



“COOPERACIÓN TRANSFRONTERIZA ENTRE
CENTROS TECNOLÓGICOS PARA LA DINAMIZACIÓN
EMPRESARIAL DE ANDALUCÍA Y MARRUECOS”
RETCETEC

*Aplicación de aceites esenciales a la conservación de productos
vegetales mínimamente procesados en fresco*

Elaborado por:



Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía IDEA
CONSEJERÍA DE ECONOMÍA, INNOVACIÓN, CIENCIA Y EMPLEO



Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Invertimos en su futuro

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 3 |
| 1.2. Aceites esenciales..... | 8 |
| 1.3. Mecanismo de acción..... | 9 |
| 1.3.1. Timol..... | 11 |
| 2. Material y métodos | 14 |
| 2.1. Material vegetal y elaboración de productos mínimamente procesados..... | 14 |
| 2.2. Los aceites esenciales..... | 14 |
| 2.2.1. Timol..... | 14 |
| 2.3. Alginato sódico (LS)..... | 15 |
| 2.4. Preparación de la emulsión..... | 15 |
| 2.5. Secado y envasado del producto y almacenado..... | 16 |
| 2.6. Análisis microbiológico..... | 16 |
| 2.7. Evaluación físico-química..... | 17 |
| 2.8. Evaluación sensorial..... | 18 |
| 2.9. Análisis estadístico..... | 18 |
| 3. Resultados..... | 18 |
| 3.1. Evaluación microbiológica..... | 18 |
| 3.1.1. Aceites esenciales..... | 19 |
| 3.1.2. Timol..... | 23 |
| 3.1.3. Análisis estadístico..... | 28 |
| 3.2. Evaluación físico-química..... | 30 |
| 3.3. Evaluación sensorial..... | 32 |
| 3.3.1. Aceites esenciales..... | 32 |
| 3.3.2. Timol..... | 33 |
| 4. Discusión..... | 35 |
| 5. Conclusiones..... | 40 |
| 6. Bibliografía:..... | 42 |

1. Introducción

La agricultura intensiva bajo plástico, es la piedra angular de la economía Almeriense y tiene una importancia vital en la producción de frutas y hortalizas a nivel nacional e internacional. Almería produce anualmente en torno a 3 millones de toneladas, alcanzando un valor de producción hortofrutícola de 1.800 millones de euros. El peso del sector agroindustrial en la economía almeriense representa el 23%. La producción agrícola se sitúa a lo largo de toda la franja litoral, desde Adra hasta Pulpí, y se cifra en 30.000 Ha. (Coexphal).

En los últimos años, se ha dado un aumento de la competencia, en la producción de frutas y hortalizas tanto a nivel comunitario como extracomunitario. Por tanto, la mejor manera de aumentar la competitividad es mediante la inversión en I+D+i, con el fin de ajustarse a los mercados y adaptarse a las demandas de los consumidores. Algunas de esas inversiones, son el desarrollo de nuevas variedades, sistemas de producción, tipología de productos etc.

Un punto a tener en cuenta es el de la postcosecha, pues es la etapa donde se dan las mayores pérdidas de producto. Dentro de la postcosecha, los estudios de vida útil están cobrando gran importancia en los últimos años, motivo por el cual, se precisa de la aplicación de tecnologías de conservación clásicas o emergentes, todo ello sin olvidar mantener las características organolépticas.

Dado que los productos vegetales, a menudo se venden en zonas del mundo muy alejadas de sus centros de producción, ha surgido la necesidad de alargar el periodo de vida útil (tiempo transcurrido entre la cosecha y elaboración, hasta su consumo), manteniendo al mismo tiempo la calidad y la seguridad alimentaria. Las mejoras en la distribución de la cadena del frío y avances en el uso de atmosferas modificadas en el envasado o el transporte, han permitido el comercio internacional de muchos alimentos. Estos avances por sí solos, no pueden asegurar la calidad y la seguridad de todos los alimentos perecederos.

Para ello, es necesario el uso de técnicas de conservación, que pueden consistir en algunos casos en el uso de antimicrobianos.

Los hábitos de vida de los consumidores, están cambiando significativamente. En este sentido, se tiene cada vez menos tiempo libre para cocinar. Al mismo tiempo, crece la preocupación por lo saludable, por los alimentos frescos y listos para consumir. Actualmente, es una tendencia al alza, lo que a nivel comercial se denomina como productos de IV gama (ensaladas y frutas procesadas en fresco y listas para su consumo, conservadas bajo refrigeración) o incluso productos de V gama (recetas o productos cocinados y preparados para consumir).

La IV gama, se define como aquellas frutas y verduras frescas mínimamente procesadas, con un lavado, pelado, desinfectado, cortado o troceado y que están listas para ser consumidas, siempre manteniendo las propiedades naturales y organolépticas del producto. Estos productos se envasan en películas plásticas aplicando atmósferas modificadas, manteniendo en todo momento la cadena de frío. El período de vida útil puede oscilar desde los 7 hasta los 14 días, dependiendo del producto.

Como muestra de la creciente importancia de la IV y V gama, se tiene una demanda de valores a nivel mundial de en torno a 4 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento del 14%. El mercado más importante es el de Estados Unidos, mientras el de la Unión Europea está en continuo crecimiento, siendo Francia el principal productor y el Reino Unido el principal consumidor ([Afhorfresh](#)).

Las ensaladas envasadas concentran más de la mitad de las ventas de IV gama, ocupando las frutas una menor cuota de mercado. Las materias primas más empleadas en la actualidad para la fabricación de estos productos son las lechugas, zanahorias, espinacas, acelgas, etc. Como puede observarse, la mayor parte de los productos están constituidos por hojas grandes troceadas.



Gráfico 1: AFHORFRESH Asociación Española de Frutas y Hortalizas lavadas, listas para su empleo. Dependiente de FEPEX.

En 2010 el volumen total comercializado de frutas y hortalizas en IV Gama ascendió a 70.600 toneladas, un 6% más que el año anterior, destacando las ensaladas, con 31.100 toneladas, seguido de las verduras, con 22.500 toneladas, y por último las frutas, con 1.000 toneladas. Esta tendencia alcista se confirma en 2011 (74.064 toneladas, +4,9%) y, a falta de los datos de diciembre, se espera cerrar 2012 en esta misma línea (+1,65%) ([Afhorfresh](#)).

Si a estos datos del aumento del consumo de productos preparados, añadimos la preocupación de los consumidores por la salud, encontramos que existen numerosos estudios para mejorar la higiene y la seguridad alimentaria, se estima que hasta un 30% de las personas de países industrializados sufren enfermedades transmitidas por alimentos cada año ([Burt, 2004](#)). Por tanto, existe todavía la necesidad de desarrollar nuevos métodos para reducir y/o eliminar los patógenos de los alimentos.

Con el desarrollo de la microbiología y la epidemiología, se ha podido reconocer a los patógenos transmitidos en los alimentos y su distribución, como causantes de enfermedades alimentarias. Patógenos bacterianos reconocidos como *Salmonella intermitidas*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli O157: H7*. Los psicótrofos *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolica* son conocidos por ser transmitidos en alimentos

refrigerados de larga duración. Sin embargo, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* permanecen como las mayores amenazas a la seguridad del suministro de alimentos. El género *Campylobacter* es el responsable del mayor número de casos de enfermedades gastrointestinales en los seres humanos (Holley y Patel, 2004).

Desde un punto de vista legislativo, se regulaba la vida útil de los alimentos, mediante el Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas (Tabla1). En el cual, además de criterios de seguridad y criterios de higiene, se establecía también un criterio indicador, el cual estableció un recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, día de fabricación $n = 5$, $c = 2$, $m=10^5$, $M=10^6$ y día de caducidad $n = 5$, $c = 2$, $m=10^6$, $M=10^7$, para las comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos. En este estudio, se ha seguido el criterio indicador de microorganismo mesófilos para ver la caducidad del producto.

Tabla 1: Criterios microbiológicos para el grupo D comidas preparadas envasadas, a base de vegetales crudos. Real Decreto 3484/2000.

| | Día de Fabricación | Día de Caducidad |
|--|---|---|
| Indicadores. | | |
| Recuento total de aerobios mesófilos. | $n=5, c=2, m=10^5, M=10^6$. | $n=5, c=2, m=10^6, M=10^7$. |
| Testigos de falta de higiene. | | |
| <i>Escherichia coli</i> . | $n=5, c=0$, ausencia/25g. | |
| Patógenos. | | |
| <i>Salmonella</i> | $n=5, c=2, m=10, M=10^2$. | |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | $n=5, c=2, m=10, M=10^2$. | |

Tabla de elaboración propia

n: número de unidades que componen la muestra.

c: número de unidades de la muestra que pueden dar valores entre m y M.

m: valor umbral del número de bacterias; el resultado se considera satisfactorio si

todas las unidades de que se compone la muestra tienen un número de bacterias igual o menor que m.

M: valor límite del número de bacterias; el resultado se considerará no satisfactorio si una o varias unidades de las que componen la muestra tienen un número de bacterias igual o mayor que M.

La entrada en vigor del Reglamento CE 2073/05, de 15 de Noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, produjo la derogación del anterior Real Decreto 3484/2000, de 29 de Diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. En el nuevo reglamento solo se tiene en cuenta *Escherichia coli* y *Salmonella*, pero en este TFM, se sigue el criterio indicador del recuento total de aerobios mesófilos.

Todo esto deriva en una tendencia al consumo “verde” en la sociedad occidental, con el deseo de menos aditivos de síntesis química, debido a su toxicidad y largo plazo de degradación, y productos con un menor impacto en el medio ambiente (Burt, 2004). Ante esto, se intenta usar conservantes naturales, prescindiendo de los químicos debido a su toxicidad y/o alergenicidad, una de las posibilidades con más futuro es el uso de los aceites esenciales y de sus compuestos, que se consideran biodegradables. Sin embargo, uno de los aspectos más atractivos de la utilización de los aceites esenciales y sus componentes como protectores de los cultivos es su baja toxicidad para los mamíferos (Antunes y Cavaco, 2010), son compuestos GRAS (reconocidos como seguros).

Se describe una mayor resistencia de las bacterias Gram negativas a los aceites esenciales, posiblemente derivado de la complejidad de la doble membrana de la pared celular, con membranas lipídicas entre las que se localiza una capa de peptidoglucano frente a la simple membrana de las Gram positivas, formada por peptidoglucano y ácidos teicoicos. Los mohos y las levaduras ofrecen una menor resistencia ante los aceites esenciales, debido a la presencia en su pared celular de glicoproteínas, quitina y β -glucanos, existen además esteroides, (ausentes de las células procariotas) lo que provoca la falta de resistencia frente a estos antimicrobianos (Holley y Patel, 2004).

1.2. Aceites esenciales.

El uso de los aceites esenciales se conoce desde la antigüedad, como aromatizantes, saborizantes y conservantes. Los historiadores ya mencionan su uso por romanos y griegos, como ejemplo la trementina. La primera experiencia de los aceites esenciales como antimicrobianos, es citada ya en 1881 por De la Croix (Burt Sara., 2004).

Los aceites esenciales se obtienen a partir de material vegetal, normalmente de plantas de clima mediterráneo o tropical, y pueden ser sintetizados en flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces; almacenándose en las células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares, como metabolitos secundarios (Bakkali F.y col., 2007). Pueden ser líquidos a temperatura ambiente (la mayoría) y algunos también pueden ser sólidos o resinosos, mostrando diferentes colores que van del amarillo pálido al verde esmeralda y del azul al marrón oscuro/rojo (Nestor Bassolé I.H. y Juliani H.R., 2012). El producto de extracción, puede variar en la calidad, cantidad y composición de acuerdo con el clima, composición del suelo, órgano de la planta... (Angioni A. y col., 2006). Por lo tanto, con el fin de obtener aceites esenciales de composición constante, la extracción ha de darse siempre en las mismas condiciones.

Se estima, que existen 3.000 tipos de aceites esenciales distintos, de los cuales 300 tienen cierta importancia comercial, especialmente para la industria farmacéutica, sin olvidar a otras como la agronómica, alimentaria, sanitaria, cosméticos y perfumes. En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como agentes antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros, reduciendo su apetito por estas plantas. También pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión de polen y semillas, o repeler otros indeseables (Bakkali F. y col., 2007).

Son mezclas bastante complejas que pueden tener aproximadamente entre 20 y 60 componentes en concentraciones diferentes, normalmente cada aceite esencial posee varios componentes mayoritarios y el resto en cantidades de traza, destacando aquellos que poseen propiedades bioactivas.

Tabla 2: Componentes mayoritarios de los aceites esenciales seleccionados.

| Nombre común | Nombre latín | Principales componentes | Composición aproximada | Número de componentes | Referencias |
|--------------|-------------------------------|--|---|-----------------------|--------------------------|
| Lavanda | <i>Lavandula angustifolia</i> | Linalol. Acetato de linalilo. β -E-ocimeno. <i>trans</i> -cariofileno. Alcanfor. 1,8-cineol. Limoneno. | 32,36% 17,31% 6,82% 6,06% 5,51% 5,82% 4,13% | 13 | Santana O.y col, 2012. |
| Mejorana | <i>Origanum majorana</i> | Eucalipto. <i>endo</i> -5,5,6-Trimetil-2-norbornanone. <i>endo</i> -Borneol. <i>trans</i> -Cariofileno. Alcanfor. | 54% 13,6% 4,6% 5,8% 2,7% | 13 | Teixeira B. y col, 2012. |
| Oregano | <i>Origanum vulgare</i> | Timol. Caracrol. γ -Terpineno. p-Cimeno. | Trace-64% | 17 | Burt Sara, 2004. |
| Romero | <i>Rosmarinus officinalis</i> | α -pipene. Acetato de bornilo. Alcanfor. 1,8-cineol. | 2 –25% 0 –17% 2 –14% 3 - 89% | 16 | Burt Sara, 2004. |
| Salvia | <i>Salvia officinalis L.</i> | Alcanfor. α -pineno. β -pineno. 1,8-cineol. α -tuyona. | 6 –15% 4 – 5% 2 –10% 6 –14% 20–42% | 24 | Burt Sara, 2004. |
| Tomillo | <i>Thymus vulgaris</i> | Timol. Carvacrol. γ -Terpineno. p-Cimeno. | 10–64% | 19 | Burt Sara, 2004. |

Tabla de elaboración propia.

Los componentes incluyen dos grupos de distinto origen biosintético. El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro por constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular (Bakkali F. y col., 2007).

1.3. Mecanismo de acción.

Los diferentes compuestos de los aceites esenciales son los que poseen los distintos efectos biológicos, que hacen que parezca que no tienen un objetivo específico. Como lipófilos que son, pasan a través de la membrana plasmática de las bacterias provocando alteraciones como:

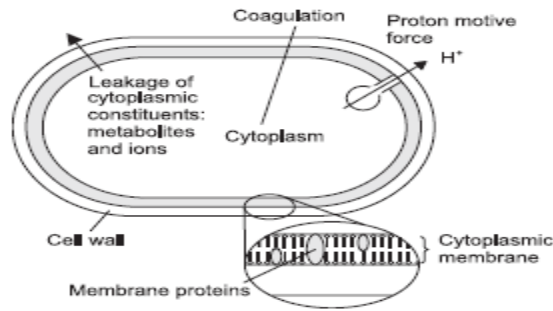


Figura 1: Mecanismo de acción de los aceites esenciales (Burt, 2004).

Localizaciones y mecanismos en la célula bacteriana, que se cree pueden ser sitios de acción para los aceites esenciales:

- Degradación de la pared celular.
- Daño a la membrana citoplasmática.
- Daño a las proteínas de membrana.
- Fuga de contenidos celulares.
- Coagulación del citoplasma.
- Disminución de la fuerza motriz protónica, reduciéndose el pool de ATP
- Lisis.

En las células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales, por la disminución del potencial de membrana, afectando a los canales iónicos del Ca^{+2} . Además, se produce la reducción del gradiente de pH, afectando a la bomba de protones y por tanto al pool de ATP. Se cambia la fluidez de la membrana que se vuelve anormalmente permeable dando lugar a fugas de radicales, citocromo C, calcio y proteínas. Como en el caso de estrés oxidativo e insuficiencia bioenergética, la permeabilización de las membranas mitocondriales interna y externa conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis, todo esto sugiere una actividad pro-oxidante (Bakkali F y col., 2007). Se han detectado componentes de aceites esenciales con propiedades fototóxicas, de igual modo se han realizado pruebas de mutagenicidad y carcinogenicidad con los componentes de los aceites esenciales, dando resultados negativos en cualquier organismo.

Tabla 3: Selección de MIC para aceites esenciales y componentes de aceites esenciales, comprobados in vitro, para patógenos de alimentarios.

| Planta de la que deriva el aceite esencial / componente del aceite esencial | Especie bacteriana | MIC: Aceites esenciales ($\mu\text{l. ml}^{-1}$). Para el timol ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) | Referencias |
|---|----------------------------------|---|-----------------------------|
| Lavanda | <i>Escherichia coli</i> | 6.0 | Sokovic M. y col., 2010. |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5.5 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 5.0 | |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | 5.0 | |
| | <i>Salmonella enteritidis</i> | 5.0 | |
| | <i>Bacillus subtilis</i> | 4.0 | |
| | <i>Micrococcus flavus</i> | 4.0 | |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 7.0 | |
| Mejorana | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 4.5 | Teixeira B. y col., 2012. |
| | <i>Escherichia coli</i> | 6.9 | |
| | <i>Listeria innocua</i> | 2.8 | |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5.8 | |
| | <i>Pseudomonas putida</i> | 1.3 | |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | 2.6 | |
| | <i>Candida albicans</i> | 10.0 | |
| Romero | <i>Escherichia coli</i> | 4.5->10 | Burt Sara., 2004. |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | >20 | |
| | <i>Bacillus cereus</i> | 0.2 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.4- 10 | |
| Salvia | <i>Escherichia coli</i> | 3.5- 5 | Burt Sara., 2004. |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | 10- 20 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 0.75-10 | |
| | <i>Listeria. monocytogenes</i> | 0.2 | |
| Timol | <i>Escherichia coli</i> | 225-5000 | Hyltdgaard M. y col., 2012. |
| | <i>Candida strains</i> | 100-150 | |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 112.5-270 | |
| | <i>Salmonella typhimurium</i> | 56.25-150 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 225-310 | |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> | 450 | |
| | <i>Bacillus cereus</i> | 450 | |
| | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 0.58 | |
| | <i>Erwinia amylovora</i> | 1600 | |
| | <i>Erwinia carotovora</i> | 1600 | |
| | <i>Erwinia carotovora</i> | 225 | |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2.88 | |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 225 | |
| | <i>Yersinia enterocolitica</i> | | |

MIC: concentración mínima inhibitoria.
 Tabla de elaboración propia.

1.3.1. Timol.

Uno de los compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales y con mayor capacidad antimicrobiana, es el "timol", que es un terpeno y más en concreto un monoterpeno fenólico, que producen modificaciones bioquímicas vía enzimática, añadiendo grupos de oxígeno y/o moviendo o eliminando grupos metilo.

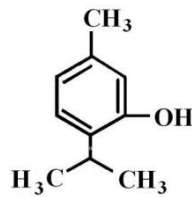


Figura 2: Molécula de timol, (Burt, 2004).

Se cree que implica la destrucción de la membrana, interacciona con las proteínas de membrana y objetivos intracelulares (dificultando la recuperación), afectando a la permeabilidad de la membrana, con pérdida del potencial de ésta, así como iones K⁺ y ATP. El timol se integra en la región de la cabeza polar de la bicapa lipídica, provocando alteraciones de la membrana celular. Incluso a bajas concentraciones, induce cambios adaptativos en el perfil lipídico de la membrana con el fin de compensar los efectos fluidificantes del timol y mantener la función de la membrana y la estructura.

En mohos y levaduras, afecta las vesículas y la membrana celular, alterando la biosíntesis de ergosterol, así como la fluidez de la membrana.

La búsqueda de métodos para retardar el crecimiento microbiano es de gran interés para todos los sectores involucrados en la producción y conservación de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. Distintos tipos de aplicación de los aceites esenciales se emplean en la actualidad para retrasar el deterioro, siendo el objetivo de estos los patógenos alimentarios. Se puede aplicar mediante baño, o inmersión en soluciones acuosas (quizás la forma más práctica de uso). Otro modo de aplicación, sería mediante encapsulación del aceite esencial o el compuesto activo, método que tiene la ventaja de no entrar en contacto con el alimento, y no provocar cambios indeseables en las propiedades organolépticas. En este caso el compuesto de interés se va liberando de forma más o menos controlada, pudiendo liberar concentraciones inhibitorias durante un largo periodo de tiempo.

Existe otro método más, que sería mediante recubrimiento comestible del alimento, revestimientos que pueden servir como portadores para una amplia gama de los aditivos alimentarios, incluidos los agentes antiparadeamiento, colorantes, saborizantes, nutrientes, especias y diversos agentes antimicrobianos que pueden extender la vida útil del producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en la superficie de los

alimentos. En cualquier caso, el compuesto usado en la película debe ser seguro, regulado como aditivo alimentario y ser utilizado dentro de las limitaciones legales.

Debido al ya citado consumo “verde”, se ha renovado el interés científico en los aceites esenciales, para encontrar métodos que ayuden a frenar el deterioro del producto fresco mínimamente procesado, que constituye uno de los principales objetivos de los sectores involucrados en la producción y conservación de frutas y hortalizas cortadas, así como del presente proyecto de investigación.

Para ello, en el proyecto se ha sometido al material vegetal, a diferentes agentes antimicrobianos, como pueden ser los aceites esenciales (lavanda, mejorana, romero y salvia) y el timol (compuesto activo de los aceites esenciales de distintas plantas, como romero y tomillo), y a diferentes métodos de aplicación, para ver su efecto sobre el crecimiento microbiano, así como sobre las propiedades físico-químicas y organolépticas:

1 – Aceites esenciales (lavanda, mejorana, romero y salvia).

- a) Tratamiento sobre *Capsicum annuum* variedad California (Pimiento rojo California), al 1,2% y 1,8%. Método baño por inmersión.
- b) Tratamiento sobre *Cucurbita pepo* variedad Cronos (Calabacín), a las concentraciones de 0,02% y 0,04%. Método baño por inmersión.

2 – Timol.

Cucurbita pepo variedad Cronos (Calabacín):

- a) Método baño por inmersión (150, 300 y 600 ppm).
- b) Método película comestible (150, 300 y 600 ppm).
- c) Método encapsulación.
 - c.1) Pocas cápsulas (150, 300 y 600 ppm).
 - c.2) Muchas cápsulas (150, 300 y 600 ppm).

2. Material y métodos

2.1. Material vegetal y elaboración de productos mínimamente procesados.

El material vegetal, *Cucurbita pepo* variedad cronos (calabacines) y *Capsicum annuum* variedad California (pimientos rojos California) fueron obtenidos de la finca experimental del Centro Tecnova.

Los frutos fueron sometidos a las etapas de recepción, selección y eliminación de partes no comestibles, cortado (uniformidad del producto) y lavado-desinfección. A continuación se aplicó un agente antimicrobiano (aceites esenciales o timol) mediante baño por inmersión, película comestible de alginato sódico más timol o encapsulación del alginato sódico y timol. Todo ello realizado en una cámara frigorífica, perfectamente higienizada.

2.2. Los aceites esenciales.

Los aceites esenciales de *Lavándula angustifolia*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* L. fueron obtenidos de Esencias Martínez Lozano S.A. (Ctra. Lorca km 7 - Paraje Venta de Cavila. 30400 - Caravaca de la Cruz (Murcia) España) y sus parámetros de calidad están certificados por las siguientes normas, la Certificación 834/2007 para la agricultura ecológica, produciendo y comercializando aceites esenciales ecológicos, la Certificación ISO 9001 y la Certificación Kosher para la comercialización de los diferentes aceites esenciales, expedida por The United Syngogue Kashrut Board Trading As Klbd de Londres. Este proveedor extrae los aceites esenciales a escala industrial por destilación al vapor. Los aceites esenciales se ensayaron a concentraciones que van desde el 1,8%, 1,2%, 0,04% y 0,02%, en pimientos rojos California y calabacines, mediante baño por inmersión, también se realizó un control.

2.2.1. Timol.

El Timol empleado en los ensayos fue obtenido de *Fluka Analytical*, con una pureza $\geq 99\%$. El timol se ensayó a distintas concentraciones 150 ppm, 300 ppm y 600 ppm, además del control, mediante baño, película comestible y encapsulación. Todas las concentraciones fueron disueltas en agua empleando ultrasonidos (JP selecta, Ultrasons HD 3 litros), durante 30 minutos.

2.3. Alginato sódico (LS).

El alginato sódico empleado en los ensayos fue obtenido de *Panreac*, con un límite máximo de impurezas de:

| | |
|--------------------------------|--------|
| Pérdida por desecación a 105°C | 15,0% |
| Residuo de calcinación | 30 % |
| Metales pesados (en Pb) | 0,004% |

2.4. Preparación de la emulsión.

La preparación de la emulsión se llevó a cabo con una solución de alginato sódico al 2%, concretamente 20 g en un litro de agua destilada. Se prepararon 4 emulsiones, una sólo con alginato sódico (control), una segunda con alginato sódico y 150 ppm de timol, la tercera con alginato sódico y 300 ppm de timol y por último una con alginato sódico y 600 ppm de timol.

La emulsión se homogenizó a temperatura ambiente con un Ultraturrax (IKA-T25), a una velocidad de 10.000 rpm durante 3 minutos. Se mantuvo la mezcla resultante en un baño de a 40°C durante el proceso de elaboración de las cápsulas y de aplicación de la película comestible.

Se sometió el calabacín cortado a inmersión en la mezcla de alginato con las distintas concentraciones de timol para formar una película comestible alrededor de cada pieza, y a continuación se sumergió en una solución de CaCl₂ al 2% y se dejó gelificar la película formada 5 minutos. Además, se prepararon cápsulas de la mezcla de alginato con las distintas concentraciones de timol, se extrusionó gota a gota la mezcla, mediante una jeringa sobre la solución de CaCl₂ al 2%, mantenida en agitación a baja velocidad (500 rpm). Se dejaron gelificar las cápsulas formadas durante 5 minutos, se recogieron y se lavaron en agua destilada, se realizaron dos tipos de envasados uno con pocas cápsulas y otro con muchas cápsulas.

2.5. Secado y envasado del producto y almacenado.

Secado mediante escurrido y separación del líquido, con papel de secado. Envasado, por medio de una envasadora (Ulma, Termoselladora SMART 300) en barquetas mediante termo sellado, en atmosfera sin modificar para ver sólo el efecto del agente antimicrobiano y almacenamiento en incubador (Ingeniería Climas, con control de T y HR) a 4°C en oscuridad, respetando la cadena del frío, para mantener los productos frescos.

2.6. Análisis microbiológico.

Se realizaron análisis para microorganismos mesófilos, psicrótrofos y mohos y levaduras. Todo ello mediante un protocolo estándar, que incluye la preparación de medios de cultivo, preparación de la muestra (10 g tomados asepticamente, que se transfieren a una bolsa digestora estéril, con 90 ml de peptona), homogenización de las muestras mediante digestor (AES easy mix) (100 segundos), diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), siembra de las distintas muestras en los medios correspondientes (PCA y PDA), incubación a 37°C, microorganismos aerobios mesófilos y mohos y levaduras, y a 5 °C los microorganismos psicrótrofos, por último recuento de colonias.

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones seriadas decimales (-1, -2, -3) y se sembró 0,1 ml de la suspensión en superficie del medio de cultivo PCA (Plate Count Agar, Cultimed: Métodos estándar (APHA), Agar (ISO 4833:2003) (medio deshidratado), Composición (g/l) Extracto de levadura 2,5; D(+)-Glucosa (Anhidro) 1,0; hidrolizado enzimático de caseína 5,0; Agar bacteriológico 15,0 y pH:7,0 +/- 0,2.) de cada dilución por duplicado, incubando durante 48 horas a 37°C. En concreto se realizaron los análisis a los 7 y 10 días del envasado.

Igualmente para aerobios mesófilos, de una muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones seriadas decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y se sembró 0.1 ml de la suspensión en superficie del medio de cultivo PCA (Plate Count Agar, Cultimed: Métodos estándar (APHA), Agar (ISO 4833:2003) (medio deshidratado), Composición (g/l) Extracto de levadura 2,5; D(+)-Glucosa (Anhidro) 1,0; Digerido Enzimático de Caseína 5,0; Agar bacteriológico 15,0 y ph:7,0 +/- 0,2.) de cada dilución por duplicado, incubando durante 7 días a 5°C. En concreto se realizaron los análisis a los 7 y 10 días del envasado.

Y para mohos y levaduras de un mismo modo, de una muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y se sembró 0,1 ml de la suspensión, en superficie del medio de cultivo para mohos y levaduras PDA (Glucosa y patata, Agar (Ph. Eur.) (Medio Deshidratado) Cultimed: Composición (g/l) D (+)-Glucosa 20,0; Infusión de patata (200 g) 4,0; Agar 15,0; pH: 5,6+/-0,2) de cada dilución por duplicado. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas.

La contaminación fúngica de los alimentos, produce defectos por sus modificaciones químicas, alterando el valor nutricional, variando sus características organolépticas y dificultando su conservación. El recuento de mohos y levaduras es un índice de las condiciones higiénicas de una materia prima y de las condiciones de manipulación. Su significado es similar al de los aerobios mesófilos.

Una vez terminada la incubación, se procede al recuento, directamente en placa para la determinar el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) en un alimento. Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en las placas inoculadas con una cantidad determinada de alimento e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas.

Para la presentación de los resultados, de todos los recuentos de placas, se expresaron en ufc/ml o ufc/g. Ufc/g o ml = número de colonias en significativas en la placa por el factor decimal de dilución / volumen de siembra.

Determinación de la carga microbiana de los productos, mediante análisis periódicos de las muestras, en concreto a los 7 y 10 días del envasado para ver la evolución de los recuentos de los principales microorganismos indicadores, para los distintos ensayos realizados.

2.7. Evaluación físico-química.

Determinación de la cantidad de antioxidantes y la vitamina C, en los productos empleados y en el control, para ver si la aplicación de los aceites esenciales o el timol (agentes antimicrobianos) afectan de manera significativa a estos parámetros.

La determinación de la cantidad de antioxidantes se efectuó por el método del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), midiéndose las absorbancias en un espectrofotómetro

(Thermo evolution 300 UV-vis), y la determinación de la vitamina C, se realizó por volumetría, con HCl y almidón como indicador.

2.8. Evaluación sensorial.

Se realizó mediante unos paneles de catas compuesto de 10 miembros. La calidad sensorial, se evaluó a los 7 días de almacenamiento. Los panelistas trabajaron en cabinas individuales con condiciones controladas de temperatura e iluminación. Porciones de cada producto ensayado se les presento, así como los controles, de manera anónima, con las muestras codificadas con números aleatorios sobre platos blancos. Se pidió a los panelistas que bebieran agua para limpiar el paladar entre las muestras evaluadas. La aceptación de la apariencia, la textura, el sabor, el olor y la percepción general se evaluó en una escala hedónica de 5 puntos, que van desde 1 (no les gusta mucho), 2 (no les gusta), 3 (ni me gusta ni me disgusta), 4 (me gusta) y 5 (les gusta mucho). Cada parámetro valorado varía entre 10 (mínimo) y 50 (máximo).

2.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 21.0.0, para determinar las diferencias significativas por ANOVA. La comparación entre grupos, se realizó Post hoc, test HSD Tukey.

3. Resultados.

3.1. Evaluación microbiológica.

Tal como se ha descrito previamente, los objetivos de este proyecto eran encontrar un agente antimicrobiano, ya sea un aceite esencial o un compuesto de los aceites esenciales (timol), que inhiba el crecimiento microbiano, así como también un método de aplicación adecuado, permitiendo prolongar la vida útil de los productos vegetales mínimamente procesados.

Una vez recogido el material vegetal, pimientos rojos California y calabacines de la finca experimental del Centro Tecnológico Tecnova, se seleccionó, se cortó, se lavó, a continuación se aplicó el agente antimicrobiano (mediante baño por inmersión para aceites esenciales y mediante baño por inmersión, película comestible y cápsulas para el timol), después se secó el material y por último se envasó, con una envasadora por termosellado, quedando todo el producto almacenado en una cámara frigorífica a 4°C.

En esta evaluación se determinó la cantidad de los microorganismos mesófilos, psicrótrofos, así como la cantidad de mohos y levaduras a los 7 y a los 10 días del envasado, usando el criterio indicador para microorganismos mesófilos (recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, día de caducidad), para determinar la vida útil del producto. Todo ello mediante un protocolo estándar, que incluye la preparación de medios de cultivo, preparación de la muestra (10 g + 90 ml peptona), homogenización de las muestras mediante digestor (100 s), diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), siembra de las distintas muestras (0,1ml) en los medios correspondientes, incubación y por último recuento de colonias (aerobios mesófilos, aerobios psicrótrofos, mohos y levaduras. El recuento, se realizó por conteo sobre la placa de Petri, de los 2 medios usados, medio no selectivo PCA (para microorganismos mesófilos y psicrótrofos) y medio para mohos y levaduras PDA.

3.1.1. Aceites esenciales.

Pimiento rojo California.

Resultados del análisis microbiológico de los pimientos rojos California a los 7 días, para el PDA donde crecen mohos y levaduras, no aparecieron colonias. Con el medio PCA para mesófilos, para la mejorana al 1,8% se excede el valor límite de 107 ufc/g. El testigo, la lavanda 1,2 %, mejorana 1,2 % y romero 1,2 % pasan el valor umbral de 106 ufc/g; y el resto lavanda 1,8%, romero 1,8%, salvia 1,2 % y salvia 1,8 % quedaron por debajo de los valores umbrales. Para el PCA psicrótrofos, los valores más altos son también para el testigo y la mejorana al 1,8%, quedando el resto de tratamientos por debajo de 106 ufc/g (datos se pueden ver en el gráfico 2).

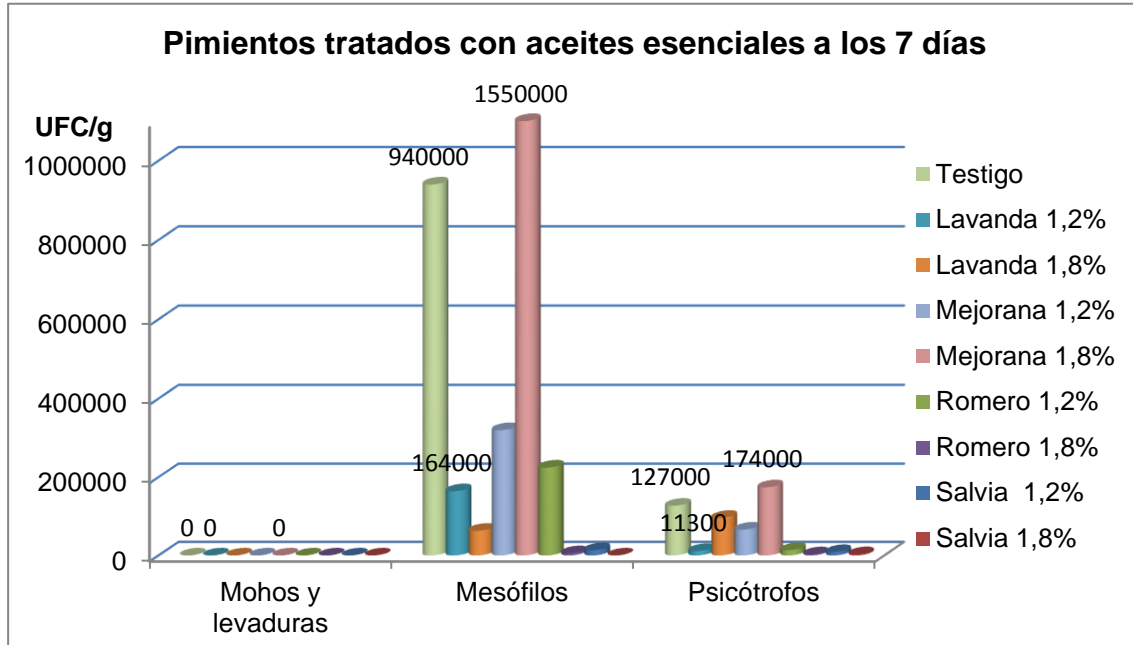


Gráfico 2: Baño de pimientos con aceites esenciales, 7 días.

A los 10 días, los resultados microbiológicos fueron los siguientes (datos en gráfico 3), para el PDA (medio para mohos y levaduras) no hubo tampoco crecimiento, sin embargo para el PCA para mesófilos, el testigo, la lavanda 1,2%, la mejorana 1,2%, la mejorana 1,8%, quedaron por encima del valor límite de 107 ufc/g, mientras lavanda 1,8% y salvia 1,2% superaron el valor umbral de 106 ufc/g, sólo salvia 1,8% y romero 1,8% quedan por debajo del valor umbral. Y para el PCA psicótrofos, vemos que el testigo, la lavanda 1,2%, la mejorana 1,8% y la mejorana 1,2% tiene valores de 105 ufc/g quedando el resto de tratamientos por debajo de 105 ufc/g.

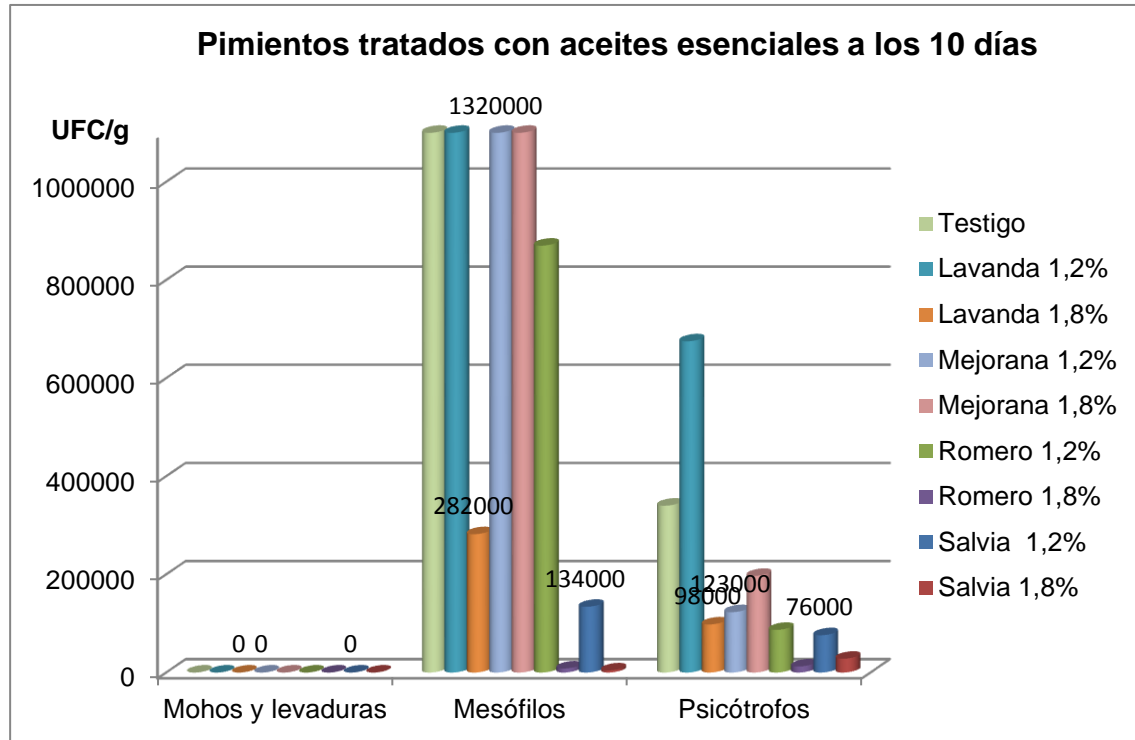


Gráfico 3: Baño de pimientos con aceites esenciales, 10 días.

En resumen, los tratamientos que parecen funcionar en el pimiento rojo California, son la lavanda 1,8%, romero 1,8%, salvia 1,2% y salvia 1,8% a los 7 días, y a los 10 días los tratamientos que quedaron por debajo de los valores umbrales, solo fueron romero 1,8% y salvia 1,8%. Por lo que podemos determinar que para este producto y el tratamiento de baño por inmersión, el aceite esencial que parece funcionar mejor, es la salvia como agente antimicrobiano.

Calabacín

Tanto para el calabacín como para el pimiento, no se han observado colonias de mohos y levaduras en los recuentos, ni a los 7 ni a los 10 días.

Para los aerobios totales mesófilos, se observa que todos los tratamientos (datos en gráfico 4), incluido el testigo, quedan por debajo del valor umbral de 10^6 ufc/g, excepto la salvia al 0,04 % que da valores cercanos al valor umbral. Para los aerobios psicótrofos, los recuentos fueron muy similares a los mesófilos.

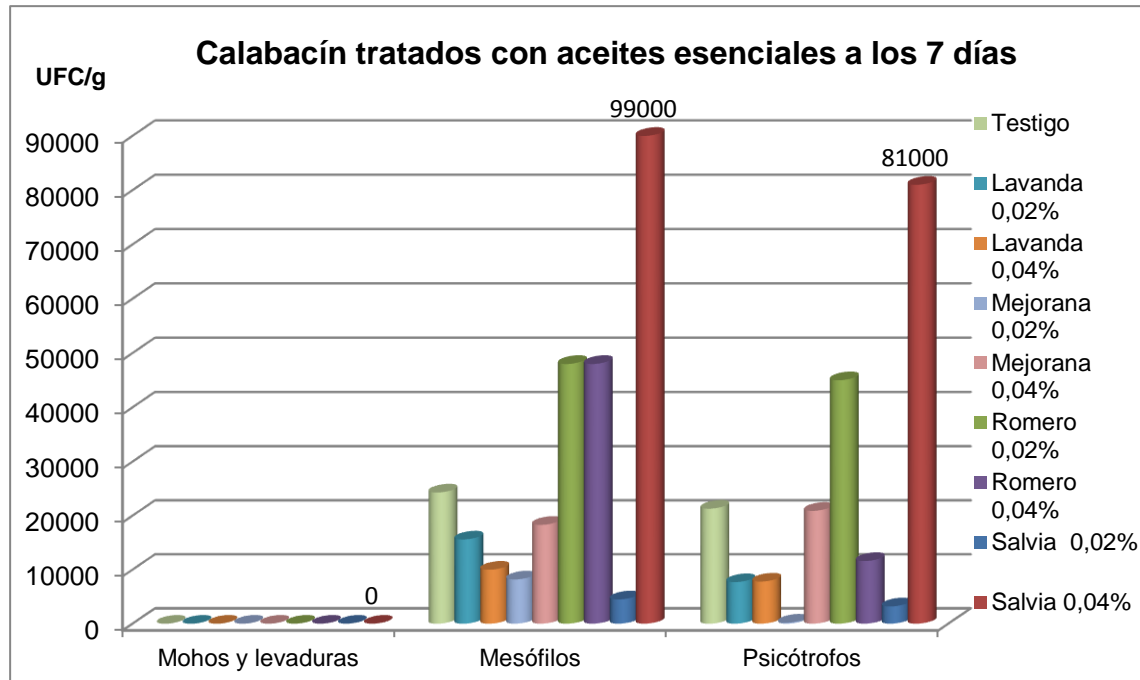


Gráfico 4: Baño de calabacines con aceites esenciales, 7 días.

A los 10 días del envasado del calabacín, en los recuentos (datos en gráfico 5) no se encontró ningún valor por encima del valor límite 107 ufc/g, pero si varios tratamientos por encima del valor umbral, como el testigo y salvia 0,04 %, para el romero también se encontraron valores cercanos al umbral pero sin llegar a él. Sin embargo, en los aerobios psicrótrofos, se obtuvieron unos recuentos mayores, con valores superiores al umbral para la salvia 0,04 % y el romero 0,02 %, y con valores muy cercanos para el testigo, mejorana 0,04 %, romero 0,02 % y romero 0,04 %. Por lo que se puede determinar que para este producto y el tratamiento de baño por inmersión, el aceite esencial que parece funcionar mejor, es la lavanda como agente antimicrobiano, tanto a 0,02% como a 0,04%. La mejorana también parece tener buenos efectos sobre el calabacín.

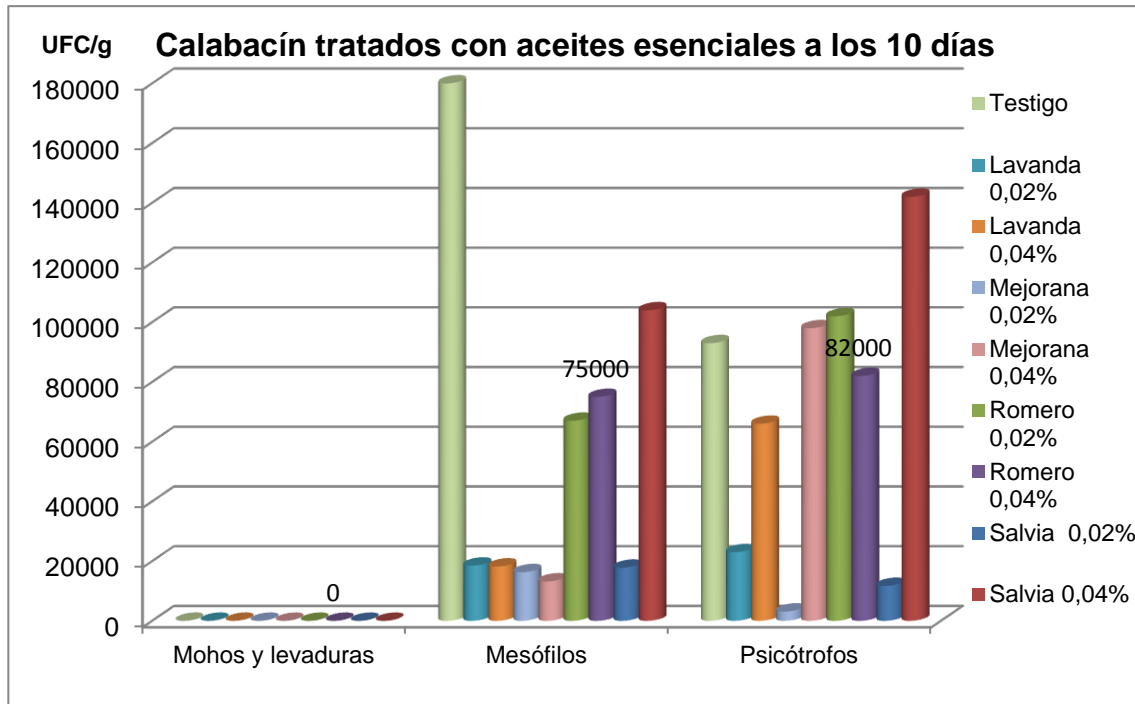


Gráfico 5: Baño con aceites esenciales, 10 días.

3.1.2. Timol.

Timol aplicado mediante inmersión.

Tratamiento con timol, mediante baño por inmersión, los datos obtenidos (datos gráfico 6) para los 7 días fueron los siguientes. Para los mohos y levaduras (PDA), no se hallaron colonias en los recuentos. Sin embargo, para los aerobios mesófilos (PCA), se encuentran valores mayores a 10^6 ufc/g, en el testigo, es decir, superiores al valor umbral, mientras que los diferentes tratamientos con timol, no sobrepasaron este umbral, salvo el baño con timol a concentración de 150 ppm, el cual quedaba muy cerca del citado umbral. Para los psicótrofos, los valores dados son similares a los obtenidos para los mesófilos, testigo mayor de 10^6 ufc/g y el resto por debajo.

Para los 10 días los recuentos fueron muy distintos, en el tratamiento testigo, en el baño con 150 ppm y en el baño con 300 ppm de timol, los recuentos fueron superiores a 107 ufc/g, sobrepasando el valor límite, para la vida útil del producto. Y para el tratamiento con 600 ppm de timol, se sobrepasó el valor umbral de 10^6 ufc/g (datos gráfico 7).

Para este ensayo, en donde se usó el baño por inmersión de timol como agente antimicrobiano, se ve que las concentraciones de 300 y 600 ppm parecen funcionar bien hasta los 7 días.

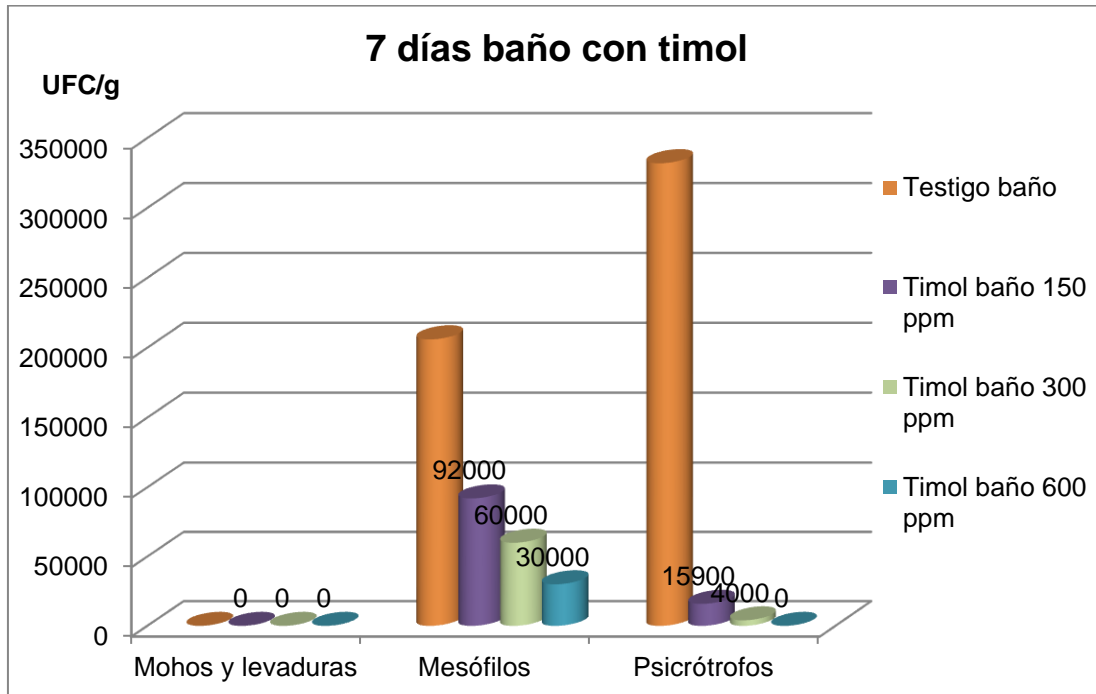


Gráfico 6: Baño con timol, 7 días.

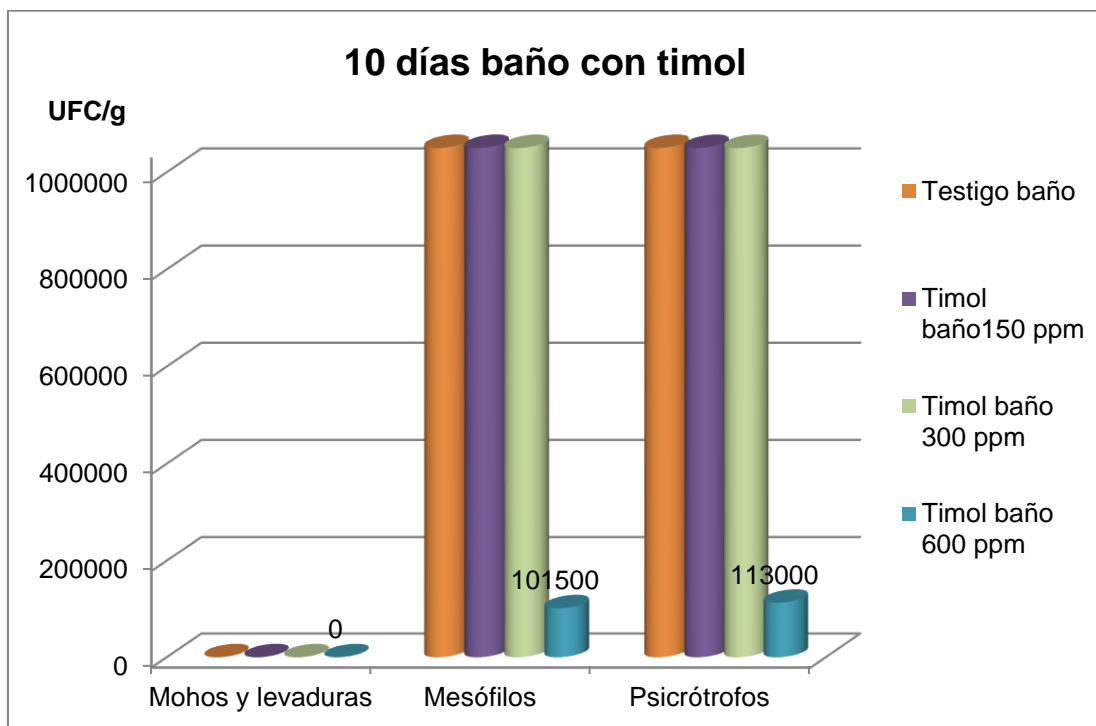


Gráfico 7: Baño con timol, 10 días.

Película de timol.

Al aplicar el timol como película comestible, los recuentos microbiológicos fueron notablemente mayores, a los obtenidos mediante la aplicación por baño. Como se puede ver en el gráfico 8, todos los tratamientos superaron el valor límite (10^7 ufc/g), para el recuento de aerobios mesófilos, a excepción de la película de timol con 600 ppm, pero este tratamiento supero el valor umbral (10^6 ufc/g). Para los psicrótrofos los valores fueron muy parecidos, a los obtenidos en aerobios.

Para mohos y levaduras (PDA), no se encontraron colonias en ningún recuento, ni a los 7 días ni a los 10 días.

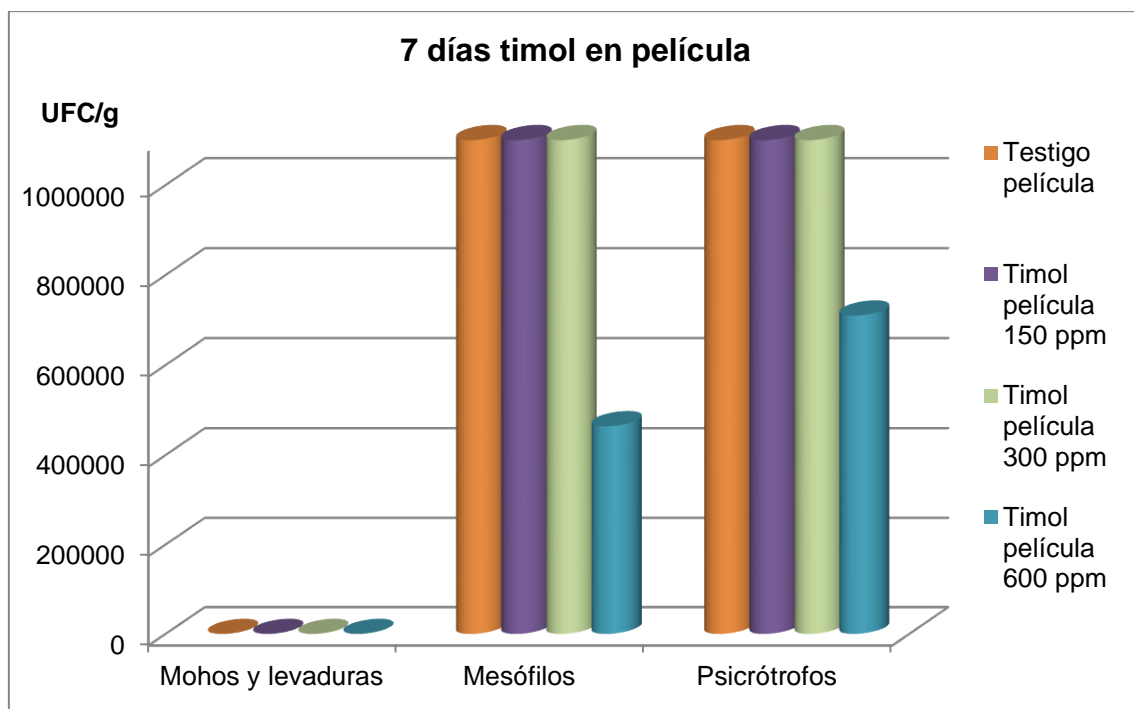


Gráfico 8: Película de timol, 7 días.

A los 10 días del envasado, los recuentos microbiológicos obtenidos (datos en gráfico 9), fueron parecidos a los anteriores, todos los tratamientos (mesófilos y psicrótrofos) sobrepasaron el valor límite de 10^7 ufc/g, a excepción del valor de la película de timol a 600 ppm para los mesófilos, que sobrepasó con creces el valor umbral.

Los resultados de este tratamiento, para el calabacín, parecen no mostrar resultados satisfactorios, al menos a los 7 y 10 días y para esas concentraciones.

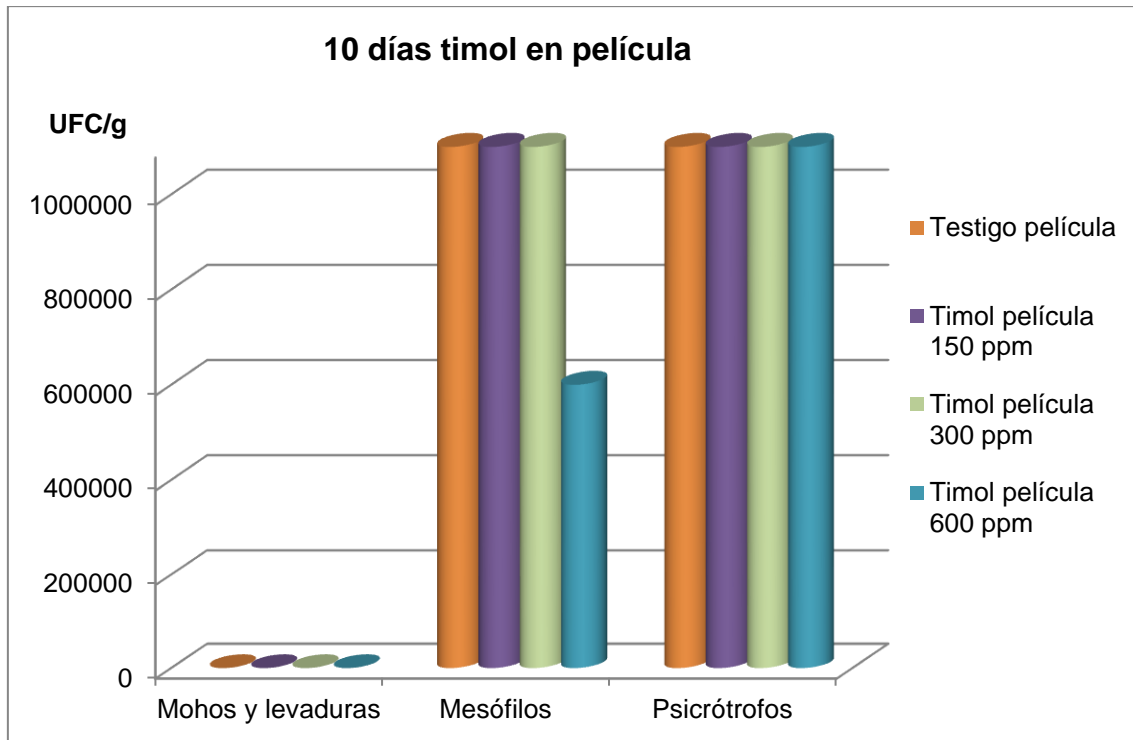


Gráfico 9: Película de timol, 10 días.

Timol encapsulado.

Los resultados de envasar el calabacín, con cápsulas de alginato con timol, fueron intermedios entre los obtenidos con la película comestible y los obtenidos para el baño por inmersión.

Dentro de este ensayo, se envasó el calabacín de 2 modos distintos, con pocas cápsulas y con muchas cápsulas.

Como en todos los tratamientos efectuados, los recuentos para mohos y levaduras, dieron negativos, tanto a los 7 como a los 10 días.

A los 7 días, los recuentos para el testigo, 150 ppm (pocas cápsulas), 150 ppm (muchas cápsulas), 300 ppm (pocas cápsulas) y 300 ppm (muchas cápsulas), sobrepasaron el valor umbral de 10^6 ufc/g, y solo los tratamientos con 600 ppm, tanto con pocas como con muchas cápsulas, quedaron por debajo de este valor umbral, como podemos ver en el gráfico 10. Para los psicrótrofos, los valores obtenidos fueron similares a los de los mesófilos.

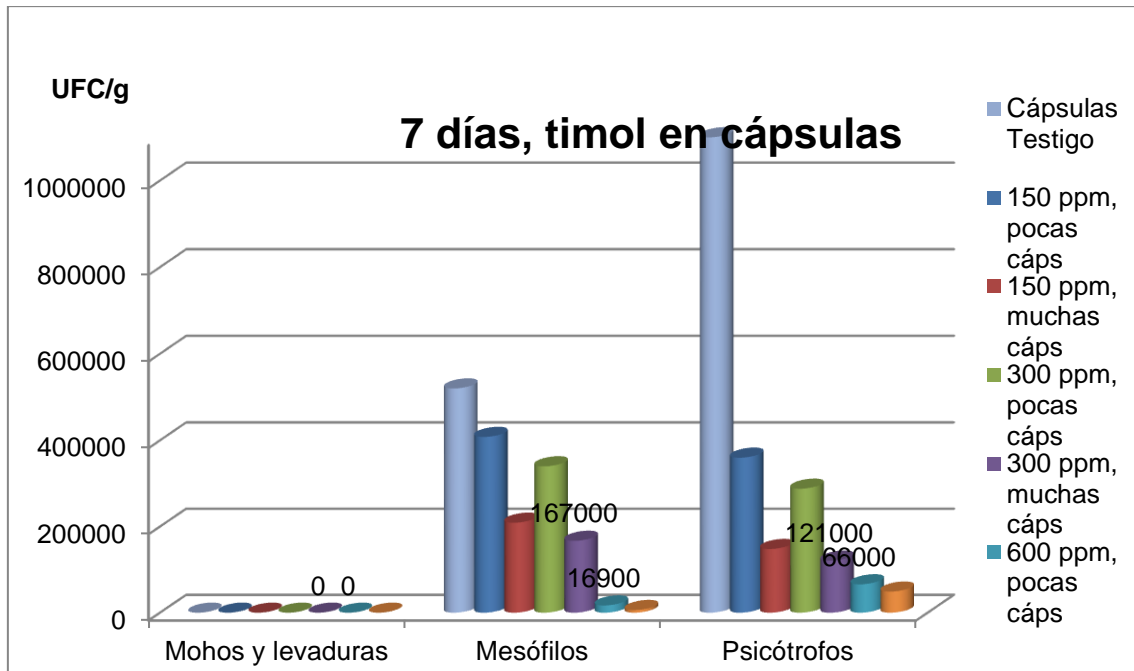


Gráfico 10: Timol en cápsulas, 7 días.

A los 10 días, los recuentos, como se ve en el gráfico 11, fueron para todos los tratamientos superiores al valor límite, menos para 600 ppm con muchas cápsulas, que superó el valor umbral, sin llegar al límite.

La tendencia en este ensayo, es que a mayor concentración de timol, menores recuentos obtenemos y también que a mayor cantidad de cápsulas en el envase, los recuentos son inferiores también.

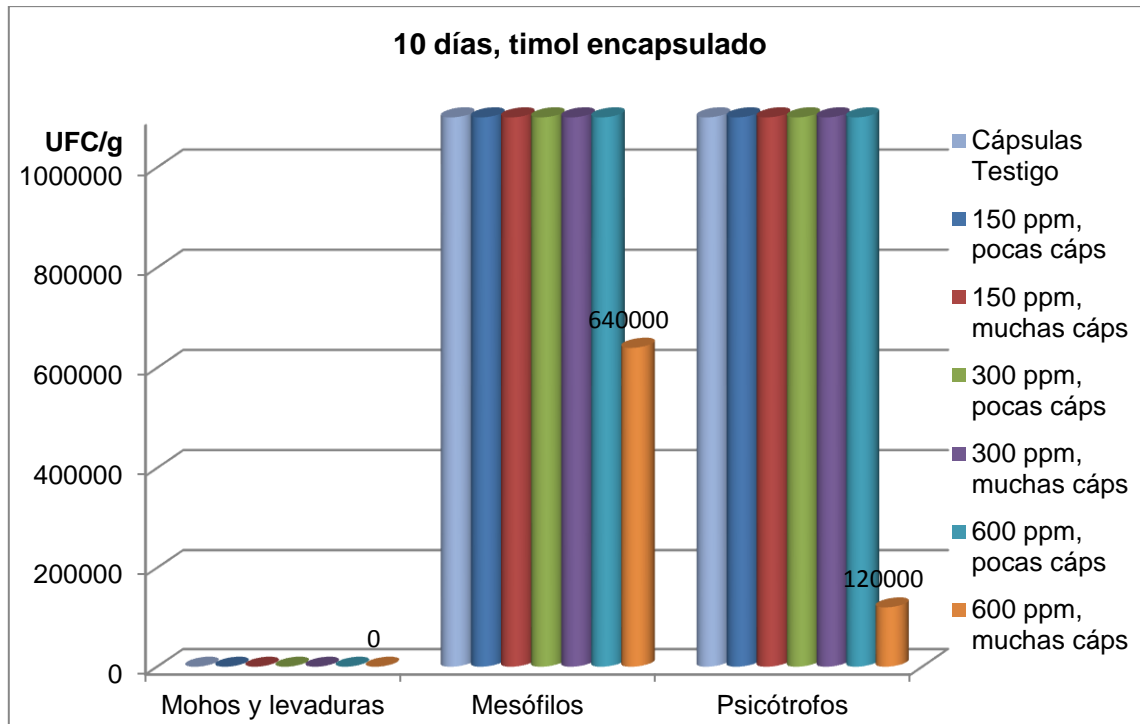


Gráfico 11: Timol encapsulado, 10 días.

Se puede decir, que en esta investigación con timol sobre calabacín envasado, los mejores resultados, desde el punto de vista microbiológico (efectos del agente antimicrobiano), fueron obtenidos mediante baño, seguidos de la encapsulación y por último la película comestible. Basándose en el indicador microbiológico de los aerobios totales mesófilos, para la fecha de caducidad.

3.1.3. Análisis estadístico.

Análisis estadístico basado en la aplicación de timol sobre el calabacín, se ha comparado la aplicación de timol a 600 ppm, dado que fue la concentración con mejores resultados, mediante baño, película comestible y cápsulas. Para ver si hay diferencias significativas entre las diferentes aplicaciones.

Como puede observarse, los puntos que representan a las medias de cada grupo aparecen dispersos a diferentes niveles; sobre todo la media del grupo definido por el factor Película. El intervalo de confianza para la media correspondiente al grupo definido por el factor Cápsula está contenido dentro del intervalo correspondiente al grupo definido por el factor Baño. El gráfico, por tanto, parece sugerir no una única población sino 2 poblaciones con distintas medias.

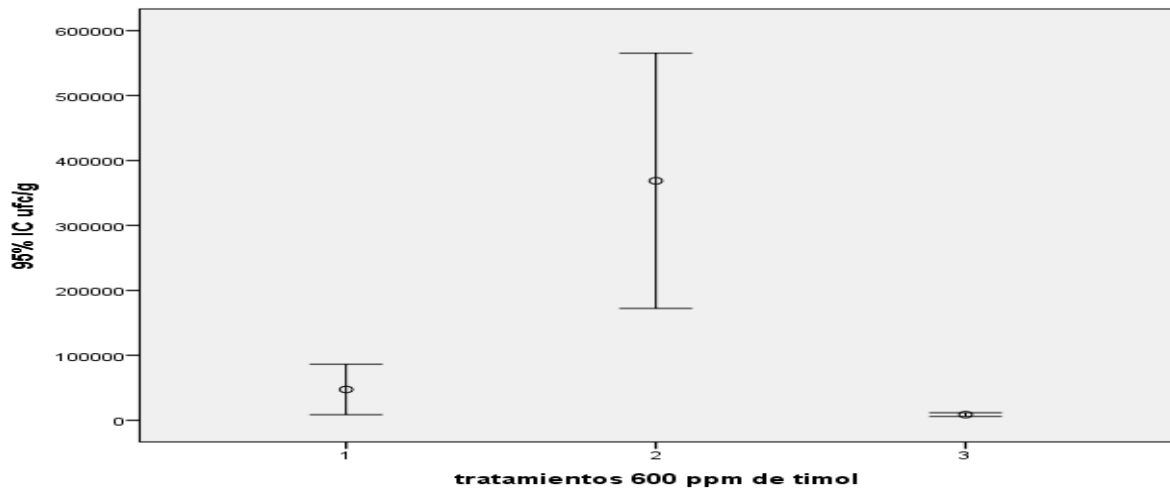


Figura 3: Gráfico barras de error.

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig |
|--------------|-------------------|----|------------------|------------|------|
| Inter-grupos | 312406491548,167 | 2 | 156203245774,083 | 29,5 51 | ,000 |
| Intra-grupos | 47573666666,750 | 9 | 5285962962,972 | | |
| Total | 359980158214,917 | 11 | | | |

Nivel de significación menor o igual que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias. Existen diferencias significativas entre grupos.

Para saber las diferencias entre que grupos se han producido, se hizo el test HSD Tukey,

Tabla 5: Prueba post hoc: HSD Tukey.

| Comparaciones múltiples, variable dependiente ufc/g | | | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------|------|------------------------|-------------|
| (I) | (J) | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig | Intervalo de confianza | |
| Tratamientos 600 ppm timol | Tratamientos 600 ppm timol | | | | L. Inferior | L. Superior |
| Baño | Película | -321300,0 | 51409,936 | ,000 | -464836,83 | 177763,17 |
| | Cápsulas | 38666,750 | 51409,936 | ,740 | -104870,08 | 182203,58 |
| Película | Baño | 321300,00 | 51409,936 | ,000 | 177763,17 | 464836,83 |
| | Cápsulas | 359966,75 | 51409,936 | ,000 | 216429,92 | 503503,58 |
| Cápsulas | Baño | -38666,75 | 51409,936 | ,740 | -182203,58 | 104870,08 |
| | Película | -359966,7 | 51409,936 | ,000 | -503503,58 | -216429,9 |

La diferencia de medias es significativa al nivel de 0,05.

Como se ha visto en el gráfico de los intervalos de confianza, el test HSD Tukey también ha obtenido diferencias significativas entre la película y los otros tratamientos, pero entre el baño y las cápsulas no.

3.2. Evaluación físico-química.

La evaluación físico-química se realizó a los 15 días del envasado, para los pimientos y los calabacines, en concreto se midió la actividad antioxidante y la vitamina C, para los productos tratados con agentes antimicrobianos (aceites esenciales y timol) y también para los controles, para ver si existían diferencias significativas en los parámetros, con la aplicación de los agentes antimicrobianos.

A. Vitamina C

Pimiento rojo California.

Los resultados de la vitamina C, en pimientos rojos California (el pimiento es un vegetal que destaca por su contenido en esta vitamina), como podemos ver hay diferencias significativas según la concentración usada, vemos la cantidad de Vitamina C en el testigo es de 457,92 mg/l (tabla 6), la cual al aplicar un 1,2% de aceites esenciales, desciende oscilando entre 436,72 mg/l de la mejorana y 250,16 mg/l del romero. El gran cambio se produce al aumentar la concentración a 1,8%, en torno a 10 veces, podemos ver que el contenido en vitamina C desciende a 55,12 mg/l en mejorana y 33,92 mg/l en lavanda.

Tabla 6: Vitamina C en pimientos rojos California.

| Código de muestra. | Testigo | Lavanda 1,2%. | Mejorana 1,2%. | Romero 1,2%. | Salvia 1,2%. | Lavanda 1,8%. | Mejorana 1,8%. |
|------------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| Volumen de muestra mL. | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Yodo inicial. | 3 | 13,80 | 22,90 | 33,20 | 39,10 | 47,60 | 48,40 |
| Yodo final. | 13,8 | 22,90 | 33,20 | 39,10 | 47,60 | 48,40 | 49,70 |
| Yodo consumido. | 10,80 | 9,10 | 10,30 | 5,90 | 8,50 | 0,80 | 1,30 |
| Resultado mg/L. | 457,92 | 385,84 | 436,72 | 250,16 | 360,40 | 33,92 | 55,12 |

Calabacín.

El calabacín es un vegetal, que no destaca por su concentración en vitamina C (tabla 7), en este caso al añadir los aceites esenciales, no se producen diferencias significativas, en parte por la poca cantidad de vitamina C que posee, en parte quizá por errores experimentales al realizar la valoración.

Tabla 7: Vitamina C en calabacines.

| Código de muestra. | Testigo | Lavanda 0,02% | Lavanda 0,04% | Mejorana 0,02% | Mejorana 0,04% | Romero 0,02% | Romero 0,04% | Salvia 0,02% | Salvia 0,04% |
|------------------------|--------------|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Volumen de muestra ml. | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Yodo inicial. | 19,20 | 19,40 | 20,00 | 20,20 | 20,70 | 20,90 | 21,60 | 22,10 | 22,30 |
| Yodo final. | 19,40 | 20,00 | 20,20 | 20,70 | 20,90 | 21,60 | 22,10 | 22,30 | 22,50 |
| Yodo consumido. | 0,20 | 0,60 | 0,20 | 0,50 | 0,20 | 0,70 | 0,50 | 0,20 | 0,20 |
| Resultado mg/l. | 16,96 | 25,44 | 16,96 | 21,20 | 8,48 | 29,68 | 21,20 | 16,96 | 16,96 |

B. Actividad antioxidante

Pimiento rojo California.

La actividad antioxidante en pimientos rojos California, como se puede ver en la tabla 8, se ve afectada al ir aumentando la concentración de aceite esencial, para las concentraciones de 1,2%, se ve que la actividad es similar al testigo, pero al aumentar la concentración a 1,8% la actividad antioxidante desciende del orden de 10 veces. Vemos que es algo parecido a lo que ocurre con la vitamina C.

Tabla 8: Actividad antioxidante en pimiento rojo California.

| Código de muestra | Testigo | Salvia 1,2% | Romero 1,2% | Lavanda 1,2% | Mejorana 1,2% | Lavanda 1,8% | Mejorana 1,8% |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Valor solución estándar | 1,119 | 1,119 | 1,119 | 1,114 | 1,114 | 1,114 | 1,114 |
| Valor muestra | 0,771 | 0,83 | 0,754 | 0,763 | 0,754 | 0,952 | 0,875 |
| Volumen obtenido | 41 | 43 | 43 | 38 | 41,5 | 45 | 27 |
| Dilución | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 1 | 1 |
| Gramos muestra | 10,01 | 10 | 10 | 10,03 | 10,04 | 10 | 10,04 |
| Resultado masc/g | 0,8569 | 0,7456 | 0,9417 | 0,8027 | 0,9000 | 0,0729 | 0,0648 |

Calabacín

La actividad antioxidante de los calabacines, tampoco destaca por su alta concentración en antioxidantes, se puede observar como norma general que al ir aumentando la cantidad de aceite esencial la actividad antioxidante va descendiendo paulatinamente (tabla 9). En este caso tampoco apreciamos diferencias significativas, quizá por la poca cantidad de actividad antioxidante que contiene el calabacín.

Tabla 9: Actividad antioxidante en calabacines.

| Código de muestra | Testigo | Lavanda 0,02% | Lavanda 0,04% | Mejorana 0,02% | Mejorana 0,04% | Romero 0,02% | Romero 0,04% | Salvia 0,02% | Salvia 0,04% |
|-------------------------|---------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Valor solución estándar | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 | 1,13 |
| Valor muestra | 1,075 | 1,10 | 1,106 | 1,094 | 1,088 | 1,075 | 1,102 | 1,101 | 1,108 |
| Volumen obtenido | 36 | 36 | 37 | 40 | 40 | 39 | 31 | 39 | 34 |
| Dilución | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gramos muestra | 10 | 10 | 10 | 10,01 | 10,01 | 10,02 | 10,01 | 10 | 10,03 |
| Resultado masc/g | 0,0198 | 0,0108 | 0,0089 | 0,0144 | 0,0168 | 0,0215 | 0,0087 | 0,0113 | 0,0075 |

3.3. Evaluación sensorial.

Los resultados de los distintos ensayos realizados, fueron bien distintos dependiendo de la concentración usada y de la forma de aplicación sobre el producto, todas las evaluaciones se realizaron a los 7 días del envasado, como se describen a continuación.

Las muestras control (sin aceites esenciales, ni timol) después de 7 días de almacenamiento, se evaluaron sobre los parámetros de sabor, color, aroma, aspecto y textura, las cuales obtuvieron calificaciones altas.

3.3.1. Aceites esenciales.

Pimientos rojo California.

En primer lugar, se aplicaron los aceites esenciales (lavanda, mejorana, romero y salvia) mediante baño por inmersión a concentraciones de 1,8 y 1,2 %.

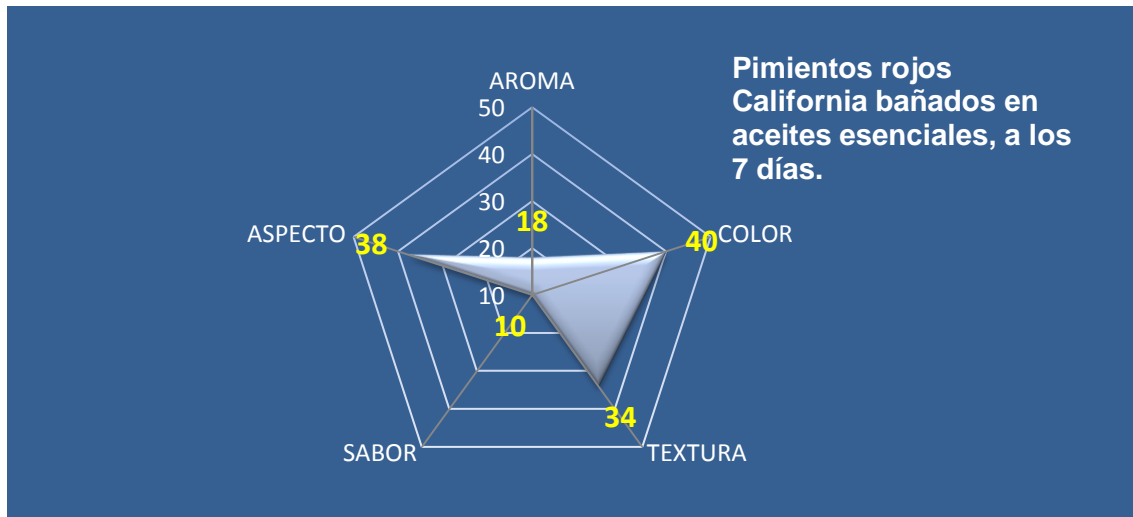


Gráfico 12: Evaluación sensorial de los pimientos rojos California a los 7 días, con tratamientos de aceites esenciales.

Debido a la elevada concentración empleada, algunos parámetros se vieron afectados significativamente. Como por ejemplo el aroma, la sensación percibida a estas concentraciones, era demasiado intensa, haciendo el producto no muy deseado, algo peor ocurrió con el sabor, ya que los aceites esenciales transmitían un intenso sabor a los pimientos (Como se ve en el gráfico 12, para el sabor, la valoración fue la mínima). Para el resto de parámetros, aspecto, color y textura no se vieron afectados significativamente. Los resultados fueron iguales para los 4 aceites esenciales y para las 2 concentraciones

Calabacín.

En un segundo ensayo, este sobre calabacín, la aplicación de los aceites esenciales (lavanda, mejorana, romero y salvia) también fue mediante baño por inmersión, esta vez a concentraciones de 0,04 y 0,02 %.

A estas concentraciones, no se vio afectado ningún parámetro significativamente, ni textura, sabor, color y aspecto, solo el aroma que se hacía notar en el producto, pero de un modo no desagradable. Los resultados fueron iguales para las 2 concentraciones (datos no mostrados).

3.3.2. Timol.

Timol aplicado por inmersión.

El primer tratamiento con Timol, mediante baño por inmersión a las concentraciones de 150, 300 y 600 ppm. En este ensayo, tampoco se vieron afectados los parámetros

significativamente, ni textura, sabor, color, aspecto ni aroma, salvo a 600 ppm, donde el aroma y sabor se hacían notar en el producto, pero también de un modo que no llegaba a desagradar. Dando al producto un sabor a picante y aroma a medicamento, a altas concentraciones.

Película de timol.

En otro ensayo con timol, este se aplicó mediante una película comestible de alginato sódico a las concentraciones de 150, 300 y 600 ppm.

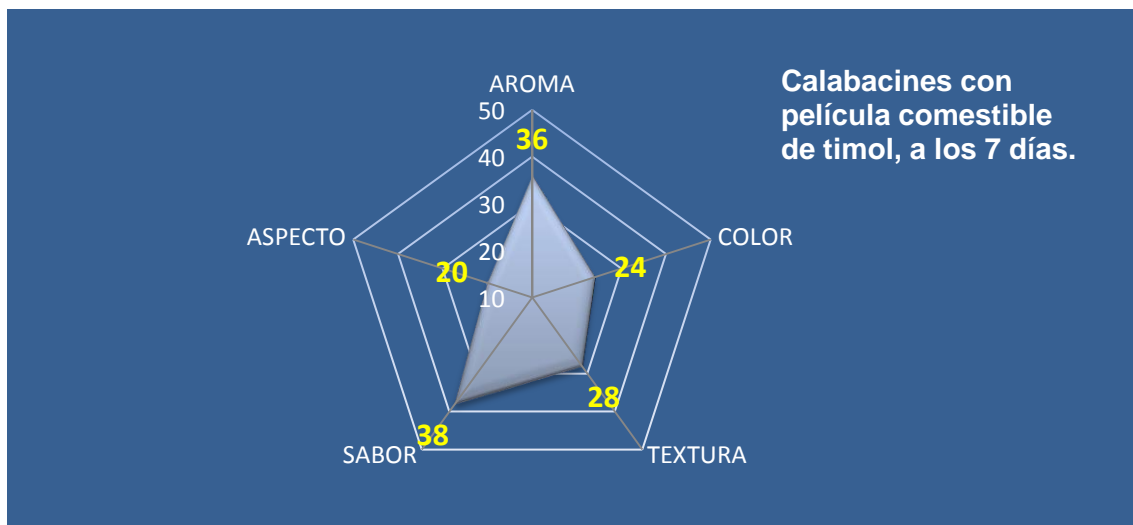


Grafico 13: Evaluación sensorial de los calabacines, con tratamiento de timol mediante película de alginato.

En este caso, no existieron diferencias significativas entre las concentraciones, pero si para los distintos parámetros. El aroma y el sabor no se vieron afectados, quedando el resto por debajo de la puntuación media (menos de 30 puntos) aspecto afectado por la película, la textura y el color también se vieron afectados pero en menor medida (Como se ve en el gráfico 13). El pardeamiento del calabacín, junto con la pérdida de textura al aplicarle el tratamiento le dieron al calabacín envasado un mal aspecto. El sabor original del calabacín se mantuvo.

Timol encapsulado.

Un último ensayo con timol, se aplicó encapsulándolo en alginato sódico a concentraciones de 150, 300 y 600 ppm (gráfico 14).

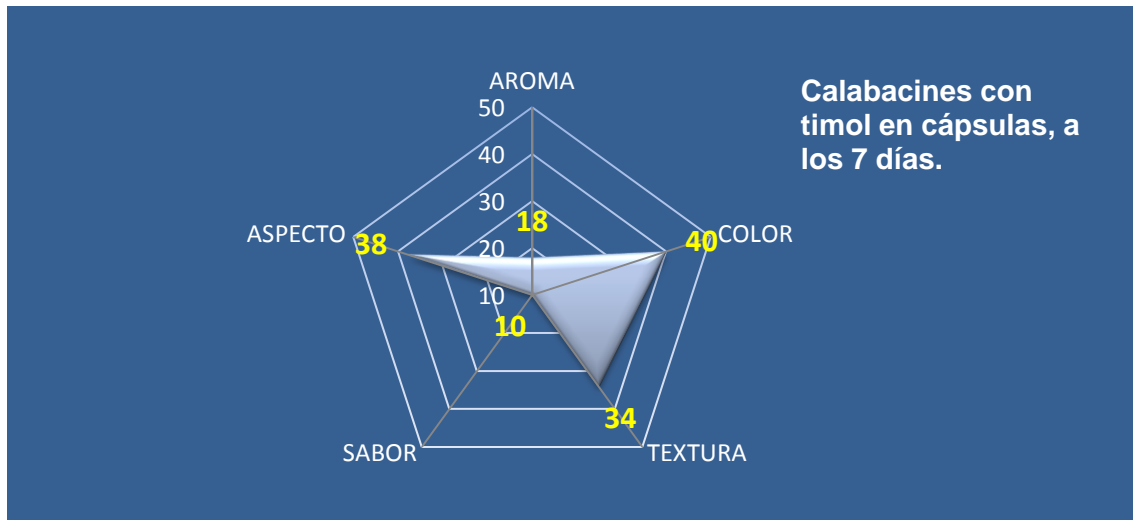


Grafico 14: Evaluación sensorial de los calabacines, con tratamiento de timol mediante encapsulación.

Los resultados variaron con respecto a la aplicación mediante película, en este caso tampoco no hubo diferencias significativas entre las concentraciones pero si para un parámetro, el aroma ya que confería un gran olor que no hacia al producto deseable, para el resto de parámetros color, textura, sabor y aspecto la evaluación sensorial fue buena, no transmitía sabor, no hubo pardeamiento, la textura quedo bien al igual que el aspecto.

Se puede resumir, diciendo que cada tratamiento tiene sus efectos concretos sobre las cualidades organolépticas de los calabacines, con el baño por inmersión se ve afectado el sabor, mediante la aplicación con película comestible el aspecto fue el parámetro más afectado y con el envasado con cápsulas, el parámetro afectado fue el aroma. En función del producto, del tipo de envasado, de la vida útil y de los requerimientos del consumidor, se puede optar por método u otro de aplicación.

4. Discusión.

Las frutas y verduras mínimamente procesadas, han adquirido relevancia en los últimos años entre los consumidores, lo cual implica el uso de nuevas tecnologías para garantizar la calidad y la inocuidad de los mismos. Un aspecto clave, se basa en conocer y comprender la evolución microbiana que este tipo de productos vegetales alberga. Las bacterias tienen la posibilidad de fijarse o infiltrarse en estructuras de protección de las verduras (lenticelas, tricomas, etc) o en heridas, pues a mayor número de microorganismos más rápidamente se degradará y se acortará su vida útil. Por eso, es necesario el uso de agentes antimicrobianos, como los usados en este proyecto, aceites esenciales y timol (un componente de los aceites esenciales).

No solo las propiedades intrínsecas de los alimentos influyen, como por ejemplo la tasa respiratoria, el pH, la actividad de agua, los antioxidantes, el contenido en grasas y proteínas, las sales etc. Sino también las extrínsecas como la recolección, manipulación, higiene, temperatura, envasado al vacío o en atmosfera modificada, las características de los microorganismos etc ([Burt, 2004](#)).

En el presente TFM se ha tomado de referencia para ver la caducidad de los productos los aerobios mesófilos (Real Decreto 3484/2000). Refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

Un recuento elevado puede significar:

- Excesiva contaminación de la materia prima.
- Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
- La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos.
- La inmediata alteración del producto.

Durante la etapa de preparación, de un producto de IV gama, la protección natural es eliminada o mermada. Se generan daños debido al corte del producto, que junto con las condiciones de alta humedad dentro del envase, crean un entorno propicio para el crecimiento bacteriano. Por el contrario, los productos de IV gama, se benefician de la disminución de la temperatura de almacenamiento, que ralentiza el crecimiento microbiano ([Burt, 2004](#)).

Se cree que los altos niveles de grasas en los alimentos, protegen a las bacterias de la acción de los aceites esenciales, debido a su poca solubilidad en agua, lo que produce que se dispersen de un modo poco uniforme, por la tendencia a unirse a los lípidos. Los vegetales, suelen tener un bajo contenido en grasa, que puede favorecer la acción de los aceites esenciales ([Bakkali y col., 2007](#)).

La concentración mínima inhibitoria (MIC), es la medida de la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de microorganismos después de su incubación. Podemos encontrar en la bibliografía, los MIC de algunos aceites esenciales ensayados contra diversos microorganismos. Pero se ha comprobado, que

se necesita una mayor concentración de aceite esencial para lograr el mismo efecto en alimentos que en ensayos in vitro, en torno al 1-3% (Holley y Patel, 2004).

La ausencia de mohos y levaduras en los ensayos, se puede deber a que fueran eliminados durante el lavado, junto con la conservación en cámara frigorífica y el posible descenso de O₂ en el envase, quedando inhibido su desarrollo.

Es posible, que la mayor disponibilidad de nutrientes en alimentos, en comparación con los medios de laboratorio, permita a los microorganismos reparar los daños celulares más rápido, o que el menor contenido de agua de los alimentos en comparación con los medios de cultivo, obstaculice el crecimiento (Burt, 2004).

Lo adición de una mayor concentración de aceites esenciales, en los alimentos frente a los ensayos in vitro puede provocar, que se sobrepase la cantidad máxima, que hace al producto organolépticamente aceptable.

Como en nuestro ensayo, con pimiento rojo California, los aceites esenciales fueron aplicados mediante baño (inmersión) y la cantidad aplicada fue sin duda mayor (1800 y 600 ppm), lo que hacía al producto organolépticamente inaceptable, en todos los casos, lo que produjo varias consecuencias en él, ya que al elevar la concentración, ésta paso a ser fitotóxica, haciendo el tejido más susceptible o sensible ante el ataque microbiano (como se pueden ver en los recuentos microbiológicos, de los gráficos 2 y 3). Esta situación condujo a un rápido deterioro de calidad (como podemos ver en las tablas 6 y 8), la cantidad de vitamina C y de antioxidantes totales, se ve reducida al aumentar la cantidad de aceites esenciales (Antunes y Cavaco, 2010). En este caso, la salvia fue el agente antimicrobiano que proporcionó mejores resultados, para el envasado de pimiento en IV gama.

Este comportamiento se confirma, mediante otro ensayo realizado posteriormente con calabacines, también aplicando aceites esenciales mediante baño (inmersión). Las concentraciones empleadas fueron menores (10 y 20 ppm), lo que dio lugar a recuentos microbianos aceptables, por debajo del 10⁶ ufc/g en el caso de aerobiosmesófilos, en los tratamientos correspondientes a lavanda y mejorana. Desde el punto de vista organoléptico, el calabacín fue afectado con un ligero olor y sabor a los mencionados aceites esenciales. En estos casos donde encontramos que un agente antimicrobiano, parece tener un buen efecto sobre un producto, si su sabor

no es compatible del todo, se debe buscar otro tipo de vegetal o alimento donde encaje más.

Según Sara Burt (2004), para las verduras las concentraciones entre 0,1-10 ppm de aceites esenciales en el lavado, logran efectos antibacterianos significativos. Una vez más recalamos que, debemos tener en cuenta siempre las propiedades organolépticas. Hasta la fecha, los aceites esenciales son más fáciles de incorporar en productos como carnes, pescados, quesos, sopas, salsas, bebidas etc.

Existen modos de utilizar los aceites esenciales, que logran efectos significativos, sobre productos con sabores no compatibles. Todas ellas, se están desarrollando en los últimos años, como por ejemplo el uso de combinaciones de aceites esenciales o de sus componentes, para ver como sus interacciones afectan a los microorganismos, si existe efecto sinérgico o aditivo, encontrando las combinaciones que actúen de forma sinérgica, para producir el efecto antimicrobiano deseado a concentraciones que no causen cambios organolépticos indeseables (NestorBassolé y Juliani, 2012; Hyldgaard y col., 2012). Algunos autores hacen referencia al uso de bacteriocinas, compuestos producidos naturalmente por las bacterias acidolácticas, que poseen amplio espectro antimicrobiano, inclusive contra patógenos tales como *Listeria monocytogenes*. Las bacteriocinas junto a los aceites esenciales o los compuestos activos de éstos, permitirían reducir la concentración de estos para salvar el escollo de la afección de los parámetros sensoriales (Gálvez y col., 2007). En este sentido, cabe destacar que la nisina es la bacteriocina más estudiada como posible antimicrobiano natural.

Como se ha comentado anteriormente, también se pueden usar como agentes antimicrobianos, el componente que realmente tiene la acción microbicina, dentro de los aceites esenciales. . Algunos compuestos fenólicos como carvacrol y timol, se encuentran entre los que mayor capacidad antimicrobiana poseen. Algunos autores como Zheng L. y colaboradores (2013), han estudiado in vitro varios componentes , como el carvacrol, el eugenol y el timol, contra 15 bacterias típicas que afectan a verduras y frutas frescas, dando la concentración mínima inhibitoria a 167, 168 y 648 ppm respectivamente.

En otro estudio llevado a cabo en Tecnova, sea aplicó timol mediante baño por inmersión, siendo las concentraciones de 150, 300 y 600 ppm. Tras 7 días de conservación a 4°C, se obtuvieron buenos resultados, obteniendo recuentos microbianos por debajo 10^6 ufc/g de aerobios mesófilos totales. Sin embargo, tras 10

días, todos los tratamientos incrementaron los citados recuentos por encima 10^7 ufc/g, excepto en aquel de 600 ppm. Por tanto, se deriva de estos resultados que el timol funciona en calabacín hasta los 7 días, es un buen candidato como agente antimicrobiano. Desde el punto de vista organoléptico, el timol a la concentración de 600 ppm, confiere al calabacín, un sabor ligeramente picante.

Los aceites esenciales y los compuestos activos de éstos, se suelen aplicar por inmersión en soluciones acuosas, debido a que es la forma más práctica o sencilla de utilización. Sin embargo, pueden producir efectos limitados o heterogéneos, ya sea porque sean neutralizados o porque no difundan bien, por problemas de hidrofobicidad, aplicación no uniforme, concentración en la parte lipídica de la membrana celular (Rojas-Graü y col., 2009).

Debido a esto, se desarrollan nuevos métodos de aplicación de los aceites esenciales o de sus componentes, como pueden ser su inclusión en películas comestibles, o su encapsulación.

El recubrimiento comestible de un alimento y la incorporación de agentes antimicrobianos, permitiría el mantenimiento de las concentraciones eficaces, en la superficie del alimento (Oms-Oliu G., 2010). También se ha detectado, que dichos recubrimientos son capaces de producir una cierta atmosfera modificada, mediante el aislamiento del producto del medio ambiente, puesto que actúan como una barrera frente al oxígeno, al dióxido de carbono y al vapor de agua. Recordemos que una de las ventajas del uso de la atmósfera modificada consiste en la disminución de la tasa respiratoria y por tanto una menor actividad metabólica, lo que conduce sin duda a una mejora de la vida útil (Rojas-Graü y col., 2009). No obstante, es necesario que no se produzcan fermentaciones por reducción excesiva de los niveles de oxígeno, lo que daría lugar a sabores desagradables (acumulación de etanol, acetaldehídos y otros volátiles (Rojas-Graü y col., 2009).

Diversos estudios como los de Rojas-Graü y colaboradores (2009), muestran la eficacia de combinar revestimientos comestibles como el alginato, con los aceites esenciales como los de orégano y hierba de limón o citronela, prolongando la vida útil de las manzanas recién cortadas. Con la aplicación de la película de alginato con orégano o bien con hierba de limón, se observó una reducción de hasta 4 unidades logarítmicas en los recuentos de *Listeria innocua* previamente inoculada.

Por este motivo, se aplicó sobre el calabacín, un recubrimiento comestible basado en alginato junto con timol, en concentraciones de 150, 300 y 600 ppm. En este ensayo, no se lograron resultados satisfactorios desde el punto de vista microbiológico, debido que a los 7 días, los recuentos ya fueron muy elevados por encima de valor límite (10^7 ufc/g), excepto con 600 ppm donde se situaron en torno a 10^6 ufc/g, tanto en el caso de mesófilos como psicrótrofos. Desde el punto de vista organoléptico, el aspecto y el color, se vieron afectados negativamente. Aparecieron pardeamientos pero el sabor y el aroma no fueron afectados. La aparición de pardeamientos, puede no deberse al uso del aceite esencial y por tanto se tendrían que realizar más estudios.

Por último, cabe mencionar el tratamiento por encapsulación del timol en alginato. Un sistema capaz de añadir el agente antimicrobiano al envase, sin que éste entre en contacto con el producto, con la consiguiente transmisión de sabor. Mediante este sistema, se pueden distribuir uniformemente, los antimicrobianos lipófilos por alimentos grasos. Además, la velocidad de liberación de los agentes antimicrobianos es menor, en comparación con otros tratamientos. En ensayos in vitro, como los de Guarda y colaboradores (2011), determino una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 125-250 ppm para el timol, contra las bacterias ensayadas. En el último ensayo realizado en Tecnova, encapsulación del timol en alginato, a las concentraciones de 150, 300 y 600 ppm, diferenciamos dos tipos de calabacín envasado, con muchas y con pocas capsulas, para comprobar si había diferencias significativas entre envasar muchas o pocas capsulas. No hubo tales diferencias, menos en los tratamientos con 600 ppm (tanto muchas, como pocas cápsulas), en el resto de tratamientos los recuentos superaron el valor umbral (10^6 ufc/g), para los 7 días, para los 10 días los recuentos fueron todos superiores.

Desde el punto de vista organoléptico, un intenso olor que apareció en el envase, lo que puede limitar su uso. Se deben realizar nuevos estudios con el fin de resolver este problema.

5. Conclusiones.

En productos vegetales de IV gama, los análisis microbiológicos y sensoriales son los instrumentos eficaces para el control de la seguridad y calidad alimentaria, así como para la aceptación del producto. Hay por tanto, necesidad de encontrar un equilibrio entre el grado de aceptación sensorial y la eficacia antimicrobiana de un determinado tratamiento.

Resulta difícil, la comparación de los resultados obtenidos a lo largo del presente estudio, con los descritos por otros autores, como consecuencia de la diversidad de variables tecnológicas usadas (atmosfera modificada, envasado al vacío, uso de distintas películas plásticas y envases, recubrimiento comestibles, encapsulación, etc). Asimismo, se ha observado una importante diversidad de aceites esenciales y de compuestos activos de éstos.

Los resultados realizados revelan:

- El efecto fitotóxico de altas concentraciones de aceites esenciales.
- A concentraciones adecuadas el efecto antibacteriano de los aceites esenciales y de sus componentes.
- Los efectos significativos, en las propiedades organolépticas de los vegetales, de los aceites esenciales y sus compuestos activos. Ya sea mediante la aplicación por baño, afectando al sabor, o mediante película comestible, afectando al color y el aspecto, junto con la técnica de la encapsulación, donde se vio afectado tan sólo el aroma.

Por tanto, analizando los resultados obtenidos, queda probado el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y de sus componentes activos, teniendo en cuenta que son compuestos GRAS (reconocidos como seguros, en la alimentación), y la tendencia actual a sustituir a los conservantes químicos, por productos naturales. Se precisa continuar estudiándolos para lograr que sean también, organolépticamente aceptables los productos tratados con ellos. Para ello, se están empleando diferentes alternativas como el empleo de combinaciones sinérgicas, bacteriocinas, nuevos modelos de aplicación, como por ejemplo las películas comestibles o la encapsulación.

6. Bibliografía:

- Afhorfresh: Asociación Española de Frutas y Hortalizas lavadas, listas para su empleo.
Dependiente de Fepex: Federación Española de asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas.
- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., y Cabras P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, 2006.
- Antunes M.D., y Cavaco A.M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and fragrance journal*, 2010.
- Alves de Azeredo G., Montenegro Stamford T.L., Campos Nunes P., Gomes Neto N.J., Gomes de Oliveira M.E. y Leite de Souza E. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 2011.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. y Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2007.
- Burt Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004.
- Camele I., Altieri L., De Martino L., De Feo V., Mancini E. y Rana G.L. In Vitro Control of Post-Harvest Fruit Rot Fungi by Some Plant Essential Oil Components. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012.
- Coexphal: Asociación de Organizaciones de Productores de Frutas y Hortalizas de Almería.
- Gálvez A., Abriouel H., Lucas López R., y Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 2007.
- Guarda A., Rubilar J.F., Miltz J., y Galotto M^a.J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 2011.

- Hyltdgaard M., Mygind T., y Meyer R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 2012.
- Holley R.A. and Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 2004.
- Klein G., Rüben C., y Upmann M. Antimicrobial Activity of Essential Oil Components Against Potential Food Spoilage Microorganisms. *Current Microbiol*, 2013.
- Nestor Bassolé I.H., y Juliani H.R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties, review. *Molecules*, 2012.
- Oms-Oliua G., Rojas-Graü M^a Alejandra., Alandes González L., Varela P., Soliva-Fortuny R., Hernando Hernando M^a. I., Pérez M., Fiszman S., y Martin-Belloso O. Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 2010.
- Rodríguez A., R. Batlle., y C. Nerin. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings*, 2007.
- Santana O., Cabrera R., Giménez C., González-Coloma A., Sánchez-Vioque R., de los Mozos-Pascual M., Rodríguez-Conde M.F., Laserna-Ruiz I., Usano-Aleman J. y Herraiz D. Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agro-industrial en Castilla-La Mancha (España). *Grasas y aceites*, 2012.
- Shah B., Davidson P.M., y Zhong Q. Nanocapsular Dispersion of Thymol for Enhanced Dispersibility and Increased Antimicrobial Effectiveness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Model Food Systems. *Applied and environmental microbiology*, 2012.
- Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., y van Griensven Leo J. L. D. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules*, 2010.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N.R., Nogueira J., Saraiva J.A. y Nunes M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 2012.

Zheng L., Bae Y.M., Jung K.S., Heu S., y Lee S.Y. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. Food Control, 2013.