

ANEXO I de resultados COOP4PAM

Antecedentes

La industria alimentaria genera cada año toneladas de envases plásticos, los cuales están fabricados con polímeros no biodegradables procedentes del petróleo. En los últimos años se está creando una conciencia social dirigida a minimizar el uso de este tipo de envases, a la vez que se está legislando en este sentido. Por tanto, las nuevas tendencias en el envasado y envasado activo de alimentos deben basarse en la utilización de biopolímeros o plásticos biobasados procedentes de fuentes sostenibles. En este sentido, los aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas y medicinales (PAM), constituyen un recurso para la formulación de estos envases activos dadas sus propiedades bioactivas asociadas a los fitoquímicos volátiles que los componen.

En base a este desafío, el objetivo de las actividades ejecutadas durante este periodo ha sido caracterizar aceites esenciales de diferentes PAM y desarrollar biomateriales basados en polímeros biodegradables y compostables, a partir de residuos agroalimentarios y agroforestales. La implementación de este proceso permitirá al mismo tiempo reducir los costes de producción de los biopolímeros, valorizar los residuos, y producir nuevas formulaciones de envasado de alimentos 100% biodegradables y sostenibles. Estos biopolímeros se han obtenido del exoesqueleto de crustáceos (quitosano) y residuos del pescado (gelatina) en diferentes proporciones y a los cuales se le han incorporado aceites esenciales de *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus*, *Salvia rosmarinus* y *Mentha suaveolens*. Los resultados revelan el potencial antimicrobiano y antioxidante de estos aceites, debido generalmente a la mezcla compleja de constituyentes que pertenecen, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos. Del mismo modo, los biopolímeros mostraron una alta capacidad antioxidante, por la liberación de estos compuestos, y actividad antimicrobiana, la cual se ve incrementada por el efecto sinérgico con el quitosano que, también actúa como agente antimicrobiano. Se puede concluir que los residuos agroalimentarios y agroforestales pueden ser valorizados para la obtención de biomateriales sostenibles destinados a la formulación de envases activos de alimentos que tenga un menor impacto ambiental. Así mismo, los aceites esenciales proporcionan fitoquímicos con propiedades biológicas que pueden ser empleados en la preservación y/o enriquecimiento de matrices alimentarias contenidas dentro de biopolímeros activos.

Resultados de las actividades realizadas

Caracterización del perfil y bioactividad de los fitoquímicos del aceite esencial de romero empleado para la formulación de biopolímeros activos

Para evaluar la composición química del aceite esencial de romero (AER), se determinó el perfil de los compuestos volátiles presentes en el aceite mediante GC-MS. Los resultados de dicho perfil se recogen en la tabla 1.

En relación con el contenido de los volátiles, se identificaron 37 compuestos volátiles y se representan con el porcentaje de la composición de cada uno. Siguiendo la tabla, los compuestos predominantes del AER son: eucaliptol (20,77%), alcanfor (14,80%), 1s- α -pineno (13,18%), acetato de l-bornilo (10,66%), cis-verbenona (5,06%), β -pineno (4,52%), borneol (4,23%), canfeno (4,09%), l- β -pineno (3,25%), γ -terpineno (2,74%), α -terpinoleno (2,66%), α -terpineol (2,37%), 4-terpineol (1,75%), linalol (1,55%), 3-pinanona (1,37%), α -felandreno (1,30%), α -terpineno (1,22%) y m-cimeno (1,19%). El resto de los compuestos tienen una composición

menor a 0,1%. Por lo tanto, el eucaliptol y el alcanfor son los compuestos volátiles identificados con mayor porcentaje, siendo el primero el predominante.

Tabla 1. Perfil de los compuestos volátiles del AER.

Nombre del compuesto	Composición (%)
Eucaliptol	20,77
Alcanfor	14,80
1S- α -Pino	13,18
Acetato de L-bornilo	10,66
Cis-verbenona	5,06
β -pino	4,52
Borneol	4,23
Canfeno	4,09
L- β -pino	3,25
γ -Terpino	2,74
α -Terpinoleno	2,66
α -Terpineol	2,37
4-Terpineol	1,75
Linalol	1,55
3-Pinanona	1,37
α -felandreno	1,30
α -Terpino	1,22
M-Cimeno	1,19
3-Careno	0,98
Mirtenol	0,40
Carvona	0,33
Crisantenona	0,32
Triciclono	0,29
3-Hexenol	0,28
L-trans-Pinocarveol	0,23
Acetato de mirtenilo	0,15
Borneol, Formiato	0,14
3-Carvomentenona	0,13
4-Metil-3-Penten-2-ona	0,04
Óxido de cis-linalool	nd
Timol	nd
Carvacrol	nd
Acetato de lavandulilo	nd
L-Cariofileno	nd
Cariofileno	nd
β -Bisaboleno	nd
Óxido de β -Cariofileno	nd

Medida de la actividad antimicrobiana

Método de dilución en caldo

Se evaluó la actividad antibacteriana (es decir, el porcentaje de inhibición) del AER en los microorganismos *Escherichia coli* (CECT 45) y *Listeria innocua* (CECT 910). Primero se disolvió en DMSO y después se diluyó en distintas diluciones (1:1, 1:10, 1:100).

Como se muestra en la tabla 2, el porcentaje de inhibición en *E. coli* es mayor para el AER con dilución (1:1) con un valor de 148,81% y el menor en la dilución 1:100 con 51,02%. Lo mismo pasa para *L. innocua*, siendo el mayor valor 95,53%, que corresponde con la dilución 1:1. Sin embargo, para *L. innocua* la dilución 1:100 no llegó a determinarse. Entre los dos microorganismos, el porcentaje de inhibición del AER fue mayor en *E. coli* para todas las diluciones.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana *in vitro* del AER (microdilución en caldo).

Aceite esencial (v:v)	Actividad antibacteriana (% inhibición)	
	<i>E. coli</i>	<i>L. innocua</i>
Romero (1:1)	>100	95,53 ± 1,27
Romero (1:10)	89,12 ± 2,00	76,89 ± 4,99
Romero (1:100)	51,02 ± 10,58	<0

Método de difusión en disco

Para determinar la actividad bactericida del AER, se realizó el método de difusión en disco o antibiograma, el cual se trata de una prueba de sensibilidad de los extractos para conocer cuál es la susceptibilidad de los mismos microorganismos usados anteriormente frente a antimicrobianos. Las cepas se cultivaron en placas Petri y se introdujeron 4 discos estériles en cada una. Después de 24 horas incubadas a 37° C, se midieron en milímetros los halos formados en los discos de cada placa y se realizó la media.

Tabla 3. Antibiograma del AER para *E. coli* y *L. innocua*.

	Muestras	Diámetro de halos (mm)
<i>E. coli</i>	Ampicilina	2,73 ± 0,01
	Cloranfenicol	3,30 ± 0,01
	Romero	1,26 ± 0,01
<i>L. innocua</i>	Ampicilina	3,2 ± 0,02
	Cloranfenicol	2,55 ± 0,01
	Romero	1,23 ± 0,03

Formulación de biopolímeros y validación de sus propiedades antimicrobianas y antioxidante en modelos *in vitro*.

El objetivo fue determinar y validar diferentes formulaciones de biopolímeros biodegradables y compostables activados mediante la inclusión de aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales (PAM). Así mismo, se determinó sus propiedades bioactivas y su productividad bajo modelos industriales.

Tabla 4. Formulación de biopolímeros activos.

	Formulación 1 (100 gr de disolución)	Formulación 2 (100 gr de disolución)
Quitosano	2 gramos	2 gramo
Glicerol	1 gramo	1 gramos
Ácido láctico	1 gramo	1 gramos
Aceite esencial de romero	-	0,1%
Agua	Hasta 100 gramos	Hasta 100 gramos

Determinación de la cinética de liberación de fitoquímicos desde el biopolímero a la matriz alimentaria

Tabla 5. Cinética de migración de los fitoquímicos desde el biopolímero a la matriz alimentaria.

	Formulación 1			Formulación 2		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
alpha-Fellandrene	nd	nd	nd	0,534	nd	0,69
1S-alpha-pinene	nd	nd	nd	18,777	42,781	22,57
Camphene	nd	nd	nd	6,827	nd	7,90
L-β-pinene	nd	nd	nd	7,061	nd	9,08
β-Myrcene	nd	nd	nd	9,456	nd	8,20
α-Phellandrene	nd	nd	nd	3,767	nd	2,88
3-Carene	nd	nd	nd	3,836	nd	3,72
alpha-Terpinolen	nd	nd	nd	2,939	nd	1,99
o-cymene	nd	nd	nd	6,389	nd	5,04
Limonene	nd	nd	nd	24,178	nd	18,47
γ-Terpinene	nd	nd	nd	4,940	nd	3,19
alpha-Terpinolen	nd	nd	nd	2,995	nd	1,71
β-Caryophyllene	nd	nd	nd	7,921	57,219	14,64
α-Caryophyllene (Humulene)	nd	nd	nd	0,379	nd	0,61

Del análisis de la cinética de liberación, se desprende que los fitoquímicos migran desde el biopolímero al alimento en las primeras fases de envasado (24 horas) y, posteriormente, se limita su liberación, volviendo a aumentar a las 72 horas, posiblemente debido al inicio de la biodegradabilidad del polímero. Debido a lo cual, la estructura tridimensional del polímero se hace más permeable y facilita la liberación de los compuestos.

Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del biopolímero a lo largo del periodo de exposición.

Medida de la actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de los biopolímeros formulados con AER a lo largo del tiempo frente a *E. coli* y *L. innocua* por el método de macrodilución en caldo. Dichos biopolímeros fueron: quitosano sin AER (formulación 1) y quitosano + AER (formulación 2).

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de los biopolímeros formulados a lo largo del tiempo frente a *L. innocua* y *E. coli*. Resultados expresados en log ufc/ml.

	Tiempo 0	24 horas	48 horas	72 horas
Control <i>L. innocua</i>	4,49	8,41±0,11	9,63±0,20	9,36±0,10
<i>L. innocua</i> vs Formulación 1	4,49	1,50±0,28	2,22±0,25	3,63±0,66
<i>L. innocua</i> vs Formulación 2	4,49	2,87±0,05	2,54±0,12	1,59±0,11
Control <i>E. coli</i>	4,79	7,79±0,05	9,32±0,11	9,88±0,11
<i>E. coli</i> vs Formulación 1	4,79	2,02±0,25	2,22±0,10	3,99±0,18
<i>E. coli</i> vs Formulación 2	4,79	3,81±0,08	2,86±0,24	2,57±0,03

En la tabla 6 se representan la media y la desviación estándar de la actividad antimicrobiana de los biopolímeros en distintos tiempos frente a *E. coli* y *L. innocua*, respectivamente. Dichos resultados están expresados en log x ufc/ml.

El biopolímero sin aceite esencial presenta actividad antimicrobiana frente a las dos bacterias, siendo su menor valor a las 24 horas. Pasado este tiempo, la bacteria comienza a crecer exponencialmente. La adición del AER a la formulación del biopolímero (formulación 2) potencia esa actividad de inhibición del crecimiento, prolongándola a lo largo del tiempo.

Medida de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de las dos formulaciones de biopolímeros con distintos tiempos de incubación: a las 2, 6 y 24 horas. En la tabla 7 están representados los resultados obtenidos como media y desviación de cada uno en los diferentes tiempos de incubación. Dichos valores están expresados en mM de Trolox/ml. Para el biopolímero sin AER, a las 6 horas se obtuvo también el mayor valor (0,43 mM de Trolox/ml) pero, en este caso, se obtuvo un valor >0 a las 24 horas de incubación. Para el biopolímero con AER, el valor más alto (0,76 mM de Trolox/ml) se obtuvo a las 6 horas, siendo el menor (0,31 mM de Trolox/ml) a las 2 horas de incubación. Por tanto, el biopolímero con AER presenta mayor actividad antioxidante.

Tabla 7. Actividad antioxidante de los dos biopolímeros formulados a lo largo del tiempo.

Biopolímero	Tiempo de incubación (h)	Media y Desviación (mM de Trolox/ml)
Formulación 1	2 horas	0,25 ± 0,14
	6 horas	0,43 ± 0,01
	24 horas	-0,25 ± 0,03
Formulación 2	2 horas	0,31 ± 0,12
	6 horas	0,76 ± 0,01
	24 horas	0,58 ± 0,01

Aplicación de los biopolímeros formulados con aceites esenciales bioactivos en diferentes matrices alimentarias para validar su aplicabilidad como envasado activo de alimentos

Se utilizaron filetes de tenca inoculados con *Listeria monocytogenes* (CECT 935) a $3,2 \cdot 10^{11}$ ufc/ml y fueron envasados entre dos películas de biopolímero. Se envasaron a vacío y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Luego de este tiempo, se llevó a cabo el recuento de los microorganismos. El objetivo de este experimento es observar del biopolímero activo sobre las poblaciones de *L. monocytogenes* en una matriz alimentaria.

Imagen 1. Filete de tenca envasado en películas de biopolímeros e inoculados con *Listeria monocytogenes*.



En la figura 1, se ve que el control (filete sin polímero) reduce la inoculación inicial debido a las condiciones de la matriz alimentaria y su almacenamiento. Sin embargo, de los dos biopolímeros, presenta un menor recuento de microorganismos la formulación que contiene AER (8,36 log x ufc/ml) mientras que el biopolímero sin el aceite tiene un mayor recuento de las mismas (9,18 log x ufc/ml). Por tanto, el biopolímero con AER reduce significativamente la concentración de *Listeria monocytogenes*.

Figura 1. Recuento de *Listeria monocytogenes* inoculadas en filetes de tenca. Resultados expresados en ufc/gramo.

