



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TFG Grado de Biotecnología

Estudio de nuevos extractos naturales para su incorporación en
biopolímeros para el futuro desarrollo de films activos/

Study of new natural extracts for their incorporation in
biopolymers for the future development of active films

Tutora: Almeida e Silva, Filomena Augusta

Estudiante: Fraca Carriquiri, Alberto

Curso 2019/2020

DEPARTAMENTO/CENTRO/INSTITUCIÓN RESPONSABLE (donde se realizara el TFG):

Departamento de Química Analítica - Grupo GUIA

LUGAR PREVISTO PARA LA REALIZACIÓN DEL TFG: Facultad de Veterinaria y laboratorios del grupo GUIA (EINA e I3A)

ANEXO IV

AUTORIZACIÓN DEL DEPÓSITO DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA (VISTO BUENO DIRECTORES/PONENTES)

ESTUDIANTE

Apellidos: Fraca Carriquiri

Nombre: Alberto

TITULACIÓN: Grado en Biotecnología

TÍTULO DEL TRABAJO: (en castellano y en inglés)

Estudio de nuevos extractos naturales para su incorporación en biopolímeros para el futuro desarrollo de films activos

Study of new natural extracts for their incorporation in biopolymers for the future development of active films

Dpto. Responsable de la propuesta: Departamento de Química Analítica

- Los abajo firmantes, dan su visto bueno y autorizan el depósito de la memoria correspondiente al Trabajo Fin de Grado arriba indicado, realizado bajo nuestra tutela y que se ajusta a los criterios que marcan la normativa y la Guía Docente correspondiente.

- Y autorizan su publicación en el repositorio institucional de la UZ. SI NO

Zaragoza, 13 de Julio de 2020

ALMEIDA E SILVA
FILOMENA
AUGUSTA -
Y3334657Q

Formado digitalmente por ALMEIDA E SILVA, FILOMENA AUGUSTA - Y3334657Q
Número de identificación IRE: 0421,
serieRutubae-IDCS-Y3334657Q,
identificado por FILOMENA AUGUSTA,
ALMEIDA E SILVA, en ALMEIDA E SILVA, FILOMENA AUGUSTA - Y3334657Q
Fecha: 2020.07.13 21:00:48 +0200'

Fdo.: Filomena Silva
Director

Fdo.:
Director

Fdo.:
Ponente

(Esta autorización deberá ser firmada por el director o directores del Trabajo Fin de Grado, así como el ponente si lo hubiere)

Índice

1. **Abstract:** página 1
2. **Introducción:**
 - 2.1. **Films de plástico:** página 2
 - 2.2. **Biopolímeros:** página 2
 - 2.3. **Films activos:** página 5
 - 2.4. **Aceites esenciales:** página 6
3. **Objetivos:** página 9
4. **Materiales y métodos**
 - 4.1. **Materiales:** página 9
 - 4.2. **Determinación de la actividad antioxidante:** página 9
 - 4.3. **Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana:** página 12
 - 4.4. **Preparación de los complejos de inclusión de tomillo rojo con ciclodextrina:** página 14
 - 4.5. **Preparación de films:** página 14
5. **Resultados**
 - 5.1. **Actividad antioxidante:** página 15
 - 5.2. **Actividad antimicrobiana:** página 18
 - 5.3. **Resultados de los films:** página 18
6. **Comparación de resultados:** página 22
7. **Conclusión:** página 22
8. **Agradecimientos:** página 23
9. **Bibliografía:** página 23

1. Abstract

Active packaging consists in the incorporation of active agents within the packaging material to obtain safer, more quality foods with longer shelf-life. This is attained with the incorporation of compounds (active agents) of synthetic origin or natural-derived such as plant extracts, essential oils, polymeric substances, phenolic compounds, among others, with antimicrobial, antioxidant or absorber/emitter capacities. Nowadays, these active agents are preferably incorporated in biodegradable polymers instead of plastic materials due to the heavy pollution produced by the use of plastic materials. In this work, we studied the antioxidant and antimicrobial properties of essential oils and natural extracts, to later incorporate them in cellulose-derived biopolymers so we could create active films with that active agents. For this purpose, essential oils of red thyme and mustard and plant extracts of purple echinacea, mother tincture echinacea and alfalfa, were our candidates to the experiment, that were submitted to antioxidant activity studies like 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging, as well as antimicrobial susceptibility studies by the determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC). Then we incorporate them in cellulose-derived biopolymers. Our results showed that red thyme essential oil is the best within our candidates for making active films, due to having an IC50 of 16 mg/g and its MIC and MBC values of being inferior to 1 mg/mL values for *E. coli* and *L. monocytogenes*. However, when incorporated on carboxymetil cellulose polymer, its miscibility with the polymer was not ideal and worse than purple equinacea's one, which lead to the incorporation of thyme oil in cyclodextrin inclusion complexes to improve its aqueous solubility. Sodium carboxymetil cellulose dries better, being less stucked to the plate. We conclude that a sodium carboxymetil cellulose film with red thyme's essential oil has the best properties so has potential to be a good active package.

El envasado activo consiste en la incorporación de agentes activos en el material de envase para obtener alimentos más seguros, de mayor calidad y con mayor vida útil. Esto se consigue con la incorporación de compuestos (agentes activos) de origen sintético o natural como extractos vegetales, aceites esenciales, etc; con capacidades antimicrobianas, antioxidantes, de absorción o emisión. Estos agentes son preferiblemente incorporados en polímeros biodegradables en vez de plásticos debido a la extensa polución provocada por su uso. En este trabajo hemos estudiado las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales y extractos naturales, para incorporarlos en biopolímeros celulósicos y así crear films activos. Para ello usamos aceites de tomillo rojo y mostaza y extractos de equinacea purpúrea, equinacea angustifolia y alfalfa, que fueron sometidos a estudios de determinación de actividad antioxidante, como el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y la captación de radicales libres, así como la evaluación de su susceptibilidad antimicrobiana mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Bactericida (MBC). Después, los más activos se incorporaron en los biopolímeros celulósicos. Nuestros resultados mostraron que el aceite esencial de tomillo era el mejor para realizar films activos, debido a tener una IC50 de 16 mg/g y valores de MIC y MBC inferiores a 1 mg/mL (0,25 mg/mL y 0,5 mg/mL para ambas MIC y MCB en *E. coli* and *L. monocytogenes* respectivamente); sin embargo, su miscibilidad con la carboximetil celulosa era problemática y peor que la de equinacea purpúrea; esto llevó a su incorporación en complejos de inclusión con ciclodextrina para mejorar la miscibilidad. La carboximetilcelulosa de sodio se secaba mejor, estando menos pegada a la placa. Concluimos que el film de carboximetilcelulosa de sodio con aceite esencial

de tomillo rojo tiene las mejores propiedades, teniendo potencial para ser un buen material para el envasado activo.

2.Introducción

2.1. Films de plástico

Según la Universidad de Cardiff (1) la cantidad de plástico en la superficie terrestre se aproxima a los 6300 millones de toneladas, incluyendo todas las formas posibles que puede adoptar el plástico, entre ellos los films. A parte de que este no es degradable biológicamente, está empezando a afectar no solo físicamente a muchas especies (generalmente marinas), sino que ya empieza a introducirse en las cadenas tróficas con los consiguientes efectos tóxicos que esto conlleva, además de facilitar la conjugación entre bacterias filogenéticamente distintas ayudando así al aumento de bacterias resistentes a antibióticos; también se registra daño celular en cultivos de microbios acuáticos y una inmensa cantidad de aditivos tóxicos en muchos plásticos.

Centrándonos en los films plásticos (2), se ha observado que contienen sustancias tóxicas como resinas, ceras como la rosina y aceites como la parafina. Por otra parte, los adyuvantes de estos films poseen cantidades significativas de metales pesados (destacando el níquel, hierro, cromo y manganeso). Además, son ingredientes comunes de estos films los aditivos lubricantes como el metilpalmitato y el metilestereato, siendo el segundo cancerígeno, los plastificadores como el Ascabiol que puede causar daño em embarazadas o los estabilizadores como Chissonox 206 y Caradate 30, siendo que el primero es cancerígeno y el segundo provoca calambres abdominales. Por estos contenidos no recomendables para la salud humana es necesario buscar una alternativa más natural al uso de plásticos, como es el caso de los biopolímeros.

2.2. Biopolímeros

Los materiales plásticos se preparan por polimerización de monómeros hidrocarbonados o similares de diferentes materiales; hay que buscar sustitutos para los materiales basados en petróleo, por lo que se propone el uso de materiales biodegradables a base de polímeros conseguidos de recursos renovables (3).

Estos se pueden clasificar en tres grupos en base a su origen: biopolímeros agrícolas, de fermentación bacteriana y sintetizados químicamente.

Biopolímeros de fermentación bacteriana, como los polihidroxicanoatos (PHA).

Los polihidroxicanoatos forman parte del grupo de polímeros de hidroxialcanoatos naturalmente sintetizados por bacterias a partir de material crudo agrario. Su función principal es la de almacenamiento de grupos carbonados y energía, conteniendo de 600 a 35000 repeticiones de monómeros. Se pueden clasificar en PHA de longitud corta (C3–5), media (C6–14) o larga (> C14). Más de 300 microorganismos sintetizan PHA, pero solo unos pocos sirven para la producción de bioplásticos, destacan algunas bacterias Gram negativas (las más utilizadas a escala industrial) como *Wautersiaeutropha*, *Methylobacterium Organophyllum*, *Pseudomonas Oleovorans* y recombinantes de *Escherichia coli*, así como también se reportan algunas Gram positivas de los géneros *Clostridium*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Bacillus* (4). Las propiedades de

los PHA incluyen resistencia a la degradación hidrolítica, la insolubilidad en agua, la resistencia a rayos UV y su ausencia de toxicidad.

Uno de los grupos de PHA más estudiados es el poli(3-hidroxiбутirato) (PHB), descubierto en 1926 por Lemoine usando la bacteria *B. megaterium*. El PHB es un poliéster lineal de ácido D(-)-3-hidroxiбутirico con un peso molecular variable. Tiene baja viscosidad y es biocompatible, lo que lo hace útil para aplicaciones industriales y alimentarias.

Biopolímeros sintetizados químicamente, como el poliácido láctico (PLA).

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiпроpanoico) es una molécula quiral que existe como dos enantiómeros, L- y D-, que difieren en su efecto en la luz polarizada. El ácido poliláctico se puede producir de dos formas: para biomedicina se recurre a la ruta de condensación de ácido láctico por fermentación de maíz; para otras aplicaciones, se recurre a la polimerización por apertura de anillo de ciclo lactido. PLA es un polímero moldeable, termoplástico y poseedor de mucha fuerza. Es un polímero muy versátil pudiendo ser procesado por moldeo por inyección, moldeo por soplado o formación de films. Aunque sea fácil su manufactura a nivel industrial, los films de PLA son bastante frágiles, no obstante esto se puede mejorar con la combinación de otros compuestos.

Biopolímeros derivados de polisacáridos y proteínas

Los polisacáridos son polímeros ampliamente disponibles, formados por uniones glicosídicas de monosacáridos. En plantas se encargan de formar depósitos energéticos, así como barreras físicas permeabilizadas para limitar la disponibilidad de O₂. Los polisacáridos más usados para la producción de biopolímeros son el almidón, los carragenanos y la goma natural.

- El almidón es el polisacárido natural más común, empaquetados en gránulos. Está compuesto de uniones repetitivas de glucosa, linealmente formando la amilosa (unión O-glicosídica 1-4) y lateralmente la amilopectina (unión O-glicosídica 1-6). Este polímero es insoluble en agua fría, pero con aplicación de calor los gránulos se liberan formando una gelatina hidrosoluble.
- Los carragenanos son polisacáridos lineales extraídos de algas rojas marinas, formados por enlaces alternados (1 → 3)- β-D-galactopiranososa y (1 → 4) α-D-galactopiranososa y una composición de 22-35% grupos sulfato.
- La goma natural, formada por unidades de isoprenos unidos en configuración *cis*-1,4, se obtienen del árbol de la goma. Posee propiedades de resiliencia, elasticidad, resistencia a impactos, dispersión térmica eficiente y maleabilidad a bajas temperaturas.

Las proteínas son macromoléculas compuestas de cadenas de aminoácidos, abundantes en los seres vivos. Nos interesan las que tienen función estructural como el colágeno (triples hélices, compatible con otros bioplímeros), la queratina (naturalmente insolubles pero de resistencia), la zeína (45–50% del maíz, insoluble en agua salvo en presencia de alcohol, detergentes o urea) y el gluten (glicoproteína soluble en alcoholes acuosos que dan viscosidad y elasticidad).

Biopolímeros derivados de la celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante (ya que no solo plantas lo producen, sino también hongos, amebas, bacterias y animales marinos). Este polímero está basado en uniones encadenadas de D-anhidroglucosa en unión (1 → 4)-β-D-glicosídica. Es altamente cristalina e insoluble, formado por nanofibrillas de un tamaño estimado de 3-30 nm. La lignina es una clase de polímero orgánico complejo estructural en los tejidos de soporte de plantas vascularizadas. En los últimos años, se han desarrollado nuevos biopolímeros derivados de la celulosa con mejores propiedades a nivel de solubilidad en agua o plasticidad como es el caso de la carboximetil celulosa o la hidroxietil celulosa.

- La carboximetil celulosa de sodio es un derivado de la celulosa utilizada en la parte experimental de este trabajo. Tiene la misma composición que la celulosa con niveles variables de sustituciones -OCH₂COO⁻ Na⁺; como hay tres grupos OH por cada seis carbonos, el grado máximo de sustitución es 3 (el nuestro tiene grado 1.2). Tiene una masa molecular de 250 kDa, y se ha estudiado como compuesto para el electrodo negativo de las pilas (5) y como estabilizador para nanopartículas de hierro acomplexadas con paladio (6).
- La 2-hidroxietil celulosa con sustituciones de hidroxietilos en el carbono 2, es otro derivado celulósico empleado en el trabajo. Es un polímero de 90kDa soluble en agua (7). Utilizado en la industria cosmética y farmacéutica, es normalmente usado como estabilizador y espesante, así como aislante en componentes electrónicos dando el menor valor de conductividad iónica.

A diferencia de los plásticos, los biopolímeros tienen muchas posibilidades de reciclado, compostabilidad e incluso biodegradabilidad en suelo y agua (8). Es cierto que estos podrían acabar tirados por la naturaleza (lo cual tendría menor impacto ambiental al ser biodegradables) o en vertederos (lo que sí tendría impacto ambiental debido a que la materia orgánica en los vertederos acelera la producción de metano y CO₂), pero serían perfectos para nuevas iniciativas como en compostaje industrial o el casero (siendo definido como “la descomposición biológica controlada de desperdicios orgánicos bajo condiciones predominantemente aerobias y permitiendo condiciones termofílicas como resultado de calor exotérmico generado biológicamente”). Como la mayoría de los biopolímeros son químicamente menos resistentes que los plásticos convencionales se requiere menos energía química o termoquímica para devolverlos a sus formas oligoméricas o monoméricas. Al ser producidos por policondensación, se puede realizar la reacción reversa para recuperar monómeros valiosos. Por último, también es conocida su capacidad para generar biogás ya sea para combustión térmica o generación energética sin emisiones contaminantes.

Lamentablemente estos materiales suelen ser más débiles física y mecánicamente además de no ejercer correctamente de barrera a gases y vapor de agua cuando usados como material de envase; por ello, se buscan procesos para mejorar sus características mediante la adición de compuestos más resistentes o flexibles. De igual manera se da mucha importancia a la mejora de las propiedades antioxidantes, antimicrobianas, etc, con la producción de envases activos: es decir, añadir a estos biopolímeros otros compuestos naturales que ayuden a aumentar dichas capacidades.

2.3. Envases activos

El empaquetado es crucial en el comercio alimentario (9). La función principal es la de ejercer de contenedor y barrera pasiva, evitando que el alimento se dañe, protegerlo de la manipulación y mantenerlo separada de sustancias volátiles, polvo, luz, oxidación y contaminaciones químicas o microbiológicas. No obstante, algunos productos frescos presentan una vida útil muy corta por lo que es necesario que el envase no ejerza sólo de barrera pasiva pero que también interactúe con el alimento de forma a mantener su seguridad química y biológica, además de alargar la vida útil de alimentos muy perecederos. Este tipo de envases se denominan envases activos.

Los envases activos son una innovadora forma de prolongar la vida útil de los productos mientras conservan su calidad, seguridad e integridad. Se definen como un sistema de empaquetado que interactúa con los alimentos de manera deliberada, incorporando componentes que liberaran o absorben sustancias tanto del ambiente del alimento como del propio alimento empaquetado.

Estos tipos de envases se pueden dividir en absorbentes o liberadores que protegen el alimento de la humedad, gases como el dióxido de carbono o oxígeno, etileno, contaminación microbiana o degradación por procesos de oxidación. La adición de estos componentes, designados agentes activos, a los envases es una alternativa a su adición directa al alimentos, permitiendo así disminuir la cantidad necesaria de estos agentes activos y la obtención de mejores resultados que añadiendo estos agentes directamente.

Las reacciones oxidativas (10) son las responsables de la disminución de los valores nutricionales de los alimentos debido a la oxidación de ácidos grasos, vitaminas, proteínas y lípidos. Además, las reacciones de oxidación resultan en la aparición de malos sabores y olores y en el cambio de color de los alimentos. Para reducir estas reacciones de oxidación se añaden antioxidantes a los alimentos directamente o se incorporan en los materiales de envase, estando demostrado que los antioxidantes son más efectivos cuando integrados en los envases en vez de añadidos a los alimentos, por lo que estos compuestos se suelen incorporar en bolsitas, almohadillas o etiquetas, o incorporados a las monocapas o multicapas del material de envase.

Estos compuestos antioxidantes se pueden clasificar según el mecanismo en primarios, también llamado captadores (“scavengers”) de radicales libres; o secundarios o preventivos, como quelantes metálicos, absorbedores de UV y oxígeno, etc. Los secuestradores de radicales libres son la clase más estudiada de antioxidantes, ya que pueden donar hidrógenos para reaccionar con estos radicales y formar moléculas estables que no pueden realizar o propagar las reacciones de oxidación no deseadas. Los más destacados son las vitaminas vegetales, el glutatión, los polifenoles y los carotenos, así como la melatonina y el ácido ascórbico, siendo algunos de estos compuestos componentes de extractos vegetales y aceites esenciales.

Además de la oxidación química, los microorganismos que viajan en nuestra piel, micropartículas aéreas o incluso en la propia superficie del alimentos y pueden colonizar las zonas más expuestas de los alimentos, lo que resulta en la metabolización de los distintos componentes nutricionales como la glucosa o la fructosa en ácidos que afectan de gran manera al sabor, olor e incluso seguridad de los alimentos contaminándolos con microorganismos patógenos que pueden causar en los humanos dolencias estomacales e incluso enfermedades más graves. Dado que no se puede añadir fármacos a los alimentos (por problemas de resistencias a antimicrobianos y temas de ética alimentaria, lo más común es alterar el medio del alimento,

como en las conservas, el envasado al vacío o en atmósfera modificada, y la adición de distintos conservantes.

Los agentes activos más estudiados son los antimicrobianos: se han utilizado iones metálicos (oro, plata, platino o cobre), óxidos de metal (TiO_2 , ZnO , MgO), aceites esenciales (tomillo, orégano, pimiento, clavo, cidra), extractos vegetales (semillas de uva, té verde), polisacáridos (chitosan), componentes de aceites esenciales como el timol, carvacrol y cinamaldehído, péptidos (nisina, lactoferrina), enzimas (peroxidasa, lisozima), agentes antimicrobianos sintéticos (sales cuaternarias de amonio, ácido propiónico) e incluso gases como el dióxido de carbono (CO_2).

De todos los agentes activos descritos, los extractos naturales y los aceites esenciales son de los más usados

2.4. Aceites esenciales y extractos naturales

Los aceites esenciales (11) son líquidos, volátiles, transparentes y, generalmente, incoloros, siendo miscibles en lípidos y solventes orgánicos. Son mezclas de compuestos caracterizadas por un fuerte olor que son obtenidas de plantas por hidrodestilación o destilación a vapor. Conocidos por sus biopropiedades, los aceites esenciales han sido usados como antisépticos, bálsamos, anestésicos locales, analgésicos y conservantes alimentarios. Para conseguir extraerlos se suelen usar destilaciones de alta o baja presión empleando vapor de agua caliente.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de entre 20 y 60 compuestos naturales, de los cuales solos dos o tres existen en concentraciones altas (20-70% de la composición total) y son los que determinan las propiedades biológicas principales de estas esencias. Su acción antimicrobiana viene dada por su acción lipídica que desestabiliza la membrana plasmática de los microorganismos, aunque también se ha visto capacidad de daño mitocondrial en hongos. Su poder antioxidante viene dado por la naturaleza de los componentes de estos aceites, donde se destacan los compuestos terpénicos y los compuestos fenólicos. :

Los terpenos son combinaciones de isoprenos: la síntesis se da a partir de la unión de varios isopentenil difosfatos, pudiéndose modificar por sintetetasas específicas y enzimas redox. Los principales son los monoterpenos (C_{10}) y los sesquiterpenos (C_{15}), aunque también existen otros compuestos más largos; los derivados del fenilpropano son menos frecuentes, cuyas rutas sintéticas suelen estar separadas de las de estos otros compuestos, aunque pueden coexistir.

En nuestro trabajo se estudiaron dos aceites distintos: el de mostaza y el de tomillo rojo.

- El aceite de tomillo rojo es un líquido transparente de incoloro a amarillo rojizo con un olor característico, aromático, fenólico y con un toque ligero a especias. Su densidad es de entre 0.910 – 0.937 g/L, y sus componentes más representativos son el p-cimeno (14 – 28%), el γ -terpineno (4 – 11%) y el linalol (3 - 6,5%).
- El aceite de mostaza es extraído de *Brassica juncea*. Es espeso y de una coloración amarilla no tan transparente como el otro aceite nombrado además de no ser miscible con metanol. Es irritante y se usa para infligir daño e inflamación por la activación del canal catiónico TRPA1 (12).

Los extractos naturales(13) de plantas tienen un enorme potencial para influenciar próximos estudios; Los extractos de plantas se han usado como pesticidas para proteger los cultivos sin ser dañinos para la naturaleza, además de degradarse mucho más rápido que los químicos; de igual manera, se consideran mejores ya que no matan hospedadores beneficiosos. El método de extracción más utilizado para la obtención de extractos comerciales es una variante del método de Ruch and Worf, donde el material vegetal molido y pulverizado se mezcla con etanol de 95% para quedar a un 10% (m/v) durante 30 minutos, se coloca en un evaporador de rotación a 60°C una hora y se deja secar en carbón activo durante dos días, a 37°C.

Los extractos obtenidos pueden variar en calidad, cantidad y composición dependiendo de la edad de la planta, el suelo, el clima o el ciclo en el que se encuentra, por lo que para poder obtener la misma composición en todos los aceites esenciales es necesario que se haga la extracción en las mismas condiciones. De nuevo, la capacidad antioxidante es resultante de fitovitaminas y otras moléculas que actúan como receptores de radicales iónicos mientras que su poder antimicrobiano viene de sus propiedades pesticidas comentadas anteriormente (al tener composiciones similares a los aceites esenciales). Los tres extractos utilizados son los siguientes:

- La alfalfa venía en pastillas comprimidas de aspecto grisáceo y es extraída de *Medicago sativa*, una especie de forraje para heno y pasto.
- La equinácea tintura madre procedía de raíces de equinácea (*Echinacea angustifolia*). Era un líquido transparente con una tonalidad marrón y un olor ligero. Utilizada antiguamente por los indios norteamericanos para tratar heridas e infecciones. A finales del siglo XIX se empezaron a usar preparaciones de equinácea para remediar el resfriado común.
- La equinácea es un extracto liofilizado de equinácea (*Echinacea purpurea*). El líquido era transparente, con cierta tonalidad amarillenta y con un olor muy suave. En culturas modernas *E. purpúrea* se ha usado con motivos medicinales, para tratar infecciones agudas del tracto respiratorio superior, infecciones del tracto urinario, quemaduras y trastornos como infecciones virales, afecciones cutáneas y enfermedades crónicas debidas a deficiencia de respuesta inmunológica: esta estimula varias células inmunológicas como macrófagos y células NK además de tener efectos antiinflamatorios.

La incorporación de compuestos naturales en biopolímeros ha sido uno de los grandes temas de estudio de los últimos años en el área del envasado activo. Biopolímeros como el quitosán, gelatina, alginato, almidón, derivados de la celulosa han sido usados como material de envase para la incorporación de diversos compuestos naturales como aceites esenciales de canela, crisantemo, romero, albaricoque, romero, tomillo, gengibre y orégano, harina de pulpa de oliva, extracto de calabaza y té verde y nanopartículas de zinc, plata, entre otras.

AE- Aceite Esencial; AO- Antioxidante; AM- Antimicrobiano

Biopolímero	Agente activo	Envase activo	Producto	Referencias
Chitosan	Harina de pulpa de oliva	AM	Arándano	(Crizel, Rios, et al., 2018)
	AE romero	AO/AM	Pollo picado	(Souza et al., 2019)
	AE hueso de albaricoque	AM	Pan	(Priyadarshi, et al., 2018)
	AE canela	AM	Cacahuets	(Chein, Sadiq, and Anal, 2019)
	AE de crisantemo	AO/AM	Carne de vacuno	(Lin et al., 2019)
	Extracto de pimienta rosa	AO/AM	Filetes de salmón	(Merlo et al., 2019)
Carboximetil celulosa	Extracto microencapsulado de hierba de arroz	AO/AM	Té verde	(Rodsamran and Sothornvit, 2018)
	AE gengibre	AM	Queso cortado	(Tapiero Cuellar, 2017)
Celulosa bacteriana	Extracto de piel de granada	AO/AM	Champiñones	(Moradian, Almasi, and Moini, 2018)
	Extracto de té verde	AO/AM		
	Extracto de romero	AO/AM		
Acetato de Celulosa	AE pimienta rosa	AM	Queso cortado	(Dannenberg et al., 2017)
Etil celulosa	AE de canela encapsulado en permanganato de plata/zinc	AM	Arrayán chino	(Niu et al., 2018)
Almidón	AE de orégano con Extracto de calabaza	AO/AM	Carne molida	(Caetano et al., 2017)
	Extracto de rosa mosqueta	AO/AM	Carne de pollo	(Go and Song, 2019)
	AE tomillo	AM	Espinacas	(Issa, Ibrahim, and Tahergorabi, 2017)
Alginato	AE romero y orégano	AO/AM	Carne	(Vital et al., 2016)
	AE tomillo y orégano	AM	Papaya cortada	(Tabassum and Khan, 2020)

Tabla 1. Ejemplos de biopolímeros combinados con agentes activos.

3. Objetivos

El objetivo principal de este TFG radica en el estudio de las actividades antioxidantes y antimicrobianas de compuestos naturales para añadirlos a matrices de biopolímeros de carboximetil celulosa de sodio o 2-hidroximetil celulosa y conseguir producir films activos para la conservación de alimentos frescos. Para lograr este objetivo, se han definido varios objetivos específicos:

1- Revisión bibliográfica de la aplicación de los compuestos naturales seleccionados y biopolímeros en el área del envase activo

2- Revisión bibliográfica de las bioactividades (antimicrobiana, antioxidante, etc.) de los compuestos naturales elegidos para el trabajo.

3- Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los compuestos naturales elegidos

4- Incorporación de los compuestos naturales en biopolímeros

5- Desarrollo de métodos para mejorar la incorporación de los compuestos naturales elegidos en los biopolímeros

6- Discusión de los resultados obtenidos con base en las bioactividades descritas en la literatura

7- Diseño de experiencias para evaluar la sinergia de actividad antimicrobiana y/o antioxidante de los compuestos naturales utilizados en el trabajo

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Agentes activos

El aceite esencial de tomillo rojo se obtuvo de dos fuentes distintas: el primero fue comprado en la empresa Esencias Martínez Lozano S.A. bajo el nombre de “Tomillo Timol Bio Zygis”, mientras que el otro fue cedido por la investigadora María José Jordán Bueso (investigadora agraria en la Comunidad de Murcia). El extracto de *Equinacea purpúrea* fue adquirido a la empresa Soria Natural como “Extracto natural de *echinacea* Formula XXI” *purpúrea* es un suplemento alimenticio a base de extracto liofilizado de *equinacea* (*Echinacea purpurea*), compuesto por *equinácea* (540 mg), extracto liofilizado de *equinácea* (540 mg), Alfa ciclodextrinas (140 mg), Gamma ciclodextrinas (140 mg), agua y glicerina por cada 3mL.; el extracto de *Equinacea angustifolia* “Tintura madre” al 10% (con glicerina, agua, entre otros) se compró a Naturalma con nombre de artículo “EQUINÁCEA (*Echinacea angustifolia*) raíces Tintura Madre sin alcohol”. El aceite de mostaza se ha comprado a la empresa Deve Herbes como “Pure Brass Oil (*Brassica juncea*) 100%” 100% de grado terapéutico natural y prensado en frío; y las pastillas de alfalfa “Extracto de Alfalfa verde - *Medicago sativa*” se han adquirido en la empresa “Fair E use” que cada tres pastillas contienen 375 mg de extracto de alfalfa (4:1), correspondientes a 1.500 mg de alfalfa con celulosa cristalina..

4.1.2. Reactivos

El metanol (grado HPLC), peróxido de hidrógeno y etanol se obtuvieron de Scharlau Chemie S.A (Sentmenat, España). El DPPH se compró a Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España) y el agua ultrapura ha sido producida a través del sistema Millipore Milli-QPLUS 185 (Madrid, España). El salicilato de sodio se pidió a Merck (Madrid, España). Hydroxypropyl-beta-cyclodextrina de Aldrich (ref: 778966-100g) fue en material utilizado para encapsulación.

Como biopolímeros se utilizaron carboximetil celulosa de sodio (250 kDa) y 2-hidroxiethyl celulosa (90 kDa), ambos producidos por Sigma-Aldrich Química S.A (Madrid, España).

4.2. Determinación de la actividad antioxidante

4.2.1. Determinación de la actividad antioxidante a través de la captación (“scavenging”) de radicales hidroxilo

Para el ensayo (14), hay que preparar 2-2,5 L de agua Milli-Q con agua oxigenada al 30% (27,7 g de H₂O₂ por cada litro). Por otro lado, preparamos 500 g de una disolución de salicilato de sodio en Milli-Q con una concentración final de 2 µg/g. y un pH final de 4,5±0,1, obtenido a través de la adición de una disolución de ácido fórmico diluido al 0,1% (v/v) en agua ultrapura. Esta disolución de salicilato se introduce en botellas dónde borbujará el flujo de radicales libres para su reacción con el salicilato de sodio. Las muestras, previamente preparadas al 1% (m/m) añadiendo 0,1 g de las muestras a 10 g de etanol, se colocaron en 8 pipetas de Pasteur de vidrio con el pico agrandado rellenas con 3 g de lana de vidrio.

La generación de radicales OH en fase gas se consigue por el set-up que aparece a continuación. El aire comprimido se toma de un compresor Cecatto Bluair (Brendola, Italia), mientras que el aerosol lo produce la sección neumática formada por controlador de flujo y nebulizador (Perkin Elmer 370, Wellesley, MA, USA). Para aumentar la precisión del flujo de peróxido de hidrógeno, los tubos capilares se conectaron a una bomba peristáltica de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), a 0,8 mL min⁻¹; el flujo de aire total se fijó a 940 mL min⁻¹.

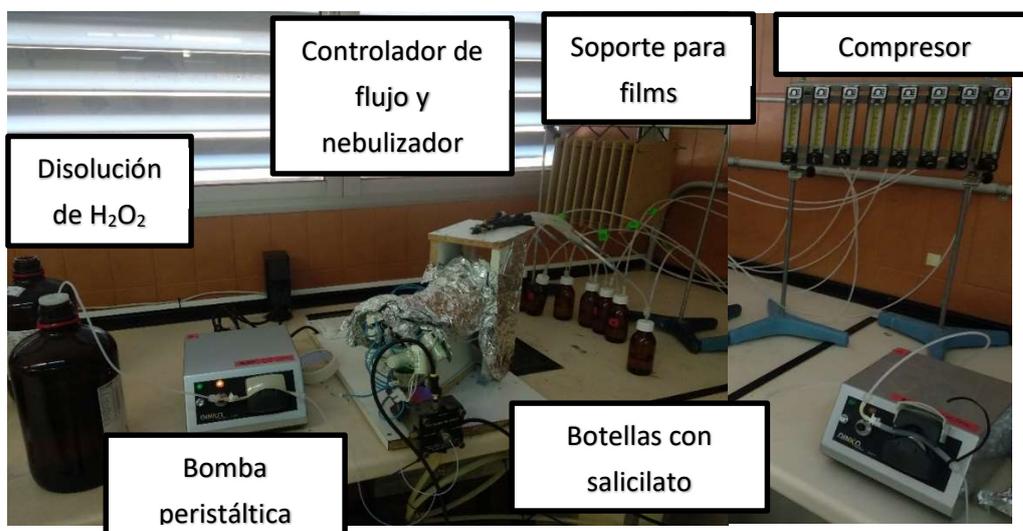


Figura 1. Set-up del ensayo de captación de radicales hidroxilo.

La cámara de reacción de los radicales hidroxilo (2.9×10^{-1} mol L⁻¹) consiste en un tubo cilíndrico de cuarzo de 300 mm×30 mm con entrada y salida opuestas. La radiación UV requerida la administraban cuatro lámparas Philips fluorescentes ultravioleta de 140 mm×15 mm TL 4W/08 F4T5/BLB Hg, (Eindhoven, Holland), dispuestas axialmente alrededor del tubo de cuarzo. Dos trampas de cristal hechas a mano (2 piezas cada una, con 29/32 conectores macho-hembra) se usaron para contener la lana de cristal en la que los aceites esenciales eran acogidos en distintas líneas; otras dos se usaron para blanco.

La solución de salicilato se contenía en botellas lavadoras de cristal tipo Drechsler. Para minimizar interferencias, todas las conexiones se hicieron con PTFE (6 mm i.d., 9 mm o.d.) de

la menor longitud posible para conseguir mayor eficacia. El análisis cromatográfico del 2,5-DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y SA (ácido salicílico) remanente se realiza con un sistema HPLC Hewlett-Packard 1050 Series (Palo Alto, CA, USA) unido a un detector de fluorescencia Waters 474 (Waters, Milford, MA, USA), operados a las longitudes de onda óptimas para ambos compuestos (2,5-DHB y SA: $\lambda_{exc}=324$ nm, $\lambda_{ems}=448$ nm). La separación cromatográfica se realizó por una columna de fase reversa Luna C18 (250 mm long, 4.6 mm i.d., 5 μ m) 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA), usando como fase móvil una mezcla de tampón acuoso de acetato (pH 5,9; 35 mmol L⁻¹) con metanol a una proporción de 90:10 (v/v) en modo isocrático a 1 mL min⁻¹, a 35°C) durante 10 minutos. El volumen de inyección de muestra fue de 20 μ L.

En el cromatograma resultante del ensayo se observa como el pico de la izquierda (el salicilato oxidado, denominado 2,5-DHB) va disminuyendo frente al pico de la derecha (salicilato no oxidado) cuanto mayor es la actividad antioxidante del compuesto. De igual manera, el área del pico correspondiente al 2,5-DHB del blanco marca la máxima hidroxilación, es decir, donde el 100% de las moléculas se han hidroxilado, y a partir de esta podemos sacar los porcentajes de hidroxilación al enfrentarlo con las áreas de los picos de la izquierda del resto de cromatografías

Para determinar este coeficiente y la concentración de 2,5-DHB es crucial cuantificar los radicales OH[•]. Se observa pérdida de agua por evaporación, por lo que para evitar errores el volumen se mantiene constante durante el proceso añadiendo el volumen requerido a las botellas cuando es necesario.

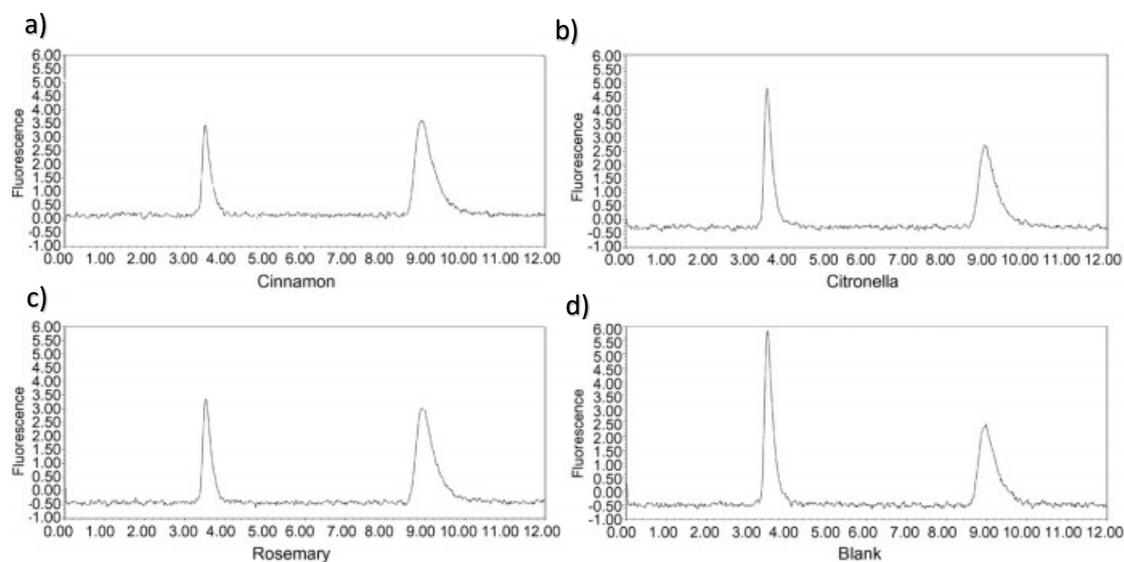


Figura 2a, 2b, 2c y 2d. Cromatogramas obtenidos en otro trabajo¹⁷ para comprobar la actividad antioxidante de aceites esenciales de canela, citronela y romero, frente a un cromatograma sin adición de antioxidante.

4.2.2. Determinación de la actividad antioxidante a través del método del DPPH

Varias concentraciones diferentes de los extractos se prepararon en metanol al 70%: para ambos extractos de equináceas se hicieron al 10, 20, 30, 40, 50 y 60%, mientras que para los aceites de tomillo se prepararon al 0,1, 0,25, 0,5, 0,7 y 1%. Después, 100 μ L de cada disolución se añadieron a 3,5 mL de DPPH preparado a 30 μ g/g en metanol. La reacción se lleva a cabo durante 15 minutos y entonces se mide la absorbancia a 515 nm usando un

espectrómetro, frente al blanco, que consiste en la adición del volumen correspondiente de muestra (100 uL) de metanol a 3,5 mL de disolución de DPPH.

Esta experiencia se basa en el cambio de color del DPPH, que en su forma oxidada es morado, mientras que en su forma reducida es amarillo. Al introducir el antioxidante, las moléculas de DPPH sufren una reducción por parte de estos, por lo que cuantas más moléculas sufran esta reacción, más el color de la disolución cambiará a amarillo modificándose su espectro de absorción; por ende, cuanto mayor sea la capacidad de reducción (es decir, la capacidad antioxidante) mayor número de reacciones se llevaran a cabo a un mismo volumen de DPPH y antioxidante en el mismo tiempo y mayor la absorbancia a 517 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

Dónde: I es el porcentaje de inhibición (%); A_0 es la absorbancia del control y A la absorbancia de cada muestra. La curva de I frente a la concentración fue dibujada en una gráfica y los valores de IC_{50} se determinó como $I=50\%$. La IC_{50} es la mitad de la concentración máxima inhibitoria, que determina la cantidad que se necesita para que la mitad de las moléculas oxidadas sean reducidas; de esta manera, sigue una proporción inversa con la capacidad antioxidante, puesto que cuanto menor es el valor de IC_{50} , mayor es la capacidad antioxidante del compuesto.

4.3. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana

4.3.1. Cepas utilizadas

Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se utilizaron dos bacterias provenientes de la Colección Española de Cultivos Tipo: *Listeria monocytogenes* CECT 911 y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 5947. El cultivo de *E. coli* se hizo en los medios Mueller Hinton Agar y Mueller Hinton broth, mientras el cultivo de *Listeria monocytogenes* se hizo en Brain Heart Infusion agar y Brain heart infusion broth. Al final de cada sesión se cogía con un asa de siembra una fracción del cultivo usado y se pasaba a su respectivo medio de crecimiento de agar, realizando un cultivo por agotamiento. Después, se dejaban en la estufa a 37°C durante 18-24h.

- Mueller Hilton agar es un medio de cultivo microbiológico utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Contiene: 2 g de extracto de carne, 17,5 g de hidrolizado de caseína, 1,5 g de almidón y 17 g de agar disueltos en 1 litro de agua destilada, con un pH ajustado a 7.3 ± 0.1 a 25°C. Mueller Hilton broth contiene los mismos componentes sin agar.
- Brain Heart Infusion agar es una infusión hervida de corazón bovino o porcino y cerebro de becerro, suplementado con aminoácidos (con gelatina u otro tejido), sal, un buffer de fosfato de disodio, glucosa y agar, utilizado para comprobar la seguridad de los alimentos, de las aguas y test antimicrobianos. Brain Heart Infusion broth contiene los mismos componentes sin agar.

4.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana se hizo a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de los extractos de tintura madre y Echinacea purpurea y el aceite comercial de Tomillo rojo frente a las bacterias seleccionadas. Para la preparación del inóculo, se resuspendieron colonias de *E. coli* y *L. monocytogenes* cultivadas en Mueller Hinton agar y Brain Heart Infusion agar, respectivamente en NaCl 0,9 % (m/m) para la obtención de una concentración de 10^8 ufc/mL (asegurándonos de que la absorbancia a 600 nm estuviera en el rango 0,08-0,12 y se realizó una dilución 1:100 de esta suspensión en su medio correspondiente (*E. coli* en Mueller Hinton broth y *L. monocytogenes* en Brain Heart Infusion broth). 50 μ L de este inóculo final se colocaron en cada uno de los pocillos de una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano. El control positivo consistió en medio con inóculo sin agente antimicrobiano, mientras el control negativo consistió en medio estéril con agente antimicrobiano pero sin inóculo.

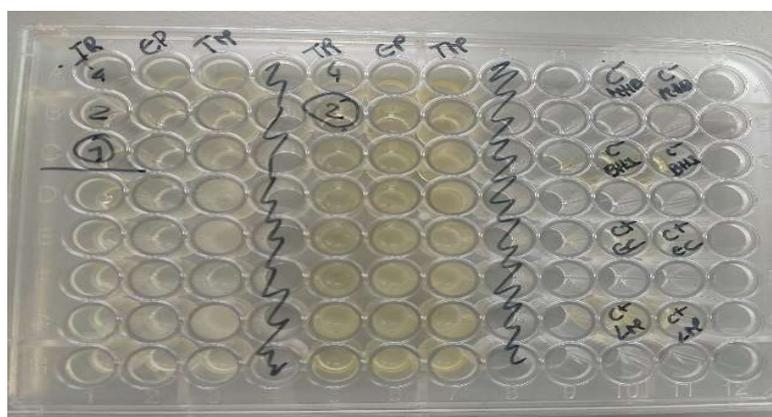


Figura 3. Distribución de la placa en sectores: el primero para *E.coli*, el segundo para *L. monocytogenes* y el tercero para controles; donde TR es Tomillo rojo, EP es equinácea purpúrea, TM es equinácea tintura madre, C- es para los controles negativos de MHB (Mueller Hilton broth) y BHIB (Brain Heart Infusion broth) y C+ para los controles positivos.

Al primer pocillo de cada columna se le añadieron 100 μ L de una preparación de los aceites esenciales en ambos medios, a una concentración de 8 mg/mL para Tomillo rojo y 32 mg/mL tanto para Equinacea purpúrea como Tintura madre, y se recogieron de forma seriada 50 μ L del pocillo anterior para pasar al siguiente que contenía 50 μ L del medio correspondiente para bacteria, realizando cada vez una dilución 1:2, resultando en un rango de concentraciones de 4 mg/mL a 0,03 mg/mL para el aceite esencial de tomillo rojo y de 16 mg/mL hasta 0,125 mg/mL para ambos extractos de equinácea. Las placas se incubaron durante 24 horas en la estufa a 37°C. A las 24h se observa la turbidez del medio y se determina visualmente la concentración mínima inhibitoria (MIC) como la concentración mínima de compuesto antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de la bacteria. Estos resultados fueron sujetos a confirmación a través de la medición de la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas.

4.3.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (MCB)

Una vez se habían determinado los pocillos que no tenían turbidez (es decir, sin crecimiento visible) se traspasaban 20 μ L a una placa de Mueller Hilton agar si era de *E. coli* y Brian Heart Infusion agar si era de *L. monocytogenes* para comprobar si aún podían crecer en un

medio sólido, para así determinar la MCB; se dividían en sectores para cultivar en la misma placa y se dejaba secar el líquido del inóculo.

Si no crecían en una concentración es que esta ya era bactericida, por lo que se tomará el valor de la menor concentración en la que no hay habido crecimiento (menos de 5 colonias).

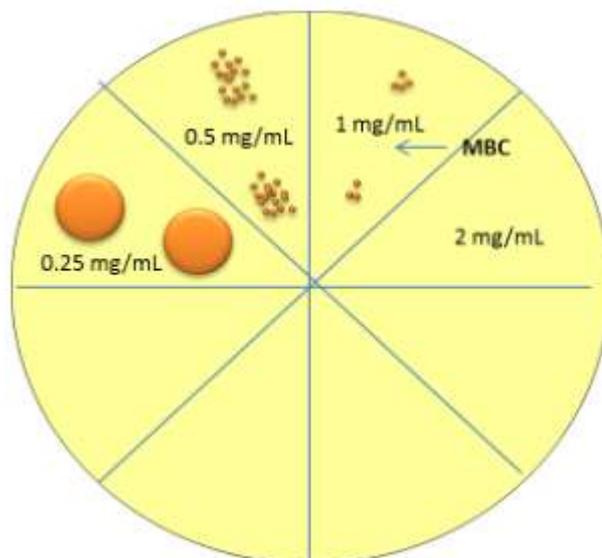


Figura 4. Esquema de la placa a preparar; se considera MCB en la sección en la que crezcan 5 colonias o menos.

El protocolo se ha repetido hasta 5 veces y los valores modales de MIC y MBC se han seleccionado

4.4. Preparación de los complejos de inclusión de tomillo rojo con ciclodextrina

Dado que en el paso siguiente vamos a mezclar el aceite esencial de tomillo rojo con una disolución acuosa, y sabemos que este no es miscible en agua, decidimos preparar complejos de inclusión del aceite esencial de tomillo con ciclodextrina para aumentar la miscibilidad.

Para ello, se prepara una solución de hidroxipropil-beta-ciclodextrina a 65g/100 mL (6,5 g en 10 mL de agua destilada), se añaden 2 mL de aceite esencial de tomillo rojo y se deja en agitación magnética durante 24h a 750 rpm (IKA placa agitadora multiposición) en viales sellados con Parafilm y cubiertos con aluminio que después se guardan a -80 °C antes de su liofilización. La muestra liofilizada se utilizó de la misma manera que como si fuera aceite de tomillo rojo puro en el protocolo siguiente.

4.5. Preparación de films

Para la preparación de los films se seleccionaron dos biopolímeros: carboximetil celulosa de sodio y 2-hidroxietil celulosa; y dos de los candidatos a agente activo: el extracto de equinácea púrpura y el aceite esencial de tomillo rojo comercial. Se prepararon en un plato magnético, juntando 7,5 g del polímero en 250 mL de agua hirviendo y manteniendo la agitación hasta que la mezcla fuera homogénea. Después se añade a cada disolución 500 mL de agua fría, de manera que quedara el polímero a una concentración del 10% (m/v).

Después, se separaban en volúmenes de 135 g y se juntaban con los agentes activos seleccionados. Para la preparación de los films de tomillo rojo al 1%, 0,5% y 0,1% (m/m), se preparó una disolución de aceite esencial de tomillo rojo al 10% (v/v) en etanol y se añadieron 15 g de extracto al 10%, 7,5 g de extracto al 10%+7,5 g EtOH y 1,5 g de extracto al 10% + 13,5 g EtOH para obtener las tres distintas concentraciones de aceite esencial en los films. Para los films con extracto de equinácea purpúrea, se añadieron 15 g del extracto a 135g de cada polímero preparado; de igual manera, se realizaron dos controles con 15 g de etanol y 135g de los polímeros para que estuvieran en las mismas condiciones frente a un compuesto que no da problemas en la polimerización .. Una vez mezclados se distribuían en placas cuadradas(12cmx12cm) 35 g de la disolución. Finalmente, se dejaban secar durante una semana a temperatura ambiente.

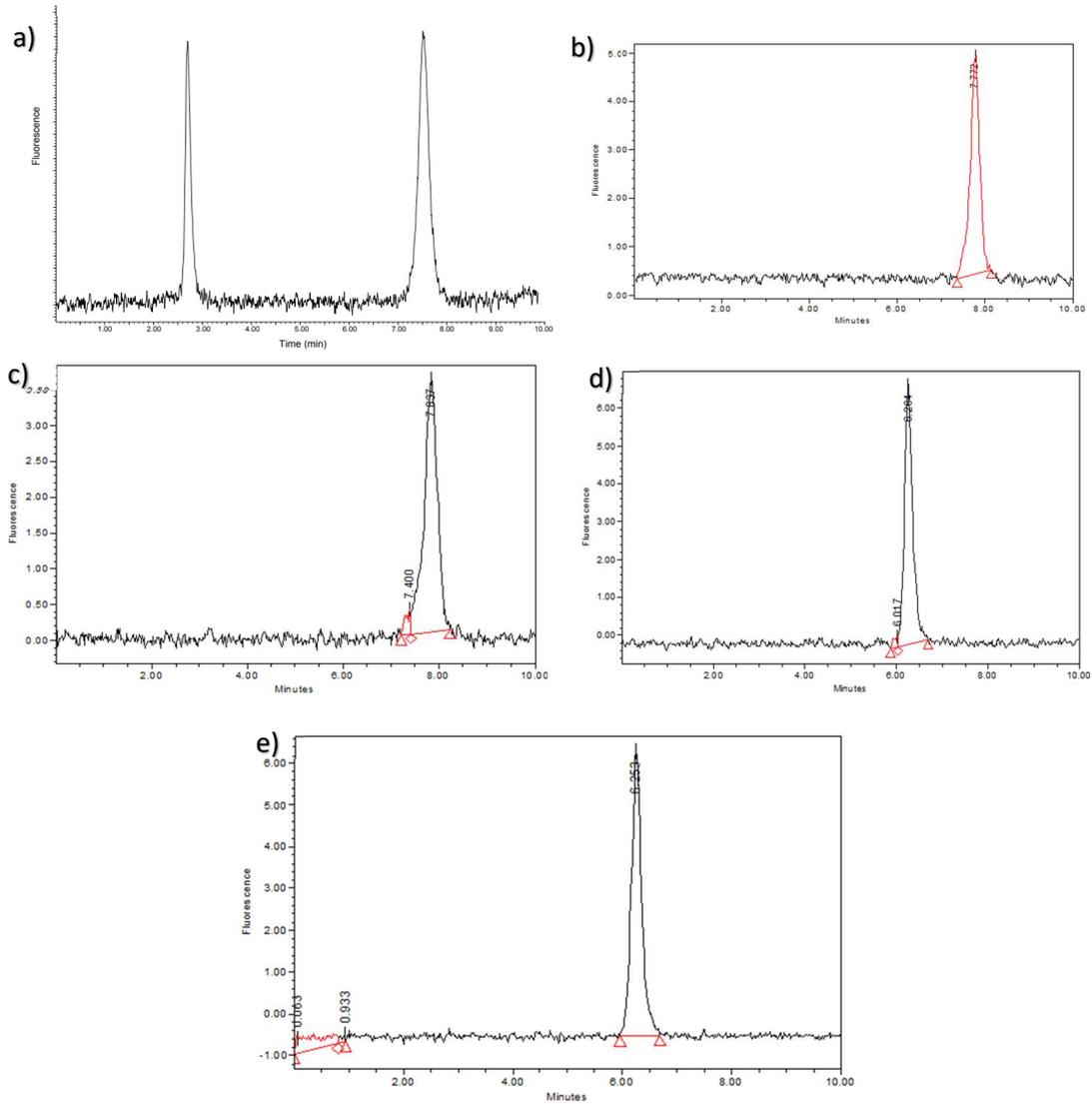
5. Resultados experimentales

5.1. Actividad antioxidante

Para la determinación del carácter antioxidante de nuestros compuestos se han realizado dos pruebas distintas: el DPPH y la captación de radicales hidroxilo.

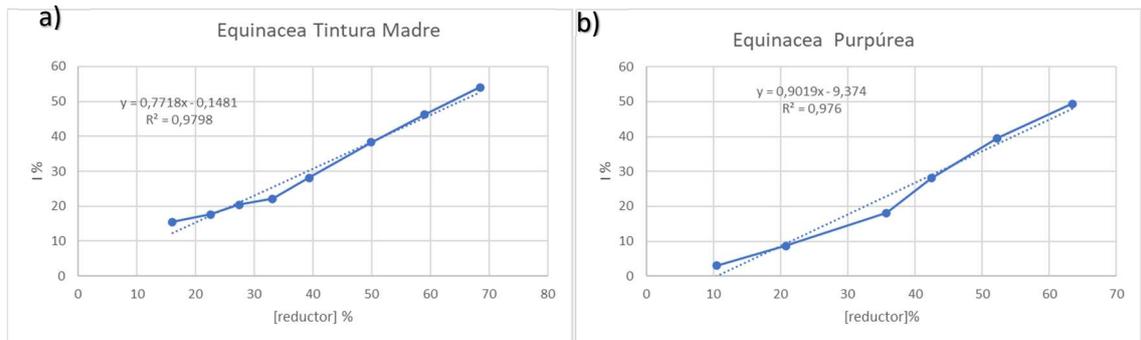
No ha sido posible determinar la actividad antioxidante ni del aceite de mostaza ni de la pastilla de alfalfa. El aceite de mostaza tenía una coloración amarilla y una hidrofobicidad tan alta que era imposible apreciar el cambio de color morado del DPPH a amarillo, ya que se mezclaban los colores además de aparecer muchas gotas micelares; mientras la pastilla de alfalfa daba muchos problemas para deshacerse en el metanol hasta el punto de solo dispersarse parcialmente tras someterla a sonicación.

A la excepción del aceite de tomillo ecológico, todos los demás aceites y extractos testados han demostrado tener capacidad para la captación de radicales hidroxilo, ya que el pico correspondiente al producto de oxidación 2,5-DHB, ha desaparecido completamente en estas muestras, significando que estos compuestos inhiben completamente la hidroxilación, o sea, los valores de inhibición de hidroxilación son del 100%. En el caso del aceite de tomillo rojo ecológico, sería necesario volver a repetir estos ensayos, ya que las pruebas de DPPH (ver abajo) demuestran que este compuesto es un fuerte antioxidante y tiene un comportamiento similar al tomillo rojo ZYGIS.



Figuras 5a, 5b, 5c, 5d y 5e. Cromatograma obtenido del a) blanco, b) equinacea purpúrea, c) equinacea tintura madre, d) tomillo rojo ZYGIS, e) tomillo rojo ecológico.

El DPPH se preparó con diluciones de los compuestos realizando cada una de estas por triplicado. Los resultados se plasmaron tal y como indica el apartado de materiales y métodos, realizando las gráficas y, con la ecuación de la recta obtenida, obtener los IC50 de los compuestos.



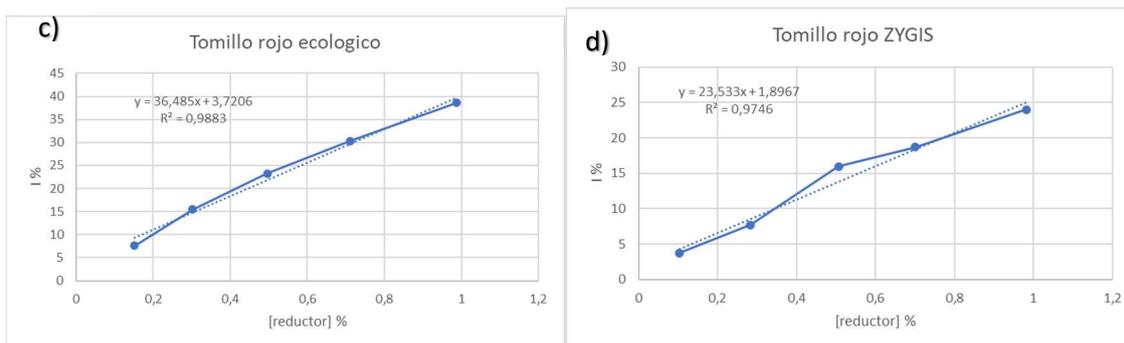


Figura 6a, 6b, 6c Y 6d. Representación gráfica de los datos obtenidos por DPPH junto con la ecuación de la recta y su coeficiente de fiabilidad de a) Equinacea tintura madre; b) equinácea purpúrea; c) tomillo rojo ecológico; d) tomillo rojo ZYGIS

Compuestos	IC50 (mg/g)	IC50 (mg/mL)
E. purpúrea	648,8±13,4	513,8±10,6
E. tintura madre	647,1 ±45,4	512,5±36,0
Tomillo rojo eco.	16,04±3,1	12,7±2,4
Tomillo rojo ZYGIS	15,9±4,0	12,6±3,2

Tabla 2. Resultados obtenidos de IC50

Es en este momento en el que descartamos el tomillo rojo ecológico, dado que los resultados obtenidos son muy similares al aceite esencial comercial, que está disponible en mayor cantidad. Como se puede apreciar, los valores de IC50 del aceite esencial de tomillo rojo son muy superiores a los de los extractos de equinácea, siendo el mejor de los tres compuestos respecto a capacidad antioxidante.

Teniendo en cuenta que tanto el aceite esencial de tomillo como los extractos de equinácea tenían actividad antioxidante por el método del DPPH, el paso siguiente sería la realización de un protocolo de sinergia entre el aceite de tomillo rojo y el extracto de equinácea purpúrea para verificar si, en conjunto, la actividad antioxidante obtenida sería superior a la de cada uno de los extractos/aceites por sí sólo.

Para el protocolo de sinergia hay que determinar IC50 de los dos compuestos a utilizar (Compuesto A: IC50 Tomillo rojo 16 mg/g; Compuesto B: IC50 Equinacea Purpúrea 648,8 mg/g), y recrear una tabla con el rango de concentraciones que vamos a medir, donde utilizaríamos como control positivo 100µL de un compuesto como el ácido ascórbico (del que conocemos su actividad antioxidante) con 100µL de DPPH; y de control negativo 200µL de metanol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	CP	IC50_A/16	IC50_A/8	IC50_A/4	IC50_A/2	IC50_A	IC50_A*2	IC50_A*4	IC50_A*8	IC50_A*16
B	IC50_B/4									
C	IC50_B/2									
D	IC50_B									
E	IC50_B*2									
F	IC50_B*4									CN

Tabla 3. Esqueleto inicial para preparación de protocolo de sinergias

Se prepararía los dos compuestos en dos placas distintas por diluciones seriadas como en el apartado 4.3.2., y una vez terminadas se mezclarían los contenidos, quedando 100µL en

cada pocillo (excepto en el control negativo) y se añadirían los 100µL de DPPH en todos los pocillos (excepto en el control negativo).

5.2. Actividad antimicrobiana

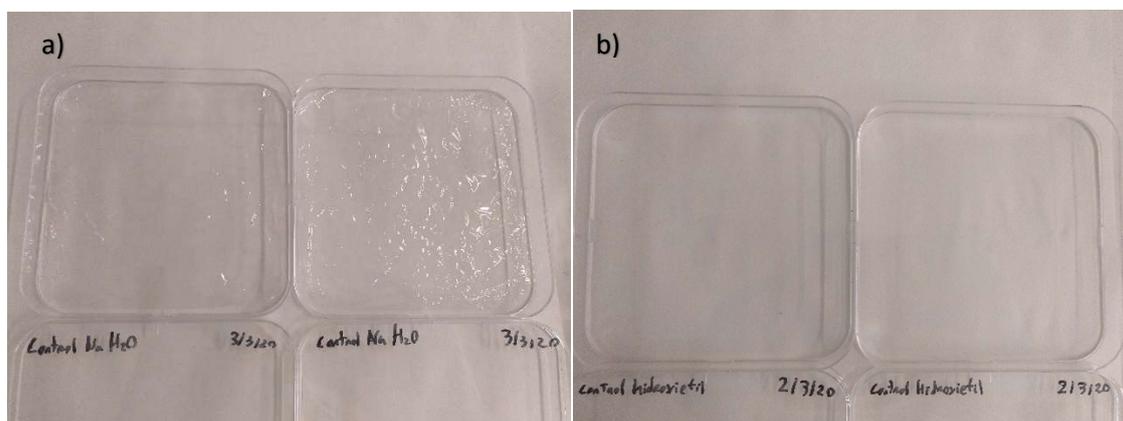
Compuesto	E. coli		L. monocytogenes	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
Tomillo Rojo	0,25	0,25	0,5	0,5
Equinacea purpúrea	>16	>16	>16	>16
Equinacea Tintura Madre	>16	>16	>16	>16

Tabla 4. Resultados de las pruebas de determinación antimicrobiana

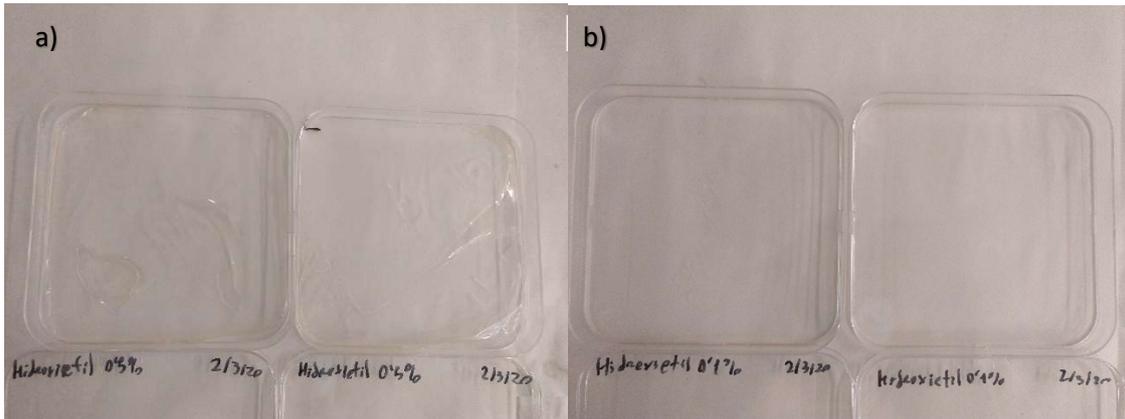
De nuevo, el aceite esencial de tomillo rojo es él que presenta mejor actividad antimicrobiana con valores de MIC y MBC muy inferiores a los extractos de equinácea. Los valores de MIC y MBC de equinácea no se han podido determinar, ya que su valor era superior a la concentración más alta testada y concentraciones superiores no se podían preparar por motivos de precipitación de los extractos.. En esta parte es donde se descartó por completo el extracto de equinácea tintura madre, no solo por no tener capacidad antimicrobiana sino además por su molesta coloración marronácea que resultaba demasiado fuerte para su incorporación en un material de envase que se requiere que sea lo más transparente posible. Se conservó Equinacea purpúrea por su capacidad antioxidante y su posible sinergia previamente comentada. Si bien la sinergia se podría medir también para el poder antimicrobiano, como veremos en los siguientes apartados Equinacea purpúrea no parecía tenerlo, así que solo se consideró para sus capacidades antioxidantes y su mayor miscibilidad frente al tomillo rojo.

5.3. Preparación de los films activos de celulosas

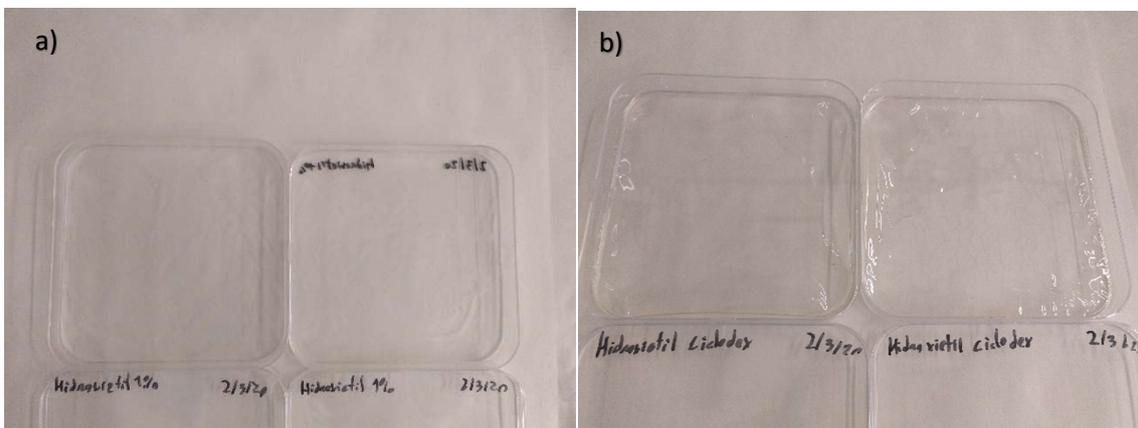
Los films por lo general tienen que aparecer a la semana con aspecto laminar y despegados de su placa parcialmente. Si bien la mayoría cumplen estos requisitos y no parecen tener problemas de polimerización al añadirse los aceites esenciales, en la primera preparación la concentración al 0.5% y 1% de tomillo rojo parecían formar exclusiones lipídicas de color amarillento, haciendo imposible su integración en la polimerización (figura 15). No obstante, tanto en la preparación de ciclodextrina como en el segundo intento al 1%, el aceite esencial de tomillo se integró aceptablemente en la extensión de los film (figura 14a y 14b).



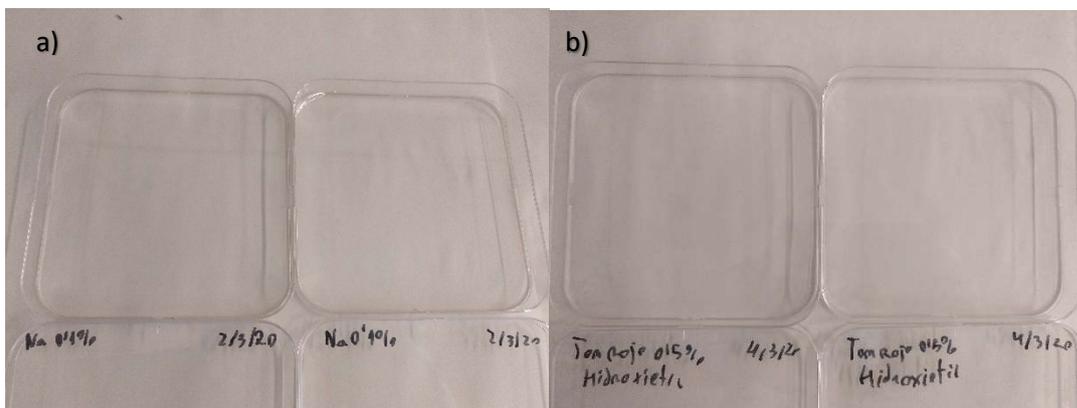
Figuras 7a y 7b. Films control de carboximetilcelulosa de sodio (izquierda) e hidroxietil celulosa (derecha) sin aceites esenciales (con EtOH)



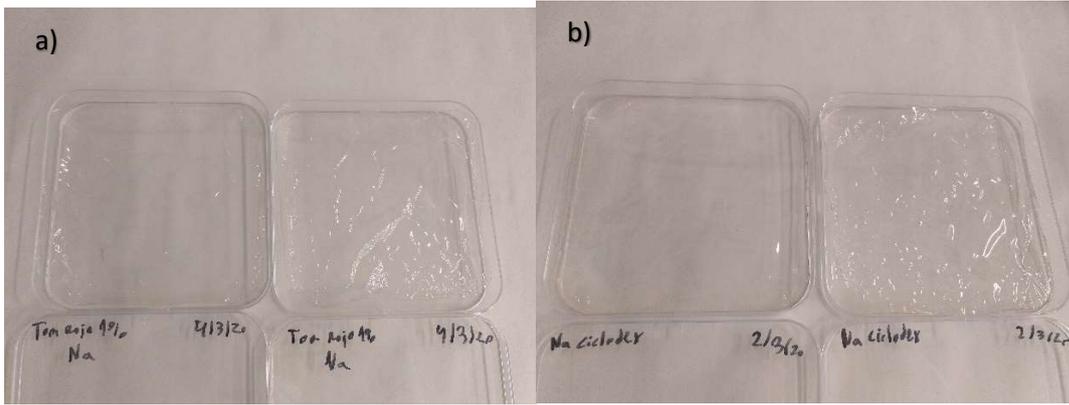
Figuras 8a y 8b. Films de hidroximetil celulosa con aceite de tomillo rojo al 0,5 % (izquierda; se detectan fallos de polimerización) y 0,1% (derecha)



Figuras 9a y 9b. Films de hidroximetil celulosa con aceite de tomillo rojo al 1% (izquierda) y acompañado con ciclodextrinas (derecho)



Figuras 10a y 10b. Films de carboximetilcelulosa de sodio con aceite de tomillo rojo al 0,1% (izquierda) y al 0,5% (derecha)



Figuras 11a y 11b. Films de carboximetilcelulosa de sodio con aceite de tomillo rojo al 1% (izquierda) y acomplejado con ciclodextrinas (derecho)

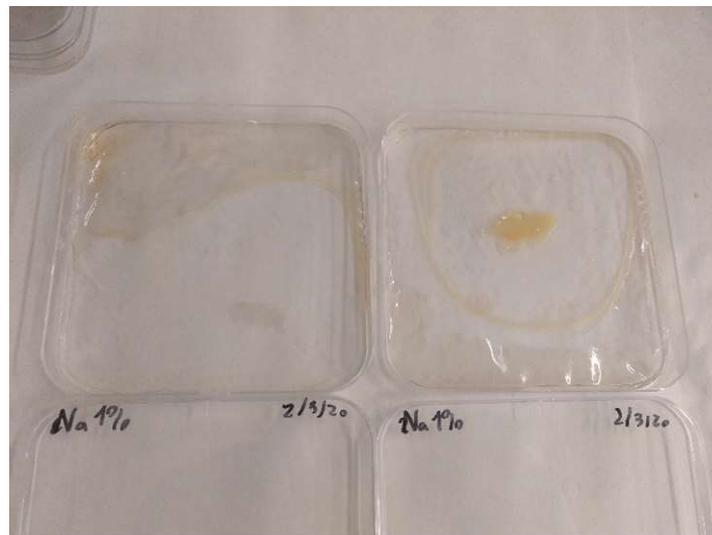


Figura 12. Films de carboximetilcelulosa de sodio con aceite de tomillo rojo al 1% fallidos (zonas de exclusión del aceite en amarillo)

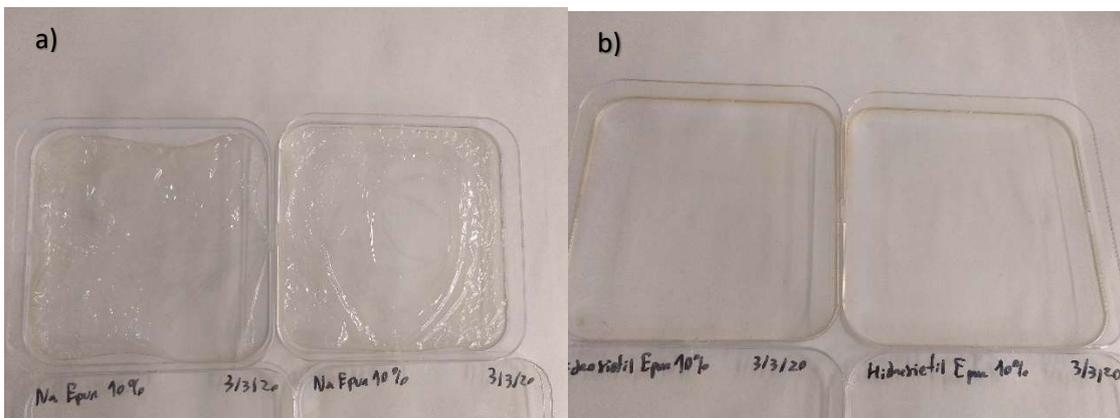


Figura 13a y 13b. Films de carboximetilcelulosa de sodio (izquierda) e hidroxietil celulosa (derecha) con aceite de Equinácea purpúrea al 10%

Dado que la masa final de los films era de aproximadamente 35 g y se distribuyó por toda la placa, de 12x12 cm, el gramaje de estos films resulta de 0,24 g/cm². Como observación podemos destacar que los films realizados con carboximetilcelulosa de sodio parece separarse mucho mejor de la placa de lo que lo hacen los preparados con 2-hidroxietil celulosa. Aunque al principio parecía que no se mezclaría con los polímeros, está claro que el aceite esencial de tomillo rojo ha superado todas las pruebas y se sitúa como el mejor candidato de los estudiados.

Teniendo ya los films activos, los próximos pasos serían la determinación de sus actividades antioxidantes y antimicrobianas. Para la evaluación de la actividad antioxidante del material se utilizaría nuevamente en ensayo de captación de radicales hidroxilo, usando el mismo aparato que el explicado en el apartado 4.2.1, solo que esta vez cambia la disposición de las muestras¹⁸. Cuando se estudian films en bolsas, las trampas de cristal (hechas con pipetas recortadas) se reemplazan por bolsas de 12x12 cm hechas con el material activo polimérico que se pretende probar que se preparan por termosellado con un sellador de impulso PFS-200 Zhejiang Dongfeng Packing Machine Co. (Wenzhou, Zhejiang, China) y se incluyen en las mismas dos puntas de micropipeta (100 uL) para permitir la conexión de las bolsas al flujo de radicales colocadas en posiciones cercanas para evitar rutas de flujo preferenciales así como para maximizar la turbulencia en las bolsas.

Estas bolsas son colocadas paralelamente en un separador que consiste de nueve paneles de fibra de densidad media. Las bolsas (120 mm × 120 mm se colocan en el equipo de forma a que el flujo de aire con los radicales hidroxilo circule por todo el volumen de la bolsa, como se puede ver en la figura X.

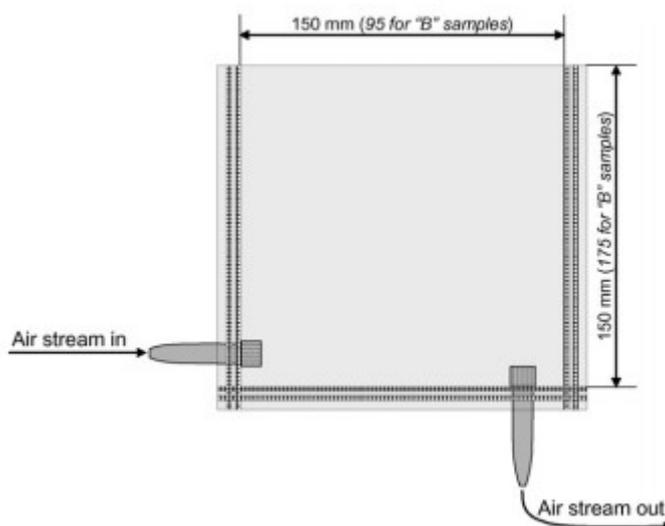


Figura 14 (15). Aspecto final de la bolsa para polímeros

Para la determinación de la actividad antimicrobiana in vitro de los films activos, se cogerían recortes de 2x2cm se colocarían en una placa con el agar apropiado, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de 1×10^6 ufc/mL bacteriano (preparado como se explica en la sección 4.3.2,) en agar y se dejaría durante 24h a 37°C en la estufa. Al día siguiente, se comprobaría la aparición de halos de inhibición de crecimiento.

6. Discusión de resultados

Comparando nuestros resultados con los de otros trabajos, hemos encontrado que para *Listeria monocytogenes* los aceites esenciales de otros tomillos (*Thymus eriocalyx* y *Thymus x-porlock*) (16) dan unas MIC y MCB de 125 y 150 ppm respectivamente, las cuales son similares a las obtenidas para tomillo rojo (250 ppm). Otro estudio también ha demostrado que *Thymus mastichina* (17), otra especie de tomillo, también tenía actividad antimicrobiana sobre la misma bacteria, con 8 log CUF/mL (descenso logarítmico de unidades formadoras de colonias por mL) y 2,9 log CUF /mL para *E.coli*, siendo este más eficaz en la bacteria Gram positiva que en la Gram negativa, justo al contrario que en lo obtenido en nuestros resultados, siendo *E. coli* más susceptible al aceite de tomillo rojo que *L. monocytogenes*..

Respecto a la actividad antioxidante, uno de los experimentos encontrados (18) da tres valores de IC50 de 25, 50 y 12,5 ppm para tres ensayos distintos (en yema de huevo, hígado de pollo y músculo de pollo respectivamente), dando en rango similares a los obtenidos por el ensayo de DPPH; en uno de los artículos mencionados anteriormente (19) también destaca que su actividad de captación de radicales libres es de un 75% y su capacidad antioxidante del 90%, valores tan buenos como los obtenidos en los ensayos de captación de radicales hidroxilo.. Por último, en otro trabajo(20) destaca que films de quitosán preparados al 1,2% de tomillo rojo perdían resistencia mecánica, pero que no solo ganaban muy buenas propiedades antioxidantes y antimicrobianas sino que además mejoraba el intercambio de vapor de agua y oxígeno.

Otros artículos hablan de equinácea purpúrea, dando una IC50 (21) de 50-55 mg/mL y 65.48±1.12 mg/mL (22), muy inferiores a los nuestros, pero debido a que los extractos no son de composición constante y que no son totalmente puros, o sea, que el extracto no es sólo equinácea, pero contiene otros excipientes, como se puede ver en la sección de materiales y métodos, por lo que nuestros valores serán siempre superiores. Lo que si destaca el último artículo (21) es que a concentraciones inferiores a 10 mg/mL es capaz de inhibir al 50% de su actividad a las enzimas α -amilasa, α -glucosidasa y angiotensina convertasa (ACE); a parte de esto, no se han encontrado indicios de actividad antimicrobiana, igual que en nuestros experimentos.

7. Conclusión

Even though we didn't have all the experiments performed as we intended we could prove that red thyme's role as an active agent in packaging films is very promising and give us very positive values regarding its antioxidant, antimicrobial and incorporation in the cellulose-derived biopolymers selected for this study. Echinacea extract was not as effective in its antioxidant and antimicrobial activities when compared with red thyme essential oil, although its antioxidant capacity is not negligible and its aqueous solubility eases its incorporation in biopolymers, due to almost every of them are soluble in water. Finally, the best combination consisted of sodium carboxymethyl cellulose films with red thyme essential oil encapsulated with cyclodextrin at 1% (m/m), being this film the best candidate for a future development of a totally natural and biodegradable active packaging material.

Pese a no contar con todos los experimentos realizados tal y como queríamos hemos podido comprobar que el papel del aceite esencial del tomillo rojo como agente activo en films es muy prometedor y arroja valores muy positivos en relación a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de su incorporación en los biopolímeros derivados de la celulosa

seleccionados en este trabajo. Los extractos de equinácea no han sido tan efectivos en su actividad cuando comparados con el aceite esencial de tomillo rojo pero su capacidad antioxidante no es despreciable y el hecho de ser soluble en agua facilita su incorporación en biopolímeros, ya que gran parte de estos son solubles en agua.. Finalmente, la mejor combinación ha resultado ser la de films de carboximetil celulosa de sodio con el tomillo rojo encapsulado en ciclodextrina al 1% (m/m), siendo este film el mejor candidato para el futuro desarrollo de un material de envase activo totalmente biodegradable y natural.

8.Agradecimientos

Nos gustaría agradecer todo el apoyo y trabajo realizado por la investigadora Magdalena Wrona, que ayudó a diseñar y llevar a cabo todos los experimentos del Trabajo de Fin de Grado y sin la cual habría sido imposible reunir los datos necesarios debido a las circunstancias vividas en la época de realización.

9.Bibliografía

1. Windsor FM, Durance I, Horton AA, Thompson RC, Tyler CR, Ormerod SJ. A catchment-scale perspective of plastic pollution. *Global Change Biology* [Internet]. 2019 Apr 1;25(4):1207–21. Available from: <https://doi.org/10.1111/gcb.14572>
2. Cherif Lahimer M, Ayed N, Horriche J, Belgaied S. Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* [Internet]. 2017 May;10:S1938–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213002220>
3. Garavand F, Rouhi M, Razavi SH, Cacciotti I, Mohammadi R. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [Internet]. 2017 Nov;104:687–707. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017309509>
4. Otero-Ramírez ID, Fernandez P. Bioprospeccion de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (pha's) en el departamento de Nariño. *Bioteconología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 2013;
5. Li J, Lewis RB, Dahn JR. Sodium Carboxymethyl Cellulose. *Electrochemical and Solid-State Letters* [Internet]. 2007;10(2):A17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1149/1.2398725>
6. He F, Zhao D, Liu J, Roberts CB. Stabilization of Fe–Pd Nanoparticles with Sodium Carboxymethyl Cellulose for Enhanced Transport and Dechlorination of Trichloroethylene in Soil and Groundwater. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [Internet]. 2007 Jan 1;46(1):29–34. Available from: <https://doi.org/10.1021/ie0610896>
7. Muhamaruesa N, Isa M. Studies of ionic conductivity and ac conduction mechanism of 2-hydroxyethyl cellulose based solid polymer electrolytes. *Journal of Sustainability Science and Management* . 2017;(2):65–70.

8. Endres H-J, Siebert-Raths A. Engineering biopolymers. *Eng Biopolym.* 2011;7:1148.
9. Yildirim S, Röcker B, Pettersen MK, Nilsen-Nygaard J, Ayhan Z, Rutkaite R, et al. Active Packaging Applications for Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [Internet]. 2018 Jan;17(1):165–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12322>
10. Vilela C, Kurek M, Hayouka Z, Röcker B, Yildirim S, Antunes MDC, et al. A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology* [Internet]. 2018 Oct;80:212–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418302760>
11. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. 2008 Feb;46(2):446–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004541>
12. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, et al. The Capsaicin Receptor TRPV1 Is a Crucial Mediator of the Noxious Effects of Mustard Oil. *Current Biology* [Internet]. 2011 Feb;21(4):316–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982211000546>
13. Al-Samarrai G, Singh H, Syarhabil M. Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides [Internet]. Vol. 19, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2012. Available from: www.aaem.pl
14. Pezo D, Salafranca J, Nerín C. Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Internet]. 2006 Jul 19;385(7):1241–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0395-4>
15. Pezo D, Salafranca J, Nerín C. Determination of the antioxidant capacity of active food packagings by in situ gas-phase hydroxyl radical generation and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* [Internet]. 2008 Jan;1178(1–2):126–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307020687>
16. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2006 May;10(3):236–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971205001773>
17. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Neng NR, Nogueira JMF, Saraiva JA, et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2013 May;43:587–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669012004475>

18. Damien Dorman HJ, Deans SG, Noble RC, Surai P. Evaluation In Vitro of Plant Essential Oils as Natural Antioxidants. *Journal of Essential Oil Research* [Internet]. 1995 Nov;7(6):645–51. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1995.9700520>
19. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* [Internet]. 2005 Aug;91(4):621–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814604005096>
20. Altıok D, Altıok E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010 Jul 7;21(7):2227–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-010-4065-x>
21. Chiou S-Y, Sung J-M, Huang P-W, Lin S-D. Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food* [Internet]. 2017 Feb;20(2):171–9. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2016.3790>
22. Stanisavljević I, Stojičević S, Veličković D, Veljković V, Lazić M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering* [Internet]. 2009 Jun;17(3):478–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1004954108602347>