



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**
***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA BIOZIENTZIE-
TAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

Extracción de compuestos bioactivos del cangrejo
Liocarcinus Depurator

presentado por

Nerea Sarasa Gil (e)k

aurkeztua

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS
GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN

Mayo, 2023 / *Maiatza*,, 2023

RESUMEN

Ante una creciente falta de recursos, el presente trabajo pretende valorizar el cangrejo *Liocarcinus depurator*, que es una especie común en los descartes de pesca del mediterráneo, para su uso en alimentación, disminuyendo el desperdicio alimentario que suponen estos descartes. Para ello, se extraen compuestos bioactivos empleando como solvente etanol al 75%, aunque además se tendrán en cuenta también los resultados obtenidos con etanol al 50% y con agua.

Se estudiaron por separado las vísceras del cangrejo, las patas y pinzas, el caparazón y el cangrejo entero, determinando la capacidad antioxidante y antimicrobiana de cada una de ellas. En primer lugar, se llevó a cabo la extracción de compuestos activos mediante ultrasonidos, utilizando etanol a diferentes concentraciones como solvente. La capacidad antioxidante fue determinada mediante el método DPPH y, además, se estudió el contenido en polifenoles de las muestras mediante el método Folin-Ciocalteu. Por otra parte, la capacidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en disco, estudiando la inhibición contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* y *Listeria innocua*.

Los resultados indican que los extractos de vísceras presentan, no sólo un mayor rendimiento de extracción, sino también una mayor capacidad antioxidante y mayor cantidad de compuestos fenólicos en base a su extracto seco. Por otro lado, se determinó que a una concentración de 100 mg/ml, los extractos de cangrejo no poseen capacidad antimicrobiana contra ninguna de las bacterias estudiadas.

Al comparar los resultados con el resto de los solventes, se observó un mayor rendimiento de extracción y una misma capacidad antioxidante al utilizar etanol al 50%, por lo que este solvente podría considerarse una mejor opción.

Palabras clave: extracción, cangrejo, capacidad antioxidante, capacidad antimicrobiana.

ABSTRACT

Faced with a growing lack of resources, this work aims to valorise the crab *Liocarcinus depurator*, which is a common species in Mediterranean fishing discards, for its use in food, reducing the food waste that these discards represent. To this end, bioactive compounds are extracted using 75% ethanol as a solvent, although the results obtained with 50% ethanol and water will also be taken into account.

Crab viscera, legs and claws, shell and whole crab were studied separately, determining the antioxidant and antimicrobial capacity of each one of them. First, the extraction of active compounds was carried out by ultrasound, using ethanol at different concentrations as solvent. The antioxidant capacity was determined using the DPPH method and, in addition, the polyphenol content of the samples was studied using the Folin-Ciocalteu method. On the other hand, the antimicrobial capacity was determined by the disc diffusion method, studying the inhibition against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* and *Listeria innocua*.

The results indicate that the viscera extracts show not only a higher extraction yield, but also a higher antioxidant capacity and a higher amount of phenolic compounds on a dry extract basis. On the other hand, it was determined that at a concentration of 100 mg/ml, crab extracts do not possess antimicrobial capacity against any of the bacteria studied.

When comparing the results with the rest of the solvents, a higher extraction yield and the same antioxidant capacity was observed when using 50% ethanol, so this solvent could be considered a better option.

Keywords: extraction, crab, antioxidant capacity, antimicrobial capacity.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	6
1.1	Descartes de pesca	6
1.2	<i>Liocarcinus depurator</i>	7
1.3	Extracción mediante ultrasonidos.....	8
1.4	Sustancias antioxidantes	9
1.5	Sustancias antimicrobianas	9
1.6	Posibles aplicaciones	10
2.	OBJETIVOS	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1	MATERIALES EMPLEADOS	12
3.1.1	Materias primas	12
3.1.2	Materiales y equipos.....	13
3.2	MÉTODOS	15
3.2.1	Procesamiento de cangrejos	16
3.2.2	Extracción asistida por ultrasonidos.....	17
3.2.3	Eliminación de solventes.....	17
3.2.4	Estudio de propiedades antioxidantes	20
3.2.5	Estudio de actividad antimicrobiana	22
3.2.6	Análisis estadístico	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1	EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS.....	25
4.1.1	Rendimiento de extracción con etanol 75%	25
4.1.2	Comparación de extracciones con otros solventes	26
4.2	DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES	27
4.2.1	Método Folin-Ciocalteu	27
4.2.2	Método DPPH	29
4.2.3	Comparación de capacidad antioxidante con otros solventes	32
4.3	DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIMICROBIANA	35
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	35
4.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.3.3	<i>Pseudomonas fragi</i>	39
4.3.4	<i>Listeria innocua</i>	40
5.	CONCLUSIONES	42
	BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descartes registrados por área estadística de la FAO.	8
Figura 2. Imagen de la especie <i>Liocarcinus depurator</i>	8
Figura 3. Ciclos de compresión y expansión, formación de burbujas de cavitación.....	9
Figura 4. Fracción de vísceras.....	13
Figura 5. Fracción de patas y pinzas	13
Figura 6. Fracción de caparazón	13
Figura 7. Cangrejo entero.....	13
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso experimental	16
Figura 9. Diagrama de flujo de la obtención de fracciones.....	17
Figura 10. Botellas pírex con muestras de cangrejo entero y disolvente.	18
Figura 11. Equipo de rotavapor.....	19
Figura 12. Extracto concentrado en el rotavapor.	19
Figura 13. Extracción de vísceras	19
Figura 14. Extracción de patas y pinzas.....	19
Figura 15. Extracción de caparazón	19
Figura 16. Extracción de cangrejo entero.....	19
Figura 17. Liófilo de vísceras.....	20
Figura 18. Liófilo de patas y pinzas	20
Figura 19. Liófilo de caparazón	20
Figura 20. Liófilo de cangrejo entero.....	20
Figura 21. Separación de sobrenadante por centrifugación.	21
Figura 22. Microplaca con muestras y reactivos.....	22
Figura 23. Microplaca con muestras y reactivos.....	22
Figura 24. Campana de flujo laminar.....	23
Figura 25. Césped de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. fragi</i> , <i>L. innocua</i> , respectivamente.	24
Figura 26. Rendimientos de extracción de cada fracción con etanol 75%.....	26
Figura 27. Rendimientos de extracción en función del solvente utilizado.....	27
Figura 28. Recta patrón para el método Folin.....	28
Figura 29. Concentración de ácido gálico según el volumen de extracto.	29
Figura 30. Concentración de ácido gálico según el extracto seco de cada muestra.	29
Figura 31. Recta patrón para el método DPPH.	30
Figura 32. Capacidad antioxidante por DPPH según el volumen de extracto.....	31
Figura 33. Capacidad antioxidante por DPPH según el extracto seco.	31
Figura 34. Cantidad de polifenoles mediante Folin según el solvente (en base a volumen).....	33
Figura 35. Cantidad de polifenoles mediante Folin según el solvente (en extracto seco).....	33

Figura 36. Capacidad antioxidante mediante DPPH, según el solvente (en base a volumen) ...	34
Figura 37. Capacidad antioxidante mediante DPPH, según el solvente (en extracto seco)	35
Figura 38. Placas para el recuento de bacterias <i>S. aureus</i>	36
Figura 39. Muestras de vísceras (1,2,3) y patas (4) en siembra de <i>E.coli</i>	37
Figura 40. Inhibición de patas en prueba 2.	37
Figura 41. Muestra de caparazón en prueba 1.....	38
Figura 42. Muestra de caparazón en prueba 1.....	38
Figura 43. Inhibición de caparazón en prueba 3	38
Figura 44. Muestras de patas (5,6) y de caparazón (7,8) en siembra de <i>S.aureus</i>	38
Figura 45. Inhibición de vísceras en prueba 3.....	39
Figura 46. Inhibición de patas en prueba 2	39
Figura 47. Discos con muestras de patas desplazados.	39
Figura 48. Inhibición de vísceras en <i>P.fragi</i>	40
Figura 49. Inhibición de patas en <i>P.fragi</i>	40
Figura 50. Inhibición de caparazón en <i>P.fragi</i>	40
Figura 51. Inhibición de entero en <i>P.fragi</i>	40
Figura 52. Halos de inhibición de caparazón (izq) y entero (dcha) en <i>E. coli</i>	41
Figura 53. Inhibición de vísceras en <i>L.innocua</i>	41
Figura 54. Inhibición de patas en <i>L.innocua</i>	41
Figura 55. Inhibición de caparazón en <i>L.innocua</i>	41
Figura 56. Inhibición de entero en <i>L.innocua</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo para cada cepa bacteriana	16
Tabla 2. Temperatura de incubación de cada cepa bacteriana	24
Tabla 3. Humedad,y cenizas de cada fracción	25
Tabla 4. Porcentaje de muestras con inhibición contra <i>E.coli</i> (%).	34
Tabla 5. Porcentaje de muestras con inhibición contra <i>S.aureus</i> (%).	35
Tabla 6. Porcentaje de muestras con inhibición contra <i>P.fragi</i> (%).	37
Tabla 7. Porcentaje de muestras con inhibición contra <i>L.innocua</i> (%).	37

1. INTRODUCCIÓN

En un contexto de sobrepoblación y falta de recursos, la FAO estima que se deberán producir un 70% más de alimentos para los 2300 millones de personas adicionales de aquí a 2050 (Northoff, 2009). La forma actual de producción genera una gran cantidad de subproductos que no se aprovechan para la alimentación humana pero que pueden llegar a tener efectos beneficiosos para nuestra salud, por lo que el aprovechamiento de estos desperdicios puede ser una buena fuente de alimentación.

1.1 Descartes de pesca

Según la FAO, un descarte o captura descartada es la porción de la captura, que es desaprovechada o vertida en el mar por cualquier razón, aunque normalmente es económica (Kelleher, 2008). El precio del pescado varía según sus características, además, existen normativas como el Real Decreto 560/1995, de 7 de abril, por el que se establece las tallas mínimas de determinadas especies pesqueras, impidiendo retener a bordo especies con dimensiones inferiores a las establecidas y otras normativas que establecen un total admisible de capturas. Todo ello provoca que se desechen gran parte de las especies pescadas.

Por otra parte, se debe prestar atención a la captura accidental de especies (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021), ya que a menudo caen en las redes de pesca especies que no tienen valor económico en el mercado pero que pueden tener un gran interés tecnológico y funcional.

España es uno de los países pesqueros más importante de la Unión Europea, por lo que también produce gran cantidad de desechos en este sector. Según un estudio realizado por la Universidad Politécnica de Valencia, en el Golfo de Valencia solo se comercializan entre el 2,7 y el 8 % del total de especies capturadas, mientras que el resto son descartadas (El Aoussimi, 2021).

Para poder tener una idea representativa de la cantidad de descartes generados a nivel global, en la *Figura 1* se puede observar la suma de los descartes registrados por la FAO.

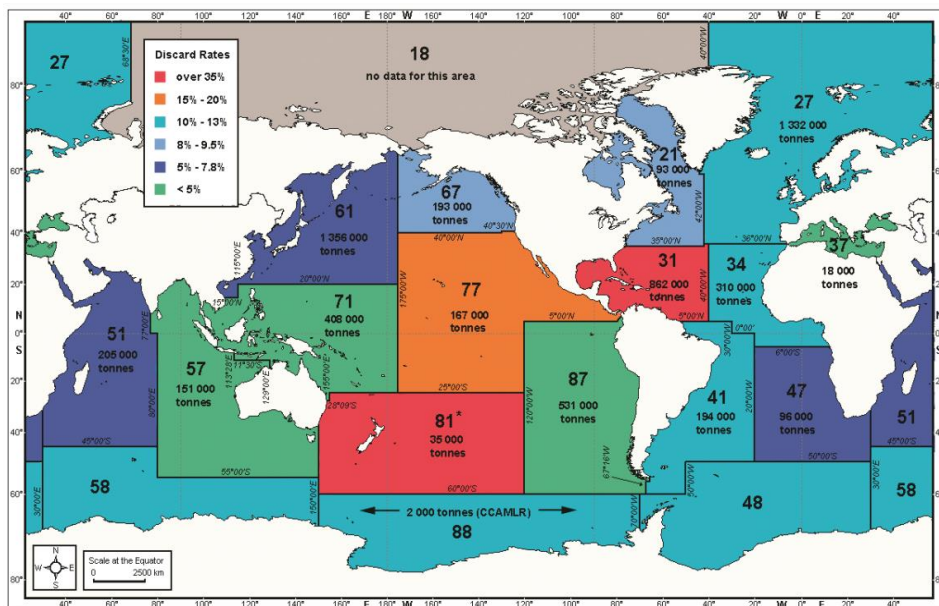


Figura 1. Descartes registrados por área estadística de la FAO (Kelleher, 2008).

Dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, encontramos que uno de ellos busca conservar y utilizar de forma sostenible los océanos, los mares y los recursos marinos para lograr el desarrollo sostenible. Por ello, las investigaciones orientadas a conservar y utilizar de forma sostenible los recursos acuáticos toman gran importancia (Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030, 2021).

Por lo que la extracción de compuestos bioactivos de los productos desechados de la pesca puede ser una forma de reducir los residuos de la industria y de añadirles valor. Este trabajo se centrará concretamente en cangrejos de la especie *Liocarcinus depurator*, que forma parte de los invertebrados de captura accidental.

1.2 *Liocarcinus depurator*

Liocarcinus depurator es un crustáceo comestible, que por lo general se captura, como especie acompañante, en pesquerías de arrastre de fondo en la costa catalana, y se le considera un producto de escaso valor. Taxonómicamente, *L. depurator* se clasifica en la familia de los portunoideos, dentro del orden de los decápodos (Abelló, 1986).

Es una especie que muestra preferencia por los fondos fangosos y que habita principalmente en profundidades por encima de los 200 m, aunque se puede encontrar por debajo incluso de los 1000 metros de profundidad. Se distribuye por el Atlántico oriental y por todo el mar Mediterráneo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, s. f.).

Respecto a sus características morfológicas, su cuerpo es de color pardo rojizo o amarillento, aunque los cangrejos jóvenes tienen una coloración rojiza muy pálida. Su caparazón suele medir 50 mm de anchura y 40 mm de longitud (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, s. f.).



Figura 2. Imagen de la especie *Liocarcinus depurator* (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, s. f.)

1.3 Extracción mediante ultrasonidos

El ultrasonido (US) son ondas de sonido que, debido que pertenece a frecuencias superiores a 16 kHz, no pueden ser captadas por el oído humano (Calderón et al., 2019). Se utiliza en extracciones sólido-líquido debido a los efectos físicos y químicos que provoca la cavitación. Los ultrasonidos alteran las paredes celulares biológicas, facilitando la penetración del disolvente y mejorando la extracción de compuestos bioactivos (Lavilla & Bendicho, 2017).

Debido a que una onda acústica consiste en variaciones de presión periódicas, existen ciclos de compresión y de expansión. Durante el ciclo de compresión se produce una presión positiva, que disminuye la distancia entre las moléculas, y durante la expansión se produce una presión negativa que las separa. Si se aplica una presión superior a la fuerza de tensión del líquido, se forman burbujas de cavitación (nucleación). Al continuar con los ciclos de compresión y expansión las burbujas irán incrementando su tamaño hasta llegar a la implosión (Calderón et al., 2019; Lavilla & Bendicho, 2017).

Cuando hay partículas sólidas en el medio líquido, el colapso de las burbujas de cavitación puede ser simétrico o asimétrico, dependiendo de la proximidad de las burbujas a los sólidos. La cavitación simétrica provoca microturbulencias cerca del sólido, aumentando la velocidad de transferencia de masa. Por otra parte, la cavitación asimétrica es responsable de la alteración de partículas y de la destrucción de paredes celulares. Además, los ultrasonidos provocan una intensa sacudida a nivel macroscópico (flujo de ultrasonidos) que contribuye a la extracción (Lavilla & Bendicho, 2017).

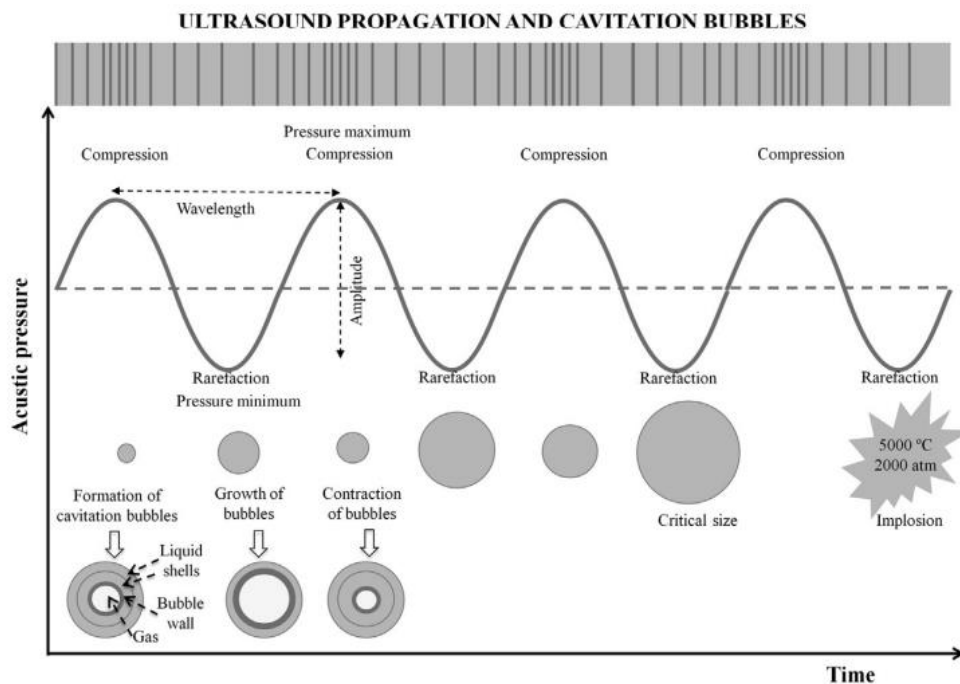


Figura 3. Ciclos de compresión y expansión, formación de burbujas de cavitación (Lavilla & Bendicho, 2017).

1.4 Sustancias antioxidantes

Las reacciones de oxidación están relacionadas con gran cantidad de cambios organolépticos durante el procesamiento, distribución y almacenamiento de alimentos. Además, pueden causar pérdidas del valor nutricional por la destrucción de algunas vitaminas liposolubles (Rojano, 1997).

Los lípidos son los sustratos más oxidables en los alimentos y tienen efectos negativos en sus parámetros cualitativos. Este proceso se inicia con pequeñas cantidades de oxígeno, por lo cual resulta difícil evitarlo (Rojano, 1997). En mariscos, además, la oxidación está catalizada por las altas concentraciones de prooxidantes como hemoglobina e iones metálicos en el músculo del pescado (Hamed et al., 2016).

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, reaccionando con los radicales libres que se producen durante la oxidación. La mayoría de los seres vivos dispone de sus propias defensas antioxidantes, como vitaminas como las del grupo A, C y E o sustancias como los polifenoles (Ideia et al., 2020).

Uno de los principales grupos de antioxidantes que se puede encontrar son los carotenoides, que son una clase de pigmentos, en su mayoría solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo y el rojo (Ideia et al., 2020; Rojano, 1997). Los carotenos son los responsables de la coloración de peces como el salmón y la trucha, y de los exoesqueletos de crustáceos como el camarón, la langosta y el cangrejo (Ozogul et al., 2021).

Por otra parte, los subproductos como las pieles, cabezas y aletas constituyen una fuente abundante de colágeno y gelatina, que contiene muchos aminoácidos como glicina, valina, alanina, prolina e hidroxiprolina, y podría contener péptidos con una potente actividad antioxidante (Ozogul et al., 2021).

Además, la quitina y sus derivados, que se pueden obtener del exoesqueleto de crustáceos, tienen diferentes actividades biológicas como efectos antioxidantes. Los quitosanos pueden retardar la oxidación lipídica.

1.5 Sustancias antimicrobianas

Un antimicrobiano es un agente que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de microorganismos. Estos agentes pueden ser bacteriostáticos si retrasan el crecimiento de bacterias o bactericidas si las inactivan (Olatunde et al., 2020).

Los microorganismos, que son las formas de vida más abundantes, pueden ser patógenos para otros seres vivos, por ello tanto plantas como animales han evolucionado para desarrollar un mecanismo de defensa conocido como inmunidad innata, que es una respuesta no específica que se activa por el contacto con agentes extraños (Montaño-Pérez & Vargas-Albores, 2002).

Esta respuesta tiene lugar por moléculas como los péptidos antimicrobianos, que son proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir en la síntesis de enzimas metabólicas o del DNA, y que pueden actuar en la membrana celular alterando su permeabilidad o provocando su lisis (Montaño-Pérez & Vargas-Albores, 2002).

Los animales marinos son una buena fuente de péptidos antimicrobianos, como pardaxina, misgurina, catelicidinas, defensinas, hepcidina, NK-lisina, piscidina, etc. Además, poseen otros

compuestos como el quitosano y sus derivados, los carotenoides y la astaxantina, que han demostrado tener propiedades antimicrobianas contra varios microorganismos (Olatunde et al., 2020).

Las propiedades antimicrobianas del quitosano y sus derivados se deben a la interacción entre las moléculas de este compuesto, que están cargadas positivamente, con la membrana celular de las bacterias, que tiene carga negativa. Además, el quitosano puede invadir el núcleo celular del microorganismo, inhibiendo la síntesis de proteínas y de ARN (Pereira-Malacara et al., 2022).

Las enfermedades transmitidas por alimentos, que son transmitidas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos vivos o sus toxinas, representan un problema de salud mundial. Gran parte de ellas son producidas por bacterias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes* que causan síntomas que van desde leves malestares hasta la muerte del paciente.

1.6 Posibles aplicaciones

Las sustancias bioactivas, que se encuentran como componentes naturales en los alimentos, son compuestos que aportan beneficios para la salud más allá del valor nutricional básico los alimentos (Biesalski et al., 2009).

Los compuestos bioactivos se pueden utilizar como ingredientes funcionales para mejorar la salud de los consumidores, aunque también se pueden utilizar como conservantes naturales en la industria alimentaria debido a las propiedades explicadas anteriormente.

Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que pueden tener los descartes de invertebrados marinos, se plantea la posibilidad de utilizarlos para su aplicación en envases. Además, la adición de este tipo de compuestos para la elaboración de recubrimientos comestibles o biodegradables permitiría la reducción del uso de plástico, que es un gran problema medioambiental.

Un ejemplo son los films comestibles a base de quitosano, que son biodegradables y pueden consumirse junto con el producto, además, pueden utilizarse como portadores de compuestos bioactivos junto con agentes microbianos como ácidos orgánicos, bacteriocinas, antibióticos, etc. (Hamed et al., 2016).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en estudiar el potencial de la especie de cangrejo *Liocarcinus depurator* como fuente de compuestos bioactivos, para su utilización en la industria alimentaria y su posible uso en alimentación funcional, o incluso, para la elaboración de recubrimientos comestibles.

De esta forma, los objetivos específicos del trabajo son:

- Extracción de compuestos bioactivos a partir diferentes fracciones de cangrejo (vísceras, patas y pinzas, caparazón y cangrejo entero), con un solvente de etanol:agua (75:25).
- Determinación de la capacidad antioxidante de las diferentes fracciones.
- Determinación de la capacidad antimicrobiana de las fracciones contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* y *Listeria innocua*.
- Comparación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las extracciones de cada fracción con diferentes solventes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES EMPLEADOS

3.1.1 Materias primas

Como materia prima se utilizó el cangrejo de la especie *Liocarcinus depurator*. Los cangrejos fueron enviados en congelación desde Burriana (Castellón) y se mantuvieron a -30°C hasta comenzar la extracción.

Las diferentes fracciones para estudiar, después de su procesado, se conservaron envasadas al vacío, como se puede ver en las Figuras 4, 5, 6 y 7.



Figura 4. Fracción de vísceras.



Figura 5. Fracción de patas y pinzas

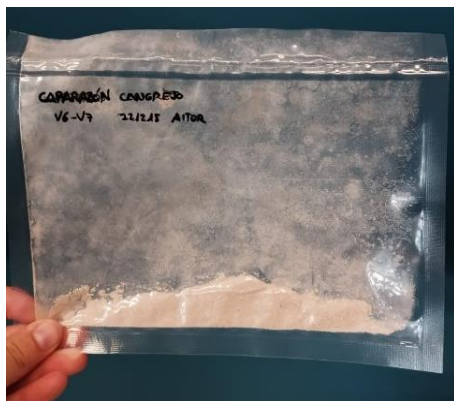


Figura 6. Fracción de caparazón

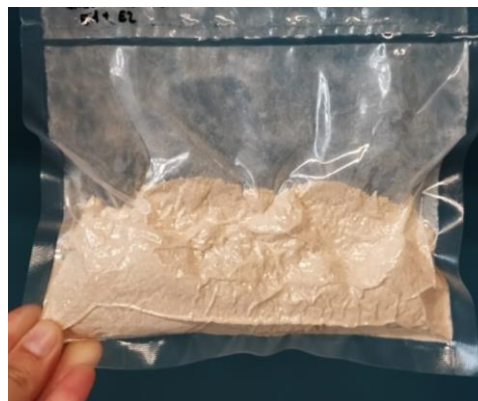


Figura 7. Cangrejo entero

3.1.2 Materiales y equipos

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

Extracción

- Polvo liofilizado de las fracciones de cangrejo
- Balanza
- Botellas pírrex 250 ml
- Solvente etanol:agua (75:25)
- Equipo de ultrasonidos UP400S Hielscher
- Baño de agua orbital Unitronic OR P.Selecta
- Tubos Falcon
- Centrífuga Sigma 3K30
- Matraz Kitasato
- Papel de filtro
- Rotavapor Büchi R-200
- Viales de cristal
- Congelador (-80°C)
- Liofilizador Telstar Lyobeta 25
- Agua ultrapura (tipo I)

Determinación de antioxidantes

- Muestras resuspendidas
- Microcentrífuga VWR Micro Star 17
- Microplaca
- Micropipeta y pipeta multicanal
- Eppendorfs
- Agua ultrapura (tipo I)
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go

- Método Folin:
 - Patrones de ácido gálico a diferentes concentraciones (a partir de solución de ácido gálico 200 ppm y agua tipo I)
 - Solución Na_2CO_3 100g/L
 - Reactivo Folin

- Método DPPH:
 - Reactivo DPPH
 - Solución de metanol al 80%
 - Probetas
 - Matraz aforado de 100 ml
 - Agitador con imán
 - Patrones de Trolox a diferentes concentraciones (a partir de solución Trolox 250 ppm y de metanol al 50%)

Determinación de actividad antimicrobiana

- Muestras resuspendidas
- Filtros PVDF de 0.45µm
- Placas Petri
- Estufas a 37°C y 26°C
- Asas de siembra
- Agitador vortex
- Tubos de ensayo estériles
- Discos de papel estériles
- Puntas de pipeta estériles y pipetas
- Pinzas estériles
- Espectrofotómetro
- Cubetas
- Campana Telstar Bio-II-A/P
- Regla graduada
- Contador de colonias
- Inóculos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* y *Listeria innocua*
- Agar bacteriológico
- Eppendorfs estériles con medio líquido
- Medios de cultivo según cepa:

Tabla 1. Medios de cultivo para cada cepa bacteriana

<i>Cepas</i>	Medio de cultivo en placa	Medio líquido
<i>E.coli</i>	Mueller Hinton	Nutrient Broth I
<i>S. aureus</i>	Nutrient Broth I	Nutrient Broth I
<i>P. fragi</i>	Nutrient Broth I	Nutrient Broth I
<i>L. innocua</i>	Brain Heart Infusion	Brain Heart Infusion

3.2 MÉTODOS

A continuación, en la *Figura 8*, se muestra un diagrama de flujo con las principales fases llevadas a cabo en el proceso experimental.

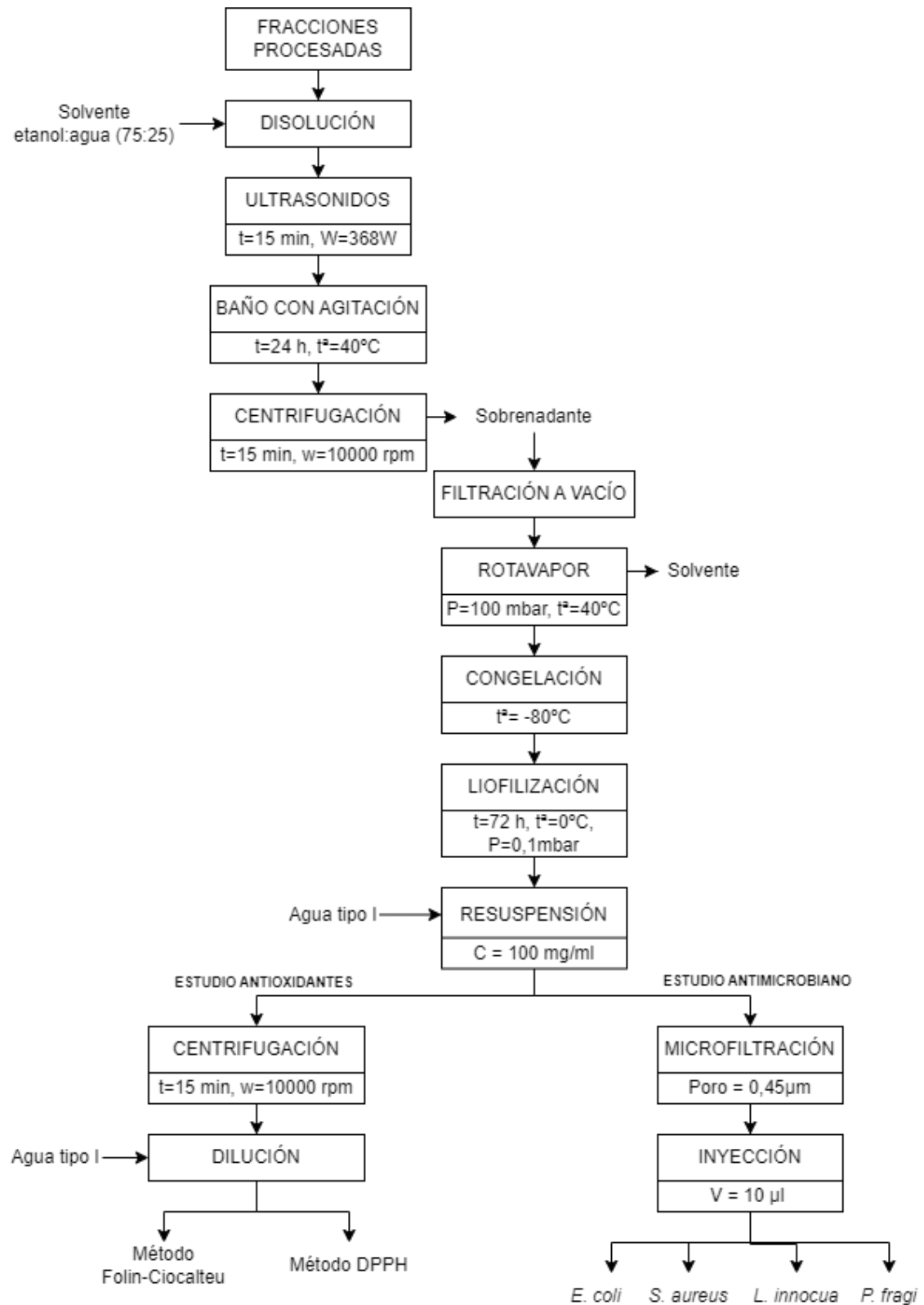


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso experimental

3.2.1 Procesamiento de cangrejos

Como se indica en el diagrama de flujo de la *Figura 8*, se partió de fracciones de cangrejo previamente procesadas. Este procesamiento se realizó antes de mi incorporación al trabajo, por lo que no se incluye en el diagrama de flujo del proceso experimental

En primer lugar, se despiezó el cangrejo y se separó en tres fracciones; vísceras, patas y pinzas, y caparazón, aunque además se toma el cangrejo entero como otra muestra para su estudio. A continuación, estas fracciones se trituraron y liofilizaron para eliminar la humedad.

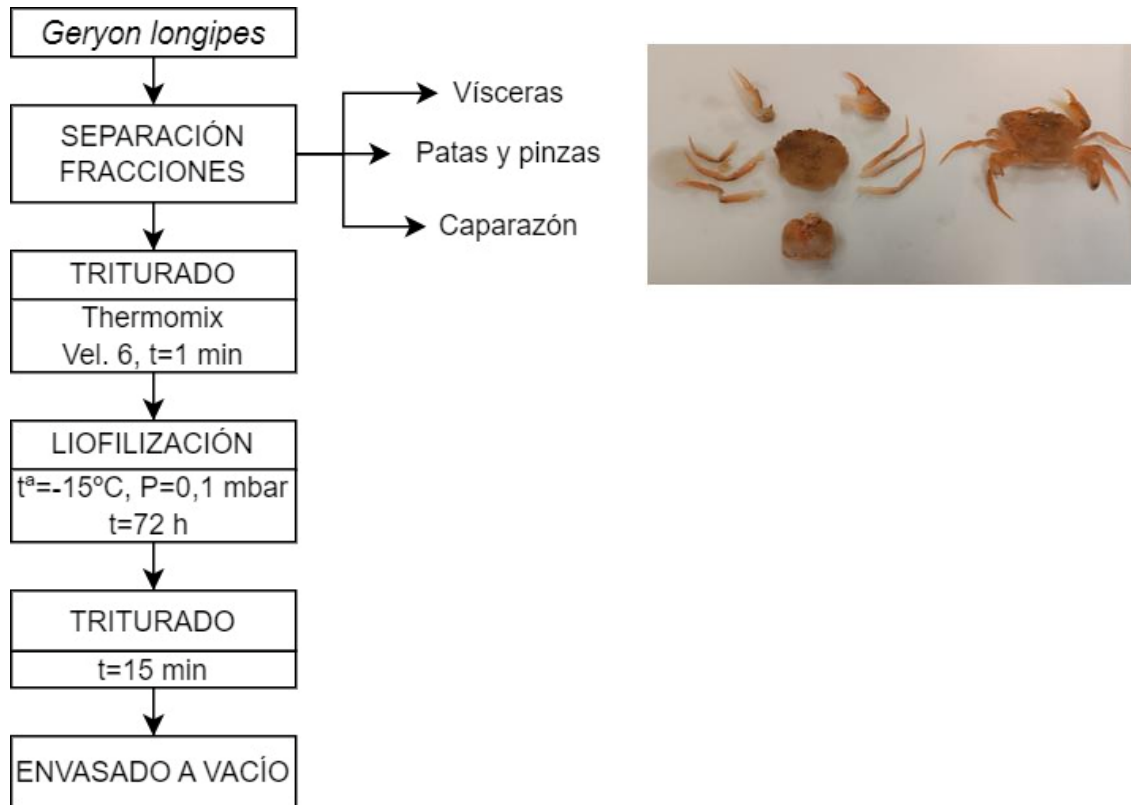


Figura 9. Diagrama de flujo de la obtención de fracciones

3.2.2 Extracción asistida por ultrasonidos

A partir del polvo de cangrejo obtenido previamente siguiendo el proceso de la *Figura 9*, se realiza una extracción de componentes bioactivos. En este caso se seleccionó un disolvente orgánico a base de etanol y agua, a una proporción de 75-25.

Se toman 8 gramos de la muestra de cangrejo y se disuelven en 200 ml del solvente preparado.



Figura 10. Botellas pírax con muestras de cangrejo entero y disolvente.

A continuación, se introducen las muestras en el equipo de ultrasonidos, utilizando hielo picado para evitar que la temperatura ascienda demasiado. Se aplica un ciclo de tratamiento de 15 minutos con una amplitud del 80%.

Una vez aplicado el tratamiento de ultrasonidos, se introducen las muestras en un baño de agua a 40°C con agitación, durante 24 horas.

Al recoger las muestras del baño se observa una separación de fases, por lo que se agitan para homogeneizar y poder repartirla en tubos Falcon para su posterior centrifugación.

3.2.3 Eliminación de solventes

Una vez realizada la extracción, se deben eliminar los solventes utilizados. Para ello, en primer lugar, se centrifugan las muestras para eliminar el precipitado y trabajar únicamente con el sobrenadante. Se introducen las muestras en la centrifuga, en cuatro tubos Falcon de 50 ml, durante 15 minutos con una velocidad de 10000 rpm.

Al centrifugar las muestras se toma únicamente el sobrenadante y se filtra a vacío mediante un matraz Kitasato para eliminar el posible precipitado restante.

Una vez filtradas, se introducen las muestras en el equipo de rotavapor, que permite eliminar los solventes de forma eficaz y precisa. Este equipo permite trabajar a temperaturas más bajas, al generar vacío, por lo que se consigue la eliminación de solventes sin descomposición de muestra ni formación de subproductos (Wang & Peng, 2023).



Figura 11. Equipo de rotavapor.



Figura 12. Extracto concentrado en el rotavapor.

Se introducen las muestras obtenidas en pequeños viales, tal como se muestra en las siguientes imágenes y se congelan a -80°C .



Figura 13. Extracción de vísceras



Figura 14. Extracción de patas y pinzas



Figura 15. Extracción de caparazón

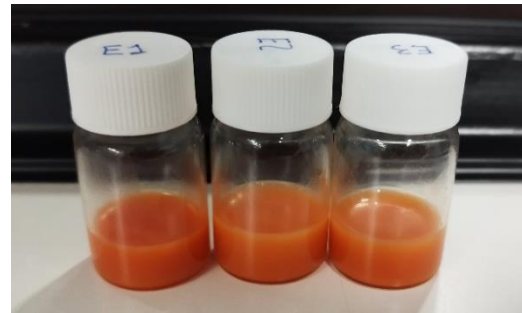


Figura 16. Extracción de cangrejo entero

Por último, se liofilizan las muestras durante 72 horas, con unas condiciones de 0°C de temperatura y 0,1 mbar de presión. Para ello, se congela en primer lugar las muestras, tal y como se ha mencionado anteriormente, y luego se someten a vacío.

La liofilización generalmente se realiza hasta que el contenido de humedad alcanza entre el 1% y el 3%, consiguiendo eliminar casi la totalidad de la humedad de las muestras, sin dañar las sustancias susceptibles al calor. Se puede observar las muestras liofilizadas en las Figuras 17, 18, 19 y 20.



Figura 17. Liófilo de vísceras



Figura 18. Liófilo de patas y pinzas



Figura 19. Liófilo de caparazón



Figura 20. Liófilo de cangrejo entero

Para analizar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos deben estar todos a la misma concentración, por lo que todos ellos se resuspenden a 100 mg/ml. Para ello se tiene en cuenta el peso de liófilo obtenido en cada muestra y se añade la cantidad correspondiente de agua ultrapura.

Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción permite conocer la cantidad de sustancias que puedes estar presentes en cada extracto. Para determinar este rendimiento se sigue la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{Peso seco de liófilo (g)}}{\text{Peso de extracto seco (g)}} \times 100$$

El peso de liófilo hace referencia al peso de muestra obtenido tras el proceso de liofilización. Se debe tener en cuenta que se asume que este extracto está seco, es decir, que la cantidad de humedad que pueda tener es despreciable.

Por otra parte, el peso de extracto seco se calcula teniendo en cuenta el peso de muestra tomado inicialmente y la humedad de cada fracción de cangrejo, indicada en la *Tabla 3*. Esta humedad fue medida por otra parte del equipo de investigación.

3.2.4 Estudio de propiedades antioxidantes

Para estudiar las propiedades antioxidantes de las diferentes fracciones se utilizan dos métodos, el método DPPH y el Folin-Ciocalteu, midiendo todas las muestras por triplicado.

Se utiliza el espectrofotómetro para microplacas UV-Vis para medir la absorbancia de la reacción provocada por los reactivos, que en ambos casos da lugar a cambios de color cuantificables mediante este equipo.

Antes de comenzar el análisis, se centrifugan las muestras para analizar únicamente el sobrenadante. Además, estas se deben diluir en caso de considerarse necesario para ajustarlas a la recta de calibrado y, de esta forma, poder interpolar los resultados.



Figura 21. Separación de sobrenadante por centrifugación.

Método DPPH

El DPPH•, o 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo, es un radical orgánico con coloración violeta. Este método se basa en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH• que, al reducirse, produce una pérdida del color violeta y, en consecuencia, una pérdida de absorbancia. Esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el descenso de la absorbancia a 517 nm (Londoño, 2012).

Se utiliza una solución metanólica con DPPH 150 μ M, para lo que se pesan 5,8 mg de DPPH y se disuelven en una solución de metanol al 80%. Por otra parte, se preparan cinco patrones de Trolox a distintas concentraciones (0, 25, 50, 100, 150 ppm), a partir de una solución Trolox a 250 ppm y de una solución de metanol al 50%.

Para el análisis, se centrifugan las muestras y se diluye el sobrenadante a 1:10 y 1:25 con agua ultrapura. Se mezclan en la microplaca 20 μ l de los patrones o las diluciones y 180 μ l de la solución de DPPH, analizando cada muestra por triplicado.

Por último, se mide la absorbancia de las muestras, a 515 nm, después de dejarlas incubar media hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Una menor absorbancia de la reacción denotará mayor actividad de eliminación de radicales libres.

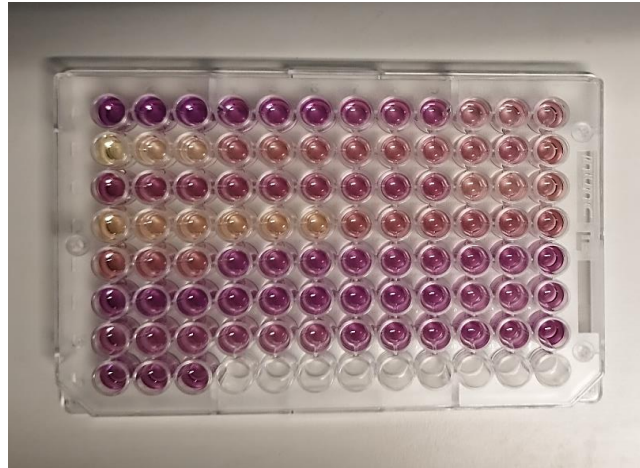


Figura 22. Microplaca con muestras y reactivos.

En primer lugar, los datos obtenidos se interpolan en la recta obtenida con los patrones y se expresan los resultados en miligramos de equivalentes Trolox (TE) por litro de extracto. Sin embargo, para el análisis estos resultados se expresarán finalmente en miligramos de TE en base al extracto seco inicial, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de antioxidantes (mg TE /g extracto seco)} = \frac{\text{Cant. antioxidantes} \left(\frac{\text{mg TE}}{\text{L extracto}} \right) \times \text{Rend. fracción} \left(\frac{\text{g liófilo}}{\text{g ext.seco} \times 100} \right)}{\text{Concentración liófilo} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{L}} \right)}$$

Método de Folin-Ciocalteu

Este procedimiento se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos de una muestra utilizando el reactivo Folin, que está compuesto por polianión molibdotungstosfosfórico, provocando un viraje de color de amarillo a azul, con una absorción máxima de 765 nm. Una de las modificaciones del método implica el uso de ácido gálico como compuesto fenólico de referencia y los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (GAE) por muestra (Londoño, 2012).

En este caso, se preparan seis patrones de ácido gálico a diferentes concentraciones (0, 10, 20, 50, 100, 200 ppm), utilizando una disolución de ácido gálico a 200 ppm y agua ultrapura. Por otra parte, se prepara una solución de Na₂CO₃ con una concentración de 100 g/l.

Para el análisis, se utiliza el sobrenadante de las propias muestras y una dilución de estas a 1:25. Se toman 20 µl de las diluciones y muestras, así como de los patrones, y se carga cada una en tres pocillos de la microplaca. A continuación, se añaden en todos los pocillos 75 µl de agua ultrapura, 25 µl del reactivo Folin y 75 µl de la solución salina.

Se deja reposar la muestra durante 2 horas en oscuridad, para que la reacción ocurra por completo. Por último, se mide la absorbancia de cada pocillo de la placa a 750 nm.

Los datos obtenidos de absorbancia se interpolan en la recta patrón y se expresan los resultados en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de extracto. Finalmente, utilizando la fórmula mostrada a continuación se expresarán los resultados en miligramos de GAE por gramo de extracto seco inicial.

$$\text{Cantidad de antioxidantes (mg GAE /g extracto seco)} = \frac{\text{Cant. antioxidantes} \left(\frac{\text{mg GAE}}{\text{L extracto}} \right) \times \text{Rend. fracción} \left(\frac{\text{g liófilo}}{\text{g ext.seco} \times 100} \right)}{\text{Concentración liófilo} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right) \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{L}} \right)}$$

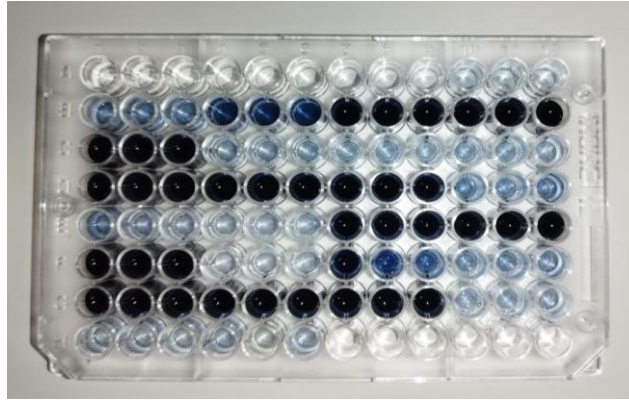


Figura 23. Microplaca con muestras y reactivos.

3.2.5 Estudio de actividad antimicrobiana

Se estudia el efecto antimicrobiano de cada fracción de cangrejo para cuatro cepas bacterianas diferentes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* y *Listeria innocua*. Se debe tener en cuenta que se dispone de tres muestras de cada fracción, y que cada una de ellas es analizada individualmente y por triplicado, es decir, en cada día de prueba se hacen nueve análisis de cada fracción.

Todo el trabajo de microbiología se realiza en una campana de flujo laminar, que permite trabajar de forma aséptica.



Figura 24. Campana de flujo laminar.

Para analizar las muestras estas se deben eliminar previamente posibles contaminaciones, para lo que se utiliza el método de microfiltración. Se utilizan filtros PVDF de $0,45\mu\text{m}$, previamente esterilizados por ultravioleta, que permiten el paso de la muestra mientras retienen las bacterias que puedan estar presentes.

Por otra parte, se preparan los medios de cultivo correspondientes para el cultivo en placa Petri y los medios de cultivo líquidos, que se autoclavan junto con el resto de material necesario (pinzas, puntas de pipeta) a 121°C durante 1 hora. Se esterilizan, además, los discos de papel mediante radiación ultravioleta.

Una vez estéril se preparan en campana las placas Petri con los medios de cultivo correspondientes y todas ellas se conservan en refrigeración hasta su uso.

Se siembran 100 μ l de cada cepa bacteriana en dos placas Petri y se dejan incubando 24 horas a la temperatura correspondiente, que se indica en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Temperatura de incubación de cada cepa bacteriana

Cepa bacteriana	Temperatura de incubación
<i>E.coli</i>	37° C
<i>S. aureus</i>	37° C
<i>P. fragi</i>	26°C
<i>L. innocua</i>	37° C

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se habrá formado un césped en las placas Petri, se debe tomar un raspado de bacterias de este césped y echarlo a un tubo estéril con medio líquido de cultivo, agitando para disolver completamente las bacterias. Se mide la absorbancia de esta mezcla para poder estimar, mediante una recta patrón, la concentración de bacterias con la que se va a trabajar.

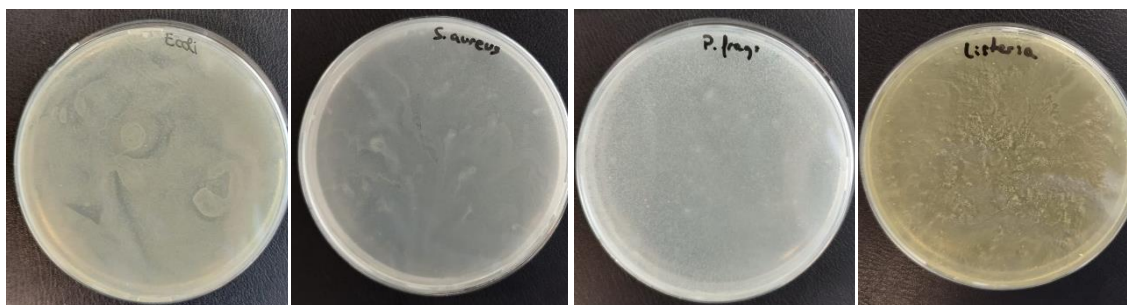


Figura 25. Césped de *E. coli*, *S. aureus*, *P. fragi*, *L. innocua*, respectivamente.

En las placas en las que se va a realizar la medición de halos, se siembran 100 μ l del medio líquido con bacterias. Se ponen cuatro discos de papel en cada placa Petri con una pinza estéril y se echan 10 μ l de cada muestra en cada uno de ellos. Cada muestra se mide por triplicado.

Por último, se hacen diluciones decimales del microorganismo para conocer la carga microbiana que estamos empleando en el análisis. Se toman 100 μ l de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se siembran cada una de ellas en dos placas, para posteriormente realizar el recuento de colonias.

Se dejan incubando todas las placas durante 24 horas a la temperatura correspondiente, indicada en la *Tabla 2*. Posteriormente se hace un recuento de colonias de cada una de las diluciones y, a continuación, se mide con una regla, el diámetro de cada halo de inhibición. Para calcular la superficie de inhibición se excluirá la de los papeles de filtro, tomando como referencia un diámetro de 5 mm.

Además, se debe tener en cuenta la concentración bacteriana con la que se está trabajando, expresada en unidades formadoras de colonias (ufc) por ml de disolución. Esta concentración se calcula con base a los recuentos realizados de las diluciones de cada bacteria y se contrasta con la concentración calculada a partir de la absorbancia de la disolución de bacterias y medio líquido inicial.

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los análisis anteriores se analizan estadísticamente para comprobar si hay diferencias significativas entre las diferentes fracciones de cangrejo y entre varios tipos de solventes.

Para ello se utiliza el programa Statgraphics, con el que se realizan análisis de varianza (ANOVA) simples, con un nivel de significación al 95% de confianza, determinado por el procedimiento LSD de Fisher. Atendiendo a los grupos homogéneos, podemos determinar si existen diferencias significativas en los resultados obtenidos para cada solvente ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se debe tener en cuenta la humedad de cada fracción del cangrejo, ya que todos los resultados se presentarán en base al extracto seco de cada una de ellas. En la *Tabla 3*, se puede observar la humedad y cenizas de cada fracción utilizada, como la media de los dos análisis realizados.

Tabla 3. *Humedad y cenizas de cada fracción*

Tipo de fracción	Humedad (%)	Cenizas (%)
Vísceras	6,09 ± 0,00	31,10 ± 0,00
Patas y pinzas	6,76 ± 0,00	38,37 ± 0,00
Caparazón	5,86 ± 0,00	42,02 ± 0,00
Entero	7,53 ± 0,00	36,42 ± 0,00

4.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS

4.1.1 Rendimiento de extracción con etanol 75%

En primer lugar, se analiza el rendimiento de extracción de cada fracción de cangrejo, utilizando etanol al 75% como solvente.

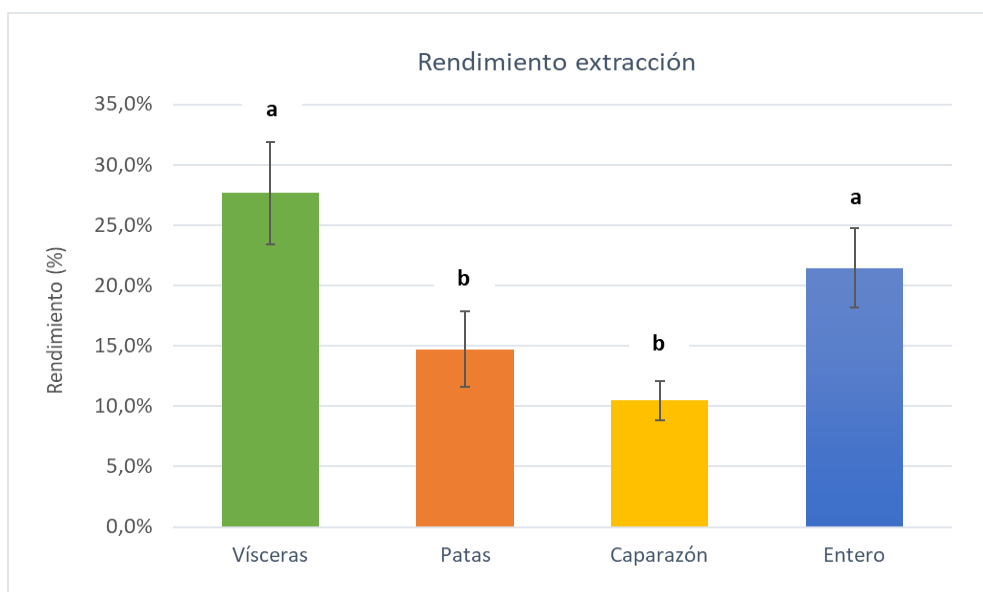


Figura 26. Rendimientos de extracción de cada fracción con etanol 75%.
a,b corresponden a grupos homogéneos, pruebas con letras iguales no tienen diferencias significativas entre sí.

En general, existe bastante variabilidad en los rendimientos obtenidos, lo que puede deberse a que en el rotavapor no se establece un tiempo determinado para el proceso. Se extraen las muestras cuando se considera que no queda más solvente, por lo que esto puede llevar a desviaciones en las muestras.

En cualquier caso, se puede observar un mayor rendimiento de extracción en vísceras y, seguidamente en el cangrejo entero, sin existir diferencias significativas entre estas dos fracciones.

El mayor rendimiento de extracción en las vísceras se puede explicar por su mayor contenido en lípidos, que son compuestos más afines al etanol. Esto coincide con los resultados expuestos por Allen (1971) que expone que, concretamente en las gónadas y el hepatopáncreas del cangrejo, es dónde se pueden encontrar más lípidos que en cualquier otro tejido. En nuestro caso, este tipo de fracciones están incluidas dentro del concepto de vísceras.

Por otra parte, el caparazón está formado en gran parte por quitina (15-30%), que es un polisacárido lineal insoluble en gran parte de los solventes (Zapata Pérez, 2018; Affes et al., 2019; Hajji et al., 2015), lo que explica su menor rendimiento de extracción.

4.1.2 Comparación de extracciones con otros solventes

Además de utilizar como solvente etanol al 75%, otros investigadores del proyecto realizaron las extracciones con etanol al 50% y con agua. A continuación, se muestra una comparativa de los rendimientos obtenidos para cada fracción según el solvente utilizado.

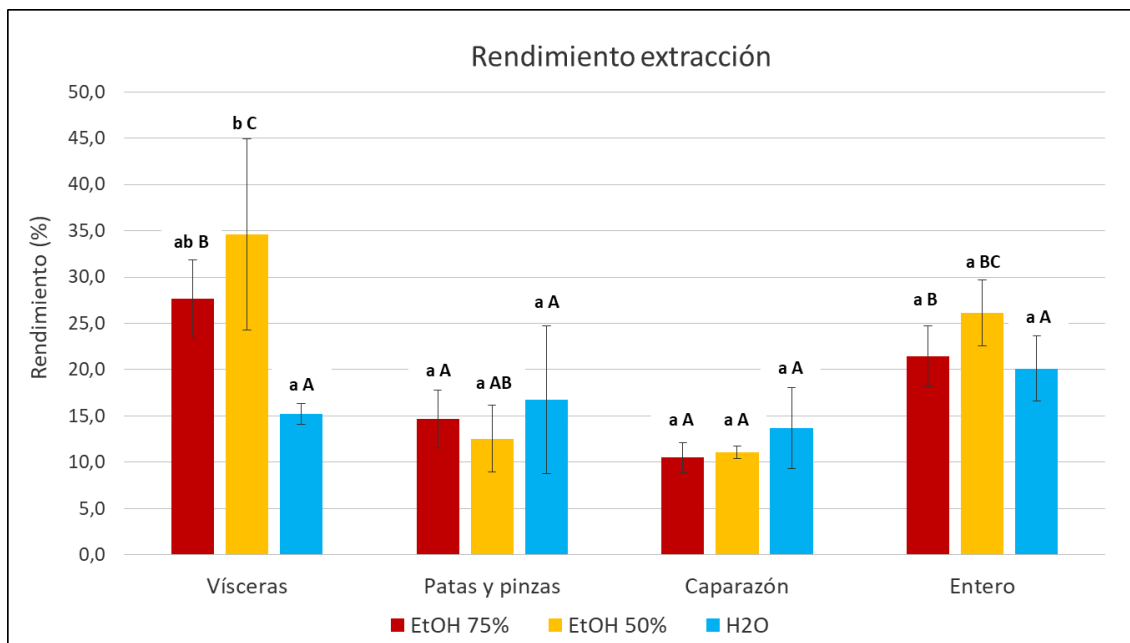


Figura 27. Rendimientos de extracción en función del solvente utilizado.

*a,b indica si hay diferencias significativas entre cada solvente dentro de la misma fracción.

*A,B,C indica si hay diferencias significativas entre cada tipo fracción con el mismo solvente.

Se puede observar que los rendimientos de extracción son menores para las muestras de caparazón, independientemente del solvente utilizado. Esto, tal y como se ha mencionado anteriormente, se puede deber a la baja solubilidad de la quitina, que es uno de los principales componentes de esta fracción.

Aunque se observa un rendimiento algo mayor en las extracciones realizadas con agua en patas y caparazón, la diferencia con el resto de los solventes y fracciones no es significativa. Por lo que podemos concluir que para estas fracciones es irrelevante el tipo de solvente utilizado.

Se puede observar que los solventes etanólicos consiguen rendimientos significativamente mayores en las vísceras del cangrejo, lo que se puede explicar con la mayor cantidad de lípidos en esta fracción. Concretamente, se consigue un mayor rendimiento al utilizar etanol al 50% como solvente, lo que puede deberse a que, al disponer de un mayor porcentaje de agua en el solvente, se consiguen extraer también otro tipo de compuestos como las proteínas, que tal y como se indica en la bibliografía, tienen gran presencia en las vísceras del cangrejo (Allen, 1971).

4.2 DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES

Como se ha mencionado en el apartado de métodos, se han utilizado dos métodos para la determinación de antioxidantes, el método DPPH y el método Folin-Ciocalteu. A continuación, se muestran los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

Se debe tener en cuenta que se dispone de tres muestras de cada fracción de cangrejo y que cada una de ellas se analiza independientemente y por triplicado. De esta forma, los datos obtenidos corresponden a nueve mediciones para cada fracción.

4.2.1 Método Folin-Ciocalteu

Para este método se expresan los resultados como los miligramos de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco de cada muestra. Se comienza calculando una recta patrón, mostrada a continuación, utilizando la absorbancia obtenida de los patrones de ácido gálico.

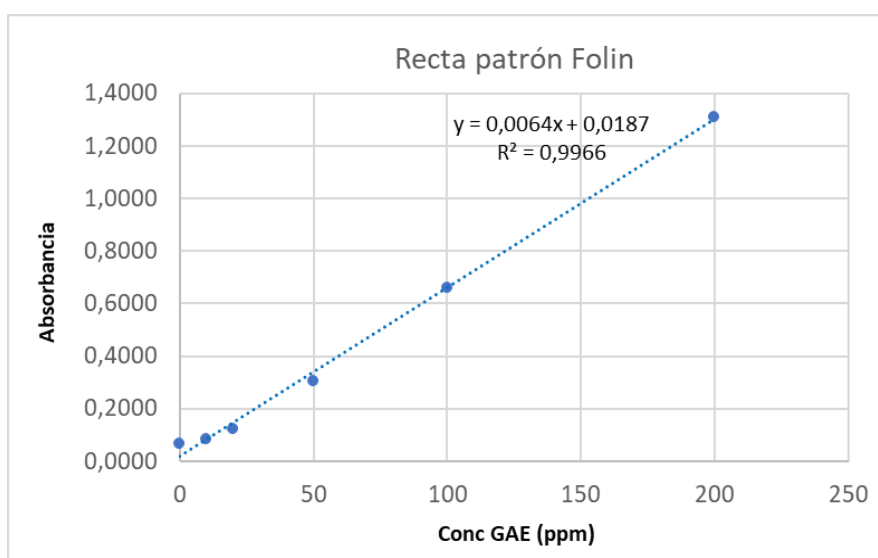


Figura 28. Recta patrón para el método Folin.

A partir de la recta patrón anterior, se interpolan los datos de absorbancia obtenidos para determinar la concentración de ácido gálico de cada muestra.

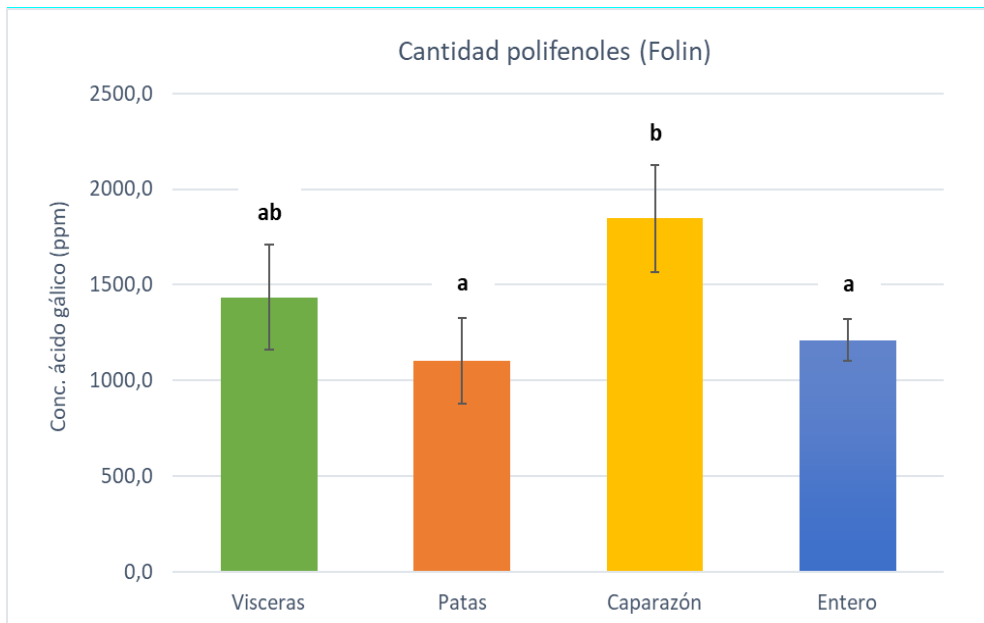


Figura 29. Concentración de ácido gálico según el volumen de extracto.
*a,b indica si hay diferencias significativas entre las fracciones.

Teniendo en cuenta la cantidad de polifenoles en base al volumen de extracto, se observa una mayor cantidad de estos compuestos en el caparazón del cangrejo.

Sin embargo, interesa comparar los resultados en función del extracto seco de cada fracción, teniendo en cuenta el rendimiento de extracción de cada una de ellas, por lo que a continuación se muestra la cantidad de polifenoles en base al extracto seco.

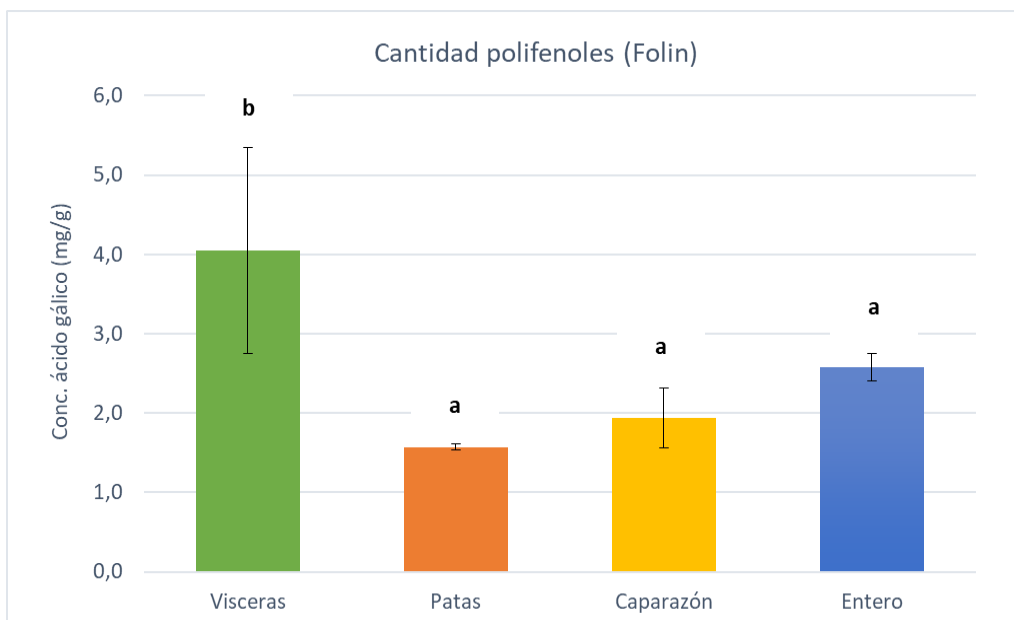


Figura 30. Concentración de ácido gálico según el extracto seco de cada muestra.
*a,b indica si hay diferencias significativas entre las fracciones

Se observa bastante variabilidad en los resultados de la fracción de vísceras, aunque comparándolos con los datos de la *Figura 29*, se observa que esta variabilidad procede, no solo de la medición de polifenoles, si no también de los diferentes rendimientos de extracción.

Sólo se observan diferencias significativas en los resultados de las vísceras, donde la cantidad total de polifenoles es mayor que en el resto de las fracciones.

En el método Folin se debe tener en cuenta que no es considerado en sí mismo un método de medición para la capacidad antioxidante, si no que permite la determinación del contenido total en compuestos fenólicos.

4.2.2 Método DPPH

Para el método DPPH, se expresan los resultados como la concentración de equivalentes Trolox (TE) en miligramos por gramo de extracto seco de muestra. Esta concentración de las muestras se calcula en base a la recta patrón mostrada en la *Gráfica 31*.

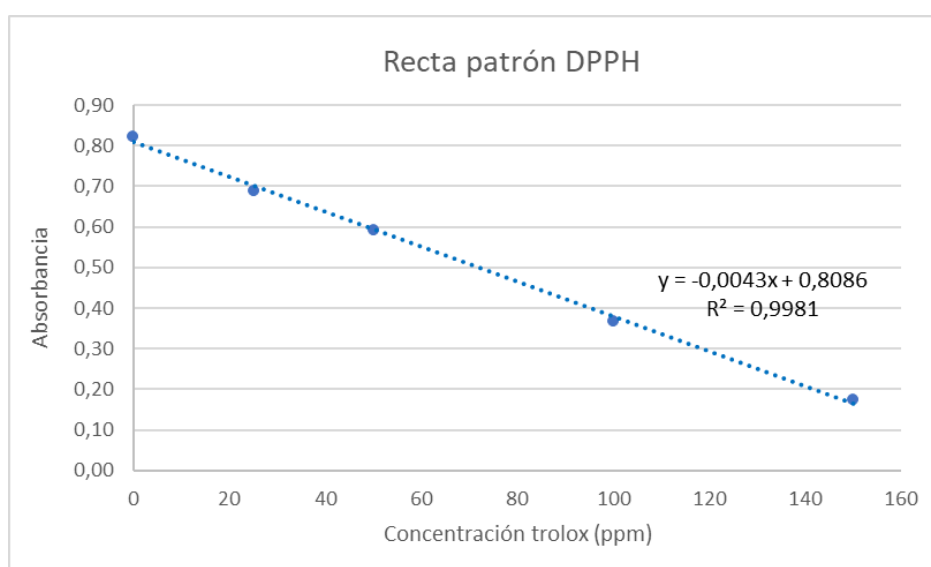


Figura 31. Recta patrón para el método DPPH.

A partir de esta recta patrón anterior, se interpolan los datos de absorbancia obtenidos en las muestras para determinar la concentración de equivalentes Trolox por el volumen de extracto obtenido.

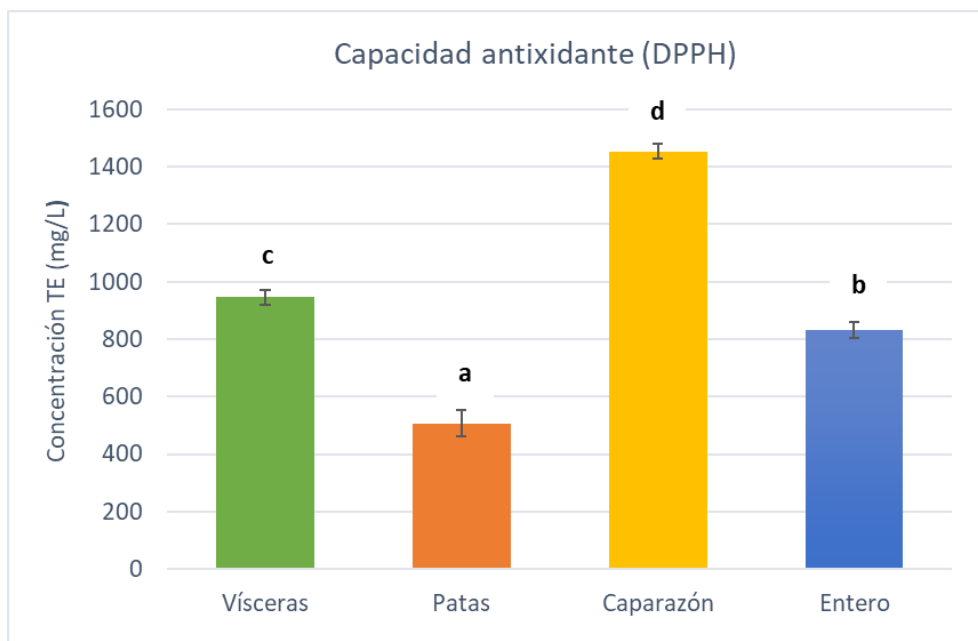


Figura 32. Capacidad antioxidante por DPPH según el volumen de extracto

*a,b,c,d indica si hay diferencias significativas entre las fracciones

Al igual que en el método Folin, teniendo en cuenta los resultados en base al volumen de extracto, se observa una mayor capacidad antioxidante en la fracción de caparazón, seguido del cangrejo entero.

Sin embargo, tal como se observa en la siguiente gráfica, al expresar los resultados en base al extracto seco de cada muestra, el resultado varía debido a los diferentes rendimientos de extracción.

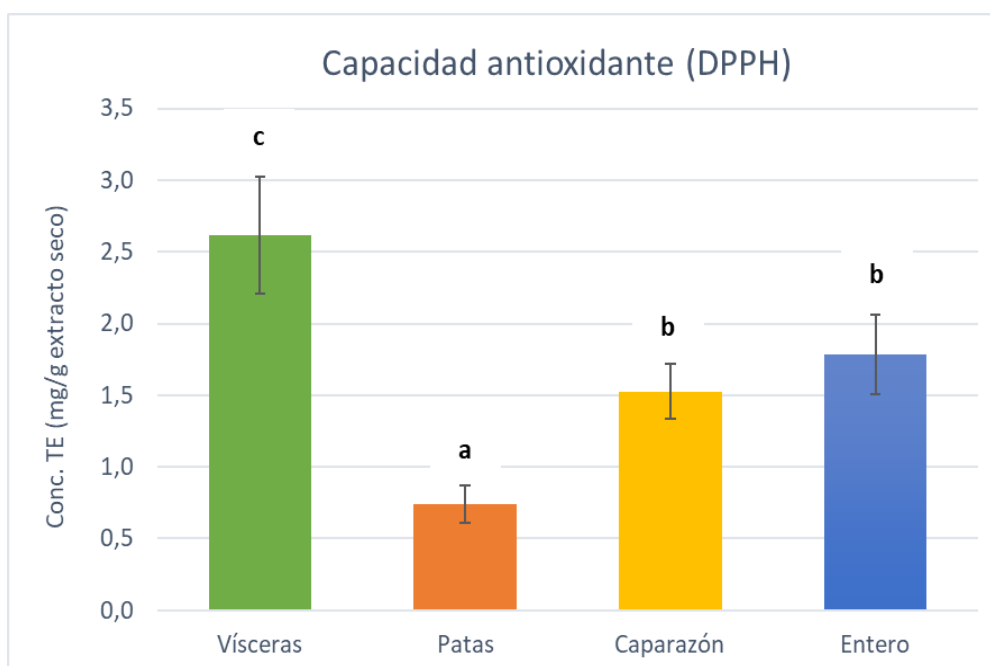


Figura 33. Capacidad antioxidante por DPPH según el extracto seco.

*a,b,c indica si hay diferencias significativas entre las fracciones

La mayor capacidad antioxidante se encuentra en las vísceras del cangrejo, seguido por el cangrejo entero y el caparazón, entre los que no existe diferencia significativa. Las patas, en cambio, muestran una capacidad antioxidante significativamente menor.

Se aprecia que los datos se corresponden con los obtenidos mediante el método Folin, por lo que existe coherencia en los resultados.

En ambos casos, al observar los datos por litro de extracto, el caparazón es la fracción con mayor capacidad antioxidante, sin embargo, al tener en cuenta únicamente el extracto seco de las muestras se observa una mayor capacidad antioxidante en las vísceras del cangrejo. Esto se debe al bajo rendimiento de extracción en el caparazón del cangrejo.

En principio, se podría esperar una mayor actividad antioxidante en el caparazón, ya que uno de los principales antioxidantes que se puede encontrar en él son los carotenoides (Ideia et al., 2020; Rojano, 1997), entre los que destaca la astaxantina, que es el principal responsable de la pigmentación del caparazón y que, además, tiene un gran poder antioxidante (Nguyen et al., 2017; Puente, 2021).

Sin embargo, para extraer carotenoides del caparazón de crustáceos, se deben aplicar tratamientos para separarlos de las proteínas y minerales antes de realizar la extracción con etanol (Shavandi et al., 2019) y este tipo de solventes orgánicos disminuyen la estabilidad de la astaxantina y afectan a su estructura (Han et al., 2012).

Podemos observar que las vísceras muestran una actividad antioxidante significativamente mayor, esto se puede deber a que esta fracción también contiene mayor cantidad de polifenoles tal y como se ha visto con el método Folin-Ciocalteu.

En los alimentos de origen animal las propiedades antioxidantes se atribuyen principalmente a aminoácidos, péptidos y proteínas (Gómez et al., 2019). De las fracciones estudiadas, las vísceras son las que mayor contenido en proteínas contienen (Allen, 1971), lo que también puede explicar su capacidad antioxidante significativamente mayor.

Se ha comprobado que los aminoácidos hidrofóbicos incrementan la eficacia de los péptidos antioxidantes (Gómez et al., 2019; Zamora-Sillero et al., 2018). Este fenómeno se debe, posiblemente, a la capacidad hidrófoba de los péptidos que potencia su interacción con las dianas lipídicas o la entrada de estos péptidos en los órganos diana a través de asociaciones con la membrana lipídica de su membrana celular. Esto permite conseguir potentes efectos antioxidantes (Gómez et al., 2019).

4.2.3 Comparación de capacidad antioxidante con otros solventes

A continuación, se muestra una comparativa de la capacidad antioxidante de cada fracción del cangrejo en función del solvente utilizado.

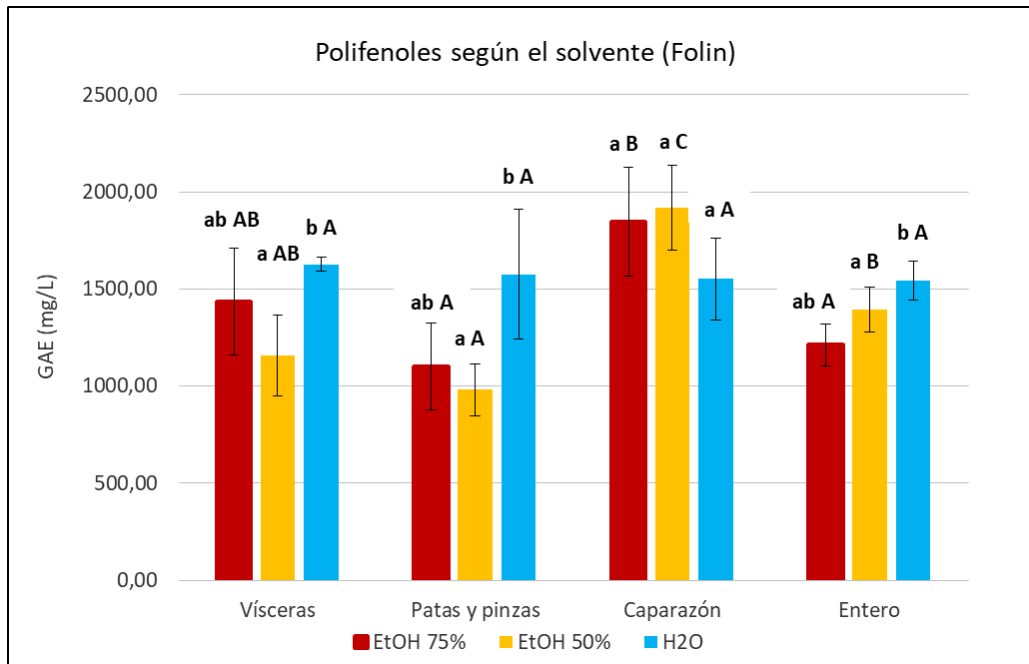


Figura 34. Cantidad de polifenoles mediante Folin según el solvente (en base a volumen extracto)
 *a,b indica si hay diferencias significativas entre cada solvente dentro de la misma fracción.
 *A,B, indica si hay diferencias significativas entre cada tipo fracción con el mismo solvente.

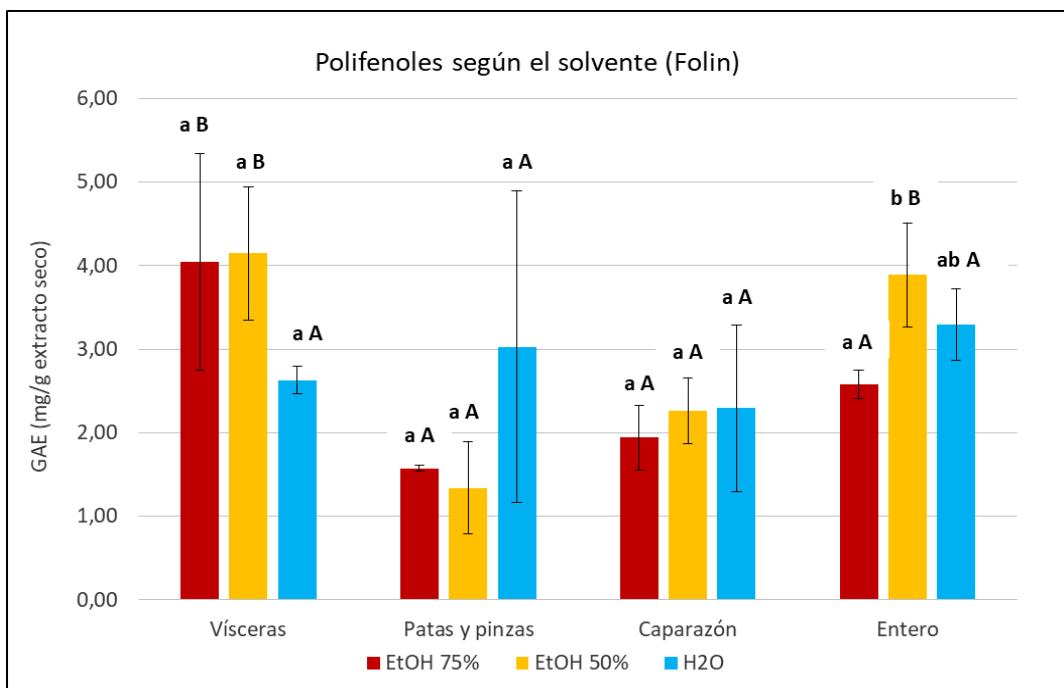


Figura 35. Cantidad de polifenoles mediante Folin según el solvente (en base al extracto seco)
 *a,b indica si hay diferencias significativas entre cada solvente dentro de la misma fracción.
 *A,B, indica si hay diferencias significativas entre cada tipo fracción con el mismo solvente.

Si se tiene en cuenta el volumen de extracto, se observa una mayor cantidad de polifenoles en los extractos etanólicos de caparazón. Aunque, al observar las extracciones con agua, se obtienen resultados sin diferencias significativas con los extractos etanólicos y, además, homogéneos entre fracciones.

Sin embargo, al expresar los resultados en base al extracto seco de cada fracción, estos cambian. Se observa en este caso una mayor capacidad antioxidante en vísceras y, aunque sin diferencias significativas, se obtienen resultados algo mejores utilizando etanol 50%. El descenso de la concentración de polifenoles en caparazón al expresarlo en base al extracto seco se debe a su bajo rendimiento de extracción.

A continuación, se estudian los resultados de la capacidad antioxidante con distintos solventes, según el método DPPH.

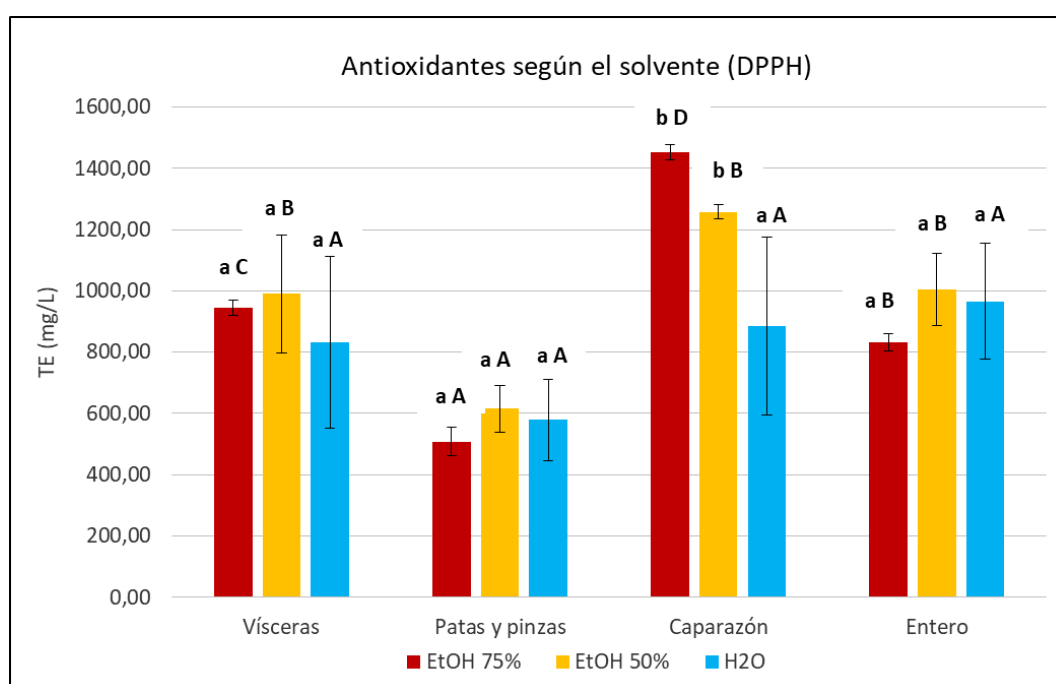


Figura 36. Capacidad antioxidante mediante DPPH, según el solvente (en base a volumen extracto)

*a,b indica si hay diferencias significativas entre cada solvente dentro de la misma fracción.

*A,B, indica si hay diferencias significativas entre cada tipo fracción con el mismo solvente.

Al igual que en el caso anterior, se observa una capacidad antioxidante mayor en la fracción de caparazón al expresarlo en base al volumen de extracto, aunque tal y como se muestra en la siguiente gráfica, los resultados de nuevo varían al expresarlos en base al extracto seco, debido a los diferentes rendimientos de extracción.

Cabe destacar que en los extractos acuosos se observa bastante variabilidad, y más sobre todo en las fracciones de vísceras y caparazón, que poseen un coeficiente de variación del 33,8% y 32,9%, respectivamente.

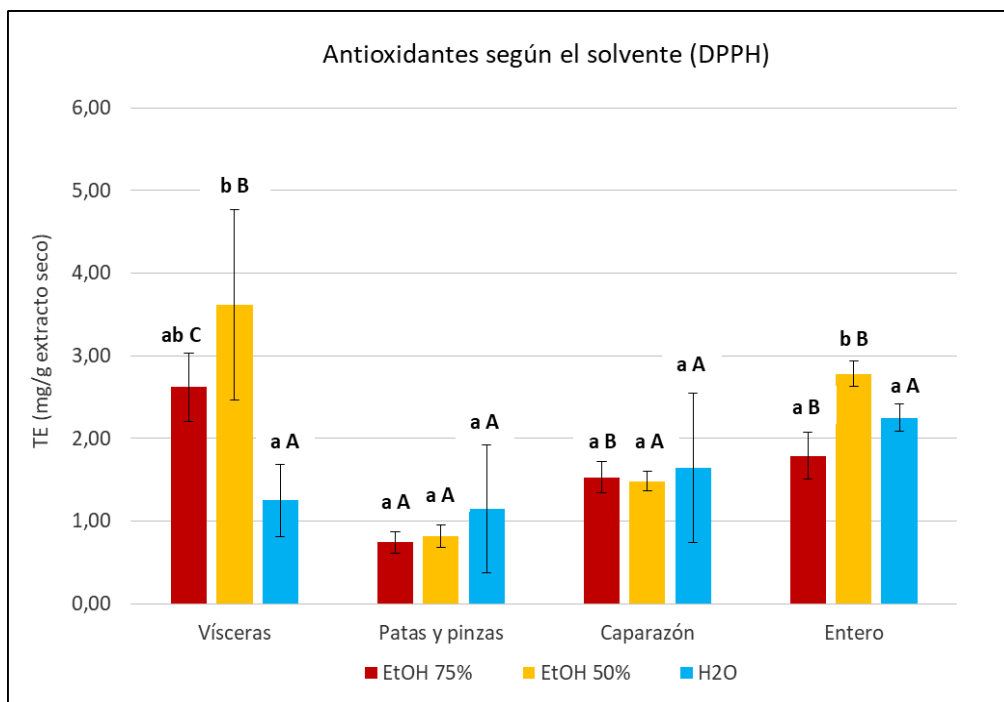


Figura 37. Capacidad antioxidante mediante DPPH, según el solvente (en base al extracto seco)

*a,b indica si hay diferencias significativas entre cada solvente dentro de la misma fracción.

*A,B, indica si hay diferencias significativas entre cada tipo fracción con el mismo solvente.

Se observa una capacidad antioxidante significativamente mayor en los extractos de vísceras y de cangrejo entero, obtenidos con etanol al 50%.

En vísceras, aunque se observa una cantidad similar de polifenoles en las dos extracciones etanólicas, estos resultados no se trasladan a su capacidad antioxidante, que es significativamente mayor en la extracción realizada con etanol al 50%. Esto puede deberse a que al hacer la extracción con etanol al 50% se extraen, además de polifenoles, otro tipo de compuestos hidrosolubles.

Por otra parte, los extractos acuosos muestran una cantidad de polifenoles y una capacidad antioxidante mayor en las fracciones de patas y caparazón, sin embargo, la diferencia con el resto de los solventes no es significativa.

4.3 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Únicamente se considerará inhibición en caso de que no se observe ningún tipo de crecimiento bacteriano en el halo formado. Además, en todos los casos se pusieron, además de las muestras, controles con agua filtrada para utilizarlos como referencia y saber si los halos observados eran por efecto de los extractos o únicamente por efecto de la difusión del líquido.

En primer lugar, se debe tener en cuenta la concentración bacteriana a la que se trabaja, que se calcula contando las diluciones de bacteria sembradas en placa. A continuación, se muestra un ejemplo de la siembra de diluciones de *S. aureus* para su recuento.

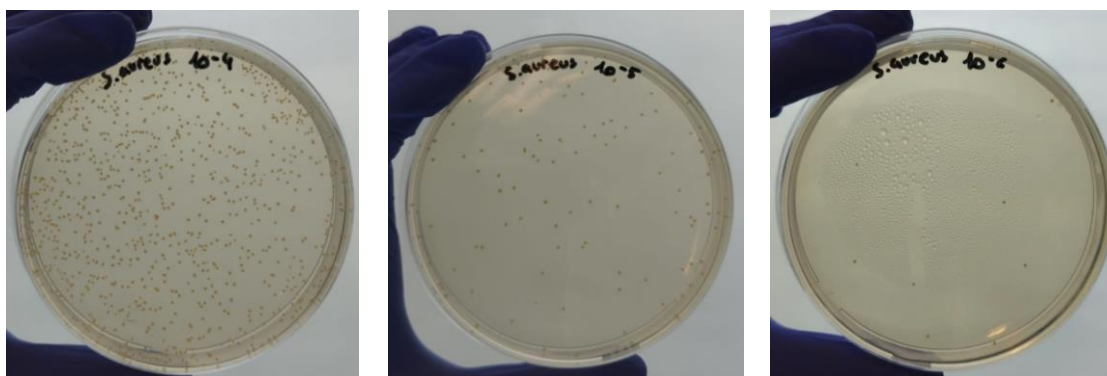


Figura 38. Placas para el recuento de bacterias *S. aureus*.

4.3.1 *Escherichia coli*

La especie *Escherichia coli* puede provocar infecciones por contacto con materia fecal y ocurre en alimentos como productos cárnicos, leche, queso, etc (Martínez, 2020).

Para *E. coli* se hicieron tres pruebas en días diferentes, sin embargo, una de las repeticiones se descartó porque la concentración de bacterias era insuficiente y no se consiguió su crecimiento en césped, por lo que los halos de inhibición no se podían observar correctamente. A continuación, se pueden observar los datos obtenidos de las otras dos pruebas restantes.

Tabla 4. Porcentaje de muestras con inhibición contra *E.coli* (%).

	Prueba 1	Prueba 2
Conc. bacterias (ufc/ml)	2,29E+08	4,06E+08
Vísceras	33,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Patas y pinzas	0,0 ± 0,0	22,2 ± 19,2
Caparazón	55,6 ± 38,5	66,7 ± 0,0
Entero	0,0 ± 0,0	22,2 ± 19,2

No se observa relación entre la concentración de bacterias y el efecto antimicrobiano encontrado. Cabe destacar que el caparazón es la fracción de la que más muestras han mostrado halos de inhibición. Sin embargo, los resultados no se consideran concluyentes porque no hay repetibilidad entre las pruebas.

Por otra parte, en casos puntuales se han encontrado inhibiciones que pueden dar a pensar que sí existe poder antimicrobiano en las muestras. A continuación, se muestran algunos ejemplos de los halos de inhibición encontrados.

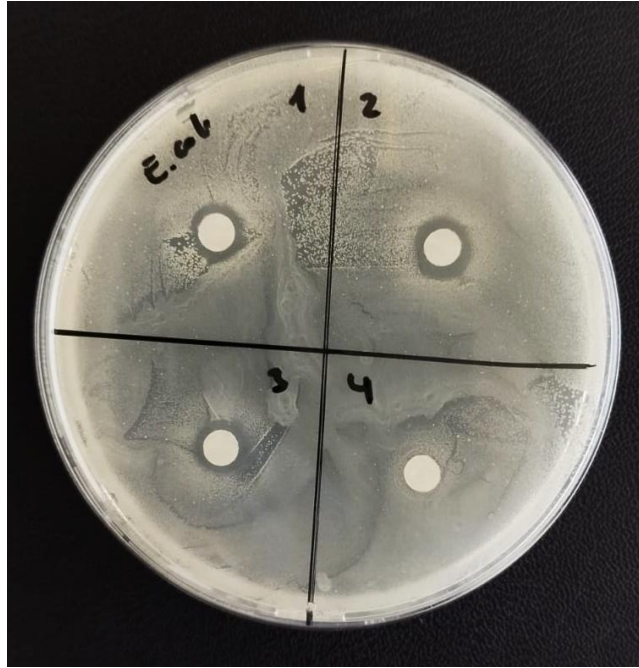


Figura 39. Muestras de vísceras (1,2,3) y patas (4) en siembra de *E.coli*.

En algunos casos, como el que se muestra a continuación, se observa algo de inhibición. Sin embargo, a pesar de observarse un halo, hay crecimiento dentro de él. Esto puede deberse a que la muestra se ha difundido demasiado rápido al pipetearla en el papel de filtro y, por tanto, en esa zona queda menos concentración de los posibles compuestos antimicrobianos.

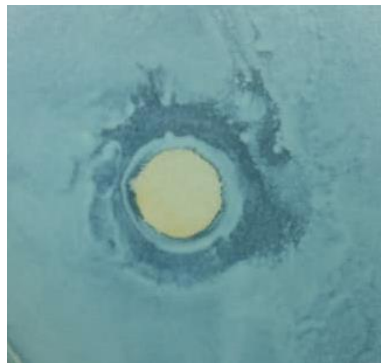


Figura 40. Inhibición de patas en prueba 2.

4.3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una de las principales bacterias implicadas en las enfermedades alimentarias, debido a su capacidad para producir toxinas (Martínez, 2020). A continuación, se muestran los porcentajes de muestras de cangrejo en los que se ha encontrado inhibición contra dicha bacteria.

Tabla 5. Porcentaje de muestras con inhibición contra *S.aureus* (%).

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Conc. bacterias (ufc/ml)	7,81E+07	1,04E+08	2,02E+08
Vísceras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Patas y pinzas	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Caparazón	55,6 ± 50,9	33,3 ± 0,0	66,7 ± 33,3
Entero	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Para *S. aureus* únicamente se encontró inhibición a las 24 horas con los extractos de caparazón, por otra parte, no se observa relación entre la concentración de bacterias con la que se trabajó y la inhibición obtenida.

A continuación, se pueden ver imágenes de algunos de los halos de inhibición observados.

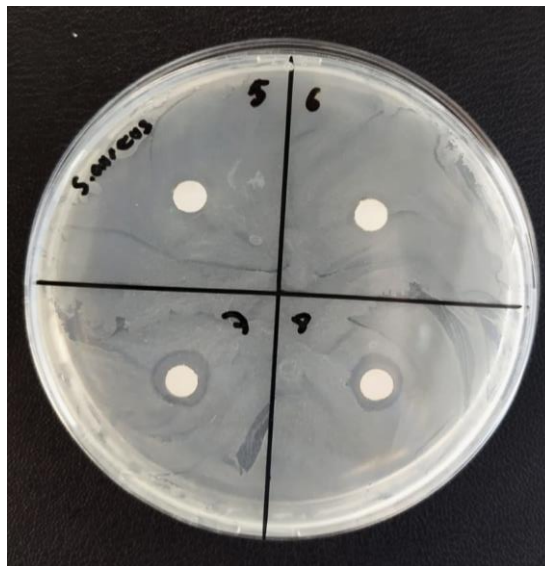


Figura 44. Muestras de patas (5,6) y de caparazón (7,8) en siembra de *S.aureus*.



Figura 41. Muestra de caparazón en prueba 1

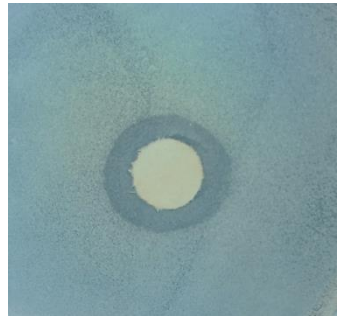


Figura 42. Muestra de caparazón en prueba 1

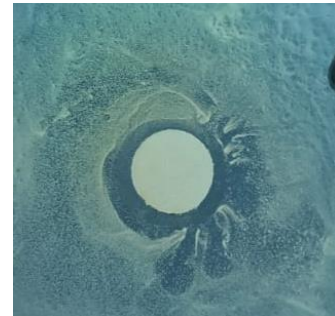


Figura 43. Inhibición de caparazón en prueba 3

Se debe mencionar que para algunas de las otras muestras se observaron halos, aunque dentro de ellos había algo de crecimiento bacteriano, por lo que no se ha considerado que estas muestras tengan inhibición contra *S.aureus*. A continuación, se muestran algunos ejemplos de este tipo de halos.

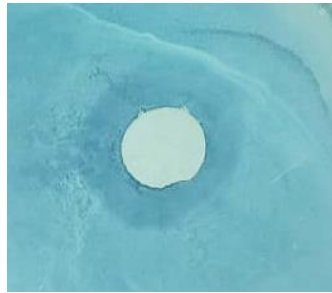


Figura 45. Inhibición de vísceras en prueba 3



Figura 46. Inhibición de patas en prueba 2

Estos halos dan lugar a pensar que en algún momento ha habido inhibición contra la bacteria pero que, con el paso de las horas, ha conseguido crecer o que la concentración de muestra es insuficiente.

Por otra parte, aunque no se ha observado inhibición para ninguna de las muestras de patas, en uno de los estudios que se dio por inválido por el desplazamiento de los discos, sí que se pudo observar. En este caso, uno de los discos con muestra se desplazó, uniéndose con otro de ellos y mostrando entonces un halo de inhibición que no se había observado en ninguna de las muestras por separado.

Por ello, se puede pensar que incrementando la concentración de estas muestras se podría conseguir inhibir el crecimiento de *S.aureus*.



Figura 47. Discos con muestras de patas desplazados.

4.3.3 *Pseudomonas fragi*

Con respecto al género *Pseudomonas*, es uno de los principales causantes de las infecciones alimentarias. Son microorganismos resistentes a gran parte de los antibióticos por su capacidad para desarrollar resistencia adquirida (Remache Tixe, 2020).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la inhibición de cada fracción de cangrejo contra esta bacteria.

Tabla 6. Porcentaje de muestras con inhibición contra *P.fragi* (%).

	Prueba 1	Prueba 2
Conc. bacterias (ufc/ml)	1,68E+09	1,37E+09
Vísceras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Patas y pinzas	22,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Caparazón	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Entero	0,0 ± 0,0	11,1 ± 19,2

Sólo se observó inhibición en algunos casos puntuales, no hubo repetibilidad en los resultados, por lo que no se puede considerar que ninguna de las fracciones tuviera efecto inhibitorio.

Sin embargo, en todas las fracciones se han visto halos que pueden dar a pensar que quizá, incrementando la concentración de muestra, se habría encontrado inhibición. A continuación, se muestran algunos ejemplos de halos que se podría considerar inhibición parcial.

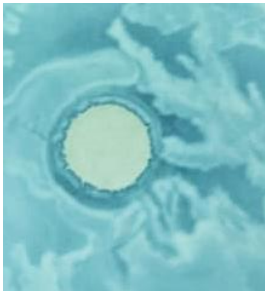


Figura 48. Inhibición de vísceras en *P.fragi*

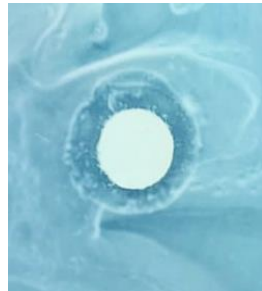


Figura 49. Inhibición de patas en *P.fragi*

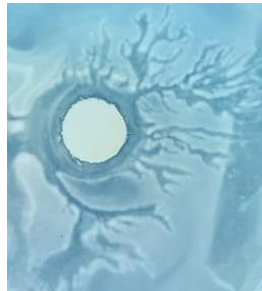


Figura 50. Inhibición de caparazón en *P.fragi*

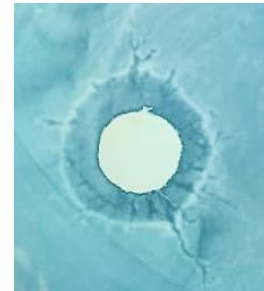


Figura 51. Inhibición de entero en *P.fragi*

4.3.4 *Listeria innocua*

Listeria innocua es un miembro del género *Listeria*, que incluye otras especies como *Listeria monocytogenes*. Además, es una bacteria bastante resistente contra tratamientos antimicrobianos, ya que tiene la capacidad de crear biofilms (Martínez, 2020). En este caso estudiaremos *L. innocua*, que a diferencia de *L. monocytogenes*, es una especie no patógena.

Tabla 7. Porcentaje de muestras con inhibición contra *L.innocua* (%).

	Prueba 1	Prueba 2
Conc. bacterias (ufc/ml)	7,77E+08	8,61E+08
Vísceras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Patas y pinzas	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Caparazón	33,3 ± 0,0	33,3 ± 33,3
Entero	11,1 ± 19,2	22,2 ± 19,2

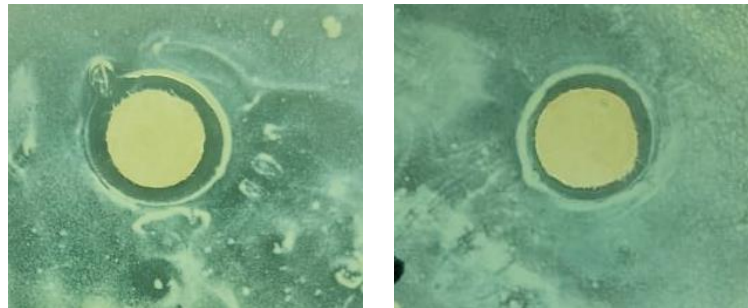


Figura 52. Halos de inhibición de caparazón (izq) y entero (dcha) en *E. coli*

En general, no se consiguieron siembras uniformes, por lo que no se pudieron ver halos claros. Sin embargo, aunque no se consideraron inhibición, se encontraron halos, como los mostrados a continuación, que podrían considerarse inhibición parcial.

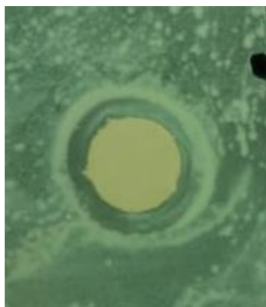


Figura 53. Inhibición de vísceras en *L.innocua*

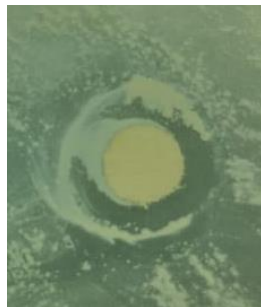


Figura 54. Inhibición de patas en *L.innocua*

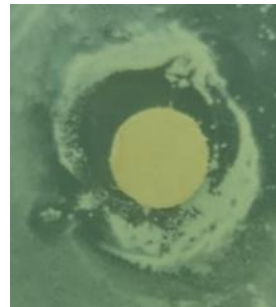


Figura 55. Inhibición de caparazón en *L.innocua*

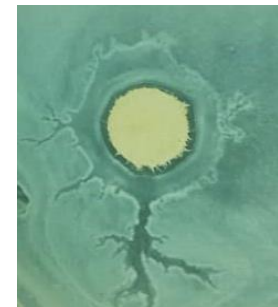


Figura 56. Inhibición de entero en *L.innocua*

Teniendo en cuenta la variabilidad de los resultados, no se considera concluyente el estudio de las propiedades antimicrobianas para ninguna de las bacterias estudiadas. Sin embargo, los halos de inhibición encontrados, que se muestran en las distintas imágenes expuestas anteriormente, dan lugar a pensar que cambiando algunas condiciones del estudio se podría encontrar efecto inhibitorio.

Aunque hay algunos estudios en los que se ha encontrado inhibición contra *E.coli* y *S.aureus* en el quitosano obtenido del caparazón del cangrejo (Islama et al., 2011) o, incluso en extractos metanólicos de hemolinfa de cangrejo (Ravichandran et al., 2010), en este caso no se ha encontrado inhibición clara contra estas bacterias. Por otra parte, cabe mencionar que en este tipo de estudios el método de extracción ha sido diferente, por ejemplo para la extracción de quitosano se llevaron a cabo los procesos de desmineralización, desproteinización y desacetilación previos a la extracción del compuesto.

5. CONCLUSIONES

A partir de las diferentes fracciones de *Liocarcinus depurator* estudiadas (vísceras, patas y pinzas, caparazón y cangrejo entero) se puede concluir que, utilizando etanol al 75% como solvente, los mayores rendimientos de extracción se dieron en la fracción de vísceras, aunque la diferencia de rendimiento con el cangrejo entero no es significativa. Sin embargo, comparando los resultados con otros solventes, se obtuvieron mejores rendimientos de extracción en estas fracciones al utilizar etanol al 50%.

Respecto a la capacidad antioxidante, si se tiene en cuenta el volumen de extracto obtenido se encuentran mejores resultados para el caparazón de cangrejo, sin embargo, debido al bajo rendimiento de extracción de esta fracción, al expresar los resultados en base al extracto seco de la muestra, se encuentran mejores resultados en las vísceras y el cangrejo entero.

Las vísceras mostraron una capacidad antioxidante y una cantidad de polifenoles significativamente mayor que el resto de las fracciones. Cabe mencionar que utilizando etanol al 50% la diferencia entre la capacidad antioxidante de las vísceras y del cangrejo entero es insignificante, por lo que utilizando el cangrejo entero se podría conseguir un efecto similar, pero con un ahorro de coste y tiempo en el procesamiento del cangrejo.

Por otra parte, se concluye que a una concentración de 100 mg/ml, las muestras no presentaron actividad antimicrobiana contra ninguna de las bacterias estudiadas. Aunque en general se observó mayor inhibición en las muestras de caparazón, los resultados no se consideran concluyentes debido a la variabilidad entre pruebas.

Los resultados obtenidos dan lugar a pensar que hay una cierta actividad antimicrobiana en los extractos, por lo que en el proyecto podría continuar con un estudio más específico de dicha propiedad, aumentando quizá la concentración de los extractos y haciendo un seguimiento del efecto inhibitorio a diferentes horas de incubación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abelló, P. (1986). Anàlisi de les poblacions de crustacis decàpodes demersals al litoral català: Aspectes biològics del braquiür *Liocarcinus depurator*.
<https://digital.csic.es/handle/10261/117102>
- Affes, S., Aranaz, I., Hamdi, M., Acosta, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Heras, Á., Nasri, M., & Maalej, H. (2019). Preparation of a crude chitosanase from blue crab viscera as well as its application in the production of biologically active chito-oligosaccharides from shrimp shells chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 558-569.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.116>
- Allen, W. V. (1971). Amino Acid and Fatty Acid Composition of Tissues of the Dungeness Crab (Cancer magister). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28(8), 1191-1195.
<https://doi.org/10.1139/f71-175>
- Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Calderón, J., Marroquin, A., Luviano, L., Maqueda, V., Marín, E., & Calderón, A. (2019). Sonido, Ultrasonido y Cavitación. 13(4).
- El Aoussimi, A. (2021). Estudio y caracterización de los descartes de pesca de arrastre de fondo en el Golfo de Valencia [Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València].
<https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/176011>
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., López-García, G., Cilla, A., & Alegría, A. (2019). In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. *Food Research International*, 120, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.029>
- Hajji, S., Ghorbel-Bellaaj, O., Younes, I., Jellouli, K., & Nasri, M. (2015). Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 167-173.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.027>
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Han, Y., Ma, Q., Wang, L., & Xue, C. (2012). Extraction of astaxanthin from *Euphausia pacific* using subcritical 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane. *Journal of Ocean University of China*, 11(4), 562-568. <https://doi.org/10.1007/s11802-012-1948-0>
- Ideia, P., Pinto, J., Ferreira, R., Figueiredo, L., Spínola, V., & Castilho, P. C. (2020). Fish Processing Industry Residues: A Review of Valuable Products Extraction and Characterization Methods. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3223-3246.
<https://doi.org/10.1007/s12649-019-00739-1>

- Islama, M. M., Masumb, S. M., Mahbuba, K. R., & Haquea, M. Z. (2011). Antibacterial activity of crab-chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2(04), 63-66.
- Kelleher, K. (2008). Descartes en la pesca de captura marina mundial. Una actualización. 470. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/aa8f9a71-b424-5246-8e8e-026e33f406a0>
- Lavilla, I., & Bendicho, C. (2017). Chapter 11—Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction. En H. Dominguez González & M. J. González Muñoz (Eds.), *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 291-316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5>
- Londoño, J. A. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *Desarrollo y transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Martínez, L. D. (2020). Principales bacterias transmitidas por alimentos, preservación y control. En *Agrobiología. Una visión general y sus aplicaciones*. (pp. 56-77).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (s. f.). Guía de especies marinas desembarcadas en puertos españoles: Crustaceos, Moluscos y Equinodermos. Recuperado 25 de mayo de 2023, de <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-buenas-practicas/buenas-practicas-sobre-alimentacion/guia-peces3.aspx>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2021). Plan nacional para la reducción de las capturas accidentales en la actividad pesquera.
- Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030. (2021). Estrategia de desarrollo sostenible 2030. <https://www.mdsocialesa2030.gob.es/agenda2030/documentos/eds-cast-acce.pdf>
- Montaño-Pérez, K., & Vargas-Albores, F. (2002). Péptidos antimicrobianos: Un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, 27(1), 21-27.
- Nguyen, T. T., Barber, A. R., Corbin, K., & Zhang, W. (2017). Lobster processing by-products as valuable bioresource of marine functional ingredients, nutraceuticals, and pharmaceuticals. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0157-5>
- Northoff, E. (2009, septiembre 23). FAO - Noticias: 2050: un tercio más de bocas que alimentar. <https://www.fao.org/news/story/es/item/35675/icode/>
- Olatunde, O. O., Benjakul, S., & Yesilsu, A. F. (2020). Antimicrobial Compounds from Crustaceans and Their Applications for Extending Shelf-Life of Marine-Based Foods. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(8), 629-646. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_8_06
- Ozogul, F., Cagalj, M., Šimat, V., Ozogul, Y., Tkaczewska, J., Hassoun, A., Kaddour, A. A., Kuley, E., Rathod, N. B., & Phadke, G. G. (2021). Recent developments in valorisation

- of bioactive ingredients in discard/seafood processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 559-582. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.007>
- Pereira-Malacara, K. D., Ortíz-Urenda, M. Á., Arenas-Arrocena, M. C., Pereira-Malacara, K. D., Ortíz-Urenda, M. Á., & Arenas-Arrocena, M. C. (2022). Efectividad antimicrobiana del quitosano como recubrimiento de suturas en cirugía oral y maxilofacial: Una revisión sistemática. *Odontoestomatología*, 24(40). <https://doi.org/10.22592/ode2022n40e317>
- Puente, K. (2021). Análisis del Método de Extracción de Astaxantina a partir del Caparazón de Cangrejos: Una Revisión Sistemática de la Literatura Analysis of the Astaxanthin Extraction Method from the Crab Shell: a Systematic Review of the Literature. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35643.54565>
- Ravichandran, S., Sivasubramanian, K., & Anbuhezian, R. M. (2010). Antimicrobial activity from the haemolymph of the crab *Ocypode macrocera* (H. Milne-Edwards 1852). *World Appl Sci J*, 11(5), 578-581.
- Real Decreto 560/1995, de 7 de abril, por el que se establece las tallas mínimas de determinadas especies pesqueras, Pub. L. No. Real Decreto 560/1995, BOE-A-1995-8639 10552 (1995). <https://www.boe.es/eli/es/rd/1995/04/07/560>
- Remache Tixe, J. M. (2020). Evaluación de desinfectantes para la inhibición de microorganismos *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus* [BachelorThesis, Quito: UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22043>
- Rojano, B. A. (1997). Oxidación de lípidos y antioxidantes. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11050>
- Shavandi, A., Hou, Y., Carne, A., McConnell, M., & Bekhit, A. E. A. (2019). Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. En *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 87, pp. 187-254). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.08.001>
- Wang, W., & Peng, Y. (2023). Mechanochemical organic synthesis in a rotary evaporator beyond conventional application: Proof-of-concept reactions. *Synthetic Communications*, 53(9), 625-639. <https://doi.org/10.1080/00397911.2023.2188463>
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: An Overview. *Marine Biotechnology*, 20(2), 118-130. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3>
- Zapata Pérez, M. P. (2018). Estudio del efecto de un solvente iónico sobre las fibras de quitina. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/4900