etanólica al 50 %.

- Extracto LIOF-75: secado de plantas mediante liofilización y Extracción etanólica al 75 %.

#### 4.1.7. Color

El color de las plantas deshidratadas tanto por la liofilización como por secado convencional y los extractos liofilizados de hinojo marino, se determinó con un colorímetro Digieye VeriVide (Leicester, Inglaterra). El equipo fue calibrado utilizando una tabla (modelo Digital Uniformity Card) blanca, y una tabla de color (serie No: DE01017). Los valores de calibración fueron:  $\Delta E^* < 5$  puntos, mediana  $< 1$  (normalmente 0.7); R, G y B estuvieron en  $225 \pm 5$ . Las muestras fueron medidas por triplicado. Los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  se midieron utilizando la escala de colores CIELAB:  $L^* = 0$  (oscuro) a  $L^* = 100$  (claro);  $-a^* = -100$  (verde) a  $+a^* = +100$  (rojo),  $-b^* = -100$  (azul) a  $+b^* = +100$  (amarillo).

#### 4.1.8. Contenido total de polifenoles de los extractos

Para determinar el contenido total de polifenoles (CTP) de los extractos se siguió el método establecido por Bobo-García *et al.* (2015). Un total de 20  $\mu\text{L}$  del extracto diluido (0.125 mg de extracto en 25 mL de agua destilada) se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:4 y se agitaron durante 60 s en una microplaca de fondo plano (NUNC, Roskilde, Dinamarca). La mezcla se dejó durante 240 s y luego se agregaron 75  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de sodio (100  $\text{g L}^{-1}$ ) y la mezcla se agitó a velocidad media continua durante 1 minuto. Después de 2 h a temperatura ambiente, la absorbancia se midió a 750 nm utilizando el lector de microplacas de un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO (ThermoFisher Scientific). La absorbancia de la misma reacción con agua, en lugar del extracto o estándar, se restó de la absorbancia de la reacción con la muestra.

Se usaron diluciones de ácido gálico (10–200mg L<sup>-1</sup>) como estándares para la calibración (Fig. 4.3). Todas las muestras fueron analizadas con una concentración al 0.5 % (0.125 mg de extracto mezclado en 25 mL de agua destilada) para obtener un rango entre 20 – 70 mg de ácido gálico L<sup>-1</sup>.

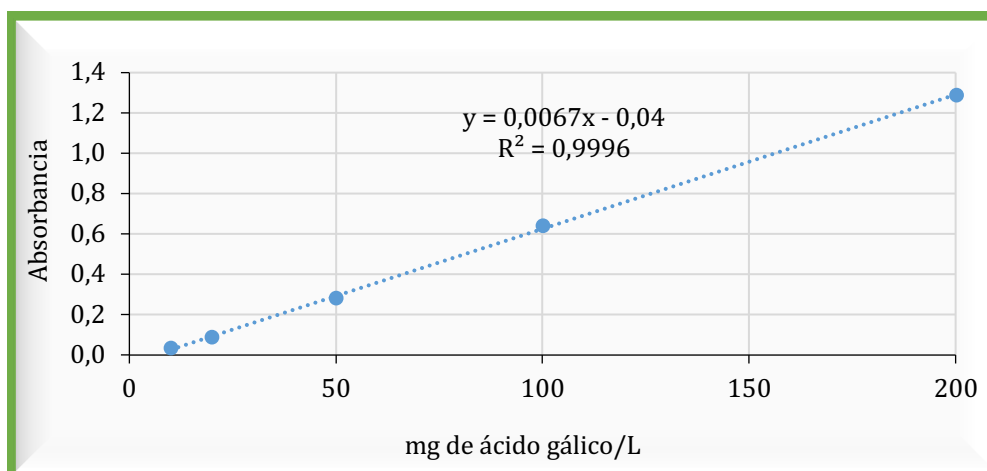


Figura 4.3. Curva de calibrado del método Folin-Ciocaltau.

#### 4.1.9. Capacidad antioxidante de los extractos

La capacidad antioxidante (CA) de los extracto de hinojo marino se determinaron mediante el método DPPH descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). En una cubeta de poliestireno, se mezclaron 2940 µL de DPPH disuelto en metanol (60 µMol L<sup>-1</sup>) con 60 µL del extracto de hinojo marino diluido (0.125 mg de extracto en 25 mL de agua destilada). La absorbancia a 515 nm se midió después de 60 minutos en la oscuridad utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan GO (ThermoFisher Scientific). El porcentaje de DPPH inhibido, se calculó utilizando la ecuación 4.1.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{final}}{Abs_{t=0}} * 100 \quad (4.1)$$

Donde:

$Abs_{t=0}$  es la absorbancia a 515 nm de 3000  $\mu$ L de metanol a tiempo cero.

$Abs_{final}$  es la absorbancia a 515 nm de 60  $\mu$ L de extracto o estándar con 2940  $\mu$ L de solución de DPPH después de 60 min.

#### **4.1.10. Protocolo de elaboración de películas comestibles basadas en WPI y extracto de hinojo marino.**

Se prepararon 100 mL de solución formadora de película (SFP) para cada tratamiento siguiendo el procedimiento descrito por Carrión-Granda *et al.* (2018) con ciertas modificaciones. En primer lugar, se preparó las SFP sin extracto de hinojo marino (control). Se elaboró una solución de WPI al 8 % (p/p) y glicerol al 4 % (p/p) en agua destilada. La solución se calentó en un baño de agua a 90°C durante 30 minutos bajo agitación constante, después de lo cual se enfrió a temperatura ambiente.

Para la elaboración de las películas activas, se escogió la extracción etanólica que mayor rendimiento mostró en polifenoles y CA (extracción LIOF-75). Se elaboraron SFP con 3 concentraciones diferentes de extracto de hinojo marino LIOF-75. Se procedió con el mismo proceso descrito para la SFP control. Antes de adicionar los extractos a las SFP, se ajustó a pH 7 a cada concentración de extracto añadiendo NaOH (1N), para evitar la precipitación de la proteína. Con esta modificación, el pH final de las SFP fue de 6.8.

Durante la fase de enfriamiento de las SFP (< 40 °C) se adicionaron las siguientes cantidades de extracto de hinojo marino LIOF-75:

- 0.40 g para una concentración final de extracto de hinojo marino del 0.5 % (p/p).

- 0.80 g para una concentración final de extracto de hinojo marino del 1 % (p/p).
- 1.60 g para una concentración final de extracto de hinojo marino del 2 % (p/p).

Para formar las películas comestibles, se vertieron 16 g de SFP en platos de vidrio de 14 cm de diámetro. Las películas fueron secadas en una cámara climática (Weis Technik, Alemania) a 40 °C y al 45 % de HR durante 18 horas. Finalmente, las películas comestibles fueron acondicionadas en un desecador con una solución saturada de bromuro de sodio (al 57 % de HR) durante 24 horas y a temperatura ambiente (22 °C ± 2 °C).

#### **4.1.11. Protocolo de elaboración de películas comestibles basadas en gelatina de pescado más extracto de hinojo marino**

Para la preparación de las SFP basadas en gelatina de pescado (GP), se siguió el proceso descrito en el Capítulo III de esta tesis. Se prepararon 100 mL de SFP para cada tratamiento. Para la SFP sin extracto (control), se preparó una mezcla al 10 % (p/p) de GP; como medio plastificante se añadió glicerol al 3 % (p/p). Seguidamente se disolvió la mezcla en agua destilada con agitación constante durante 30 minutos a 70 °C. La SFP sin extracto tuvo un pH final de 5.4.

Se elaboraron películas comestibles con 3 concentraciones diferentes de extracto de hinojo marino LIOF-75. A las SFP se adicionaron las siguientes cantidades de extracto de hinojo marino: 0.5 %, 1 % y 2 % (p/p). Antes de mezclar el extracto de hinojo marino con la SFP, este último se dejó enfriar hasta alcanzar los 40°C, con el objeto de evitar la degradación de los compuestos fenólicos. Se mezcló el extracto en la SFP con agitación lenta. Las SFP tuvieron un pH final de 5.3 (concentraciones de 0.5 % y 1 %) y de 5.2 (concentración de 2 %).

Para formar las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino, se vertieron 20 g de las SFP en platos de vidrio de 14 cm de diámetro. Las películas fueron secadas en una cámara climática (Weis Technick, Alemania) a 27 °C y al 75 % de HR durante 15 horas. Finalmente, las películas comestibles fueron acondicionadas en un desecador con una solución saturada de bromuro de sodio (al 57 % de HR) durante 24 horas y a temperatura ambiente (22 °C ± 2 °C).

#### 4.1.12. Espesor de las películas comestibles

El espesor fue determinado con un micrómetro digital (modelo ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón) con una precisión de 1 µm, en 10 puntos diferentes de cada película comestible. El espesor se midió después de equilibrar las películas comestibles al 57 % de HR y previamente a la caracterización de sus propiedades mecánicas y a los ensayos de permeabilidad al vapor de agua.

#### 4.1.13. Contenido de humedad de las películas comestibles

El contenido de humedad se determinó mediante la pérdida de peso que sufría una película comestible tras un secado de acuerdo al procedimiento explicado por Rubilar *et al.* (2013). Se equilibraron las películas comestibles durante 3 días al 57 % de HR. Posteriormente, las muestras fueron secadas en un horno de convección a 105 °C durante 24 horas y fueron nuevamente pesadas previo enfriamiento de las muestras en una cabina al 0 % de HR para evitar su rehidratación por la humedad ambiental. Se realizaron cinco repeticiones. El contenido de humedad se expresó como porcentaje respecto al peso inicial, con la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_o - P_f}{P_o} \times 100 \quad (4.2)$$



Donde:

$P_o$  = peso inicial, antes del secado en la estufa (g)

$P_f$  = peso final, tras 24 horas de secado (g)

#### 4.1.14. Solubilidad en agua de las películas comestibles

Se determinó la solubilidad de las películas comestibles de acuerdo al método realizado por Rubilar *et al.* (2013) que se expresa como el contenido de materia seca solubilizada tras 24 horas en agitación con agua. Se realizaron cinco repeticiones. En primer lugar, se determinó el contenido inicial de materia seca secando las muestras a 105 °C hasta peso constante ( $M_i$ ). A continuación, se pesaron las películas y se sumergieron en 50 mL de agua destilada. Finalmente, tras 24 horas en agitación se extrajo la muestra no disuelta y se volvió a secar a 105 °C hasta peso constante ( $M_f$ ) para determinar el peso de la materia seca que no solubiliza en el agua. La solubilidad de las películas comestibles se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (4.3)$$

#### 4.1.15. Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Para los análisis de las propiedades mecánicas se cortaron tiras de 25.4 mm de ancho por 8 mm de largo con ayuda de una doble cizalla. Se prepararon 10 tiras para cada formulación equilibradas al 57 % de HR durante 3 días. Las propiedades mecánicas de las tiras se determinaron de acuerdo al método ASTM D882 (ASTM, 2000) mediante un test de tracción utilizando un texturómetro. Texture Analyzer TA-XTZi (Surrey, Gran Bretaña) con ayuda del programa de Texture Export (versión 6.1.16) para la extracción de los parámetros relevantes.

Las tiras de las películas se colocaron entre dos pinzas y se realizó el ensayo de tracción. Se fijaron los parámetros: distancia inicial entre pinzas 5 cm, y la velocidad de ensayo  $0.8 \text{ mm s}^{-1}$ . El programa Texture Export analizó los resultados y los representó en una gráfica, representando Fuerza vs Distancia lo que permitió determinar: la tensión máxima ( $\text{N mm}^{-2}$ ), la elongación de rotura (%) y el módulo de Young (MPa). Las dimensiones tomadas antes de realizar el ensayo junto a los datos obtenidos en el ensayo, determinaron los parámetros que caracterizan las propiedades mecánicas de las películas comestibles con y sin LAE. Para los cálculos de las propiedades mecánicas se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\sigma_{max} = \frac{F_{max}}{S} \quad (4.5)$$

Donde:

$\sigma_{max}$  = Tensión máxima de rotura ( $\text{N mm}^{-2}$ )

$F_{mx}$  = Fuerza máxima de rotura (N)

S = Área ( $\text{mm}^2$ )

$$\varepsilon (\%) = \frac{L_f - L_o}{L_o} \times 100 \quad (4.6)$$

Donde:

$\varepsilon$  = elongación relativa

$L_o$  = longitud inicial de la muestra

$L_f$  = longitud final de la muestra

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l} \quad (4.7)$$

Donde:

$E$  = Módulo de Young (MPa)

$\sigma$  = Fuerza (N)/Área (mm<sup>2</sup>)

$\varepsilon$  = Deformación

#### 4.1.16. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Para el cálculo de WVP se empleó el método ASTM E96-92 (ASTM, 2000) corregido. Es un procedimiento gravimétrico que consistió en precintarse la película a evaluar en una célula de metacrilato conteniendo 6 mL de agua destilada. Seguidamente, las células fueron introducidas en una cabina desecante previamente equilibrada al 0 % de HR. La permeabilidad se midió utilizando un gradiente de humedad al 100 % de HR y a temperatura ambiente (25 °C). El ensayo empezó con la medida del peso de la célula con el agua y la película a tiempo cero. Seguidamente, se colocaron las células de metacrilato en la cabina desecante (Sanplatec Corp. Japón) equipada con un ventilador (Elco, Milano, Italia), con una velocidad de aire de 2.5 m s<sup>-1</sup>, asegurando una HR homogénea por toda la cabina. Se ensayaron un total de cinco células para cada tipo de película comestible elaborada. Se calculó la permeabilidad de las películas con los cinco valores de peso tomados y el espesor de cada película aplicando las ecuaciones correspondientes.

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{P_{A1} - P_{A2}} = g \cdot h^{-2} \cdot m^{-2} \cdot KPa^{-1} \quad (4.8)$$

$$WVP = \text{permeación} \times \text{espesor} = g \cdot \mu m^{-1} \cdot KPa^{-1} \cdot h^{-2} \cdot m^{-2} \quad (4.9)$$

#### 4.1.17. Capacidad antioxidante de las películas comestibles activas

La capacidad antioxidante de las películas comestibles con extracto de hinojo marino, se determinó mediante el método del radical libre ABTS<sup>•+</sup> descrito por Re *et al.* (1999) y adaptado por Urrutia (2010). Primeramente, se preparó una disolución de ABTS con 0.384g de ABTS (7 mM) y 0.0663g de persulfato de potasio/K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2.45 mM) en 100mL de agua destilada. Se homogeneizó la mezcla y se guardó en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas antes de su uso. Posteriormente, se prepararon 400 mL de agar técnico (15 g/1000 mL). En un Erlenmeyer se calentó sobre una placa calefactora (SBS A-160 SERIE C) a 100 °C hasta ebullición y en agitación constante. Se esperó a que la temperatura baje hasta 50°C y se añadió la disolución de ABTS al 20 % (v/v). Se vertieron 8 mL de mezcla (agar técnico con ABTS) en placas de Petri. Una vez solidificada la mezcla, se colocaron discos de 17 mm de diámetro, que se obtuvieron con un sacabocados a partir de las películas basadas en WPI y GP que contenían distintas concentraciones de extracto de hinojo marino (0 %, 0.5 %, 1 % y 2 %). Se realizaron cinco réplicas para cada tratamiento.

Se realizaron seis medidas del diámetro del halo formado alrededor de los discos en cada placa de Petri, con el objeto de observar la reducción del radical libre ABTS<sup>•+</sup> en presencia del agente antioxidante. Se midieron los halos de reducción a distintos tiempos: 0; 10; 60; 120; 180 y 240 minutos. Durante los intervalos de lecturas, las placas de Petri fueron guardadas en total oscuridad. Finalmente, se calcularon los μMoles de ABTS<sup>•+</sup> reducidos por la difusión de los compuestos fenólicos presentes en las películas activas, aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{Moles ABTS} \bullet + = \frac{(1)\text{ABTS} \cdot (0.5)k_2S_2O_8}{8 \text{ mL} \cdot k_2S_2O_8} \quad (4.10)$$

La reacción de ABTS y el  $K_2S_2O_8$  fue de 1:0.5 se conoció la concentración de ABTS y  $K_2S_2O_8$ ; con los que se calcularon los moles de  $ABTS^{\bullet+}$ . El  $ABTS^{\bullet+}$  añadido en el agar técnico fue de un 20 % (v/v) y cada placa contenía 8 mL de mezcla, mediante el volumen de  $ABTS^{\bullet+}$  añadido y el reducido (diámetros de halos) se calculó los  $\mu$ moles de  $ABTS^{\bullet+}$  reducido. Las placas de Petri de 85 mm contenían 39.2  $\mu$ Moles de  $ABTS^{\bullet+}$ .

#### 4.1.18. Propiedades antimicrobianas de las películas comestibles activas

Cuatro cepas bacterianas asociadas a la descomposición y patogenicidad del pescado fresco se utilizaron para evaluar la actividad antibacteriana de las películas comestibles. Las cepas bacterianas fueron proporcionadas liofilizadas por CECT. Para la recuperación de las cepas bacterianas se siguió el método descrito por Fernández-Pan *et al.* (2012). Antes de la inoculación de las bacterias en placas, se transfirieron 100  $\mu$ L de cada cepa a 100 mL de caldo de cultivo y se incubaron durante 18 horas para obtener células de fase estacionaria temprana, que sirvieron como inóculo inicial en las pruebas de actividad antibacteriana. Las cepas bacterianas seleccionadas y las condiciones de cultivos son presentadas en la Tabla 4.1. Las condiciones de cultivo dependieron de la característica del disco. Para el caso de los discos de gelatina de pescado, se redujo la temperatura de incubación y se prolongó el tiempo de incubación, debido a que los discos se derretían a partir de 25 °C.

**Tabla 4.1.** Condiciones de cultivo para los microorganismos seleccionados.

Microorganismos	Carac. Princ.	Medio de cultivo	Incubación WPI	Incubación GP
<i>Listeria innocua</i>	Gram +	Brain Heart Infusion	37 °C; 24 h	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gram -	Trypticase Soy Broth	30 °C; 24 h	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gram -	Nutrient Broth II	30 °C; 24 h	22 ± 2 °C; 48 h
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Gram -	Trypticase Soy Broth	30 °C; 24 h	22 ± 2 °C; 48 h

El método de difusión de disco se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana de las películas comestibles basadas en WPI y en GP sin y con extracto de hinojo marino frente a cuatro cepas de bacterias: *Listeria innocua*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Shewanella putrefaciens*. Se cortaron discos de 17 mm de diámetro de cada formulación de películas comestibles, utilizando un punzón y se colocaron en placas de agar inoculadas con una concentración bacteriana de entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de cada cepa. Las placas se incubaron en las condiciones mostradas en la Tabla 1. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los diámetros de la zona de inhibición se midieron utilizando un calibre y se expresaron como áreas de inhibición en mm<sup>2</sup> excluyendo el diámetro del disco.

#### 4.1.19. Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Las diferencias significativas entre las medias de las variables se determinaron utilizando ANOVA

de doble vía y las pruebas post hoc de rango múltiple de Duncan (nivel de confianza del 95 %).

## 4.2. Resultados y discusión

---

### 4.2.1. Caracterización de las plantas de hinojo marino deshidratadas

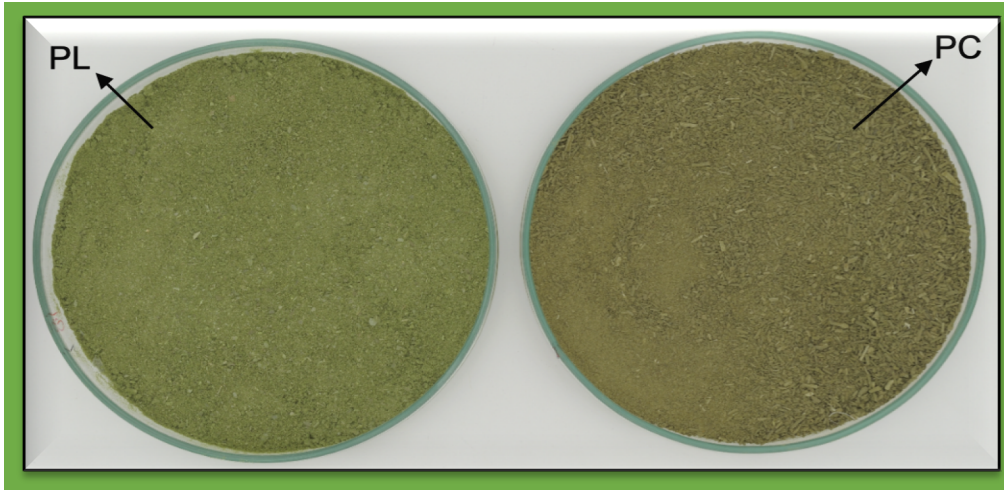
Las plantas de hinojo marino fueron deshidratadas por liofilización y por secado con aire caliente previamente al proceso de extracción hidroalcohólica. La deshidratación de las plantas se determinó a partir del contenido de humedad. Las plantas de hinojo marino tenían un contenido de humedad inicial del  $75 \pm 8$  %. La humedad final de las plantas por liofilización fue de  $9 \pm 0.9$  % y una  $a_w$  de  $0.29 \pm 0.02$ . En cambio, en el secado por el método convencional, se obtuvieron muestras deshidratadas con una humedad final de  $7.73 \pm 1.98$  % y una  $a_w$  de  $0.20 \pm 0.01$  (Fig. 4.5). La  $a_w$  en ambos métodos de secado fue relativamente baja, parámetro ideal para su conservación (Giungato *et al.*, 2019).

Se caracterizaron las propiedades ópticas de las plantas deshidratadas tanto por liofilización como por el método convencional. El color de las plantas secas se analizó utilizando la escala CIELAB y los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se utilizaron como índice para mostrar la diferencia de color entre las plantas secas (Fig. 4.4). Las plantas deshidratadas mediante liofilización mostraron un índice de  $L^* = 49 \pm 0.29$  que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) en comparación a las plantas secadas por medio convencional, que presentaron un índice de  $L^* = 45 \pm 0.22$ . Estos valores indicaron que en las plantas liofilizadas hay una tendencia a tener una coloración más clara y mejor tono, que las observadas en las plantas secas por el método convencional, que tienen una tendencia a ser más oscuras. Los valores de  $a^*$  de las plantas liofilizadas presentaron un índice negativo ( $a^* = -$

$3.90 \pm 0.23$ ) y significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a las plantas secas por el método convencional, que mostraron un índice positivo ( $a^* = 2.46 \pm 0.31$ ). El valor negativo de  $a^*$  se traduce en la coloración verde que se observó en las plantas liofilizadas y el valor positivo de  $a^*$  se traduce en la coloración marrón que se observó en las plantas secas con aire caliente. En cuanto a los parámetros de  $b^*$ , las plantas liofilizadas presentaron un valor significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) ( $b^* = 27.46 \pm 0.11$ ), en comparación al índice que se observó en las plantas secadas por aire caliente ( $b^* = 23.70 \pm 0.61$ ), estos valores indicarían una tendencia a la amarillez. Todos los valores de los índices de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , están dentro de los rangos reportados por Renna *et al.* (2017) que informaron que las plantas deshidratadas por liofilización presentaron coloración verde y las plantas secadas por aire caliente presentaron una coloración marrón.

En la Fig. 4.4 se muestra la apariencia de las plantas de hinojo marino después de la deshidratación mediante liofilización o por el secado convencional. Las plantas liofilizadas conservaron su coloración característica debido a que la degradación de su contenido de clorofila fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ). Las plantas de hinojo marino secadas por el método convencional presentaron una coloración marrón, debido al deterioro de clorofila por el proceso de calefacción por aire caliente. Estas observaciones son coherentes con lo reportado por Renna *et al.* (2017) que indicaron que en todos los tratamientos de secados de las plantas de hinojo marino se redujo significativamente el contenido de clorofila. Las plantas secadas con aire caliente resultaron con la mayor reducción (70 %) en contraste a la reducción de clorofila de las plantas liofilizadas que fue de un 42 %.





**Figura 4.4.** Plantas de hinojo marino deshidratadas y envasadas al vacío. PL: planta deshidratada mediante liofilización, PC: planta deshidratada por medio convencional.

Varios trabajos publicados (Renna *et al.*, 2017; Giungato *et al.*, 2019) evaluaron diferentes métodos de secado de las plantas de hinojo marino. Entre ellos se incluye el secado por aire caliente, donde se reportaron valores de pérdida de humedad de  $85.55 \% \pm 0.15$  y una  $a_w$  final de  $0.17 \pm 0.01$  al cabo de 48 h a  $60^\circ\text{C}$ . Estudiaron así mismo, la liofilización e indicaron una pérdida de humedad de las plantas deshidratadas del  $85.05 \% \pm 0.32$  y una  $a_w$  final de  $0.33 \pm 0.01$  después de 72 horas. A pesar de la baja humedad y  $a_w$  reportada, contrastan con los resultados reportados en este trabajo, donde se obtuvo una pérdida de humedad de 91 y 92 % y una  $a_w$  de 0.02 y 0.01 en las plantas liofilizadas y secadas por medio convencional, respectivamente. Como reflejan los datos reportados en esta tesis, en menor tiempo (24 horas de liofilización y 10 horas de secado convencional) se obtuvo una humedad y  $a_w$  relativamente inferior a los resultados expuestos por las investigaciones citadas.

#### 4.2.2. Caracterización fitoquímica de la planta de hinojo marino

De acuerdo a la literatura revisada (Renna *et al.*, 2017; Giungato *et al.*, 2019) las plantas de hinojo marino deshidratadas por liofilización tienden a conservar en mayor grado sus características y propiedades fisiológicas. Por lo que se decidió caracterizar los compuestos volátiles de estas plantas a partir de las muestras secadas por liofilización. En la Tabla 4.2 se describen los compuestos volátiles analizados en las plantas de hinojo marino liofilizadas. El perfil de los compuestos volátiles de las plantas de hinojo marino fue investigado por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) con el objeto de identificar y conocer su composición (Fig. 4.5). Los compuestos volátiles con mayor presencia (expresados en % de área de los picos de cromatograma) fueron el carvacrol metil éter (39.9 %) y el apiol (26.3 %). Los compuestos volátiles presentes en el análisis de GC-MS estuvo acorde al perfil fitoquímico que reportaron en un trabajo reciente Giungato *et al.* (2019), donde informaron que los terpenos fueron los compuestos volátiles más representados en las muestras de hinojo marino liofilizado (71.96 %). Además, indicaron que el proceso de liofilización condujo a obtener un mayor contenido de apiol (20.5 %). Lo que es coherente con los resultados de esta tesis, debido a que el apiol fue el segundo compuesto con mayor presencia en los análisis de las plantas liofilizadas. En otro trabajo, Pistelli *et al.* (2013) caracterizaron por GC-MS varias plantas aromáticas, entre ellas el hinojo marino. Estos autores, informaron que el compuesto de mayor presencia fue el sabineno (15 %) el  $\gamma$ -terpineno (30.9 %).

Como se puede observar, los compuestos volátiles identificados en la planta de hinojo marino son acorde a lo que reporta la bibliografía científica. Sin embargo, se discrepa en las concentraciones que se informan en los diferentes trabajos. Los factores que posiblemente influyan en la concentración de los compuestos fenólicos, pueden estar determinados por la época del año de cultivo y

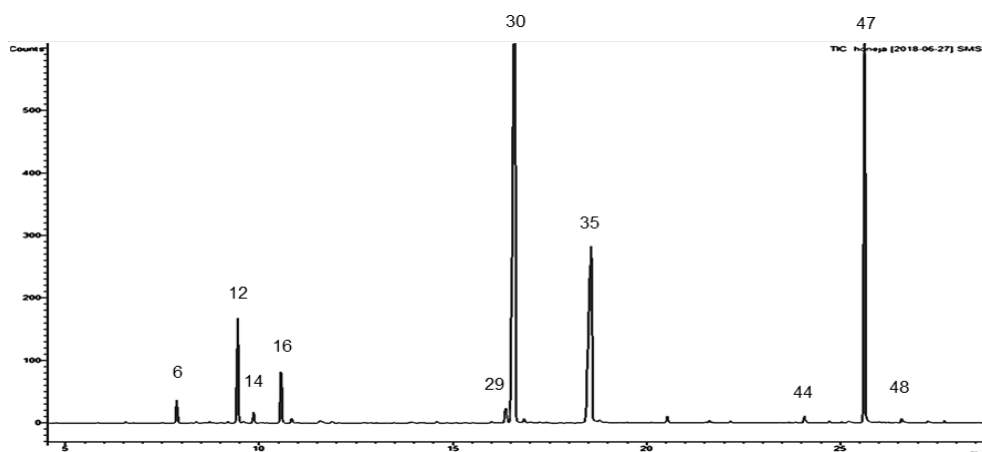
cosecha de la planta (Generalic Mekinić *et al.*, 2018), por la ubicación geográfica del cultivo (Ciccarelli *et al.*, 2016) y por la parte de la planta que se haya realizado el análisis (Generalic Mekinić *et al.*, 2016).

**Tabla 4.2.** Composición fitoquímica del hinojo marino.

Nr	Compuesto	Area (%)	Grupo
2	2-Hexenal, (E)-	0,032	Aldehído
9	n-Octanal	0,014	
15	Aldehído $\alpha$ - To-luico	0,039	
20	n-Nonanal	tr	
22	2-Nonenal, (E)-	0,076	
34	2-Decenal, (E)-	0,02	
38	Undecenal <(2E)->	0,355	
5	Benzaldehído	0,016	
12	<i>p</i> -Cimeno	5.266	Bencenos
18	<i>p</i> -Cimenoeno	0,239	
25	<i>p</i> -Cimeno-8-ol	0,01	
27	Estragole	0,016	
36	Carvacrol	0,107	
41	Timo hidroquinona éter dimetil	0,096	
44	Miristicina	0,36	
48	Dill apiol	0,201	
47	Apiol	26.302	Terpenos
3	$\alpha$ -Tujeno	0,071	
4	$\alpha$ -Pineno	0,016	
6	Sabineno	1,13	
8	$\beta$ -Mirceno	0,069	
11	$\alpha$ -Terpineno	0,074	
13	Limoneno	0,121	
14	$\beta$ - <i>cis</i> -Ocimeno	0,518	
43	$\beta$ -Bisaboleno	0,039	

**Tabla. 4.2 (Cont).** Composición fitoquímica del hinojo marino.

Nr	Compuesto	Area (%)	Grupo
10	Acetato de hexenilol <(2E)->	0,014	Ésteres
29	Timol metil éter	0,976	
30	Carvacrol metil éter	39,997	
37	Acetato de piperitol <trans->	0,029	
39	Ácido decanoico etil éster	0,053	
16	$\gamma$ -Terpineno	2,731	Derivados de terpenos
17	Hidrato de sabineno <cis->	0,236	
19	Hidrato de sabineno <trans->	0,108	
21	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno	0,026	
24	Terpineno-4-ol	0,098	
23	Óxido de Linalol <cis->	0,024	
28	$\beta$ -Ciclocitral	0,097	
32	Thimoquinona	0,041	
46	Germacreno B	0,048	
7	5-Heptano-2-ona, 6-metil-	0,012	Acetonas
26	2-Decanona	0,012	
42	Dihidro-pseudoionona	0,015	
1	Desconocido	0,02	Otros
31	Desconocido	0,219	
33	Desconocido	0,066	
35	Estándar internacional	19,436	
40	Tetradecano	0,14	
45	Copaeno-11-ol	0,079	



**Figura 4.5.** Cromatografía GC – MS de las plantas de hinojo marino. 6) sabineno, 12) *p*-cimeno, 14)  $\beta$ -*cis*-ocimeno, 16)  $\gamma$ -terpineno, 29) timol metil éter, 30) carvacrol metil éter, 35) Estándar internacional, 44) miristicina, 47) apiol, 48) Dill apiol.

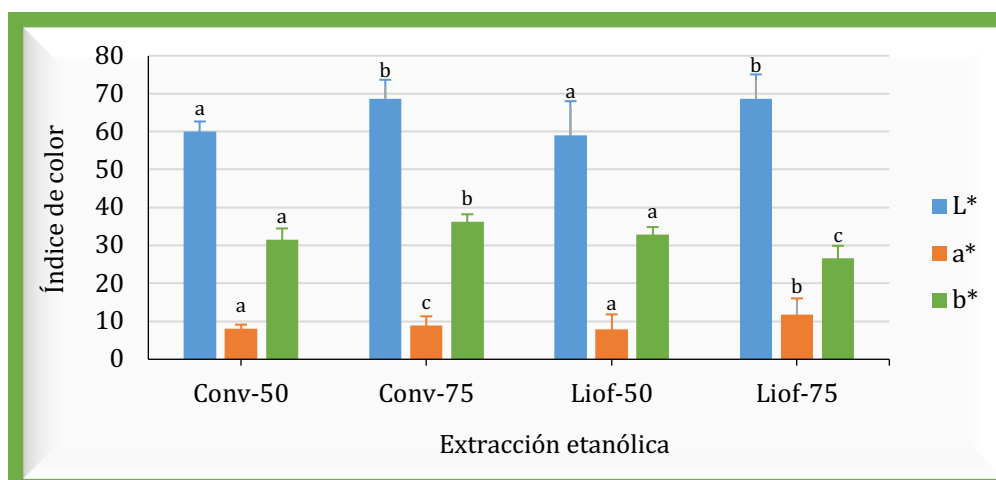
Varios artículos científicos han informado de la capacidad antioxidante y/o antimicrobiana de los compuestos fenólicos presentes en las plantas de hinojo marino. Entre ellos el  $\gamma$ -terpineno, sabineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineno, carvacrol, timol (Houta *et al.*, 2011, 2015; Rodrigues *et al.*, 2015; Nabet *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017) y el apiol (Raja *et al.*, 2016). Con estas bases científicas, se decidió estudiar la capacidad antioxidante y/o antimicrobiana de los compuestos activos presentes en los extractos de hinojo marino antes de su incorporación en PRC.

#### 4.2.3. Color de los extractos de hinojo marino

Una vez realizada las extracciones hidroalcohólicas, los extractos fueron caracterizados respecto a color. El color de los extractos liofilizados de hinojo marino se midió utilizando la escala CIELAB. Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se utilizaron como índices para mostrar la diferencia de color entre los extractos (Fig. 4.6). Los extractos LIOF-75 y CONV-75 (plantas deshidratadas mediante liofilización y por

el método convencional, procesados con una concentración de etanol:agua 75:25) presentaron un valor de  $L^* = 68.6 \pm 5.1$  y  $68.6 \pm 6.5$ , respectivamente y no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre sí. Sin embargo, ambos índices fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a los valores de  $L^*$  de las muestras LIOF-50 y CONV-50 (extraídas con una concentración de etanol:agua 50:50). Estos índices de  $L^*$ , expresarían una baja luminosidad y tono, que es una característica importante de la apariencia en los alimentos, que, en este caso se reduce como consecuencia del proceso de secado y por el efecto de la concentración del solvente utilizado.

En cuanto al parámetro  $a^*$ , los extractos correspondientes a las muestras LIOF-75 y CONV-75 presentaron los valores más elevados ( $11.8 \pm 4.3$ ) que de acuerdo a la escala CIELAB, indicarían que las muestras son más rojas en relación a los otros extractos. El índice de  $b^*$  de los extractos CONV-75 fueron los más alto ( $36,3 \pm 1.9$ ) expresando una coloración más amarilla y fueron significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los demás extractos.



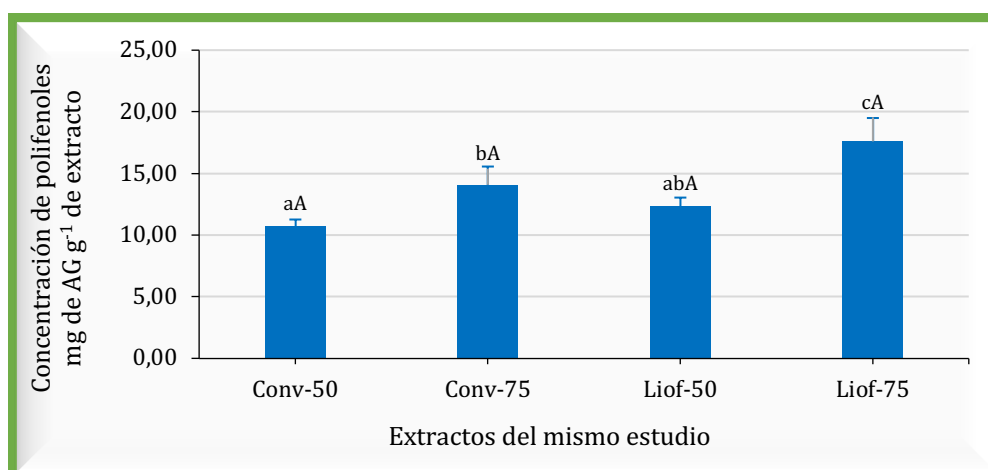
**Figura 4.6.** Parámetros de color de extractos de hinojo marino deshidratados. Conv-50 y Conv-75: secado convencional; Liof-50 y Liof-75: secado mediante liofilización (50:50 y 75:25)-etanol:agua. Letras diferentes (a, b, c) indican diferencia significativa entre concentraciones de solvente.

El cambio de color de los diferentes extractos posiblemente se debió al efecto de la concentración de etanol utilizada para las extracciones de los compuestos activos y su poder solvente. Marpaung *et al.* (2017) informaron que el cambio de color en los extractos de guisante (*Clitoria ternatea* L) posiblemente fue causado por la desacetilación de pigmentos flavonoides presentes en los extractos, debido al poder solvente utilizado, que conlleva a la destrucción de la copigmentación intramolecular; lo que acelera la degradación del color. Otro posible factor implicado en el cambio de color considerado en el estudio de los autores, fueron los cambios de temperatura a los que fueron sometidos los compuestos activos durante su extracción. Jiang *et al.* (2019) reportaron del cambio de color que sufrían los compuestos activos durante la extracción a partir de la flor y de la hoja de la patata fresca. Estos autores informaron que el tratamiento térmico fue responsable de dicho cambio de color durante la extracción.

#### 4.2.4. Contenido total de polifenoles de los extractos

Se determinó la concentración del contenido total de polifenoles (CTP) presentes en los extractos hidroalcolicos (Fig. 4.7). No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el rendimiento de polifenoles al comparar los métodos de deshidratación a los que fueron sometidas las plantas de hinojo marino. Sin embargo, se observó que el CTP de las extracciones con LIOF-75 ( $17.6 \pm 1.9$  mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto) fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en relación al CTP de las otras extracciones ( $\leq 14.1$  mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto). Este contenido de polifenoles, podría deberse a la cantidad relativamente alta de etanol utilizado en LIOF-75 durante la extracción, unido al tratamiento térmico suave que recibieron las muestras de plantas de hinojo marino durante el secado. Cuando la deshidratación fue por liofilización la temperatura no sobrepasó los 40

°C., cómo ya se discutió anteriormente; los cambios térmicos que sufren los extractos influyen en las características y rendimiento de los compuestos activos (Jiang *et al.*, 2019). Sin embargo, el uso del 75 % de etanol en las extracciones de los compuestos fenólicos, implicó un mayor rendimiento de polifenoles en comparación al uso del 50 % de etanol, donde el rendimiento fue significativamente menor.



**Figura 4.7.** Concentración de polifenoles presentes en las muestras de extracto seco de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre muestras de extracto. Letras iguales en mayúsculas (A) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos de secado.

Varios trabajos de investigación informan sobre el CTP presentes en extractos hidroalcohólicos a partir de plantas de hinojo marino. Los valores de CTP dependen del tipo de alcohol empleado y de las concentraciones aplicadas para las extracciones. Así, Nabet *et al.* (2017) prepararon un extracto hidrometanólico, mezclando 1 gramo de polvo de planta en 100 mL de metanol al 80 %, para estudiar la actividad biológica y la composición de los compuestos del hinojo marino.



Estos investigadores obtuvieron un CTP de  $47.1 \pm 0.1$  g de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto. Además, indicaron que la concentración de polifenoles fue alta en relación al CTP extraídos con acetona al 80 % (Jallali *et al.*, 2012, 2014) donde obtuvieron un CTP de 4.1 a 14.1 mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto.

El CTP extraídos con etanol al 75 % en este trabajo fue mayor en relación a los datos reportados con las extracciones utilizando acetona. Sin embargo, es menor al CTP reportado utilizando metanol. En otro trabajo relacionado con extracción etanólica, realizado por Generalić Mekinić *et al.* (2016) evaluaron el CTP, a partir de flores, tallos y hojas de hinojo marino en etanol al 80 %, obtuvieron un rendimiento de polifenoles de  $32.6 \pm 1$ ;  $7.6 \pm 0.2$  y  $35.1 \pm 0.2$  mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto seco, respectivamente. En este caso, además de la concentración de alcohol utilizado, el CTP dependió de la parte de la planta en la que se realizó la extracción.

En otro trabajo realizado por Generalić Mekinić *et al.* (2018) con extracciones a base de etanol al 80 %, concluyen que el CTP presente en el hinojo marino depende de la época del año. Reportaron que hojas secas pulverizadas de hinojo marino que fueron recolectada en el mes de abril, presentaron el mayor CTP (16.8 mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto seco). Estos valores son similares a los reportados en este trabajo, donde se obtuvo un CTP de 17.6 mg de ácido gálico  $g^{-1}$  de extracto. Sin embargo, con el último reporte realizado por Generalić Mekinić *et al.* (2018) existe discrepancia entre sus resultados por la alta variabilidad entre los datos reportados. Posiblemente se deba, a que el método de secado de las plantas la realizo en un lugar con sombra a temperatura ambiente durante 10 días; lo que podría explicar esa variabilidad en sus resultados por influencia de la falta de control en los parámetros de tiempo y temperatura.

Así, los protocolos de extracción publicados difieren en el solvente o mezcla de solventes utilizados y el tiempo de extracción aplicado. Los tiempos de ex-

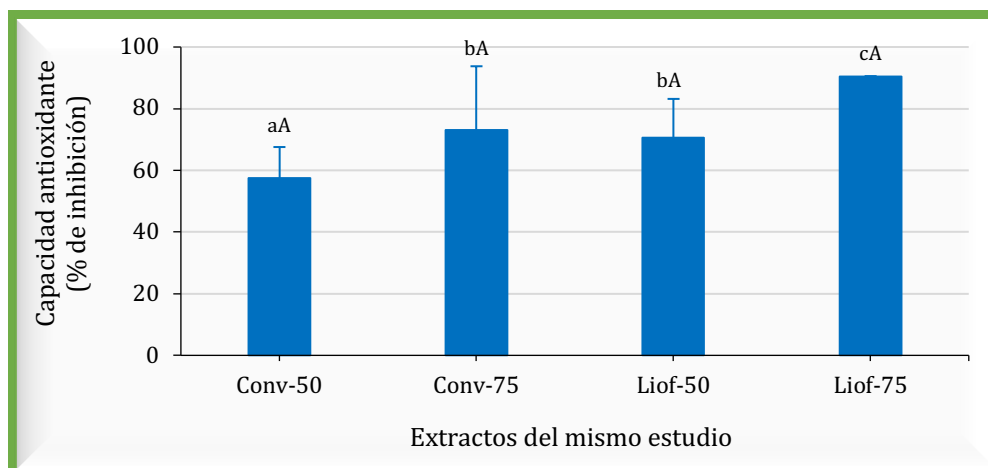
tracción van desde unos pocos minutos hasta varias horas. La mayoría de los métodos evitan la luz, el O<sub>2</sub> y las altas temperaturas para disminuir la descomposición de los compuestos extraídos y maximizar los rendimientos de extracción. Desde un punto de vista químico, y en función de la polaridad de los compuestos fenólicos, generalmente se recomienda la extracción con 70 % a 95 % de etanol para garantizar la máxima solubilización de la mayoría de los grupos fenólicos (Gallardo *et al.*, 2006).

#### 4.2.5. Capacidad antioxidante de los extractos

En las Figuras 4.8 se expresan los resultados de la capacidad antioxidante (CA) de los extractos de hinojo marino. Tal como se expuso al comparar los métodos de secados en el rendimiento del CTP, tampoco se observó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al comparar ambos métodos de secado (liofilización y convencional) en el porcentaje de inhibición radical DPPH. El mayor porcentaje de CA fue observado en los extractos con Liof-75 ( $90.4 \pm 0.2$  % de inhibición) y fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a la CA observada en los demás extractos, que fue entre 57 % y 73 % de inhibición. Este patrón está relacionado con el alto CTP presentes en el mismo tratamiento de extractos de hinojo marino. Estos valores de CA, son cercanos a los porcentajes reportados por Pereira *et al.* (2017) que estudiaron la CA del hinojo marino. Reportaron valores entre 79.4 % y 88 % de inhibición. Estos autores concluyeron que la CA está estrechamente relacionada con el CTP presentes en el extracto de la planta.

Adicionalmente, el CTP depende de la concentración y tipo de solvente que se utiliza para la extracción y del tratamiento térmico que se aplique durante el proceso de deshidratación. Como se ha podido demostrar en este trabajo, el efecto del tipo de secado por liofilización y el efecto del tipo y concentración de solvente (LIOF-75), dio como resultado un mayor CTP y una alta CA, concentraciones que

fueron significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a las concentraciones reflejadas a los CTP y CA de las demás muestras. Además, se observa un aumento significativo de la CA con respecto a los extractos CONV-50 (57 % de inhibición) de los extractos LIOF-50 y Conv-75 (70 % y 73 % de inhibición, respectivamente) estos últimos no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre sí.



**Figura 4.8.** Capacidad antioxidante de los extractos de hinojo marino. Letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas entre las muestras de extracto. Letras iguales en mayúsculas (A) indican que no hubo diferencias significativas entre tratamientos de secado.

Por otro lado, Generalić Mekinić *et al.* (2016, 2018) reportan valores de CA entre 61 % y 50 % de inhibición, a pesar de que sus datos son contradictorios en relación al CTP en ambas publicaciones. Esta variación de resultados en relación a la CA de los extractos de hinojo marino, podría deberse a que la CA global de un extracto de planta, generalmente se considera como el resultado de la sinergia de una amplia gama de compuestos que incluyen, junto a los polifenoles: péptidos, ácidos orgánicos y otros componentes (Gallardo *et al.*, 2006; Meot-Duros *et al.*, 2008). Además, la literatura científica expone diferentes métodos uti-

lizados para la extracción de compuestos fenólicos, la identificación de estos compuestos y la evaluación de la CA; lo que hace que las comparaciones entre estudios y la extrapolación de conclusiones generales sea un trabajo bastante difícil. Estas diferencias pueden explicar, hasta cierto punto, la discrepancia en los resultados expuestos por diversos autores. Los resultados de este trabajo y los resultados publicados anteriormente muestran claramente que se necesita una determinación completa de todos los componentes solubles presentes en los extractos de plantas y de su CA e interacciones para explicar completamente la CA final de los extractos.

Después de haber caracterizado la planta de hinojo marino y evaluado la CA de los compuestos presentes en los extractos, se procedió a incorporar dichos extractos en la SFP, con el objeto de elaborar películas comestibles activas y estudiar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de las películas elaboradas a base de WPI y de GP.

#### **4.2.6. Efecto de los extractos sobre el pH de las soluciones formadoras de películas activas**

Debido a la falta de información sobre la adición de extractos de hinojo marino en la formulación de PRC, la discusión del presente apartado se la realizó comparando los resultados obtenidos con estudios realizados con otros extractos de plantas combinados con diferentes matrices de recubrimiento.

Para evaluar el efecto sobre las propiedades funcionales de las PRC al adicionar los extractos de hinojo marino, se utilizó el extracto que mejores resultados mostró respecto a los análisis para ser utilizado como componente activo, en este caso el extracto LIOF-75. Por otra parte, se utilizaron dos matrices: gelatina de pescado (GP) y proteína aislada de suero lácteo (WPI) y se analizó el efecto del

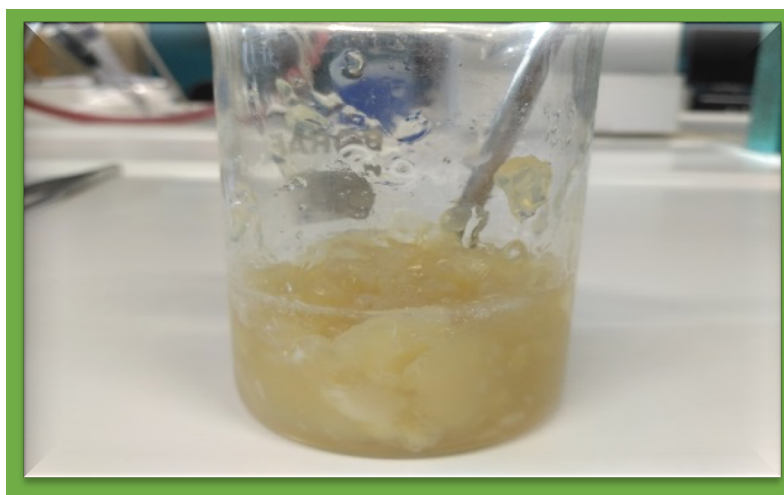
extracto de hinojo marino sobre las propiedades de las soluciones y películas resultantes.

En la Tabla 4.3 se muestra el pH de las SFP de GP y WPI con y sin distintas concentraciones de extracto de hinojo marino. La SFP basada en GP sin extracto tuvo un pH de 5.4 que está acorde a datos ya reportados y discutidos en esta tesis (Cap. III) (Etxabide *et al.*, 2017b). El extracto de hinojo marino fue diluido con 5 mL de agua destilada. El pH de esta disolución fue de 3.8 y al adicionarse a la formulación de las películas activas de GP afectó a su pH, que se redujo gradualmente (pH 5.4 a 5.2) a medida que aumentaba la concentración de extracto de hinojo marino. A pesar de disminuir el pH, no afectó a la apariencia, homogeneidad y estabilidad física de las SFP basadas en GP y se pudieron verter en los platos de vidrio para la elaboración de las películas. En contraste, la adición del extracto afectaba a las SFP basada en WPI reduciéndolo de un pH 6.9 a pH 6.2. Además, se observó que se formaban grumos (Fig. 4.9) posiblemente debido a que la proteína se acercaba al punto isoeléctrico de la  $\beta$ -lactoglobulina, que es de pH 4.8 (Ramos *et al.*, 2012). Para solucionar este inconveniente, se ajustó el pH a 7 del extracto de hinojo marino (antes de incorporarlo a la SFP) añadiendo NaOH (1N). Posteriormente, fue adicionado en la SFP y se obtuvo un pH final de las SFP de 6.8. Con esta modificación la proteína no precipitaba y se homogenizaba con facilidad y se vertía a en los platos de vidrio para la elaboración de las películas sin mayor dificultad.

**Tabla 4 3.** pH de las soluciones formadoras de películas.

Matriz	0 % extracto	0.5 % extracto	1 % extracto	2 % extracto	pH modificado
GP	5.4 <sup>a</sup>	5.3 <sup>b</sup>	5.27 <sup>bc</sup>	5.2 <sup>c</sup>	-
WPI	6.9 <sup>a</sup>	6.3 <sup>b</sup>	6.28 <sup>bc</sup>	6.22 <sup>c</sup>	6.8

Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencia significativa respecto a la concentración de extracto dentro de cada matriz de recubrimiento. GP: gelatina de pescado; WPI: proteína aislada de suero lácteo.

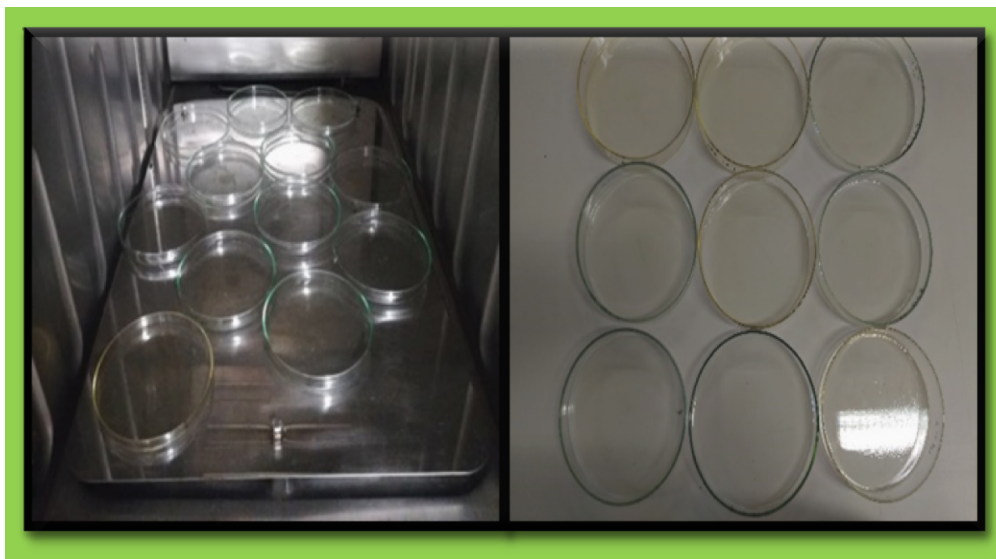
**Figura 4.9.** Solución formadora de película basada en WPI con extracto de hinojo marino sin pH modificado.

De acuerdo a los resultados reportados por Le Tien *et al.* (2000) el calentamiento de las soluciones basadas en WPI a 90 °C durante 30 minutos y a un pH 7 produce películas uniformes. Según Cagri *et al.* (2001) y Quinn *et al.* (2003) las soluciones acuosas de WPI con glicerol u otro plastificante forman una solución de proteína formadora de películas. Las condiciones de temperatura y pH tienen un efecto clave en la formación de enlaces que estabilizan la matriz proteica de los que dependen sus características mecánicas, fisicoquímicas y funcionales. En torno al pH 6.5, probablemente se evitaría la formación de enlaces S-S en la matriz

proteica, debilitando la estructura de la película (Cagri *et al.*, 2001). Acorde a lo citado, el pH 6.2 de las SFP a base de WPI con extractos de hinojo marino, afectó la interacción intramolecular de la matriz de recubrimientos, impidiendo su estabilidad y condiciones para una buena solubilidad y dispersión de los compuestos fenólicos.

#### **4.2.7. Apariencia y espesor de las películas activas**

Todas las películas desarrolladas fueron uniformes, sin grietas y homogéneas. Visualmente, las películas comestibles de GP y de WPI sin extracto (Fig. 4.10) tuvieron una apariencia transparente. Estas características están de acuerdo a lo reportado por Quinn *et al.* (2003) para las películas de WPI y por Hosseini *et al.* (2013) para las películas de GP. En cambio, los extractos de plantas comúnmente proporcionan opacidad a los biopolímeros y, como resultado, las películas que contienen extractos son menos transparentes que las películas sin extractos (Norajit *et al.*, 2010).



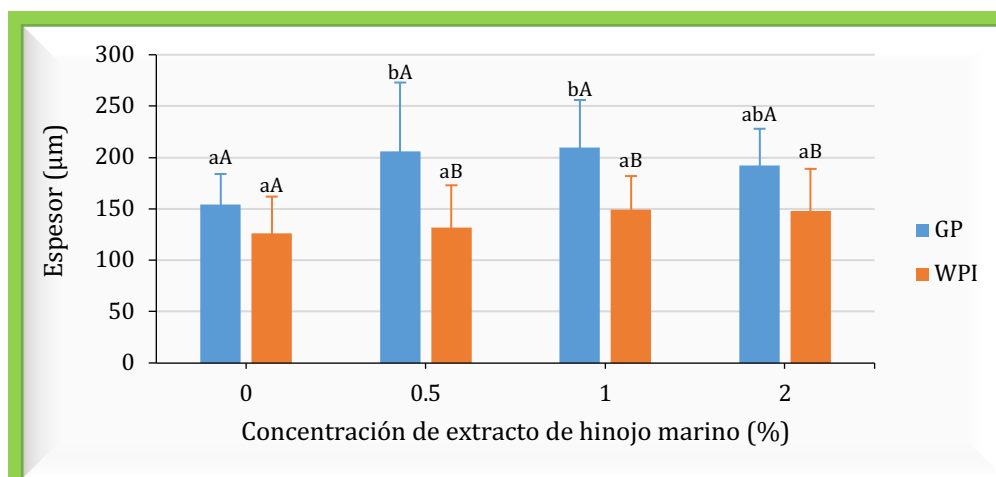
**Figura 4 10.** Secado de películas basadas en proteína aislada de suero lácteo y gelatina de pescado con o sin extracto, respectivamente.

En la Fig. 4.11 se representan los valores de espesor tanto de las películas a base de GP como de WPI, con y sin extracto de hinojo marino. Los valores de espesor de las películas comestibles sin extracto fueron de  $154 \pm 30 \mu\text{m}$  (GP) y de  $126 \pm 36 \mu\text{m}$  (WPI). Estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí ( $p > 0.05$ ). El efecto de la adición del extracto sobre el espesor de las películas comestibles fue en proporción muy diferente al comparar ambas matrices. A pesar de observarse una cierta tendencia al incremento del espesor de las películas basadas en WPI a medida que se aumentaba la concentración del extracto de hinojo marino, los valores de espesor no fueron significativamente diferentes entre sí ( $p > 0.05$ ), ni con respecto al control (películas sin extracto).

En cambio, la adición del extracto de hinojo marino, afectó significativamente al espesor de las películas basadas en GP. Este incremento fue alto en las películas comestibles con 0.5 % ( $206 \pm 67 \mu\text{m}$ ) y 1 % ( $210 \pm 46 \mu\text{m}$ ) estos valores fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a las películas de GP sin extracto ( $154 \pm 30 \mu\text{m}$ ). Además, el incremento en el espesor de las películas basadas en



GP con extracto fue significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) para todas las películas, en comparación al espesor de las películas basadas en WPI con extracto.



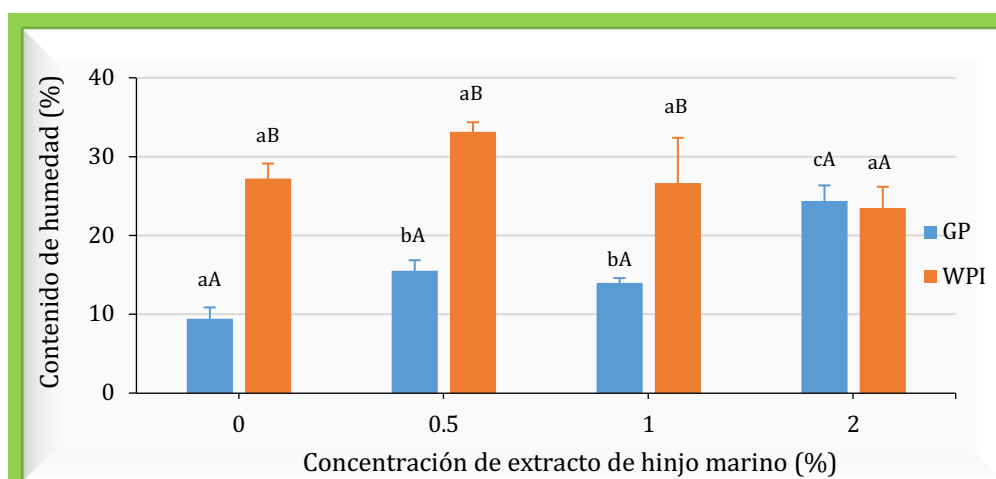
**Figura 4.11.** Espesor de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo.

Torres-León *et al.* (2018) desarrollaron y caracterizaron películas biodegradables mediante el uso de cáscara de mago y extractos de la semilla del mango. Estos autores informaron que la adición del extracto aumentó significativamente el espesor de las películas activas afectando sus propiedades mecánicas. Además, mejoraron las propiedades de barrera de las películas activas, reduciendo la transferencia de gases. Estos resultados son coherentes con los datos expuestos en esta tesis.

#### 4.2.8. Contenido de húmeda de las películas activas

El contenido de humedad de las películas comestibles basadas en GP y WPI con y sin extracto de hinojo marino y equilibradas al 57 % de HR es representado

en la Fig. 4.12. El contenido de humedad de las películas de GP sin extracto fue de  $9.46 \pm 1.42$  %. Este nivel incrementó a medida que se aumentó la concentración de extracto de hinojo marino. El contenido de humedad más alto se observó en las películas activas con el 2 % de extracto ( $24.41 \pm 1.94$  %), que fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) a las otras películas de GP con concentraciones inferiores. En cambio, el contenido de humedad de las películas de WPI sin extracto fue de  $27.24 \pm 1.89$  %, que fue significativamente más alto ( $p < 0.05$ ) en relación al contenido de humedad de las películas de GP sin extracto. Esta diferencia entre ambas matrices, se debe al carácter predominantemente hidrófilo que poseen las películas basadas en WPI y por tanto, poseen mayor capacidad de retención de agua (Kokoszka *et al.*, 2010).



**Figura 4.12.** Contenido de humedad de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI proteína aislada de suero lácteo.

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el contenido de humedad entre las películas de GP y WPI con el 2 % de extracto de hinojo marino.

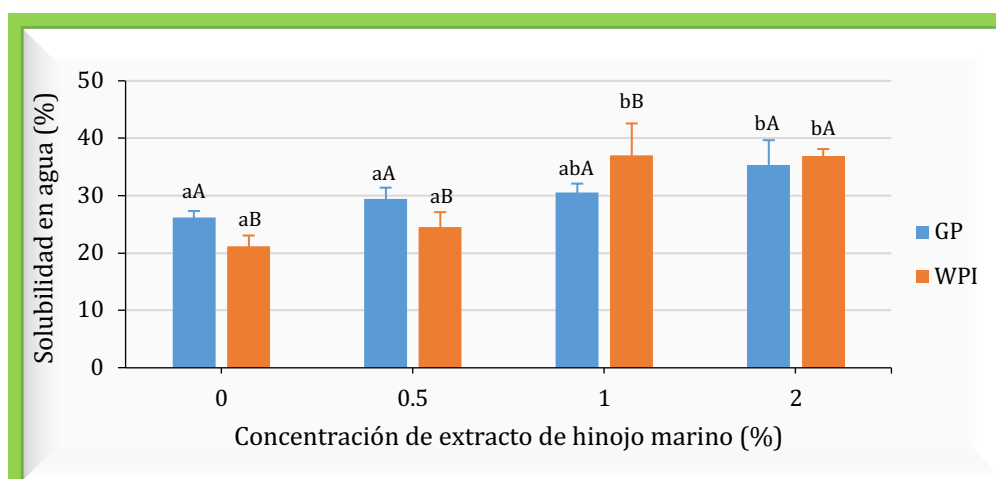
Esto posiblemente se debió, a que con esa concentración de extracto aumentaría el carácter hidrófilo de las películas de GP (Etxabide *et al.*, 2017a). Además, Sui Chin *et al.* (2017) informaron que el aumento en el contenido de humedad de las películas de GP, podría deberse a la reducción de la interacción de las moléculas de gelatina con la adición de extractos de origen vegetal, lo que aumentó la disponibilidad del grupo hidroxilo libre para absorber más agua. Los contenidos sólidos del extracto vegetal podrían haber interactuado con los radicales libres de la gelatina de pescado y, por lo tanto, aumentaría la retención de moléculas de agua (Bhat y Karim, 2014). Con respecto a la aparente reducción del contenido de humedad en las películas activas basadas en WPI, según Zolfi *et al.* (2014) y Li *et al.* (2011) indicaron que estos comportamientos podrían deberse a la colocación de moléculas liposolubles en la estructura de la red de la matriz proteica y a la interacción con los grupos funcionales de la cadena del biopolímero, lo que conduce a la reducción del espacio disponible en los biopolímeros para la colocación y reacción de moléculas de agua.

#### 4.2.9. Solubilidad en agua de las películas activas

Se observó que la solubilidad de las películas con GP y WPI aumentó significativamente a medida que incrementó la concentración de extracto de hinojo marino (Fig. 4.13). En las películas de GP, el mayor porcentaje de solubilidad fue observado en las películas con el 2 % de extracto de hinojo marino ( $35 \pm 4$  %) y fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) al porcentaje de solubilidad de las otras películas que contenían menor concentración de extracto y con respecto al control ( $26 \pm 1$  %). Un patrón similar fue observado en las películas con WPI, donde el nivel de solubilidad aumentó a medida que incrementó la concentración de extracto. Sin embargo, las películas con el 1 y 2 % de extracto ( $37 \pm 3$  %) fueron

significativamente más altas ( $p < 0.05$ ) en relación a las películas con el 0.5 % de extracto ( $25 \pm 3$  %) y con las películas sin extracto ( $21 \pm 2$  %).

Al comparar los valores de solubilidad de los dos tipos películas, a pesar que en ambas se observó un incremento progresivo de la solubilidad a medida que aumentó la concentración de extracto, este no fue uniforme para cada tratamiento. Las películas de GP sin extracto y con el 0.5 % de extracto fueron significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) en relación a las películas con WPI con las mismas concentraciones de extracto. En cambio, con la concentración de extracto al 1 %, el porcentaje de solubilidad fue más alto en las películas con WPI ( $37 \pm 3$  %), en relación a las películas con GP ( $31 \pm 2$  %), valores que fueron significativamente diferente ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, en la solubilidad de ambas películas con el 2 % de extracto no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 4.13.** Solubilidad en agua de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo.

La concentración de extracto incrementó significativamente la solubilidad de las películas activas, tanto en las basadas con WPI como en las basadas con GP. El elevado porcentaje de solubilidad en ambas películas activas con respecto a las películas sin extracto, se debió al carácter hidrófilo que posee tanto las películas basadas en GP (Etxabide *et al.*, 2017a) como las basadas en WPI (Kokoszka *et al.*, 2010). Además, los extractos de hinojo marino contienen compuestos antioxidantes de carácter hidrosolubles (fitonutrientes) (Romojaro *et al.*, 2013) lo que aumentaría la solubilidad de las películas activas.

Según Giménez *et al.* (2013) la adición del extracto de té verde en las películas comestibles a base de gelatina incrementó la solubilidad en agua de las películas activas, debido a la naturaleza hidrófila del extracto. Estos autores, reportaron rangos de solubilidad entre el 24 % para las películas sin extracto y el 50 % para las películas con extracto. El primer valor es coherente con los resultados expuestos en este trabajo. Nouri y Mohammadi (2014) observaron que la solubilidad en agua era mayor en las películas de almidón con extracto de hoja de betel en comparación con las películas sin extracto. Como ya se ha indicado anteriormente, la adición de extractos vegetales posiblemente redujo la interacción de las moléculas de las películas, incrementando de esta manera grupos hidroxilos libres, lo que conllevaría a aumentar la solubilidad de las películas.

La solubilidad de la película es una propiedad funcional importante que influye en la biodegradabilidad de las películas. La variación en la solubilidad podría atribuirse a los diferentes componentes activos presentes en los extractos de hinojo marino, como moléculas hidrosolubles y liposolubles (Romojaro *et al.*, 2013). Estas moléculas afectan en la propiedades hidrofílicas de las películas, afectando la difusión de agua, la ionización de grupos amino o carboxilo, la disociación de hidrógeno y los enlaces iónicos y la relajación del biopolímero (Mathew *et al.*, 2006; Mir *et al.*, 2018).

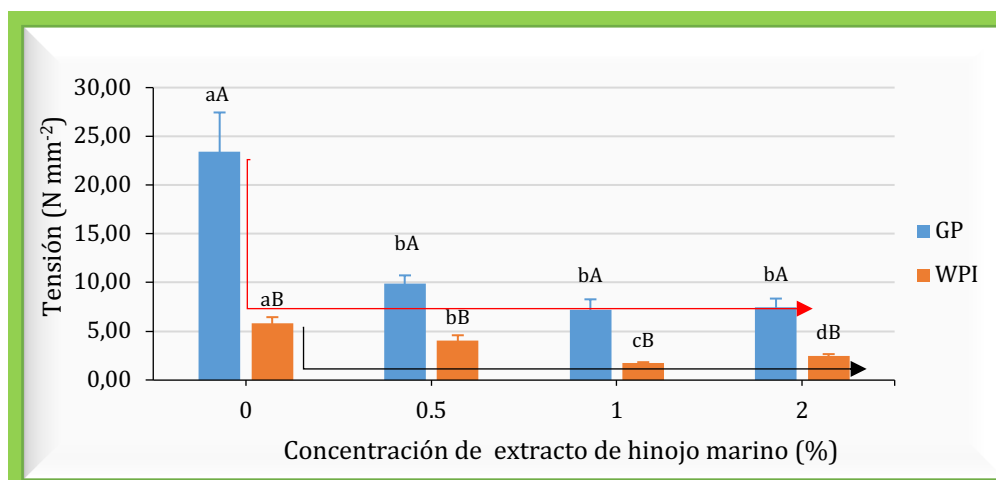
#### 4.2.10. Propiedades mecánicas de las películas comestibles activas

Se evaluaron las propiedades mecánicas en un test de tracción de las películas activas a base de WPI y de GP con y sin extracto de hinojo marino. Se analizaron tiras de cada película comestible, seleccionándose aquellas con espesores de  $126 \pm 36 \mu\text{m}$  (WPI) y de  $154 \pm 30 \mu\text{m}$  (GP). Se observó que a medida que aumentaba la concentración de extracto de hinojo marino, afectaba significativamente a la tensión máxima (TM), a la elongación de rotura (ER) y al módulo de Young (MY).

En el Fig. 4.14 se exponen los resultados de la TM de las películas comestibles basadas en GP y WPI con y sin extracto de hinojo marino. La TM en las películas comestibles basadas en WPI son mayores que las películas activas basadas en GP, independientemente de la concentración del extracto de hinojo añadido. Se observó una reducción significativa y exponencial de la TM al aumentar el contenido de extracto de hinojo marino. Las películas con GP sin extracto fue la que mayor TM alcanzó ( $23.4 \pm 4 \text{ N mm}^{-2}$ ). No se observaron diferencias significativas entre los valores de TM de las películas de GP con extracto. Por otra parte, se observó una reducción significativa y lineal de la TM de las películas de WPI a medida que aumentaba la concentración de extracto. La TM de las películas con WPI sin extracto fue de  $5.8 \pm 0.6 \text{ N mm}^{-2}$  y fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a la TM de las películas con extracto. Además, los valores de TM de las películas de WPI con extractos fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ), entre sí. La TM de todas las películas de GP fueron significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) a la TM observada en las películas con WPI.

De acuerdo a estos resultados, la adición del extracto de hinojo marino redujo la TM de las películas comestibles activas tanto de GP como de WPI, debido a la pobre interacción de las moléculas de las películas comestibles con las molé-

culas de los compuestos presentes en el extracto (Benavides *et al.*, 2012). La presencia de algunas moléculas del extracto del hinojo marino hizo reducir el número de interacciones, entre los diferentes biopolímeros que resulta en una menor TM. El aumento del contenido de humedad de las películas activas y su consecuente efecto plastificante probablemente ha influido en los resultados.



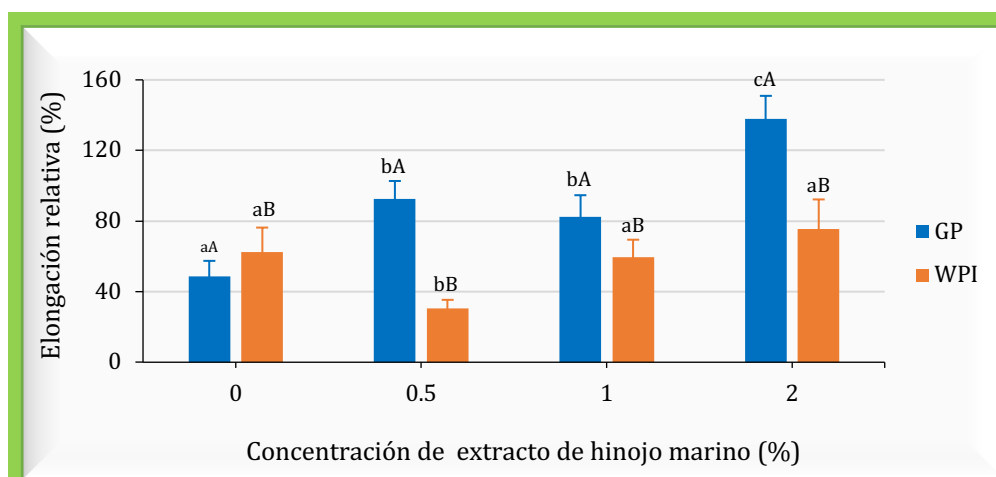
**Figura 4.14.** Tensión máxima de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas con respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas con respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo.

La concentración de extracto de hinojo marino en la formulación de la SFP, afectó también la elongación de rotura (ER) de las películas resultantes tanto para las basadas en GP como en WPI (Fig. 4.15). La ER de las películas de GP sin extracto fue del  $48 \pm 9$  %, valor que está dentro del rango reportado en la bibliografía (Le *et al.*, 2015) y que ya fue discutido en esta tesis (Cap. III). Con la adición del extracto de hinojo marino la ER aumentó en todas las películas. Se observó el valor más alto en las películas con el 2 % de extracto, que sobrepasó el 100 % de ER y que fue significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) a las otras películas con y sin extracto.

Por otro lado, la ER de las películas con WPI sin extracto fue de  $62 \% \pm 14 \%$ . Esta ER es similar a la reportada por Shaw *et al.* (2002). La ER de las películas de WPI con 0.5 % de extracto, al contrario de lo observado en las películas de GP, fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que el de las películas sin extracto. Sin embargo, con las concentraciones de 1 % ( $59 \pm 10 \%$ ) y 2 % de extracto ( $75 \pm 17 \%$ ) la ER incrementó de manera gradual, a pesar de no observarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Al comparar la ER de ambas películas comestibles, las compuestas de WPI sin extracto presentaron una ER significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la ER observada en las películas de GP. Sin embargo, al adicionar el extracto de hinojo marino la ER fue significativamente mayor en todas las películas en base a GP. Posiblemente, el extracto de hinojo marino está actuando como plastificante; algunos de sus compuestos hidrófilos y de bajo peso molecular se sitúan entre las cadenas poliméricas reduciendo los enlaces interpoliméricos y consecuentemente disminuyendo la TM e incrementando la ER. Además, este factor podría estar relacionado con el contenido de humedad de las películas activas (Fig. 4.12). La adición del extracto de hinojo marino incrementó el contenido de humedad, de forma más contundente en las películas de GP y de forma no tan determinante en las películas de WPI. Como ya se discutió anteriormente, la pobre interacción de las moléculas al adicionar los extractos vegetales en ambas matrices, permitirían la absorción de más agua, por lo tanto incrementar el ER de ambas películas. Li *et al.* (2014) informaron que la reducción de la TM puede deberse a que los compuestos polifenólicos de los extractos antioxidantes podrían formar puentes de hidrógeno con grupos amino e hidroxilo de la gelatina, lo que debilitaría las interacciones proteína-proteína para estabilizar la red de proteínas. Sin embargo, una gran cantidad de extracto incorporado en una película pudo inducir el desarrollo de una estructura heterogénea con la presencia de áreas discontinuas, lo que produce una baja resistencia a la tracción.



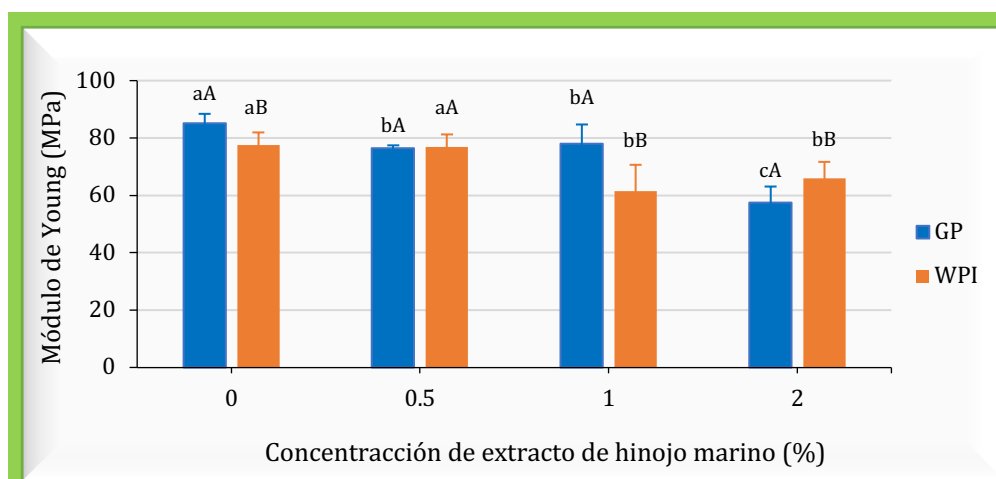


**Figura 4.15.** Elongación relativa de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína aislada de suero lácteo.

El extracto de hinojo marino afectó, pero no de manera significativa la ER de las películas activas a base de WPI, a excepción de las películas con un 0.5 % de extracto donde disminuyó la ER. Sin embargo, este incremento fue significativo ( $p < 0.05$ ) en las películas con GP, posiblemente el extracto de hinojo marino tuvo un efecto plastificante incrementando la ER de estas películas. Tongnuanchan *et al.* (2016) informaron que la adición de extractos naturales alteró la estructura de la película y provocaron una disminución en las interacciones de los materiales de base de la película. Produciendo una disminución de la TM y un aumento de la ER. Teoría que ratifica los resultados de TM y ER de esta tesis.

Por último, se determinó el módulo de Young (MY) en las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino (Fig. 4.16). El extracto disminuyó el MY en ambos tipos de películas. En las películas activas con GP el valor más bajo se

observó en las películas con el 2 % de extracto ( $57.5 \pm 5.6$  MPa) que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los valores del MY de las películas con el 0.5 % ( $76.5 \pm 0.9$  MPa) y 1 % ( $77.9 \pm 6.8$  MPa). Todas las películas activas de GP fueron significativamente diferentes a las películas sin extracto ( $85.1 \pm 3.4$  MPa). El MY también disminuyó en las películas activas con WPI, los valores más bajo fueron observados en las películas con el 1 y 2 % ( $61.5 \pm 9.16$  y  $65.9 \pm 5.8$  MPa, respectivamente), ambos valores fueron significativamente diferentes a las películas con el 0.5 % de extracto ( $77 \pm 4.3$  MPa) y a las películas sin extracto ( $77.6 \pm 4.4$  MPa). Este efecto del extracto de hinojo sobre el MY, está claramente razonado con la reducción de la TM de las películas activas.



**Figura 4.16.** Módulo de Young de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino equilibradas al 57 % de HR. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína de suero aislado de leche.

Las propiedades de las películas pueden verse afectadas incluso por pequeños cambios provocados por el extracto utilizado. Norajit *et al.* (2010) infor-

maron que varios compuestos fenólicos que son abundantes en el extracto de ginseng, causaron una reducción significativa en los valores de TM y de MY, lo cual es coherente con los resultados expuestos en este trabajo, donde el extracto de hinojo marino afectó tanto a la TM como al MY de las películas activas de GP y WP. Las diferencias en las propiedades mecánicas de las películas biodegradables se han relacionado con el tipo de extractos de plantas y la naturaleza del biopolímero (Norajit *et al.*, 2010). Los extractos de plantas influyen en las propiedades mecánicas de las películas, y su interacción dependería del tipo de biopolímero y extractos de plantas (Li *et al.*, 2014). Así, se ha demostrado que los extractos de tomillo afectan el comportamiento de tracción de las películas de quitosano, aumentando la TM y el MY, pero disminuyen la ER (Talón *et al.*, 2017). Cuando se mezcla extractos de plantas con películas comestibles de quitosano, los polifenoles interactúan con las cadenas poliméricas, actuando como reticulantes y afectando así el comportamiento de tracción.

En otros trabajos, los ensayos mecánicos realizados en películas comestibles activas; revelaron que la adición de extractos de grano de mango aumentó la TM de películas a base de aislado de proteína de soja y de películas de GP. Registraron una mayor TM en las películas de GP que en las películas de aislado de proteína de soja (Adilah *et al.*, 2018). En otros estudio, el extracto de té verde aumenta ligeramente la resistencia a la tracción y el alargamiento al romperse las películas a base de quitosano (Siripatrawan y Harte, 2010), mientras que estas propiedades disminuyeron para las películas de agar y agar-gelatina (Giménez *et al.*, 2013). Las propiedades mecánicas de la película de quitosano no cambiaron significativamente cuando la concentración del extracto de té verde aumentó de 0 a 5 %, pero aumentó significativamente cuando la concentración del extracto cambió de 5 a 20 % (Siripatrawan y Harte, 2010). La mejora en las propiedades mecánicas de las películas que contienen extracto puede atribuirse a la interacción entre la matriz de quitosano y los compuestos polifenólicos del extracto de té verde.

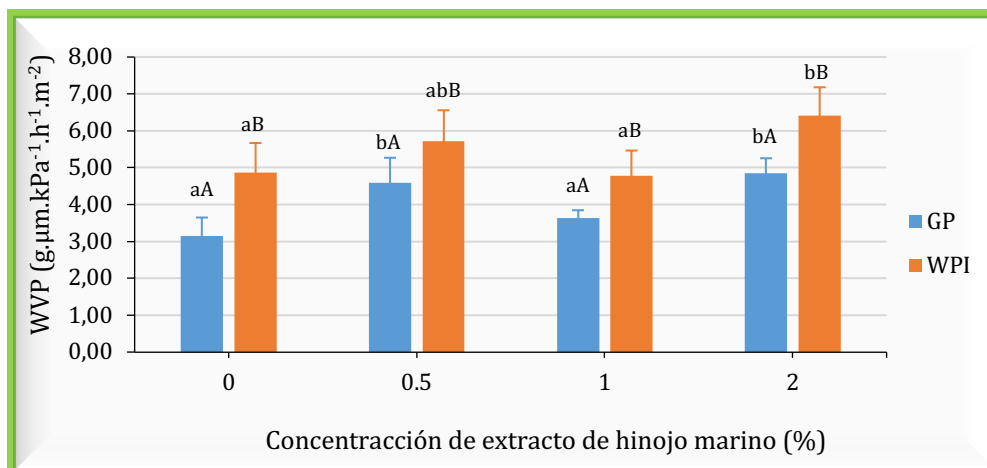
En resumen, existe una relación entre la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto de la planta y las propiedades mecánicas de las películas comestibles. La incorporación de extractos de fuentes vegetales en PRC representa un enfoque prometedor para el desarrollo de películas comestibles activas. Los extractos de plantas implican un impacto en las propiedades físicas y estructurales de las películas comestibles. Sin embargo, se han encontrado contribuciones clave de extractos de plantas en películas de biopolímeros que indican que podrían servir como aditivos naturales. Los extractos de plantas pueden proporcionar a las películas propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, dependiendo de su composición y las interacciones con la matriz polimérica.

#### 4.2.11. Permeabilidad al vapor de agua

En la Fig. 4.17 se representan los valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas comestibles a base de GP y WPI con y sin extracto de hinojo marino LIOF-75. El extracto de hinojo marino incidió en la tasa de WVP de las películas activas. Las películas de GP sin extracto, tuvieron una WVP de  $3.14 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , que fue significativamente más baja en comparación a las películas con el 0.5 % de extracto ( $4.60 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Sin embargo, la tasa de WVP de las películas con el 1 % de extracto ( $3.64 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) bajó a niveles semejante a las películas de GP sin extracto. En cambio, la tasa de WVP de las películas de GP con el 2 % de extracto ( $4.85 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) subió a un nivel parecido a la tasa de WVP de las películas de GP con el 0.5 % de extracto. Algo parecido, se presenció en los valores de WVP de las películas con WPI. Los valores de WVP de las películas sin extracto, con el 0.5 %; 1 % y 2 % de extracto fueron de: 4.88; 5.72; 4.79 y  $6.42 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ , respectivamente. A pesar, que no se pre-

senciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores de WVP de las distintas películas, se observa una tendencia al incremento de la tasa de permeabilidad.

Al comparar la tasa de WVP de películas de GP o WPI, se observó que la permeabilidad fue significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) en todas las películas de GP independientemente del contenido de extracto. Es probable que las películas de GP sean más compactas y más densa dejando menos espacios para migraciones. Además, al absorber más agua les hizo ser más permeables (Fig. 4.13). La tasa de WVP incrementó debido a la presencia de moléculas hidrosolubles en el extracto de hinojo marino (Romero *et al.*, 2013) potenciando la hidrofiliidad de las películas activas. Por lo que el extracto afectaría a las propiedades de barrera de estas películas. Contrastando con lo indicado por Cagri *et al.* (2001) que indican que las propiedades de barrera de las películas basadas en proteínas mejoran agregando compuestos de extractos vegetales.



**Figura 4.17.** Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles con y sin extracto de hinojo marino. Letras diferentes en minúscula (a, b) indican diferencias significativas respecto a la concentración de extracto. Letras diferentes en mayúscula (A, B) indican diferencias significativas respecto a la matriz polimérica. GP: gelatina de pescado. WPI: proteína de suero aislado de leche.

Adicionalmente, algunos estudios informan que los extractos de plantas no afectan la tasa de WVP de las películas comestibles activas. Así, Norajit *et al.* (2010) caracterizaron las propiedades físicas y mecánicas de películas comestibles a base de alginato con extracto de ginseng, informaron que el extracto no afectó significativamente la tasa de WVP de las películas activas ( $2.03 \pm 055 \cdot \text{g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) en comparación a las películas sin extracto ( $1.72 \pm 007 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). En otro trabajo, también reportaron un incremento no significativo de WVP para las películas de puré de manzana con extractos de plantas, debido a que los compuestos liposolubles de los extractos aportaron una mayor permeabilidad a las películas activas ( $5.25 \pm 033 \cdot \text{g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) en comparación al control ( $4.95 \pm 043 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) (Rojas-Graü *et al.*, 2007). Lo que es coherente con los resultados de este trabajo, que, a pesar de la tendencia al alza en la tasa de permeabilidad de todas las películas activas esta no fue significativa. Se puede indicar que la presencia de moléculas liposolubles en los extractos no permitió que este incremento sea desproporcionado. Como se ha podido observar, los valores expuestos en los diferentes trabajos publicados varían debido a las características de la matriz utilizada, Sin embargo, el propósito fue demostrar el efecto de los extractos vegetales sobre la WVP de las películas comestibles a base de GP y WPI.

#### 4.2.12. Capacidad antioxidante de las películas comestibles

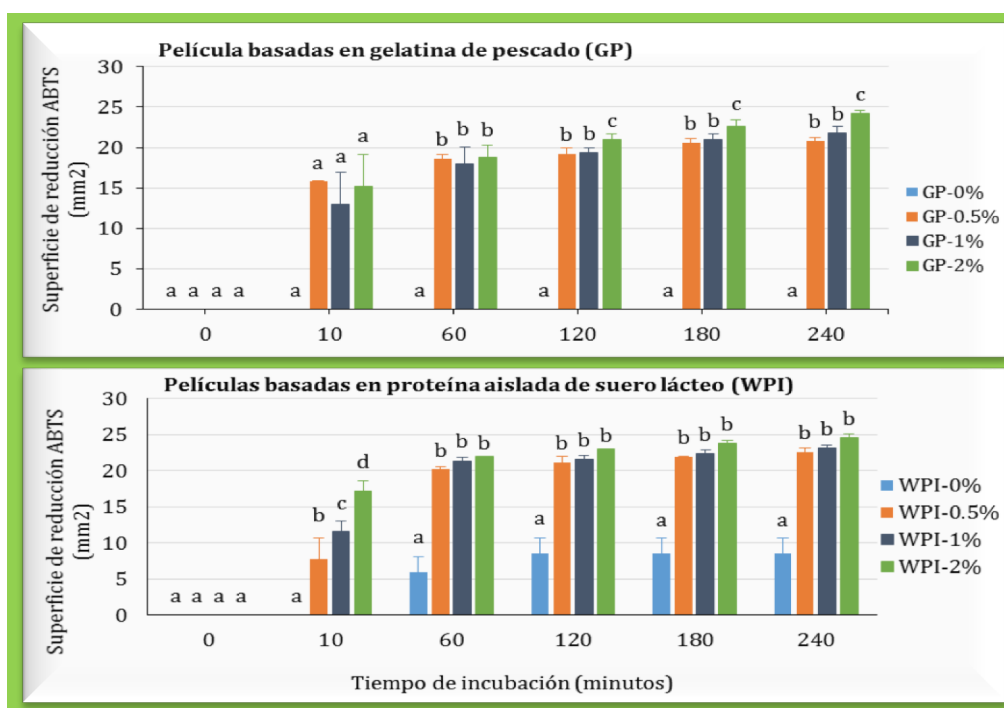
La capacidad antioxidante (CA) fue medida mediante la reducción causada sobre el ABTS que estaba inmovilizado en un gel. Esta reducción implicó un cambio de color (de azul a transparente). A mayor superficie transparente mayor difusión de compuestos antioxidantes de la película y por tanto mayor potencial antioxidante. En las Fig. 4.19 se representa la superficie de los halos transparentes

causados por la liberación de los compuestos antioxidantes de las películas activas. Debido a la difusión gradual de los compuestos antioxidantes, las mediciones de los halos fueron realizadas en la zona en la que el ABTS•+ estuvo totalmente reducido (zona transparente). Los tiempos de medida fueron establecidos en función de la velocidad de liberación de los antioxidantes contenidos en las películas activas (cada 60 minutos). En estos intervalos de tiempo se observaron cambios en el diámetro de los halos, producidos por la liberación de los compuestos antioxidantes, esta superficie calculada corresponde a la superficie reducida excluyendo la superficie del disco.

Se observó que el extracto de hinojo marino contenido en ambas películas reducía el ABTS•+ a medida que aumentaba la concentración. Esta reducción fue gradual hasta los 240 minutos. En las películas de GP, a los 10 min se observaron halos de reducción ABTS•+ con las películas que contenían el 0.5 %, 1 % y 2 % de extracto (entre 13 y 16 mm<sup>2</sup>, lo que corresponde a 0.09 y 0.11 μMoles de ABTS•+ reducido, respectivamente). La máxima reducción de ABTS•+ fue observada a los 240 min en las películas con el 2 % de extracto (24.2 mm<sup>2</sup> o 0.17 μMoles de ABTS•+ reducido), que fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a la reducción de ABTS•+ producida por la liberación de compuestos antioxidantes en las otras películas (< 22 mm<sup>2</sup>).

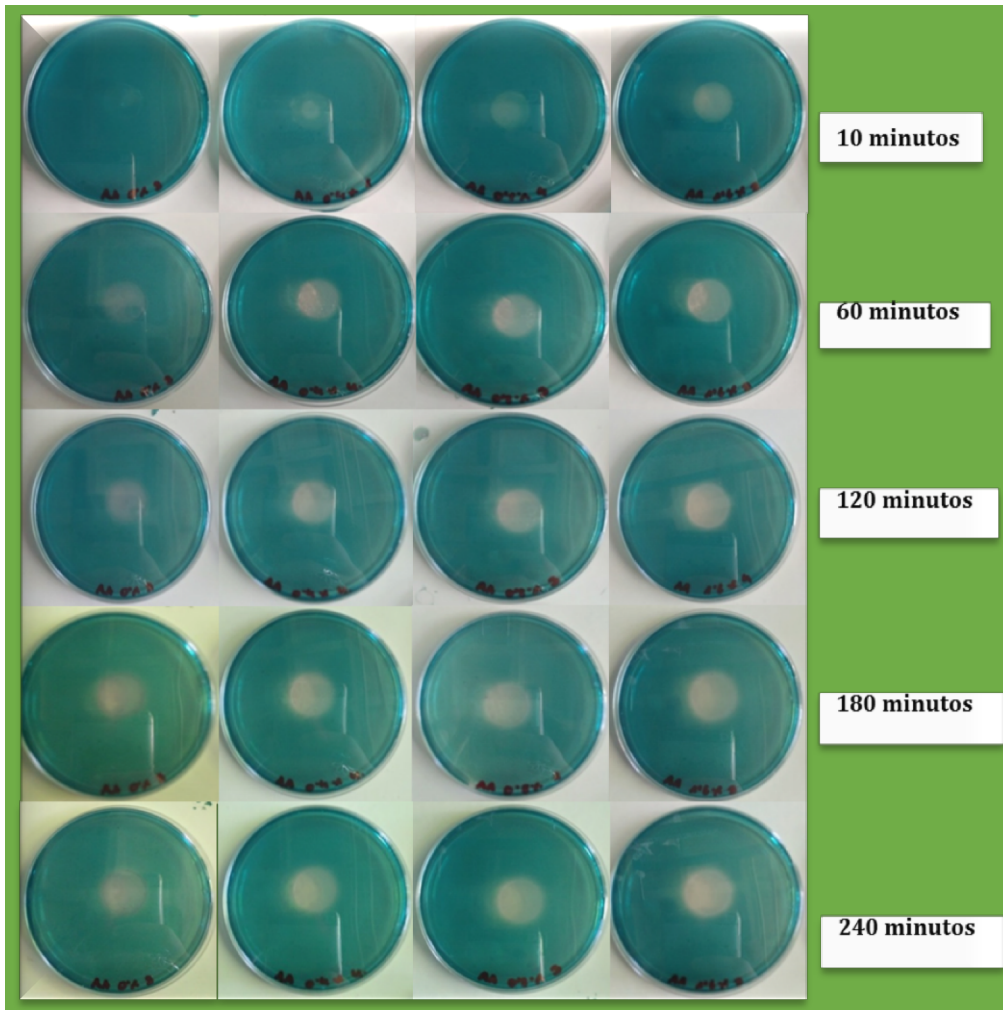
En las películas basadas en WPI, a diferencia de las películas basadas en GP, se observó que el control (sin extracto) presentaba CA (Fig. 4.20). Esto es posiblemente a que la proteína aislada posee aminoácidos aromáticos libres (Yen *et al.*, 2008; Aziz y Almasi, 2018; López-Hernández *et al.*, 2018) y probablemente la reacción de los radicales libres con el grupo de aminos libres se mantuvo para formar radicales estables de macromoléculas, provocando la reducción del ABTS•+. Sin embargo, esta CA fue significativamente menor en relación a la CA de las películas de WPI con las diferentes concentraciones de extracto (Fig. 4.18). En las películas activas con el 2 %, a los 10 min hubo un área de reducción de 17.20

mm<sup>2</sup> (0.12 μMoles de ABTS•+ reducido), que fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en relación a la reducción provocada por la liberación de compuestos antioxidantes en las otras películas activas con menores niveles de extracción (< 12 mm<sup>2</sup>). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las películas con diferente concentración de extracto a partir de 60 minutos. Se observó que el área de reducción se estabilizó a partir de los 60 min, manteniéndose entre el rango de 20.2 mm<sup>2</sup> (0.14 μMoles de ABTS•+ reducido) a 24.6 mm<sup>2</sup> (0.17 μMoles de ABTS•+ reducido). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre el material base de la película utilizada (GP y WPI), por lo que ambas películas tienen la capacidad de transportar y liberar agentes antioxidantes y/o antimicrobianos (Fernández-Pan *et al.*, 2012; Ganiari *et al.*, 2017).



**Figura 4.18.** Actividad antioxidante de las películas comestibles activas. Letras diferentes en minúscula (a, b, c) indican diferencias significativas entre tratamientos.





**Figura 4.19.** Actividad antioxidante de las películas comestibles activas basadas en proteína aislada de suero lácteo (WPI). De izquierda a derecha, concentraciones de extracto de hinojo marino: 0 %, 0.5 %, 1 % y 2%, incubadas durante 240 min.

A pesar de la capacidad antioxidante observada en las películas activas, la reducción del ABTS•+ es muy inferior a lo que reportó Urrutia (2010) que evaluó la capacidad antioxidante por el método de ABTS de las películas activas a base de zeína de maíz, enriquecidas con carvacrol y/o eugenol. Con las películas con carvacrol, reportó áreas de reducción de hasta 1547 mm<sup>2</sup> (12 μMoles de ABTS•+ reducido) en 240 min y con películas activas con eugenol hasta 2266 mm<sup>2</sup> (17 μMoles de ABTS•+ reducido) también en 240 min. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en su investigación fueron entre el 5 % y 20 % para ambos casos, muy superiores a las utilizadas en este trabajo. Además, Urrutia (2010) trabajó con carvacrol y eugenol, conocidos por su potente CA.

Otras investigaciones han reportado la utilización de altas concentraciones de extractos de plantas en la SFP para aportar CA. Así, Norajit *et al.*, (2010) utilizaron extracto de ginseng blanco, que entre sus componentes activos contiene al maltol (2.60 %), al ácido salicílico (0.12 %), al ácido vanílico ( 0.40 %) y al ácido *p*-cumárico (0.52 %); estos autores indican que al añadir 0.5 mg de extracto de ginseng por mL de SFP, se obtuvo entre 21 % y 33 % de inhibición del radical DPPH. Saberi *et al.* (2017) elaboraron películas activas a base de almidón de guisante y goma guar con extractos de varias plantas (galato de epigallocatequina, extracto de fruta de arándano, extracto de cáscara de macadamia y extracto de cáscara de banano) en concentraciones que variaron entre 0.75 mg mL<sup>-1</sup> y 3 mg mL<sup>-1</sup>. El porcentaje de inhibición dependió de la concentración empleada, llegando hasta el 40 % de inhibición del radical DPPH con la concentración de 3 mg mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2.13. Capacidad antimicrobiana de las películas comestibles**

Tal como se procedió en la descripción de los resultados de la capacidad antibacteriana en el capítulo III de esta tesis, las películas de GP y de WPI sin extracto de hinojo marino sirvieron como control para determinar el posible efecto

antibacteriano intrínseco de la misma. Como se esperaba, no se observó área de inhibición frente a las 4 bacterias ensayadas para las películas de gelatina sin extracto. Por lo tanto, las diferencias en el área de inhibición que se observaron para las películas que contenían extracto, se pudo atribuir solo al efecto que este agente antimicrobiano tuvo sobre cada cepa cuando se difunde en los medios inoculados.

Sin embargo y en contra de lo esperado, no se observó efecto antimicrobiano de las películas de GP o de WPI con las diferentes concentraciones de extracto frente a las cuatro bacterias ensayadas (Tabla 4.4). Posiblemente las bajas concentraciones de los posibles agentes antimicrobianos, no fueron lo suficientemente altas para inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas. Otros autores han informado sobre el efecto antibacteriano de varias películas activas, evaluando diferentes concentraciones de compuestos activos naturales. Así, Andrade *et al.* (2018) evaluaron películas comestibles activas basadas en WPI con el 3 % y 5 % extracto de romero. Las películas presentaron actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. A nivel *in vitro*, Proestos *et al.* (2005) observaron con las concentraciones mencionadas, efecto antibacteriano frente a los patógenos *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Por su parte, Bodini *et al.*, (2013) informaron sobre el efecto antibacteriano de películas comestibles basadas en gelatina incorporando extractos naturales (propóleo) en concentraciones de 0 a 200 g/100 g de gelatina. Estos autores reportaron, que la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* fue observada a partir de los 40 g/100 g de gelatina. Sin embargo, el efecto antibacteriano frente *S. aureus* por otras películas bioactivas es muy variable. Un estudio con películas comestibles a base de alginato enriquecidas con aceite de ajo (Pranoto *et al.*, 2005) mostró un efecto inhibitorio frente a esta bacteria con una concentración de 0.2 %. En cambio Seydim y Sarikus, (2006) reportaron para las películas de WPI con aceites esenciales de orégano y ajo, un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus*, a concentraciones entre el 2 % y 3 %, respectivamente. Con películas de proteína de soja, fue suficiente

una concentración de 1 % de aceite de orégano y tomillo para inhibir a *S. aureus*, y el aumento de la concentración de los aceites esenciales (2–5 %) incrementó significativamente el diámetro de inhibición (Emiroğlu *et al.*, 2010). Para las películas de quitosano enriquecidas con aceite de tomillo (1 %) inhibió *S. aureus* (Altiok *et al.*, 2010). Todos estos resultados, indicarían que el efecto inhibitorio del compuesto bioactivo también puede estar asociado, no solamente; a la concentración del compuesto activo agregado en la matriz de recubrimiento, sino también, con la macromolécula utilizada en la elaboración de las películas comestibles activas.

**Tabla 4.4.** Actividad antibacteriana de las películas comestibles a base de GP y de WPI.

Microorganismos	Carac. Princ.	Extracto 0 %	Extracto 0.5 %	Extracto 1 %	Extracto 2 %
<i>Listeria innocua</i>	Gram +	NA	NA	NA	NA
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gram -	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gram -	NA	NA	NA	NA
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Gram -	NA	NA	NA	NA

NA: No hay actividad.

Como ya se ha indicado, no existe bibliografía sobre la adición de extractos de hinojo marino en películas comestibles antimicrobiana. Pero sí existen artículos que han informado sobre ensayos a nivel *in vitro*, sobre la capacidad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales del hinojo marino, por lo que se esperaba cierta actividad antibacteriana. Entre los trabajos, el de Nabet *et al.* (2017) y el de Jallali *et al.* (2014) que reportaron de la actividad antimicrobiana de los compuestos presentes en el aceite esencial del *C. maritimum* extraída por el método

de hidrodestilación. Estos autores, informaron que el aceite esencial del *C. maritimum* exhibió actividad antimicrobiana frente a todos los patógenos analizados. *Cyida albicans* fue la cepa más sensible, seguida de *S. aureus*, *L. innocua* y *E. coli*. Concluyeron que la fuerte actividad antimicrobiana del aceite esencial de *C. maritimum*, probablemente esté relacionada con sus principales compuestos (timol metil éter = 33.65 %,  $\gamma$ -terpineno = 50.48 % y *p*-cimeno = 12.57 %). De hecho, se considera que los componentes fenólicos (timol y carvacrol) y sus precursores (*p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno) presentes en el aceite esencial son antifúngicos. También demostraron que el  $\gamma$ -terpineno ejerce un efecto bactericida contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Estos efectos están relacionados con la capacidad de estas moléculas para romper las membranas celulares. Houta *et al.*, (2011) informaron de la actividad del aceite esencial de *C. maritimum*, contra una levadura y siete cepas bacterianas asociadas al deterioro de alimentos. Dichos autores, indicaron que el aceite esencial de semillas provocó una zona media de inhibición del crecimiento antimicrobiano de 18 mm<sup>2</sup> en el medio de difusión frente a *S. aureo*. Esta actividad antibacteriana se debe a la presencia de compuestos activos y podría atribuirse a la presencia de monoterpenos como el *p*-cimeno (22,08 %), que también posee una actividad antibacteriana y la presencia de timol y carvacrol. Meot-Duros *et al.* (2008, 2010) también realizaron un análisis de la actividad antimicrobiana de *C. maritimum*. Informaron que su fracción apolar era activa frente a *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*. Después aislaron e identificaron un compuesto presente en los extractos (el faltarindiol), pero no presentó la misma actividad frente a las bacterias ensayadas.

De acuerdo a toda la literatura revisada, los extractos de hinojo marino contienen compuestos activos con capacidad antimicrobiana y su eficacia ha sido demostrada. Sin embargo, en este trabajo no se observó actividad antimicrobiana de las películas comestibles incorporando los extractos de hinojo marino frente a

las bacterias ensayadas. La posible causa, se deba a que la concentración de compuesto activo incorporado en la SFP de película fue relativamente baja, en comparación a lo reportado en la bibliografía científica.

## Conclusiones

---

Las plantas de hinojo marino liofilizadas conservaron en mayor grado sus características como apariencia y coloración y una variedad de compuestos fenólicos volátiles, destacando la presencia de ésteres (carvacrol metil éter y timol metil éter), bencenos (apiol, *p*-cymene), terpenos ( $\gamma$ -terpineno, el sabineno,  $\beta$ -cis-Ocimeno, limoneno). La extracción LIOF-75 resultó tener la mayor concentración de polifenoles y la más alta capacidad antioxidante debido a la presencia de compuestos activos. La incorporación de los extractos de hinojo marino afectó a la estabilidad de la SFP a base de proteína aislada de suero lácteo (WPI), pero no así de la SFP base de gelatina de pescado (GP). En cuanto a las propiedades de las películas comestibles, los extractos aumentaron el carácter hidrófilo de ambas películas. Con respecto a las propiedades mecánicas, la adición del extracto disminuyó la TM y el MY, pero incrementaron la ER. Además, los extractos afectaron la WVP de las películas, pero no de manera significativa. Con respecto a la capacidad antioxidante, la liberación de compuestos activos fue más rápida en las películas de GP. No se observó capacidad antibacteriana frente a las bacterias ensayadas, posiblemente a las bajas concentraciones utilizadas en las películas comestibles. De acuerdo a los resultados observados, y dado al efecto considerable de los extractos de hinojo marino sobre la SFP a base de WPI, las películas comestibles basadas en GP; serían más adecuadas que las basadas en WPI para ser utilizadas como matriz de recubrimiento incorporando extracto de hinojo marino.

## Referencias

---

- Adams, R.P. (2007). Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18**, 803–806.
- Adilah, A.N., Jamilah, B., Noranizan, M.A. & Hanani, Z.A.N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, **16**, 1–7.
- Altiok, D., Altiok, E. & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **21**, 2227–2236.
- Andrade, M.A., Ribeiro-Santos, R., Costa Bonito, M.C., Saraiva, M. & Sanches-Silva, A. (2018). Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. *LWT*, **92**, 497–508.
- ASTM. (2000). *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. Philadelphia, PA: ASTM 2000: Annual Book of ASTM Standards.
- Atia, A., Barhoumi, Z., Mokded, R., Abdelly, C. & Smaoui, A. (2011). Environmental eco-physiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 3564–3571.
- Aziz, S.G.G. & Almasi, H. (2018). Physical Characteristics, Release Properties, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Extract-Loaded Nanoliposomes. *Food and Bioprocess Technology*, 1–14.
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R. & Reyes, J.E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, **110**, 232–239.
- Benbassat, N., Yoncheva, K., Hadjimitova, V., Hristova, N., Konstantinov, S. & Lambov, N. (2014). Influence of the extraction solvent on antioxidant activity of *Althaea officinalis* L. root extracts. *Central European Journal of Biology*, **9**, 182–188.
- Bhat, R. & Karim, A.A. (2014). Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. *Journal of Food Science and Technology*, **51**, 1326–1333.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M.R. & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the*

- Science of Food and Agriculture*, **95**, 204–209.
- Bodini, R.B., Sobral, P.J.A., Favaro-Trindade, C.S. & Carvalho, R.A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, **51**, 104–110.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, **28**, 25–30.
- Cagri, A., Ustunol, Z. & Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *Journal of Food Science*, **66**, 865–870.
- Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Rovira, J. & Maté, J.I. (2018). Effect of Antimicrobial Edible Coatings and Modified Atmosphere Packaging on the Microbiological Quality of Cold Stored Hake (*Merluccius merluccius*) Fillets. *Journal of Food Quality*, 1–12.
- Ciccarelli, D., Picciarelli, P., Bedini, G. & Sorce, C. (2016). Mediterranean sea cliff plants: Morphological and physiological responses to environmental conditions. *Journal of Plant Ecology*, **9**, 153–164.
- Emiroğlu, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K. & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, **86**, 283–288.
- Erbay, Z. & Icier, F. (2009). Optimization of drying of olive leaves in a pilot-scale heat pump dryer. *Drying Technology*, **27**, 416–427.
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. & la Caba, K. de. (2017a). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, **68**, 192–198.
- Etxabide, A., Urdanpilleta, M., Gómez-Arriaran, I., la Caba, K. de & Guerrero, P. (2017b). Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films. *Reactive and Functional Polymers*, **117**, 140–146.
- Fakhreddin Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M. & Ghavi, F.F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, **136**, 1490–1495.
- Fernández-Pan, I., Mendoza, M. & Maté, J.I. (2013). Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93**, 2986–2994.
- 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**, M383-90.
- Gallardo, C., Jiménez, L. & García-Conesa, M.-T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry*, **99**, 455–463.
- Ganiari, S., Choulitoudi, E. & Oreopoulou, V. (2017). Edible and active films and



- coatings as carriers of natural antioxidants for lipid food. *Trends in Food Science and Technology*.
- Generalić Mekinić, I., Blažević, I., Mudnić, I., Burčul, F., Grga, M., Skroza, D., Jerčić, I., Ljubenković, I., Boban, M., Miloš, M. & Katalinić, V. (2016). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 3104–3112.
- Generalić Mekinić, I., Šimat, V., Ljubenković, I., Burčul, F., Grga, M., Mihajlovski, M., Lončar, R., Katalinić, V. & Skroza, D. (2018). Influence of the vegetation period on sea fennel, *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae), phenolic composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, **124**, 947–953.
- George, S.D. St. & Cenkowski, S. (2009). Modeling of thin-layer drying on an inert sphere. *Drying Technology*, **27**, 770–781.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E. & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, **30**, 264–271.
- Giungato, P., Renna, M., Rana, R., Licen, S. & Barbieri, P. (2019). Characterization of dried and freeze-dried sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) samples with headspace gas-chromatography/mass spectrometry and evaluation of an electronic nose discrimination potential. *Food Research International*, **115**, 65–72.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1461–1469.
- Gómez-Estaca, J., López De Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E. & Montero, P. (2009). Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **18**, 46–52.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985–990.
- 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**, 1459–1466.
- Houta, O., Akrou, A., Neffati, M. & Amri, H. (2011). Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of *Crithmum maritimum* Cultivated in Tunisia Arid Zones. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, **1**, 138–143.
- Jallali, I., Megdiche, W., M’Hamdi, B., Oueslati, S., Smaoui, A., Abdelly, C. & Ksouri, R. (2012). Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. With physiological stage and

- extraction method. *Acta Physiologiae Plantarum*, **34**, 1451–1459.
- Jallali, I., Zaouali, Y., Missaoui, I., Smeoui, A., Abdelly, C. & Ksouri, R. (2014). Variability of antioxidant and antibacterial effects of essential oils and acetic extracts of two edible halophytes: *Crithmum maritimum* L. and *Inula crithmoides* L. *Food Chemistry*, **145**, 1031–1038.
- Jiang, T., Mao, Y., Sui, L., Yang, N., Li, S., Zhu, Z., Wang, C., Yin, S., He, J. & He, Y. (2019). Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. *Food Chemistry*, **274**, 460–470.
- Ko, S., Janes, M.E., Hettiarachchy, N.S. & Johnson, M.G. (2001). Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, **66**, 1006–1011.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A. & Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, **20**, 53–60.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K.P.K.P. & Biliaderis, C.G.C.G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, **22**, 373–386.
- Le, T., Maki, H., Takahashi, K., Okazaki, E. & Osako, K. (2015). Properties of Gelatin Film from Horse Mackerel (*Trachurus japonicus*) Scale. *Journal of Food Science*, **80**, E734–E741.
- Li, J.-H., Miao, J., Wu, J.-L., Chen, S.-F. & Zhang, Q.-Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, **37**, 166–173.
- Li, Y., Jiang, Y., Liu, F., Ren, F., Zhao, G. & Leng, X. (2011). Fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, **25**, 1098–1104.
- Liu, F., Saricaoglu, F.T., Avena-Bustillos, R.J., Bridges, D.F., Takeoka, G.R., Wu, V.C.H., Chiou, B.-S., Wood, D.F., McHugh, T.H. & Zhong, F. (2018). Antimicrobial Carvacrol in Solution Blow-Spun Fish-Skin Gelatin Nanofibers. *Journal of Food Science*, **83**, 984–991.
- López-Hernández, L.H., Calderón-Oliver, M., Soriano-Santos, J., Severiano-Pérez, P., Escalona-Buendía, H.B. & Ponce-Alquicira, E. (2018). Development and antioxidant stability of edible films supplemented with a tamarind seed extract | Desarrollo y estabilidad antioxidante de películas comestibles agregadas con un extracto de semillas de tamarindo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **17**, 975–987.
- Maleš, Ž., Žuntar, I., Nigović, B., Plazibat, M. & Vundać, V.B. (2003). Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire - *Crithmum maritimum* L. *Acta Pharmaceutica*, **53**, 139–144.

- Marpaung, A.M., Andarwulan, N., Hariyadi, P. & Nur Faridah, D. (2017). The colour degradation of anthocyanin-rich extract from butterfly pea ( *Clitoria ternatea* L.) petal in various solvents at pH 7. *Natural Product Research*, **31**, 2273–2280.
- Mathew, S., Brahmakumar, M. & Abraham, T.E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. *Biopolymers*, **82**, 176–187.
- Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Meur, C. Le, Floch, G. Le & Magné, C. (2010). New antibacterial and cytotoxic activities of faltarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 553–557.
- Meot-Duros, L., Floch, G. Le & Magné, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 258–262.
- Mir, S.A., Dar, B.N., Wani, A.A. & Shah, M.A. (2018). Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. *Trends in Food Science & Technology*, **80**, 141–154.
- Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, Á.A., Madani, K. & Larbat, R. (2017). Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *International Journal of Food Properties*, **20**, 1843–1855.
- Norajit, K., Kim, K.M. & Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, **98**, 377–384.
- Nouri, L. & Mohammadi Nafchi, A. (2014). Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, **66**, 254–259.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A. & Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, **62**, 139–148.
- Pereira, C.G., Barreira, L., Rosa Neng, N. da, Nogueira, J.M.F., Marques, C., Santos, T.F., Varela, J. & 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. *Food and Chemical Toxicology*, **107**, 581–589.
- Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2015). Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Research International*, **74**, 315–323.

- Pezeshk, S., Ojagh, S.M. & Alishahi, A. (2015). Effect of plant antioxidant and antimicrobial compounds on the shelf-life of seafood - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, **33**, 195–203.
- Pistelli, L.L., Noccioli, C., D'Angiolillo, F. & Pistelli, L.L. (2013). Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from tuscan islands. *Acta Biochimica Polonica*, **60**, 43–50.
- Pranoto, Y., Salokhe, V.M. & Rakshit, S.K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, **38**, 267–272.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E. & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1190–1195.
- Quinn, G., Monahan, F.J., O'Riordan, E.D., O'Sullivan, M. & Longares, A. (2003). Role of Covalent and Noncovalent Interactions in the Formation of Films from Unheated Whey. *Journal of Food Science*, **68**.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, **62**, 373–380.
- Raja, S.A., Ashraf, M., Anjum, A.A. & Javeed, A. (2016). Evaluation of anti-bacterial activity, GC/MS analysis and genotoxic potential of *Carum copticum* essential oil fractions against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Animal and Plant Sciences*, **26**.
- Ramos, Ó.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 533–552.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231–1237.
- 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**, 205–216.
- Rodrigues, M.J., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A.P., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L. & 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.
- Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z. & McHugh, T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, **81**, 634–

641.

- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, **20**, 438–447.
- 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**, 944–952.
- Rooney, M.L. (1995). Overview of active food packaging BT - Active Food Packaging. In: (edited by M.L. Rooney). Pp. 1–37. Boston, MA: Springer US.
- Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. & Vieira, M.C. (2013). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, **115**, 466–474.
- Saberi, B., Vuong, Q. V., Chockchaisawasdee, S., Golding, J.B., Scarlett, C.J. & Stathopoulos, C.E. (2017). Physical, Barrier, and Antioxidant Properties of Pea Starch-Guar Gum Biocomposite Edible Films by Incorporation of Natural Plant Extracts. *Food and Bioprocess Technology*, **10**, 2240–2250.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J.E., Regalado, C., Sanjuás Rey, M., Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J.E. & Regalado, C. (2014). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. *TheScientificWorldJournal*, **2014**, 248935.
- Sebti, I., Ripoche Carnet, A., Blanc, D., Saurel, R. & Coma, V. (2003). Controlled diffusion of an antimicrobial peptide from a biopolymer film. *Chemical Engineering Research and Design*, **81**, 1099–1104.
- Seydim, A.C. & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, **39**, 639–644.
- Shaw, N.B., Monahan, F.J., O’Riordan, E.D. & O’Sullivan, M. (2002). Physical Properties of WPI Films Plasticized with Glycerol, Xylitol, or Sorbitol. *Journal of Food Science*, **67**, 164–167.
- Siripatrawan, U. & Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, **24**, 770–775.
- Siripatrawan, U. & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, **27**, 102–108.
- Sui Chin, S., Han Lyn, F. & Nur Hanani, Z.A. (2017). Effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel on the physical and functional properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, **12**, 128–134.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice

- compounds in food. *Food Control*, **21**, 1199–1218.
- Talón, E., Trifkovic, K.T., Nedovic, V.A., Bugarski, B.M., Vargas, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2017). Antioxidant edible films based on chitosan and starch containing polyphenols from thyme extracts. *Carbohydrate Polymers*, **157**, 1153–1161.
- Tien, C. Le, Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M.A., Delmas-Patterson, G., Yu, H.L. & Lacroix, M. (2000). Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5566–5575.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T., Pisuchpen, S. & Osako, K. (2016). Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. *Food Hydrocolloids*, **56**, 93–107.
- Torres-León, C., Vicente, A.A., Flores-López, M.L., Rojas, R., Serna-Cock, L., Alvarez-Pérez, O.B. & Aguilar, C.N. (2018). Edible films and coatings based on mango (var. Ataulfo) by-products to improve gas transfer rate of peach. *LWT*, **97**, 624–631.
- Urrutia, R. (2010). *Estudio de la actividad antioxidante de films comestibles basados en zeína de maíz. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Pública de Navarra.*
- Wray, D. & Ramaswamy, H.S. (2015). Novel Concepts in Microwave Drying of Foods. *Drying Technology*, **33**, 769–783.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H. & Mau, J.-L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, **74**, 840–844.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, **65**, 340–345.



## **CONCLUSIONES FINALES**

---





## Conclusiones finales

---

Durante los últimos años, se han realizado muchos estudios de investigación con el objetivo de desarrollar nuevas películas y recubrimientos comestibles (PRC) que contengan agentes antimicrobianos con actividad frente a diferentes patógenos transmitidos por los alimentos. La actividad antimicrobiana de las películas comestibles se ha evaluado ampliamente utilizando ensayos *in vitro*, posteriormente se han aplicado en sistemas alimentarios con el objeto de extender su vida útil.

En el capítulo 2, concluimos que una reducción de la carga microbiana por sí misma tuvo un efecto limitado en la evolución de la calidad microbiana (mayores cantidades de UFC g<sup>-1</sup>), aunque fue muy efectiva en el grupo de las bacterias ácido lácticas. Además, se demostró que la efectividad de los recubrimientos comestibles antimicrobianos fue mucho mayor cuando la superficie del pescado tenía una carga microbiana inicial muy baja, lo que implicó un efecto sinérgico entre el tratamiento con hipoclorito de sodio y el tratamiento con un recubrimiento antimicrobiano. Se puede concluir que, para asegurar un aumento en la vida comercial del pescado fresco a través de recubrimientos comestibles antimicrobianos, el pescado debe ser manejado higiénicamente antes del tratamiento y/o debe ser sometido a un proceso de desinfección superficial. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los efectos antimicrobianos de los recubrimientos comestibles con aceite esencial de orégano (AEO) o carvacrol en las mismas concentraciones, lo que demuestra que el posible efecto sinérgico de los otros componentes del AEO no tuvo un impacto significativo.

De los ensayos descritos en el capítulo 3, podemos concluir que, la incorporación de etil louroil arginato (LAE) en las películas comestibles a base de gelatina de pescado (GP), afectó a sus características físicas y mecánicas y les atribuyó

propiedades antimicrobianas. El pH y la tensión superficial de la solución formadora de película (SFP) disminuyeron a medida que se incrementó la concentración del LAE. La SFP tuvo una apariencia muy transparente y homogénea, al igual que las películas elaboradas con ella. El contenido de humedad de las películas con LAE se incrementó por el aumento de la hidrofiliidad, aumentando también la solubilidad de las películas comestibles. El agente antimicrobiano no afectó la permeabilidad al vapor de agua, pero sí a las propiedades mecánicas, aumentando la tensión máxima y la elongación relativa de las películas comestibles, lo que resultó en mejores propiedades mecánicas. Finalmente, la presencia de LAE implicó impartir propiedades antimicrobianas a las películas con un efecto más pronunciado frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las bacterias Gram-negativas.

Por último, del capítulo 4 podemos concluir que las plantas de hinojo marino liofilizadas conservaron en mayor grado sus características químicas con una mayor concentración de compuestos fenólicos volátiles. La extracción con etanol al 75 % resultó tener mayor concentración de polifenoles y más alta capacidad antioxidante debido a la presencia de compuestos activos. La incorporación de los extractos de hinojo marino afectó a la estabilidad de la SFP a base de WPI, pero no así de la SFP base de GP. En cuanto a las propiedades de las películas comestibles, los extractos aumentaron el carácter hidrófilo de ambas películas. Con respecto a las propiedades mecánicas, la adición del extracto disminuyó la tensión máxima y el módulo de Young, pero incrementaron la elongación de rotura. Además, los extractos afectaron la permeabilidad al vapor de agua de las películas, pero no de manera significativa. Con respecto a la capacidad antioxidante, la liberación de compuestos activos fue más rápida en las películas de GP. No se observó capacidad antibacteriana frente a las bacterias ensayadas, debido posiblemente a las bajas concentraciones utilizadas en las películas comestibles. De acuerdo a los resultados observados, y dado al efecto considerable de los extractos de hinojo marino

sobre la SFP a base de WPI, las películas comestibles basadas en GP serían más adecuadas que las basadas en WPI para ser utilizadas como matriz de recubrimiento incorporando extracto de hinojo marino.

Las PRC antimicrobianos representan una tecnología innovadora efectiva para mejorar la calidad microbiológica del pescado fresco, al tiempo que prolongan la vida útil y garantizan la seguridad de los productos al inhibir el crecimiento de los microorganismos y los patógenos transmitidos por los alimentos. Si bien las PRC antimicrobianos ofrecen muchas ventajas, no pueden reemplazar las buenas prácticas de higiene y manejo y los sistemas actuales de conservación de productos frescos, pero su uso en conjunto con otros medios de procesamiento que se utilizan actualmente en las industrias alimentaria (MAP y refrigeración) ofrece nuevas oportunidades y desafía tanto a los científicos como a los fabricantes para satisfacer las demandas de los consumidores de productos mínimamente procesados.