

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Departamento de Tecnología de Alimentos



Proyecto Fin de Máster

Actividad antibacteriana de aceites esenciales de  
orégano y tomillo incorporados en soluciones  
formadoras de films sobre la microbiota superficial  
de filetes de merluza

Presentada por:

Iñaki Elizari Reta

Dirigida por:

Dr. Juan Ignacio Maté Caballero

Pamplona, Septiembre 2013



## Resumen

Los aceites esenciales de orégano y tomillo han demostrado ser eficaces antimicrobianos. Su uso como aditivos en películas y recubrimientos comestibles permite prolongar y localizar su efecto en las zonas deseadas, reduciendo la cantidad necesaria. Se estudió la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo, incorporados en soluciones formadoras de films de proteína del suero de leche, sobre la microbiota superficial aislada de filetes de merluza conservados en atmósfera aeróbica y en atmósfera modificada (MAP: 45% N<sub>2</sub>, 50% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). La inhibición del crecimiento bacteriano aumentó con la concentración de los dos aceites esenciales, siendo óptima al 3% (p/p). No se observaron diferencias significativas en la inhibición bacteriana al aplicar los aceites en soluciones formadoras de films o diluidos en agua, ni tampoco entre los aceites de orégano y tomillo. La inhibición fue alta mientras la concentración de bacterias fue inferior a 10<sup>8</sup> log ufc/mL.

**Palabras clave:** Aceite esencial, Orégano, Tomillo, Merluza, Solución formadora de films, Proteína aislada de suero de leche, Actividad antibacteriana, MAP



## **Abstract**

Oregano and thyme essential oils have proven to be effective antimicrobials. Its use as additives in edible films and coatings allows to prolongate and focus its effect at the desired locations, lowering the amount necessary. This study evaluated the antibacterial activity of oregano and thyme essential oils incorporated in whey protein isolate film forming solutions on hake fillets surface isolated microflora. Hake fillets were stored in aerobic atmosphere and modified atmosphere (MAP: 45% N<sub>2</sub>, 50% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). The bacterial growth inhibition increased as both oil ratios (1, 3 and 5% w/w) did, being optimal at 3% level. There were no significant differences in the bacterial inhibition among oils incorporated in film forming solutions and oils diluted in water. Neither was difference among oregano and thyme oils bacterial inhibition. Essential oils were effective whilst bacteria didn't grow over 10<sup>8</sup> cfu/mL.

**Keywords:** Essential oil, Oregano, Thyme, Hake, Film forming solution, Whey protein isolate, Antibacterial activity, MAP



# Índice

Resumen .....	3
Abstract .....	5
Índice .....	7
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
<hr/>	
1.1. Caracterización de la merluza .....	9
1.1.1. Aspectos generales .....	9
1.1.2. Aspectos microbiológicos .....	10
1.2. Películas y recubrimientos comestibles .....	13
1.2.1. Aspectos generales .....	13
1.2.2. Películas basadas en proteína aislada del suero de leche .....	15
1.3. Aceites esenciales como agentes antimicrobianos .....	16
1.3.1. Aspectos generales .....	16
1.3.2. Actividad antimicrobiana .....	17
1.3.3. Composición de los aceites esenciales de orégano y tomillo .....	18
<b>2. Diseño experimental</b>	<b>21</b>
<hr/>	
2.1. Objetivos .....	21
2.2. Diseño experimental .....	21
<b>3. Material y métodos</b>	<b>25</b>
<hr/>	
3.1. Preparación de las muestras .....	25
3.1.1. Filetes de merluza .....	25
3.1.2. Condiciones de envasado .....	26
3.2. Preparación de las soluciones formadoras de films .....	26
3.2.1. Composición de las soluciones formadoras de films .....	26
3.2.2. Elaboración de las soluciones formadoras de films .....	27
3.3. Preparación de las mezclas de aceites esenciales y agua .....	28
3.4. Aislamiento y caracterización de la microbiota superficial de los filetes de merluza	29
3.4.1. Aislamiento de la microbiota superficial de los filetes de merluza .....	29
3.4.2. Caracterización de la microbiota aislada .....	30
3.4.2.1. Medios de cultivo .....	30
3.4.2.2. Cuantificación de la microbiota .....	31
3.5. Control de calidad .....	32
3.5.1. Preparación de las muestras para el control de calidad .....	32
3.5.2. Microorganismos indicadores de la calidad .....	33

3.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de las soluciones formadoras de films y las mezclas de agua y aceite .....	34
3.7. Análisis estadístico .....	37
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>39</b>
<hr/>	
4.1. Actividad antibacteriana de las soluciones sobre la microbiota aislada de los filetes de merluza .....	39
4.1.1. Tratamiento de envasado en aire .....	39
4.1.1.1. Influencia de la concentración de aceite en la actividad antibacteriana .....	40
4.1.1.2. Influencia de las soluciones formadoras de films en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales .....	41
4.1.1.3. Comparación entre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo .....	44
4.1.1.4. Evolución de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales durante el almacenamiento de los filetes de merluza .....	44
4.1.2. Tratamiento de envasado en MAP .....	46
4.1.2.1. Influencia de la concentración de aceite en la actividad antibacteriana .....	46
4.1.2.2. Influencia de las soluciones formadoras de films en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales .....	48
4.1.2.3. Comparación entre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo .....	50
4.1.2.4. Evolución de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales durante el almacenamiento de los filetes de merluza .....	51
4.2. Caracterización de la microbiota superficial .....	52
4.2.1. Tratamiento de envasado en aire .....	52
4.2.2. Tratamiento de envasado en MAP .....	54
4.3. Control de calidad .....	55
4.3.1. Tratamiento de envasado en aire .....	55
4.3.2. Tratamiento de envasado en MAP .....	56
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>59</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>61</b>

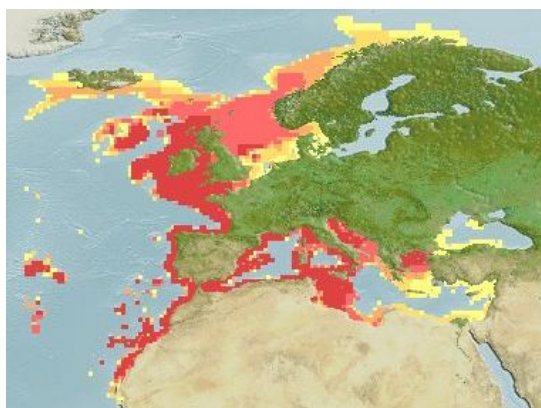


# 1. Introducción

## 1.1. Caracterización de la merluza

### 1.1.1. Aspectos generales

La especie de merluza más consumida en Europa es la merluza europea común (*Merluccius merluccius*), aunque existen otras muchas especies en la familia de los merlúcidos que poseen valor comercial (*M. bilinearis*, *M. productus*, *M. gayi*, *M. australis*, *M. capensis*, *M. paradoxus*, *M. hubbsi*, *M. senegalensis* y *M. polli*). En la figura 1 (aquamaps, 2010) pueden observarse los puntos de las costas europeas donde habita la merluza (en las zonas rojas su presencia es alta, mientras que en las amarillas es baja).



**Figura 1.** Mapa de distribución de *Merluccius merluccius*.

La merluza es un pescado blanco con bajo contenido en grasas (tabla 1). Habita en aguas templadas, a profundidades entre los 70 y 400 metros, y tiene un tamaño medio entre 20 y 70, cm aunque se han descrito ejemplares de 140 cm y 15 kg de peso (FishBase.org, 2012).

Algunas características a tener en cuenta en la merluza, por su importancia en el proceso de degradación por fenómenos de autólisis y crecimiento bacteriano, son el alto pH *post-mortem*, la baja cantidad de aminoácidos libres en comparación con otros peces de agua salada, y la baja cantidad de hierro disponible. La concentración limitante de hierro tiene una gran importancia en la presión selectiva que se ejerce sobre la microbiota,

favoreciendo el crecimiento de las especies más eficientes en su obtención. (Gram, Ravn, Rasch, Bruhn, Christenesen, et al., 2002).

**Tabla 1.** Información nutricional de la merluza mediterránea.

<b>Composición por 100 gramos de porción comestible</b>	
<b>Calorías</b>	63,4
<b>Proteínas (g)</b>	11,8
<b>Grasas (g)</b>	1,8
<b>*G. saturadas (g)</b>	0,35
<b>*G. monoinsaturadas (g)</b>	0,43
<b>*G. poliinsaturadas (g)</b>	0,46
<b>Hierro (mg)</b>	1,10
<b>Magnesio (mg)</b>	25,1
<b>Potasio (mg)</b>	270
<b>Fósforo (mg)</b>	190
<b>Cinc (mg)</b>	0,37
<b>Yodo (mg)</b>	18
<b>B1 o tiamina (mg)</b>	0,09
<b>B2 o riboflavina (mg)</b>	0,09
<b>B3 o niacina (mg)</b>	6,1
<b>B9 o ácido fólico (mcg)</b>	12,3
<b>B12 o cianocobalamina (mcg)</b>	1,10

mcg = microgramos

Información obtenida en <http://pescadosymariscos.consumer.es/merluza/propiedades-nutritivas>

El consumo de merluza en España durante 2009 fue de 178,9 millones de toneladas (25,5 % del consumo de pescado total), siendo el pescado más consumido por los españoles y produciendo unos beneficios de 1.175 millones de euros. El 75 % de la merluza se comercializó como producto fresco, mientras que solamente el 25 % se vendió congelado (Martín-Cerdeño, V.J., 2010). Debido a la preferencia por parte de los consumidores hacia la merluza fresca y al rápido deterioro del pescado, cobra mucha importancia el desarrollo de tecnologías para su conservación que permitan aumentar su vida útil manteniendo sus propiedades organolépticas.

### 1.1.2. Aspectos microbiológicos

La merluza, al igual que la mayoría de peces, tiene una vida útil muy corta cuando es comercializada en refrigeración y sin tratamientos adicionales (salado, secado, etc.). Su degradación puede deberse tanto a causas que sólo afectan a los aspectos sensoriales del producto, provocando rechazo por parte de los

consumidores, como a causas que pueden suponer un riesgo para la seguridad alimentaria.

La naturaleza poiquiloterma de la merluza, y su elevado pH *post-mortem* (por encima de 6) permite que un gran número de especies bacterianas, capaces de crecer en rangos amplios de temperatura formen parte de su microbiota. La merluza de aguas templadas está colonizada generalmente por bacilos Gram negativos psicrotrofos, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae*. También están presentes diversas especies Gram positivas de importancia como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* (Gram & Huss, 1996).

El crecimiento de microorganismos hasta llegar a altas concentraciones ( $10^7 - 10^9$  ufc/g) es la principal causa de degradación de la merluza, tanto por la aparición de colonias visibles, decoloración y exudados, como por la producción de compuestos volátiles de olor desagradable. Las especies bacterianas que crecen en la superficie de la merluza son muy variadas, dependiendo de la temperatura y contaminación de las aguas donde habite, y la posterior contaminación durante el procesado. Sin embargo, sólo algunos microorganismos son capaces de crecer en cantidades suficientes para poder afectar a la calidad del pescado, y a este conjunto de microorganismos se le conoce como organismos específicos del deterioro (specific spoilage organisms, SSO) (Gram, Ravn, Rasch, Bruhn, Christenesen, et al., 2002).

Un hecho importante a tener en cuenta a la hora de aplicar tratamientos para limitar el crecimiento de los SSO son las relaciones de competencia y sinergismos entre las distintas especies presentes en la microbiota. Debido a los fenómenos de competencia, es común que al limitar el crecimiento de un tipo de bacterias sean otras las que proliferen gracias a que ya no existe la presión competitiva que antes se lo impedía. El sinergismo, por el contrario, permite que ciertas especies bacterianas puedan proliferar aprovechándose de los metabolitos producidos por otras especies, sin las cuales su crecimiento sería

mucho menor (Gram, Ravn, Rasch, Bruhn, Christensen, et al., 2002). Las relaciones entre la microbiota del pescado han sido ampliamente estudiadas, permitiendo predecir cuáles serán los principales SSO responsables del deterioro de la merluza (tabla 2).

**Tabla 2.** Microorganismos responsables del deterioro de la merluza bajo distintas condiciones de conservación.

Tª (°C)	Atmósfera	pH	a <sub>w</sub>	Tipo de tratamiento	SSO
Ambiente	Aerobia	5 - 7	Alta	Ninguno	Vibrionaceae
4 -5	Aerobia	5 - 7	Alta	Refrigeración	Shewanella, Pseudomonas
4 - 5	Anaerobia	5 - 7	Alta	Refrigeración, MAP (CO <sub>2</sub> )	Photobacterium, Shewanella
4 - 5	Anaerobia	5 - 7	Baja	Refrigeración, MAP, NaCl	Bact. ácido lácticas, Enterobacteriaceae, Photobacterium
4 -5	Anaerobia	<5	Baja	Refrigeración, MAP, NaCl (6%), sorbato, benzoato	Bact. ácido lácticas, levaduras

Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria (Gram, Ravn, Rasch, Bruhn, Christensen, et al., 2002)

El envasado en atmósfera modificada es una tecnología de barrera que ha permitido incrementar la vida útil del pescado en refrigeración varios días (Mexis, Chouliara, & Kontominas, 2009) en comparación con la vida útil del pescado envasado en atmósfera aerobia. El uso de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (50% o superiores) tiene un efecto bacteriostático y fungistático (Stammen, Gerdes, & Caporaso, 1990). Sin embargo, la ausencia de O<sub>2</sub> en alimentos con alta actividad de agua (a<sub>w</sub> > 0,92) puede permitir el crecimiento de patógenos anaerobios como *Clostridium botulinum* (Mexis et al., 2009).

Las bacterias mesófilas son las principales responsables de la producción de aminas biógenas a temperatura ambiente, especialmente histamina. Entre las bacterias psicrotrofas, son pocas las que tienen capacidad de formar aminas biógenas, por lo que su aparición en condiciones de refrigeración es más lenta. Sin embargo, conforme aumenta la población de bacterias psicrotrofas la producción de aminas es cada vez mayor (Al Bulushi, Poole, Deeth, & Dykes,

2009). Por todo ello, los recuentos bacterianos son utilizados como indicador de la calidad de la merluza. Habitualmente se realiza un recuento de bacterias viables totales (mesófilas), cuyo valor debe ser inferior a  $10^6$  ufc/g según la normativa europea (MSC 1991). También es habitual hacer recuentos de las bacterias psicrotrofas, ácido lácticas y enterobacterias.

## **1.2. Películas y recubrimientos comestibles**

### 1.2.1. Aspectos generales

Las películas y los recubrimientos son dos caras de la misma moneda. Tienen la misma composición pero mientras que las películas son sintetizadas en estado sólido independientemente del alimento (para formar bolsas, envoltorios, láminas, etc.), los recubrimientos son aplicados directamente sobre el alimento formando parte inseparable del producto final.

Las películas y recubrimientos comestibles han sido objeto de una intensa investigación durante los últimos años debido al amplio espectro de posibilidades que ofrecen. Dependiendo de su composición (proteínas, polisacáridos, lípidos o mezclas de estas sustancias) y de la formulación empleada, pueden igualar a sus contrapartidas sintéticas en cuanto a propiedades barrera frente a los gases, la humedad y/o los aromas, resistencia mecánica, flexibilidad y elasticidad. Además, al ser comestibles pueden aplicarse entre distintas capas de un producto evitando el paso de humedad y/o materia de unas a otras. A todo ello se une el hecho de que son biodegradables y no tóxicas, además de poder elaborarse a partir de los residuos procedentes de otras industrias alimentarias. Por último, es posible incorporar aditivos con funciones especiales (antimicrobianos, antioxidantes, etc.) en la matriz de las películas y recubrimientos, dando lugar a una infinidad de posibilidades a la hora de mejorar la conservación de los alimentos (Ramos, Fernandes, Silva, Pintado, & Malcata, 2012).

La contaminación y generación de residuos no biodegradables es un gran problema para la sociedad actual, donde gran parte de los plásticos sintéticos no biodegradables presentes en los vertederos provienen de los envases alimentarios. El uso de películas y recubrimientos comestibles para controlar la conservación y calidad de los alimentos permite reducir la cantidad de plásticos sintéticos utilizados en la elaboración del envase externo, resultando en una disminución de los residuos no biodegradables que se generarán.

La incorporación de aditivos en las películas y recubrimientos comestibles en lugar de aplicarlos directamente sobre el alimento conlleva varias ventajas. Por una parte, se consigue que los aditivos ejerzan su acción de forma localizada (sobre las superficies en contacto con la película) por lo que se reduce la concentración de aditivo necesaria para obtener los mismos efectos que en la aplicación directa. Además, se protege al aditivo de su interacción con compuestos del alimento que podrían anular su actividad, y permite la liberación gradual del aditivo de forma que sus efectos se mantengan durante más tiempo (Campos, Gerschenson, & Flores, 2010).

Las propiedades de las películas y recubrimientos comestibles dependen en gran medida del polímero utilizado como matriz, aunque pueden verse influenciadas también por el uso de diversos aditivos. A continuación se muestra un resumen de los principales polímeros empleados para la síntesis de películas y recubrimientos:

### **Polisacáridos**

Los polisacáridos producen películas homogéneas y transparentes, con una resistencia mecánica media. Actúan bien como barrera frente al oxígeno, aromas y lípidos, pero no como barrera a la humedad (Ramos et al., 2012). Algunos de los polisacáridos utilizados para la elaboración de películas son:

- a. Celulosa y derivados
- b. Almidón y derivados
- c. Alginatos

- d. Gomas (arábica, guar, gellan, etc.)
- e. Pectinas
- f. Quitosano

### **Proteínas**

Las propiedades de las películas formadas a partir de proteínas dependen en gran medida de las características de las proteínas utilizadas. Las películas elaboradas con proteínas tienen buena resistencia mecánica, barrera al oxígeno, lípido y aromas, pero actúan mal como barrera a la humedad (Seydim & Sarikus, 2006). Sin embargo, la permeabilidad al vapor de agua puede modificarse mediante métodos químicos, enzimáticos o físicos (Bourtoom, 2009). Algunas de las proteínas que se han estudiado con este fin son:

- a. Proteínas de la leche (caseína y proteína aislada del suero)
- b. Zeína de maíz
- c. Colágeno
- d. Gluten de trigo
- e. Proteína de soja

### **Lípidos**

Se caracterizan por formar películas con alta barrera frente a la humedad. Además, pueden utilizarse para incorporar aditivos lipofílicos que presentan dificultades para ser incluidos en las películas anteriormente nombradas. Los más utilizados son ceras, resinas y ácidos grasos. Sin embargo, los lípidos no son adecuados para formar películas por sí solos, por lo que habitualmente se aplican en combinación con una matriz de polisacáridos para mejorar su resistencia mecánica (Campos et al., 2010).

#### **1.2.2. Proteína aislada del suero de leche**

Las proteínas de la leche se dividen en dos grandes grupos: caseínas (80 %) y proteínas del suero (20 %). Las caseínas son insolubles en agua, mientras que las proteínas aisladas del suero de leche (whey protein isolate, WPI) son solubles, y se obtienen como residuo durante la coagulación de las caseínas en la

fabricación de quesos. Además de las propiedades barrera y resistencia mecánica de los films elaborados con WPI, aportan valor nutritivo al producto.

Los films de WPI se elaboran mediante la desnaturalización en medio acuoso de las proteínas (por acción de la presión hidrostática, calor, enfriamiento, hidrólisis enzimática, etc.) y su posterior gelificación debido a interacciones físicas y químicas entre las proteínas. Para obtener el film sólido se deshidrata la emulsión, teniendo en cuenta que dependiendo de las condiciones de deshidratación pueden afectar a las características finales del film (Guilbert et al., 1996).

Los films WPI tienden a ser muy frágiles, por lo que es necesaria la adición de plastificantes de grado alimentario como el glicerol o el sorbitol. Estas sustancias se intercalan entre los polímeros del film aumentando el espacio libre entre ellos y facilitando su movilidad. De esta forma se mejora la flexibilidad de los films, facilitando su manipulación durante el procesado. Los plastificantes hidrofílicos como el glicerol tienden a aumentar la permeabilidad a los gases y la capacidad de absorber agua de los films (Perez-Gago and Krochta, 2002), aunque debido a su mejor estabilidad y compatibilidad con matrices hidrofílicas en comparación con otros plastificantes es uno de los más utilizados (Fernández-Cervera et al., 2004).

### **1.3. Aceites esenciales**

#### 1.3.1. Aspectos generales

Los aceites esenciales están compuestos por sustancias lipofílicas, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos, ésteres y éteres) en distintas cantidades (Fornari, Vicente, Vazquez, Garcia-Risco, & Reglero, 2012). Han sido tradicionalmente utilizados por la industria cosmética en la elaboración de perfumes, aunque durante el último siglo han cobrado relevancia en el sector farmacéutico y alimentario debido a sus propiedades antimicrobianas y a la



creciente demanda de productos de origen natural por parte de los consumidores (Burt, 2004).

Dependiendo de la fuente de origen de los aceites esenciales (especie vegetal y órgano de la planta), y de diversos factores como la fase del ciclo vital de la planta en la que se produjo la extracción de los aceites esenciales, la zona geográfica donde crecieron esas plantas y el método de extracción empleado, la composición química de los aceites esenciales puede variar en gran medida (Seydim & Sarikus, 2006). Esta variabilidad en la composición de los aceites esenciales sumada a la falta de un método estándar para evaluar su actividad antimicrobiana dificulta la comparación de los resultados obtenidos en distintos experimentos (Burt, 2004). A pesar de ello, algunos aceites esenciales como los extraídos del orégano y el tomillo destacan por su efectividad sobre un amplio espectro de microorganismos alterantes de los alimentos (Gutierrez, Rodríguez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008).

Entre los métodos de extracción más utilizados se encuentran la extracción con disolventes orgánicos, destilación con vapor o la extracción con fluidos supercríticos. La extracción utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico ha demostrado tener grandes ventajas sobre el resto de métodos ya que no utiliza compuestos tóxicos, se realiza a baja temperatura (reduciendo la alteración de los componentes termolábiles de los aceites esenciales), no es inflamable y, en general, produce aceites esenciales de mejor calidad (Fornari et al., 2012).

### 1.3.2. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (carvacrol, timol, eugenol, etc.) presentes en ellos. Los aceites esenciales con mayor actividad antimicrobiana son aquellos en los que la proporción de compuestos fenólicos es mayor, aunque se ha observado que los elementos traza también son relevantes debido a efectos de sinergia con el resto de componentes (Burt, 2004).

La capacidad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento microbiano ha sido estudiada en gran variedad de productos como frutas y verduras mínimamente procesadas (Gutierrez et al., 2008), carne picada (Hulankova, Borilova, & Steinhauserova, 2013), pollo (Fernandez-Pan, Mendoza, & Mate, 2013), etc.

Los aceites esenciales de orégano y tomillo han sido estudiados también sobre los principales microorganismos alterantes y patógenos presentes en el pescado (Iturriaga, Olabarrieta, & de Maranon, 2012; Kostaki, Giatrakou, Savvaidis, & Kontominas, 2009; Kykkidou, Giatrakou, Papavergou, Kontominas, & Savvaidis, 2009), aunque en general se han limitado a evaluar su actividad antibacteriana frente a bacterias aisladas y no sobre la microbiota completa del pescado.

### 1.3.3. Composición de los aceites esenciales de orégano y tomillo

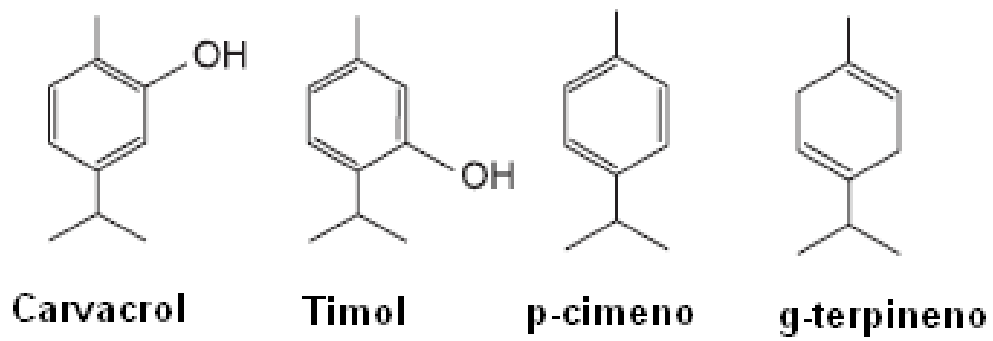
Los componentes de los aceites esenciales de orégano y tomillo son muy similares, aunque varían las cantidades en que se encuentran en cada uno de ellos (Tabla 3). Sin embargo, la suma de los cuatro compuestos siempre se mantiene constante, por lo que se sugirió la hipótesis de que estén relacionados biológicamente, siendo unos los precursores de otros (Burt, 2004).

**Tabla 3.** Estimación de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales de orégano y tomillo.

<b>Aceite esencial</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>Timol</b>	<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	<b>p-cimeno</b>
Orégano	Traza – 80%	Traza – 64%	2 – 52%	Traza – 52%
Tomillo	10 – 64%	2 – 11%	2 – 31%	10 – 56%

Fuente: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review (Burt, 2004)

En la figura 2 se muestran las moléculas de estos cuatro compuestos que, como puede apreciarse, son muy similares.



**Figura 2.** Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales de orégano y tomillo.



## 2. Objetivos y diseño experimental

### 2.1. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de soluciones formadoras de films (SFF) elaboradas con proteína aislada de suero de leche (whey protein isolate, WPI), que incorporaban distintas concentraciones de aceites esenciales de orégano y tomillo, sobre la microbiota aislada de filetes de merluza.

También se estudió la influencia en la actividad antibacteriana de incorporar los aceites esenciales incorporados en SFF de WPI, en comparación con su aplicación en ausencia de SFF.

Por último, se observó la influencia del tipo de atmósfera de envasado en el crecimiento de las distintas especies bacterianas que componen la microbiota superficial de los filetes de merluza, y cómo varía esta microbiota durante el almacenamiento.

### 2.2. Diseño experimental

En este estudio se analizó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales incorporados en soluciones formadoras de films (SFF) en distintas combinaciones y bajo varias condiciones de conservación. Los factores tenidos en cuenta para comparar las actividades antibacterianas de los aceites esenciales fueron los siguientes:

- a. Aceites esenciales:** Orégano y tomillo.
- b. Concentración de los aceites esenciales:** 1, 3 y 5% (p/p) respecto al peso total de la SFF.
- c. Aplicación de los aceites esenciales:** Incorporados en SFF o diluidos en agua.
- e. Condiciones de envasado:** Aire y atmósfera modificada.
- f. Días de almacenamiento:** 8 (envasado en aire) y 15 días (envasado en MAP).

Se realizaron dos experimentos independientes diferenciados únicamente por la atmósfera en la que se envasaron los filetes de merluza, y cada uno de ellos

se realizó por triplicado. En la Tabla 4 se muestra el resumen del desarrollo de cada experimento. Las muestras de merluza se analizaron los días 0, 4, y 8 a partir del día en que se envasaron. Las muestras envasadas en MAP se analizaron también el día 15.

**Tabla 4.** Desarrollo de los experimentos

Día	Operaciones	Envasado aire			Envasado MAP		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	Actividad antibacteriana	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Caracterización de la microbiota	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Control de calidad	-	-	Si	-	-	Si
4	Actividad antibacteriana	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Caracterización de la microbiota	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Control de calidad	-	-	Si	-	-	Si
8	Actividad antibacteriana	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Caracterización de la microbiota	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Control de calidad	-	-	Si	-	-	Si
15	Actividad antibacteriana	-	-	-	Si	Si	Si
	Caracterización de la microbiota	-	-	-	Si	Si	Si
	Control de calidad	-	-	-	-	-	Si

### 2.2.1. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante espectrofotometría, registrando la variación en la densidad óptica (DO) de las soluciones preparadas durante 24 horas de incubación. Todas las soluciones contenían un medio de crecimiento general (caldo nutritivo) y uno o más de los siguientes componentes:

- a. Solución formadora de films
- b. Aceite esencial: orégano o tomillo en distintas concentraciones.
- c. Inóculo: bacterias aisladas de la superficie de los filetes de merluza.

Entre esas soluciones se incluyeron controles para el medio de cultivo y la SFF, a los que no se añadieron aceites esenciales.

### 2.2.2. Caracterización de la microbiota superficial de los filetes de merluza

Se caracterizó la microbiota aislada de la superficie de los filetes de merluza con el fin de relacionar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales con la presencia de los principales microorganismos responsables de la degradación del pescado (specific spoilage organisms, SSO). Los SSO cuantificados fueron:

- a. Bacterias mesófilas
- b. *Pseudomonas* spp.
- c. Bacterias ácido lácticas
- d. Bacterias psicrotrofas

### 2.2.3. Control de calidad

La calidad de los filetes de merluza durante el almacenamiento se evaluó mediante un control de calidad que se realizó únicamente en la última repetición (R3) de cada experimento. Los SSO que se cuantificaron fueron los siguientes:

- a. Bacterias mesófilas
- b. *Pseudomonas* spp.
- c. Bacterias ácido lácticas
- d. Bacterias psicrotrofas
- e. Bacterias sulfito reductoras
- f. Enterobacterias

El control de calidad se realizó por triplicado sobre muestras de merluza pertenecientes a un lote preparado específicamente para este fin.





### 3. Material y métodos

Debido al riesgo de contaminación de las muestras por microorganismos ambientales, todas las operaciones en las que se trabajó con muestras que no podían ser esterilizadas posteriormente se realizaron en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar (Telstar bio-II-A/P, Azbil Telstar S.L.). Así mismo, todos los materiales empleados dentro de la cabina (escalpelo, probetas, medios de cultivo, etc.) fueron previamente esterilizados en autoclave (15 min, 121 °C).

En este estudio se analizó la actividad antibacteriana de las SFF que incorporaban aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus zygis*), que fueron adquiridos en Esencias Lozano S.A. (Murcia, España).

#### 3.1. Preparación de las muestras

##### 3.1.1. Filetes de merluza

Los filetes de merluza fueron comprados en una pescadería local, donde se conservaban en atmósfera aerobia y sobre hielo picado. Las merluzas fueron descabezadas, peladas, evisceradas y fileteadas en la pescadería, y fueron procesadas inmediatamente al llegar al laboratorio, donde se prepararon dos lotes de muestra.

En el primer lote de tres filetes de merluza, de cada uno de ellos se cortó una porción de aproximadamente 60 gramos y se envasó en una bandeja independiente. Este lote se utilizó para el análisis de la actividad antibacteriana y la caracterización de la microbiota.

En el segundo lote las porciones envasadas pesaron aproximadamente 100 gramos y se utilizó para el control de calidad. También se realizó por triplicado.

### 3.1.2. Condiciones de envasado

Los filetes de merluza fueron envasados en bandejas de polipropileno, cubiertas por un film de 82  $\mu\text{m}$  de espesor compuesto por varias capas (PET/PP/EVOH/PP). El termosellado de las bandejas se realizó en una envasadora (FoodPack 400, ILPRA, Mataró, España), estableciendo la temperatura de la resistencia de sellado en 170  $^{\circ}\text{C}$ , y el tiempo de sellado en 5 segundos.

Se emplearon dos tipos de atmósfera de envasado para la conservación de los filetes de merluza:

- Aire atmosférico
- Atmósfera modificada (MAP): 45%  $\text{N}_2$ , 50%  $\text{CO}_2$  y 5%  $\text{O}_2$

Para las muestras envasadas en MAP se preparó la mezcla de gases en un tanque antes de realizar el envasado. El resto de muestras se envasó utilizando la toma de aire atmosférico de la envasadora.

Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración (4-5  $^{\circ}\text{C}$ ) hasta el momento en que fueron analizadas. La duración del experimento fue de 8 días en el caso de las muestras envasadas en aire, y de 15 días en el caso de las muestras envasadas en atmósfera modificada.

## **3.2. Preparación de las soluciones formadoras de films**

### 3.2.1. Composición de las soluciones formadoras de films

El polímero escogido como matriz en las soluciones formadoras de films fue la proteína aislada de suero de leche (whey protein isolate, WPI), procedente de Davisco Foods International (Le Sueur, MN, E.E.U.U.).

La elaboración de las soluciones formadoras de films con aceites esenciales incorporados se realizó siguiendo el método descrito por Royo et al. (Royo, Fernandez-Pan, & Mate, 2010). Las formulaciones preparadas se resumen en la Tabla 5. En todos los casos se añadió WPI (10 g/100g de solución), glicerol

(5 gramos/100 g de solución) (Panreac Química S.A., Barcelona, España), y agua destilada en la cantidad adecuada dependiendo de los gramos de aceite correspondientes a la muestra. Se preparó una solución control sin contenido en aceite para comparar la actividad antibacteriana de las soluciones formadoras de films en presencia y ausencia de los aceites esenciales.

**Tabla 5.** Composición de las distintas soluciones formadoras de films.

<b>Muestra</b>	<b>WPI (g)</b>	<b>Glicerol (g)</b>	<b>Agua (g)</b>	<b>Aceite (g)</b>
SFF-Control	10	5	85	0
SFF-OR 1%	10	5	84	1
SFF-OR 3%	10	5	82	3
SFF-OR 5%	10	5	80	5
SFF-TOM 1%	10	5	84	1
SFF-TOM 3%	10	5	82	3
SFF-TOM 5%	10	5	80	5

### 3.2.2. Elaboración de las soluciones formadoras de films

En primer lugar se prepararon e identificaron siete vasos de precipitados de 250 mL en los que se añadieron las cantidades correspondientes de WPI, glicerol y agua según la solución de que se tratase. Estos componentes fueron mezclados durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador magnético.

A continuación, se introdujeron los vasos de precipitados cubiertos por papel de aluminio en un baño termostático con agitación orbital (Unitronic Orbital, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España), donde fueron sometidos a una temperatura constante de 90 °C durante 30 minutos. El objetivo de este tratamiento es desnaturalizar las proteínas del suero de leche, de forma que al enfriarse puedan organizarse en forma de polímeros. El motivo de cubrir los vasos de precipitados con papel de aluminio es evitar la caída del agua de condensación en el interior de las soluciones, lo que conllevaría una modificación de su composición.

Una vez desnaturalizadas las proteínas, se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente hasta llegar a 40 °C aproximadamente y se retiró la nata

formada en la superficie de las soluciones. Los compuestos activos de los aceites esenciales son termolábiles, por lo que si se añaden cuando la solución está aún muy caliente su actividad antimicrobiana se verá reducida. Por otra parte, si la temperatura es muy baja las proteínas polimerizarán, dificultando la mezcla del aceite en la solución. Del mismo modo, la nata formada por el enfriamiento al extraer las soluciones del baño a 90 °C tiende a aglutinar las gotas de aceite si no es retirada previamente, impidiendo que se distribuya homogéneamente.

Por último, el aceite se mezcló en la solución mediante ultrasonidos (UP400S, Hielscher, Teltow, Alemania) empleando la punta H7, el ciclo 1 y una amplitud del 100% durante 5 minutos. Este proceso se realizó introduciendo los vasos de precipitados en bandejas con hielo para evitar que el calor generado por los ultrasonidos degradase los compuestos activos de los aceites esenciales.

### 3.3. Preparación de las mezclas de aceite esencial y agua

Se prepararon mezclas de agua destilada y aceites esenciales (oil/water, O/W) para observar si existen diferencias entre la actividad antibacteriana de estas mezclas y los aceites esenciales incorporados en SFF. Los aceites esenciales se diluyeron de forma que su concentración fuese la misma que la en el caso de las SFF para poder compararlas posteriormente (Tabla 6). Estas diluciones fueron agitadas en un vortex hasta que el aceite se mezcló completamente en el agua, e inmediatamente fueron añadidas a las soluciones para evitar que se separasen las dos fases y se alterase la concentración de aceite añadida.

**Tabla 6.** Composición de las muestras de aceite diluidas en agua

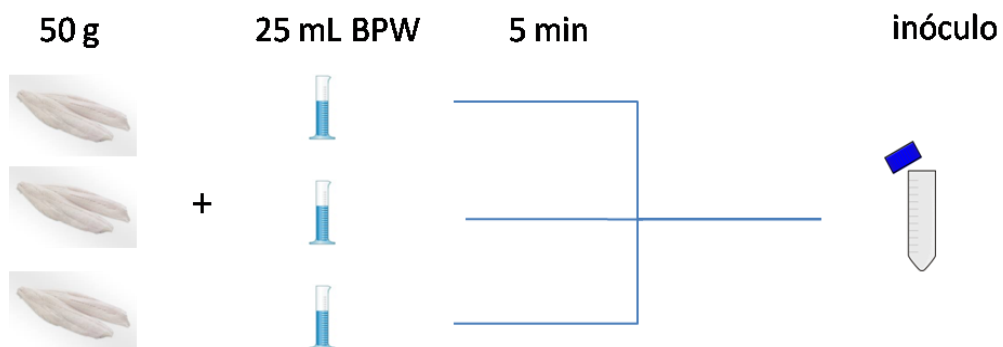
<b>Muestra</b>	<b>Agua (g)</b>	<b>Aceite (g)</b>
O/W-OR 1%	9,9	0,1
O/W-OR 3%	9,7	0,3
O/W-OR 5%	9,5	0,5
O/W-TOM 1%	9,9	0,1
O/W-TOM 3%	9,7	0,3
O/W-TOM 5%	9,5	0,5

### 3.4. Aislamiento y caracterización de la microbiota superficial de los filetes de merluza

Tanto el análisis de la actividad antibacteriana como la caracterización de la microbiota se realizaron con bacterias aisladas de la superficie de los filetes de merluza, ya que el objetivo último es aplicar las SFF con aceites esenciales incorporados sobre la superficie del producto.

#### 3.4.1. Aislamiento de la microbiota superficial de los filetes de merluza

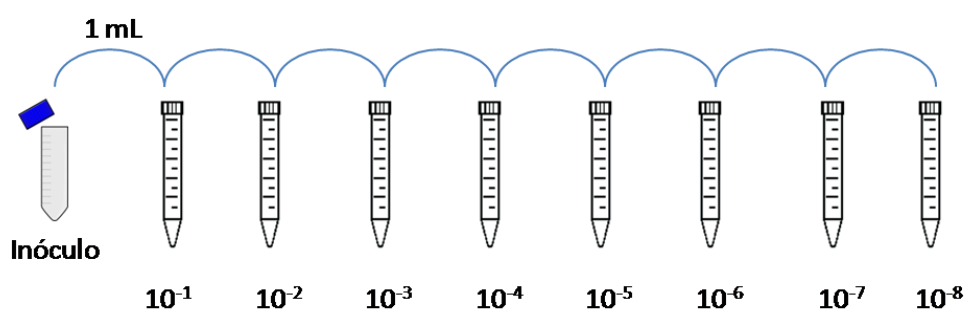
Debido a que no todos los especímenes de merluza presentan la misma población bacteriana, se extrajeron las bacterias superficiales de tres filetes procedentes de merluzas diferentes y posteriormente se juntaron en un único extracto al que denominaremos inóculo. De esta forma se obtuvo una mejor representación de los SSO presentes en la superficie de la merluza.



**Figura 3.** Extracción de la microbiota superficial de los filetes de merluza.

Cada día de análisis, a partir de la porción de filete de merluza envasada (60 gramos aproximadamente) se cortaron y pesaron 50 gramos que fueron introducidos en una bolsa de plástico estéril. A continuación se añadieron 25 mL de agua de peptona tamponada (BPW, Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España) estéril, se aplicó un ligero masaje a la merluza (para facilitar el paso de las bacterias desde su superficie hacia el BPW) y se dejó reposar durante 5 minutos. Este proceso se realizó por triplicado, y después del período de reposo se recogieron 15 mL de agua de peptona de cada bolsa en un tubo falcon de 50 mL (Figura 3).

Para poder realizar la caracterización de la microbiota superficial se prepararon diluciones seriadas ( $10^{-1} - 10^{-8}$ ) a partir del inóculo (Figura 4).



**Figura 4.** Diluciones seriadas del inóculo en las que se diluyó 1 mL del inóculo en 9 mL de agua de peptona tamponada de forma sucesiva.

### 3.4.2. Caracterización de la microbiota aislada

Se determinó la presencia en el inóculo de los principales grupos y especies bacterianas responsables del deterioro del pescado conservado en refrigeración: bacterias mesófilas, psicrotrofas, ácido lácticas y *Pseudomonas* spp.

#### **3.4.2.1. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo empleados para el recuento de los SSO y los parámetros de incubación para cada uno de ellos fueron los mostrados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Medios de cultivo empleados para el recuento bacteriano.

Bacterias	Medio de cultivo	Abreviatura	Incubación	
			Tiempo	Temperatura (°C)
Mesófilos totales	Plate count agar	PCA	48 horas	30
Psicrotrofos	Plate count agar	PSICRO	7 días	5
Bacterias ácido lácticas	Man-Rogosa-Sharpe agar	MRS	5 días	30
Pseudomonas	Pseudomonas CFC agar	PS	48 horas	30

Para el recuento de las bacterias mesófilas totales y psicrotrofas, se sembró el inóculo en agar de recuento en placa (Merck, Darmstadt, Alemania). El

inóculo fue sembrado mediante la técnica de vertido en placa, por lo que el volumen de inóculo sembrado fue 1 mL en cada placa. Se sembraron tres placas con distintas diluciones del inóculo para garantizar que al menos en una de ellas creciese un número de colonias que permitiese realizar el recuento. Además, cada una de las diluciones se sembró por duplicado y posteriormente se calculó el valor medio de los recuentos.

Para el recuento de las bacterias ácido lácticas el inóculo fue sembrado en el medio agar Man-Rogosa-Sharpe (Merck, Darmstadt, Alemania. La siembra se realizó en superficie, por lo que el volumen de inóculo sembrado fue de 0,1 mL . También se hicieron siembras por duplicado para cada dilución, aunque en este caso únicamente se sembraron dos de las diluciones.

En el caso del recuento de *Pseudomonas* spp., el inóculo fue sembrado en el medio agar Pseudomonas con suplemento Centrimida-Fucidina-Cefalosporina (Oxoid, Madrid, España). La siembra se realizó en superficie con 0,1 mL de inóculo. Se sembraron 3 placas por duplicado con distintas diluciones del inóculo.

#### **3.4.2.2. Cuantificación de la microbiota**

Debido a que la concentración de bacterias presente en el inóculo es desconocida, la dilución a sembrar en el día 0 de cada experimento fue escogida en base a estudios previos, y en los días sucesivos se escogió teniendo en cuenta los resultados obtenidos el anterior día de análisis. Como medida de precaución, se sembraron varias diluciones en cada medio de cultivo para evitar problemas a la hora de realizar el recuento.

La estimación de la concentración de bacterias en el inóculo se calculó teniendo en cuenta las diluciones con la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 1. } \text{UFC/mL inóculo} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias} \times (1/\text{factor de dilución})}{\text{mL sembrados}}$$

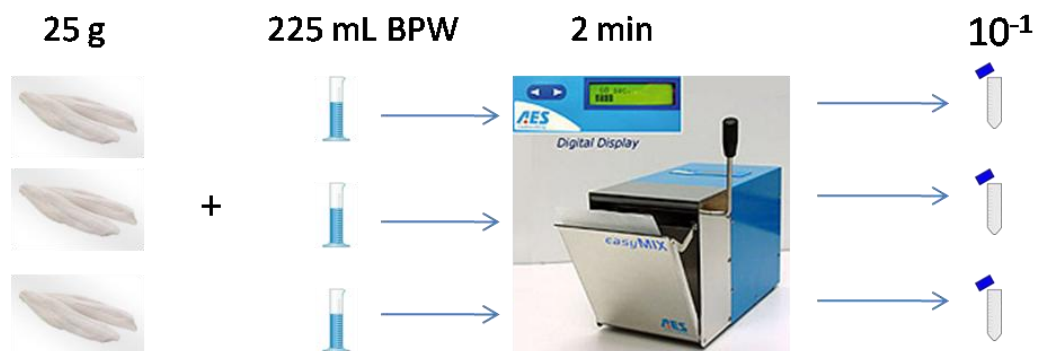
### 3.5. Control de calidad

El control de calidad de los filetes de merluza se realizó únicamente en la tercera repetición de cada experimento. El método seguido fue el descrito por Kostaki et al. (Kostaki et al., 2009), aunque introduciendo algunas modificaciones.

#### 3.5.1. Preparación de las muestras para el control de calidad

A partir del filete de merluza envasado se cortó una porción de 25 gramos. A continuación se introdujo en una bolsa de plástico con filtro para homogeneizador estéril (Circulator 400 filter bags, Seward Stomacher, UK), y se añadieron 225 mL de BPW. Se introdujo la bolsa en el homogeneizador (Stomacher, AES Chemunex, Francia) y se homogeneizó la muestra durante 2 minutos. El contenido de la bolsa se utilizó posteriormente para realizar el control de calidad, considerando que se trataba de una dilución decimal de la microbiota presente en el filete de merluza. A partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas para su siembra en los medios de cultivo.

Este proceso se realizó por triplicado y cada una de las muestras obtenidas se analizó de forma independiente. En la figura 5 puede observarse un esquema del proceso de obtención de las muestras para el control de calidad.



**Figura 5.** Aislamiento de la microbiota total para el análisis de control de calidad.



### 3.5.2. Microorganismos indicadores de la calidad

Para la evaluación de la calidad de los filetes de merluza, se cuantificó la presencia en la microbiota de varios grupos bacterianos responsables del deterioro del pescado:

- a. Bacterias mesófilas
- b. Bacterias psicrotrofas
- c. *Pseudomonas* spp.
- d. Bacterias ácido lácticas
- e. Enterobacterias
- f. Bacterias sulfito reductoras

Las muestras obtenidas para el control de calidad fueron sembradas en varios medios de cultivo específicos para el recuento de los microorganismos indicadores (Tabla 8).

**Tabla 8.** Medios de cultivo empleados en el control de calidad.

Bacterias	Medio de cultivo	Abreviatura	Incubación	
			Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Mesófilos totales	Plate count agar	PCA	48 horas	30
Psicrotrofos	Plate count agar	PS	7 días	5
Bacterias ácido lácticas	Agar Man Rogosa Sharpe	MRS	5 días	30
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> CFC agar	PS	48 horas	30
Enterobacterias	Agar glucosa bilis rojo violeta	VRBG	24 horas	37
Sulfito reductoras	Agar hierro	IA	48 horas	37

El método de siembra para la determinación de bacterias mesófilas, psicrotrofas, ácido lácticas y *Pseudomonas* spp. fue el mismo que el descrito en la sección 3.4.2.1 para la caracterización de la microbiota superficial.

Las enterobacterias se sembraron en el medio de cultivo VRBG (Panreac, Castelar del Vallès, Barcelona). La incubación se realizó en anaerobiosis, por lo que tras la siembra del inóculo (1 mL) mediante vertido en placa se añadió una

segunda capa de agar. Durante el recuento sólo se contabilizaron las colonias grandes con un halo púrpura.

Para el recuento de bacterias sulfito reductoras se empleó el medio de cultivo IA (Laboratorios Conda S.A., España). Se sembró en superficie 0,1 mL de inóculo, y durante el recuento se contabilizaron las colonias de color negro.

### **3.6. Evaluación de la actividad antibacteriana de las soluciones formadoras de films y de las mezclas de agua y aceite**

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo fue evaluada por separado, por lo que no se tuvo en cuenta el efecto de combinar ambos aceites en una misma solución formadora de films. Además, se emplearon distintas concentraciones (1, 3 y 5% de aceite esencial respecto al peso final de la solución formadora de films) con el objetivo de observar cómo varía la actividad antibacteriana en función de la concentración. También se comparó la actividad antibacteriana de los aceites esenciales incorporados en SFF y de las mezclas O/W.





























#### **3.6.1. Procedimiento para la medida de la actividad antibacteriana**

Debido a que se estudiaron diversas formulaciones de las SFF (Tabla 5), aceites diluidos en agua (Tabla 6) y a la necesidad de incluir blancos y controles para asegurarnos de que la variación en la densidad óptica se debía únicamente al crecimiento bacteriano, fue necesario preparar un total de 28 soluciones que se detallan en la tabla 9.

Las soluciones se prepararon en matraces de 50 mL. Todos los matraces fueron llenados con 50 mL de caldo nutritivo, cubiertos con tapones y esterilizados en autoclave (121 °C, 15 min). En los matraces correspondientes se añadieron 500 µL de inóculo, 500 µL de SFF y/o 500 µL de O/W. Las soluciones que no contenían inóculo fueron utilizadas como blanco de las que sí lo hacían, de forma que se pueda asegurar que la diferencia en las absorbancias de ambas soluciones se debió únicamente al crecimiento de las bacterias presentes en el inóculo. Además se prepararon dos controles, de los cuales uno contenía SFF

pero sin aceites esenciales, y el otro contenía únicamente el medio de cultivo. El control que sólo contenía medio de cultivo se utilizó como referencia para observar el crecimiento bacteriano máximo, mientras que el segundo control tuvo como propósito observar si la SFF tenía actividad antibacteriana por sí misma.

**Tabla 9.** Soluciones empleadas para medir la actividad antibacteriana.

	Orégano			Tomillo		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
SFF						
SFF + inóculo						
O/W						
O/W + inóculo						
	Medio cultivo	Medio + inóculo	Medio + SFF	Medio + SFF + inóculo		
Controles						

El crecimiento bacteriano se estudió durante 24 horas, tomándose medidas a las 0, 6 y 24 horas a partir de la preparación de las soluciones para observar la evolución del crecimiento bacteriano y/o su inhibición. Durante ese tiempo, las soluciones fueron incubadas a 30 °C en un baño con agitación orbital.

Para tomar las medidas de densidad óptica se emplearon cubetas de plástico estériles en las que se vertió parte del contenido de los matraces. Las cubetas fueron cubiertas con parafilm para evitar la contaminación de las soluciones, ya que tras tomar las medidas en el espectrofotómetro el contenido de las cubetas fue devuelto a las soluciones correspondientes. El motivo de esto fue no alterar el volumen de las soluciones, ya que tanto la concentración de los componentes de la solución como la carga bacteriana presente podrían verse

influenciadas. La densidad óptica se determinó por duplicado para cada solución y posteriormente se calculó el valor medio.

### 3.6.2. Presentación de los resultados

Los datos de absorbancia obtenidos para cada solución se expresaron como el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (ICB) respecto a la solución de referencia que sólo contenía el medio de cultivo y el inóculo (Ec. 1). El desarrollo bacteriano (DB) en cada solución se calculó como la diferencia entre las absorbancias medidas a las 24 y 0 horas de incubación (Ec. 2).

$$\text{Ec. 2. } ICB = \left[ 1 - \frac{DB_{\text{Solución}}}{DB_{\text{Referencia}}} \right] \times 100$$

$$\text{Ec. 3. } DB = [Absorbancia_{24} - Absorbancia_0]$$

Los datos de ICB de las soluciones fueron utilizados para hacer diversas comparaciones entre las soluciones:

- Comparación entre la actividad antibacteriana de las soluciones SFF con distintas concentraciones de aceite esencial.
- Comparación entre las soluciones con SFF y las soluciones O/W.
- Comparación entre la actividad antibacteriana de las SFF que contenían orégano y las que contenían tomillo
- Observación de la evolución de la actividad antibacteriana de las soluciones conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

La ICB de las distintas soluciones se comparó de forma independiente para cada día de análisis debido a que la microbiota presente en los inóculos aislados varía conforme se prolonga el almacenamiento de las muestras de filete de merluza. Asimismo, los datos obtenidos para las muestras que recibieron distintos tratamientos de envasado fueron analizados como dos experimentos independientes ya que la microbiota presente en cada uno de ellos es muy diferente.

### **3.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 19 para Windows mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 5% ( $p \leq 0,05$ ). Las diferencias entre muestras se analizaron mediante el test de Tukey.



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Actividad antibacteriana de las soluciones sobre la microbiota aislada de la superficie de los filetes de merluza

#### 4.1.1. Tratamiento de envasado en aire

Como puede observarse en la Tabla 10, donde se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (ICB) medio de todas las soluciones en los distintos días de análisis, los datos se corresponden con lo esperado. La inhibición del crecimiento bacteriano aumenta progresivamente conforme lo hace la concentración de aceite esencial en la solución en todos los casos, tal y como ha sido descrito en otros estudios (Royo et al., 2010; Seydim & Sarikus, 2006). La solución SFF-control (sin aceite esencial) presenta una baja actividad antibacteriana, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con la solución en la que se dio la mínima inhibición bacteriana (inóculo).

**Tabla 10.** Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de las muestras envasadas en aire.

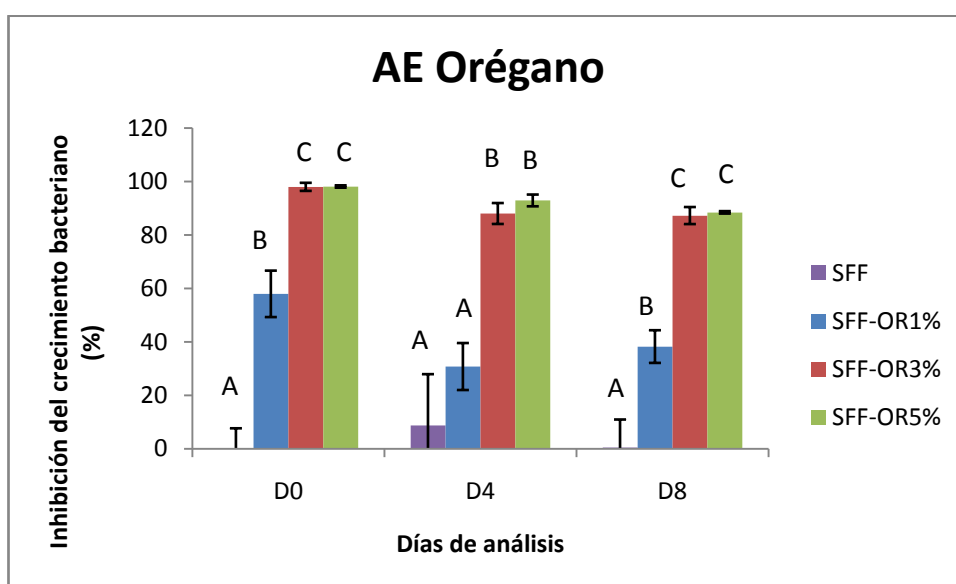
Soluciones	Tratamiento Aire		
	D0	D4	D8
Inóculo	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
SFF-Control	0.00 ± 7.62 <sup>a</sup>	8.80 ± 19.08 <sup>a</sup>	0.49 ± 10.42 <sup>a</sup>
SFF-OR 1%	57.92 ± 8.68 <sup>b</sup>	30.73 ± 8.79 <sup>a</sup>	38.20 ± 6.11 <sup>b</sup>
SFF-OR 3%	97.96 ± 1.51 <sup>b</sup>	87.98 ± 3.91 <sup>b</sup>	87.21 ± 3.19 <sup>b</sup>
SFF-OR 5%	98.08 ± 0.43 <sup>b</sup>	92.87 ± 2.20 <sup>b</sup>	88.41 ± 0.45 <sup>b</sup>
SFF-TOM 1%	63.23 ± 12.48 <sup>b</sup>	41.05 ± 9.36 <sup>a</sup>	37.85 ± 6.63 <sup>b</sup>
SFF-TOM 3%	100.00 ± 5.80 <sup>b</sup>	85.53 ± 4.03 <sup>b</sup>	88.56 ± 3.06 <sup>b</sup>
SFF-TOM 5%	100.00 ± 13.47 <sup>b</sup>	88.20 ± 6.93 <sup>b</sup>	97.15 ± 0.59 <sup>b</sup>
OR 1%	45.40 ± 12.40 <sup>a</sup>	42.85 ± 13.49 <sup>a</sup>	35.72 ± 5.67 <sup>b</sup>
OR 3%	81.98 ± 6.18 <sup>b</sup>	68.83 ± 3.76 <sup>b</sup>	74.72 ± 2.46 <sup>b</sup>
OR 5%	84.20 ± 9.48 <sup>b</sup>	83.80 ± 1.69 <sup>b</sup>	87.64 ± 1.35 <sup>b</sup>
TOM 1%	45.13 ± 10.70 <sup>a</sup>	16.65 ± 9.30 <sup>a</sup>	30.22 ± 9.29 <sup>b</sup>
TOM 3%	79.39 ± 26.99 <sup>b</sup>	66.89 ± 2.11 <sup>b</sup>	79.52 ± 2.64 <sup>b</sup>
TOM 5%	95.60 ± 2.84 <sup>b</sup>	71.56 ± 5.33 <sup>b</sup>	77.32 ± 3.11 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Inhibición del crecimiento bacteriano no significativo ( $p > 0,05$ )

Debido a la cantidad de aspectos diferentes sobre las soluciones que se pueden deducir a partir de los datos obtenidos, se comentarán en varios puntos separados para facilitar su comprensión.

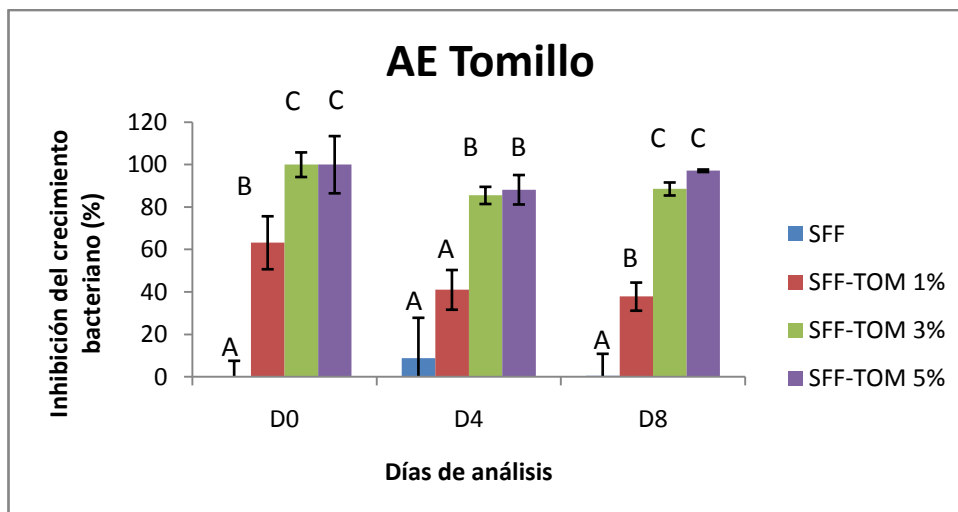
#### 4.1.1.1. Influencia de la concentración de aceite en la actividad antibacteriana

Tanto para el aceite esencial (AE) de orégano como para el de tomillo, la ICB aumentó conforme se incrementó la concentración de AE en las soluciones (figuras 6 y 7). En ambos casos, las SFF que incorporaban un 1% (p/p) de AE presentaron una inhibición del crecimiento bacteriano significativa ( $p < 0,05$ ) excepto el día 4 de análisis, aunque esta excepción se deba probablemente a la elevada variabilidad de los datos de la solución control de SFF correspondientes a ese día. Las SFF que incorporaban AE con una concentración de 3 y 5 % (p/p) mostraron un brusco aumento de la inhibición bacteriana, significativamente superior al de las soluciones con AE al 1%, aunque no presentaron diferencias entre ellas en ninguno de los casos.



**Figura 6.** Comparación de los porcentajes de inhibición bacteriana de las soluciones que contenían SFF con aceite esencial de orégano en distintas concentraciones. La misma letra en el mismo día de análisis indica que no había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. La letra A indica que no existen diferencias significativas con la solución que sólo contenía inóculo.





**Figura 7.** Comparación de los porcentajes de inhibición bacteriana de las soluciones que contenían SFF con aceite esencial de tomillo en distintas concentraciones. La misma letra en el mismo día de análisis indica que no había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. La letra A indica que no existen diferencias significativas con la solución que sólo contenía inóculo.

En resumen, tanto el aceite esencial de orégano como el de tomillo son efectivos en la inhibición del crecimiento de la microbiota superficial de los filetes de merluza. Esta actividad antibacteriana parece alcanzar un máximo cuando la concentración de aceite en las SFF es igual o superior al 3%. Teniendo en cuenta los inconvenientes de los aceites esenciales respecto a la alteración de las propiedades organolépticas de los alimentos, no parece recomendable superar esta concentración en la elaboración de films comestibles puesto que no se mejorarán las propiedades antibacterianas. Además, mientras que las soluciones con AE al 1% sufrieron un descenso importante en la inhibición del crecimiento bacteriano los días 4 y 8 (alrededor del 20%), este descenso fue menor en las soluciones con AE al 3 y 5% (alrededor del 10%).

#### **4.1.1.2. Influencia de las soluciones formadoras de films en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales**

Uno de los objetivos de este experimento fue comprobar si la aplicación de los aceites esenciales junto con una solución formadora de films influye en la actividad antibacteriana de los aceites. Para ello, se comparó la actividad antibacteriana de esas soluciones con otras en las que se diluyó la misma

concentración de aceites esenciales en agua en lugar de en una solución formadora de films.

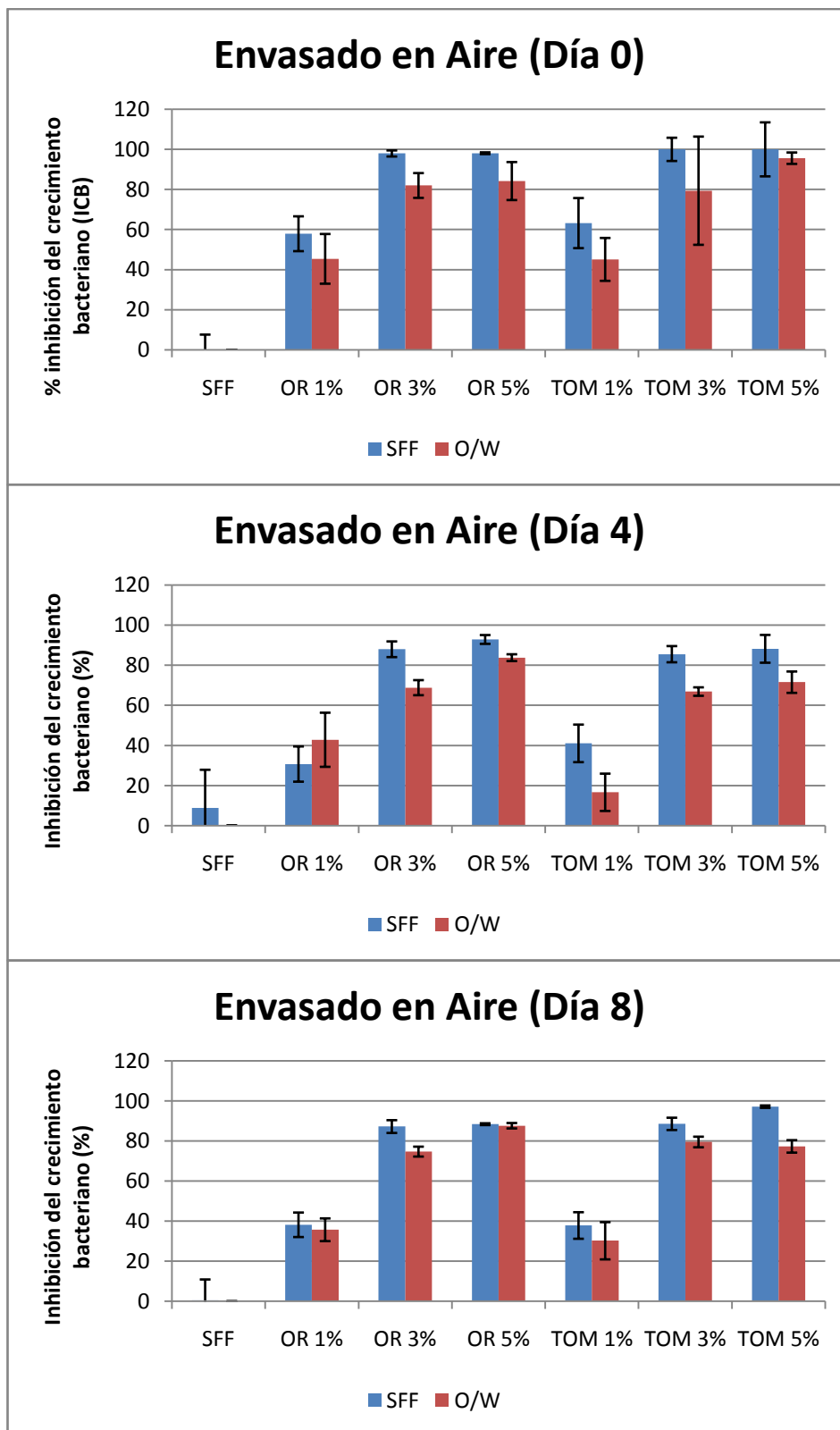
En la figura 8 se puede observar el resumen de los datos obtenidos en los tres días de análisis para las soluciones estudiadas, emparejadas por el modo de aplicación de los aceites esenciales. En la tabla 11 se muestran los resultados de las comparaciones entre las soluciones con SFF y sin SFF. Únicamente se encontraron diferencias entre las soluciones que contenían orégano al 3 y 5%, y tomillo al 3% en el día 4 de análisis. En el día 8 se observaron diferencias significativas en las soluciones que contenían orégano al 3 % y tomillo al 5%.

**Tabla 11.** Valores de significación de las comparaciones entre soluciones con SFF y sin ella.

Soluciones		Valor de significación (p) <sup>a</sup>		
		D0	D4	D8
OR 1%	SFF-OR1%	0.455	0.494	0.781
OR 3%	SFF-OR3%	0.066	0.024	0.036
OR 5%	SFF-OR5%	0.091	0.031	0.617
TOM 1%	SFF-TOM1%	0.333	0.138	0.540
TOM 3%	SFF-TOM3%	0.490	0.015	0.089
TOM 5%	SFF-TOM5%	0.128	0.130	0.003

<sup>a</sup> Diferencias significativas cuando  $p < 0,05$

Sin embargo, la clara tendencia observada en la figura 8, en la que en todos los casos el valor medio de ICB de las soluciones que contenían SFF fue mayor al de las soluciones que sólo contenían aceite esencial, parece indicar que el motivo de que no se encontrasen diferencias estadísticamente significativas entre ellas se debe al pequeño número de observaciones cada caso ( $n=3$ ) con las que se realizó la comparación. Si realmente no existieran diferencias entre los dos tipos de soluciones se esperaría encontrar casos en los que la ICB de las soluciones sin SFF fuese superior al de las soluciones con SFF por acción del azar. A pesar de ello, con los datos obtenidos no podemos asegurar que este sea el caso y en el futuro deberá comprobarse repitiendo el experimento con un mayor número de observaciones.



**Figura 8.** Comparación de la inhibición del crecimiento bacteriano de las SFF con aceites esenciales incorporados frente a las soluciones aceite diluido en agua.

#### 4.1.1.3. Comparación entre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo

Los aceites esenciales de orégano y tomillo contienen distintas cantidades de compuestos activos con actividad antibacteriana, algunos de ellos presentes en ambos aceites y otros propios de cada uno. Este hecho hace que cada aceite esencial pueda presentar diferentes propiedades como conservante en función de la microbiota propia del producto. Por lo tanto, uno de los objetivos fue determinar si existían diferencias en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo sobre la microbiota superficial aislada de los filetes de merluza.

**Tabla 12.** Valores de significación de la comparación entre soluciones con aceite esencial de orégano y tomillo.

Soluciones	Valores de significación ( <i>p</i> ) <sup>a</sup>		
	D0	D4	D8
SFF-TOM1% SFF-OR1%	0.745	0.467	0.971
SFF-TOM3% SFF-OR3%	0.060	0.685	0.776
SFF-TOM5% SFF-OR5%	0.151	0.556	0.001

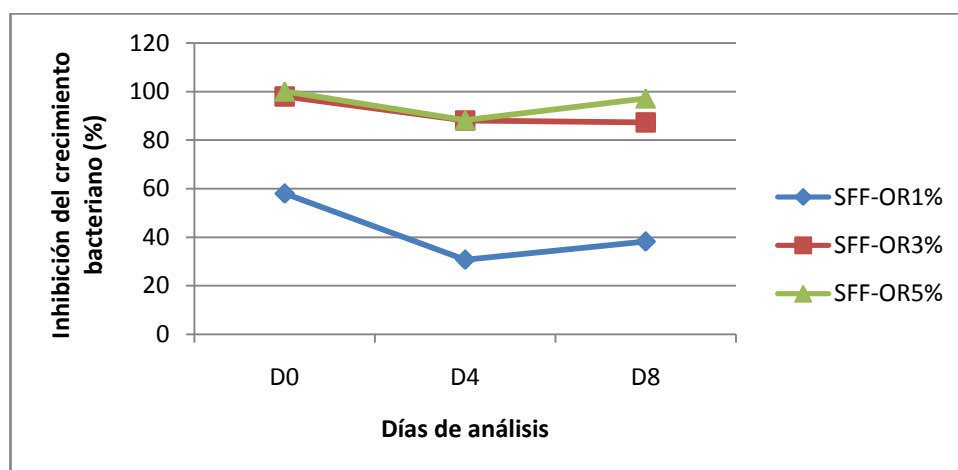
<sup>a</sup> Diferencias significativas cuando  $p < 0,05$

No se encontraron diferencias significativas en la actividad antibacteriana de las soluciones que contenían la misma concentración de aceites esenciales de orégano y tomillo, excepto en el caso del día 8 de análisis para las soluciones con una concentración de aceite del 5% (Tabla 12). Por lo tanto, estos datos sugieren que ambos aceites esenciales son igualmente efectivos a la hora de inhibir el crecimiento bacteriano de la microbiota aislada de la superficie de los filetes de merluza.

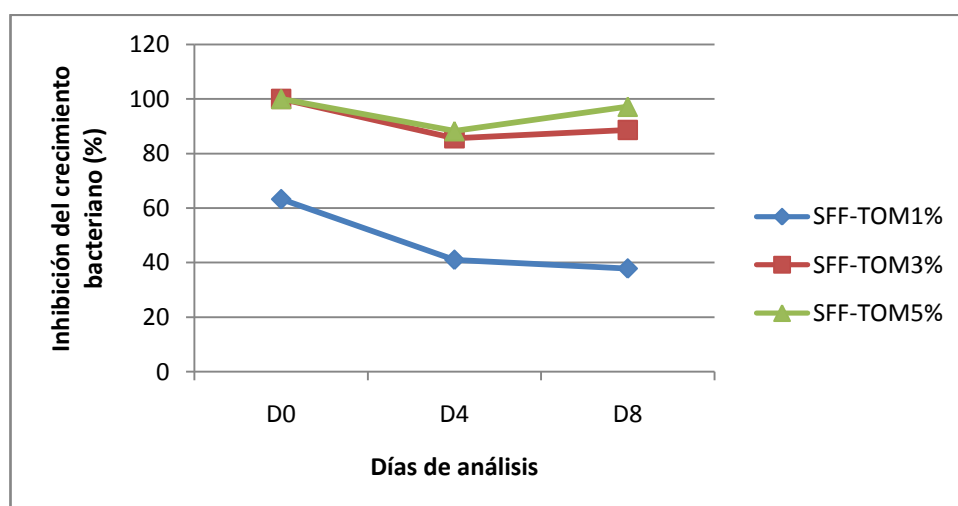
#### 4.1.1.4. Evolución de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales durante el almacenamiento de los filetes de merluza

Se estudió la evolución de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales durante la conservación de los filetes de merluza, ya que la proporción de las bacterias presentes en la microbiota también va cambiando con el paso del tiempo y dependiendo de las condiciones de conservación.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo mostró tendencia a decrecer conforme aumentaban los días de conservación de los filetes de merluza (Figuras 8 y 10). Esta disminución en el valor de ICB se produjo de manera más acusada entre los días de análisis 0 y 4, mientras que entre los días 4 y 8 se mantuvo constante o incluso aumentó ligeramente en algunos casos, aunque sin llegar al valor registrado en el día 0.



**Figura 9.** Evolución de la ICB de las soluciones con SFF y aceite esencial de orégano durante los días de análisis del tratamiento de envasado en aire.



**Figura 10.** Evolución de la ICB de las soluciones con SFF y aceite esencial de tomillo durante los días de análisis del tratamiento de envasado en aire.

Estos resultados se deben probablemente a que entre el día 0 y el día 4 la carga microbiana presente en los filetes de merluza aumenta de forma exponencial, mientras que en ambos días se aplican las mismas concentraciones

de aceites esenciales. Entre el día 4 y el día 8, la microbiota finaliza su etapa de crecimiento exponencial y comienza la fase estacionaria manteniéndose constante la carga bacteriana. Debido a esto no se observa una nueva disminución de la ICB el día 8.

#### 4.1.2. Tratamiento de envasado en MAP

La actividad antibacteriana de las soluciones sobre la microbiota superficial aislada de filetes de merluza conservados en atmósfera modificada se presenta en la tabla 13. Se observó un aumento significativo de la inhibición del crecimiento bacteriano conforme aumenta la concentración de aceite esencial en las soluciones, mientras que la solución control que sólo contenía SFF no mostró una inhibición significativa.

**Tabla 13.** Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano

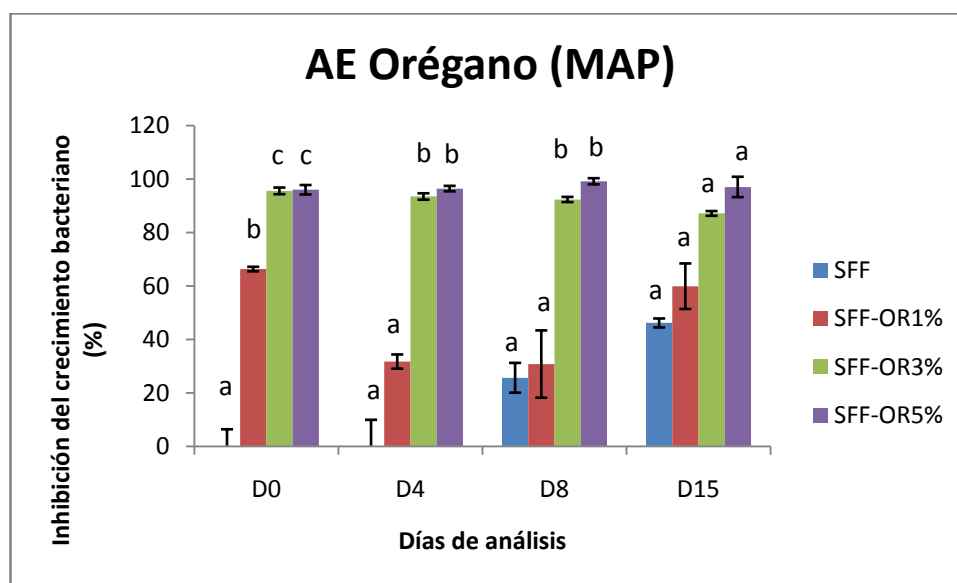
Soluciones	Tratamiento MAP			
	D0	D4	D8	D15
Inóculo	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
SFF-Control	0.00 ± 6.41 <sup>a</sup>	0.00 ± 9.94 <sup>a</sup>	25.66 ± 5.58 <sup>a</sup>	46.18 ± 1.67 <sup>a</sup>
SFF-OR 1%	66.35 ± 0.85 <sup>b</sup>	31.73 ± 2.66 <sup>a</sup>	30.81 ± 12.59 <sup>a</sup>	59.92 ± 8.53 <sup>a</sup>
SFF-OR 3%	95.59 ± 1.25 <sup>b</sup>	93.49 ± 1.20 <sup>b</sup>	92.37 ± 0.97 <sup>b</sup>	87.16 ± 0.88 <sup>b</sup>
SFF-OR 5%	96.02 ± 1.78 <sup>b</sup>	96.45 ± 1.02 <sup>b</sup>	99.18 ± 1.16 <sup>b</sup>	97.06 ± 3.81 <sup>b</sup>
SFF-TOM 1%	67.47 ± 4.92 <sup>b</sup>	40.74 ± 8.68 <sup>b</sup>	31.20 ± 7.61 <sup>a</sup>	23.47 ± 1.16 <sup>a</sup>
SFF-TOM 3%	97.42 ± 3.06 <sup>b</sup>	88.83 ± 3.94 <sup>b</sup>	98.30 ± 1.43 <sup>b</sup>	92.06 ± 0.63 <sup>b</sup>
SFF-TOM 5%	82.58 ± 1.47 <sup>b</sup>	100.00 ± 10.81 <sup>b</sup>	100.00 ± 29.09 <sup>b</sup>	88.16 ± 1.77 <sup>b</sup>
OR 1%	30.27 ± 0.22 <sup>a</sup>	28.52 ± 3.98 <sup>a</sup>	30.04 ± 1.61 <sup>a</sup>	16.49 ± 2.72 <sup>a</sup>
OR 3%	68.44 ± 20.35 <sup>b</sup>	79.56 ± 0.95 <sup>b</sup>	74.24 ± 4.01 <sup>a</sup>	34.83 ± 11.21 <sup>a</sup>
OR 5%	97.20 ± 2.89 <sup>b</sup>	85.85 ± 5.55 <sup>b</sup>	77.91 ± 3.05 <sup>b</sup>	58.09 ± 11.30 <sup>a</sup>
TOM 1%	43.86 ± 11.94 <sup>a</sup>	35.07 ± 2.17 <sup>a</sup>	23.71 ± 7.87 <sup>a</sup>	24.42 ± 0.05 <sup>a</sup>
TOM 3%	64.66 ± 17.50 <sup>b</sup>	69.70 ± 2.74 <sup>b</sup>	27.05 ± 2.69 <sup>a</sup>	44.62 ± 13.09 <sup>a</sup>
TOM 5%	83.70 ± 9.43 <sup>b</sup>	82.11 ± 0.60 <sup>b</sup>	42.69 ± 29.57 <sup>a</sup>	44.39 ± 2.20 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Inhibición del crecimiento bacteriano no significativo ( $p > 0,05$ )

##### **4.1.2.1. Influencia de la concentración de aceite en la actividad antibacteriana**

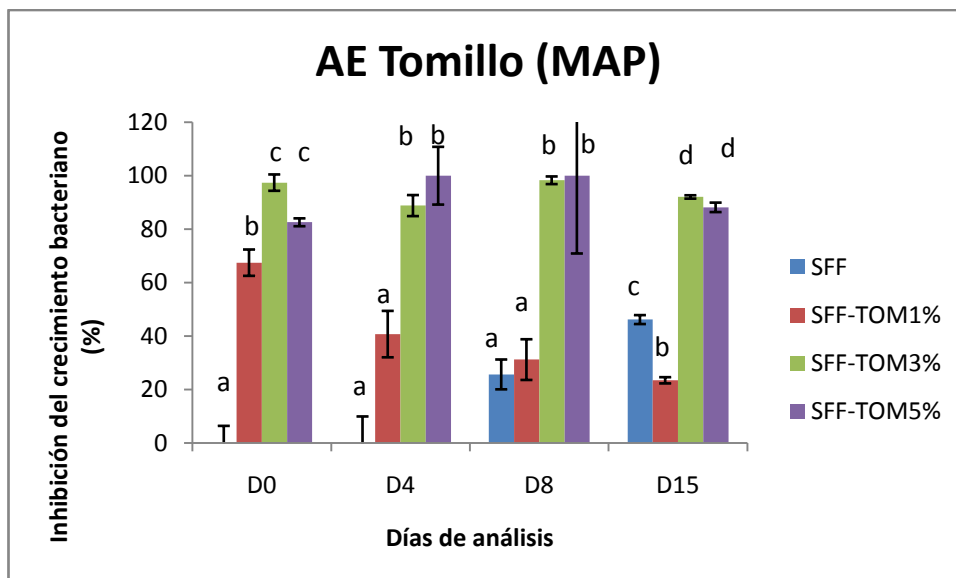
Se observaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento bacteriano entre las distintas concentraciones de ambos aceites esenciales (figuras 11 y 12). El día 0 las soluciones con una concentración del 1% (p/p) de aceite esencial (tanto las que incorporaban orégano como las que incorporaban

tomillo) mostraron una ICB significativa que disminuyó drásticamente a partir del día 4. Las soluciones con concentraciones 3 y 5% de ambos aceites esenciales, por el contrario, inhibieron el crecimiento bacteriano de forma muy significativa a lo largo de toda la duración del experimento. No se observaron diferencias significativas en la ICB de las soluciones con concentraciones 3 y 5 % de aceite esencial.



**Figura 11.** Comparación de los porcentajes de inhibición bacteriana de las soluciones que contenían SFF con aceite esencial de orégano en distintas concentraciones. La misma letra en el mismo día de análisis indica que no había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. La letra a indica que no existen diferencias significativas con la solución que sólo contenía inóculo.

Los datos correspondientes al día 15 muestran unos resultados que no se corresponden con la tendencia observada en el resto de días para las soluciones que incorporaban ambos aceites esenciales, especialmente en lo referente a las muestras control y 1%. Esto es debido probablemente a que sólo se registraron dos repeticiones para el día 15, lo que ha originado una alta variabilidad en los datos dificultando su análisis estadístico.



**Figura 12.** Comparación de los porcentajes de inhibición bacteriana de las soluciones que contenían SFF con aceite esencial de orégano en distintas concentraciones. La misma letra en el mismo día de análisis indica que no había diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. La letra a indica que no existen diferencias significativas con la solución que sólo contenía inóculo.

#### 4.1.2.2. Influencia de las soluciones formadoras de films en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales

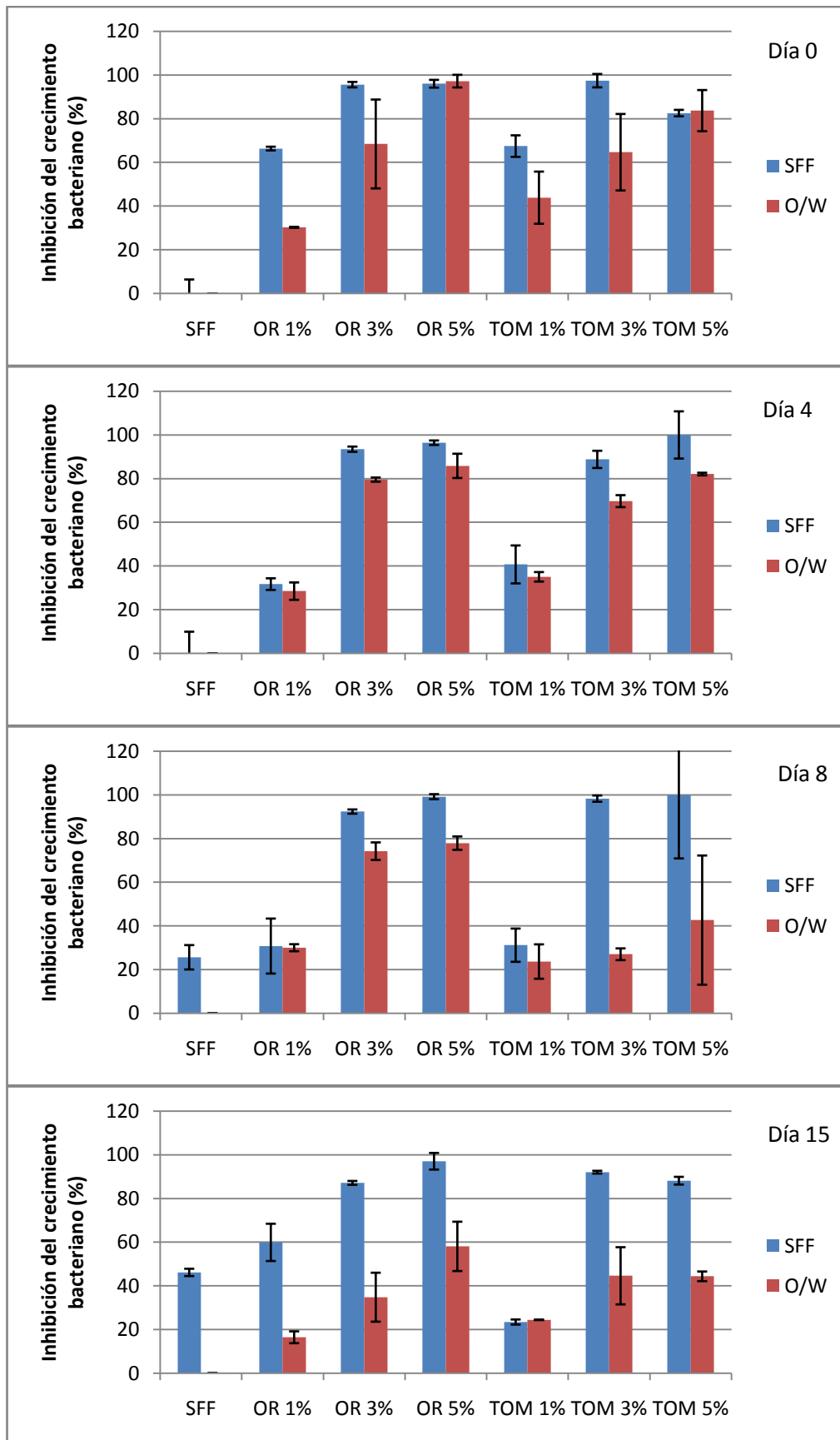
Como puede verse en la figura 13, las soluciones que contienen SFF parecen inhibir en mayor medida el crecimiento de la microbiota superficial de los filetes de merluza. Sin embargo, tras realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre las SFF con aceites esenciales incorporados y las diluciones de los aceites en agua (Tabla 14).

**Tabla 14.** Valores de significación de las comparaciones entre soluciones con SFF y sin ella.

Soluciones		$p^a$			
		D0	D4	D8	D15
OR 1%	SFF-OR1%	0.001	0.638	0.965	0.186
OR 3%	SFF-OR3%	0.390	0.018	0.070	0.198
OR 5%	SFF-OR5%	0.802	0.265	0.034	0.334
TOM 1%	SFF-TOM1%	0.274	0.656	0.633	0.77
TOM 3%	SFF-TOM3%	0.271	0.083	0.003	0.278
TOM 5%	SFF-TOM5%	0.932	0.218	0.223	0.024

<sup>a</sup> Diferencias significativas cuando  $p < 0,05$





**Figura 13.** Comparación de la inhibición del crecimiento bacteriano de las SFF con aceites esenciales incorporados frente a las soluciones aceite diluido en agua.

Las únicas diferencias significativas en la ICB se dieron entre las soluciones con orégano al 1% el día 0, orégano al 3% el día 4, orégano al 5% y tomillo al 3% el día 8 y tomillo al 5% el día 15.

Sin embargo, es muy probable que el ANOVA realizado no sea capaz de encontrar diferencias significativas debido a los pocos datos disponibles por cada grupo, lo que hace que el test no tenga la potencia suficiente para determinar estas diferencias. Ante la falta de una confirmación estadística, no se puede asegurar que las diferencias que se intuyen en la figura 13 existan realmente, por lo que será necesario comprobarlo en futuros estudios teniendo en cuenta la importancia de disponer de un número suficiente de observaciones.

#### **4.1.2.3. Comparación entre la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano y tomillo**

Se comparó la inhibición del crecimiento observada en las SFF que incorporaban aceites esenciales de orégano y tomillo en la misma concentración para comprobar si alguno de ellos tenía mayor actividad antibacteriana frente a la microbiota aislada de la superficie de los filetes de merluza, cuando estos se conservan en atmósfera modificada.

Como puede observarse en la tabla 15, en general no se observaron diferencias entre ambos tipos de aceite salvo algunas excepciones que probablemente sean debidas a la falta de datos disponibles.

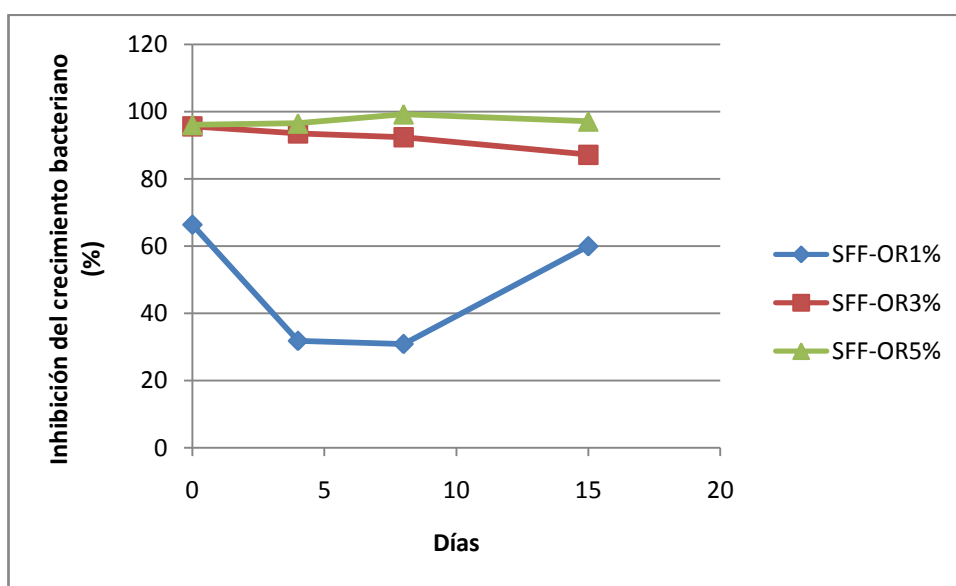
**Tabla 15.** Valores de significación de la comparación entre soluciones con aceite esencial de orégano y tomillo.

Soluciones	Valores de significación (p) <sup>a</sup>			
	D0	D4	D8	D15
SFF-TOM1% SFF-OR1%	0.871	0.503	0.001	0.226
SFF-TOM3% SFF-OR3%	0.696	0.452	0.107	0.206
SFF-TOM5% SFF-OR5%	0.041	0.561	0.462	0.527

<sup>a</sup> Diferencias significativas cuando  $p < 0,05$

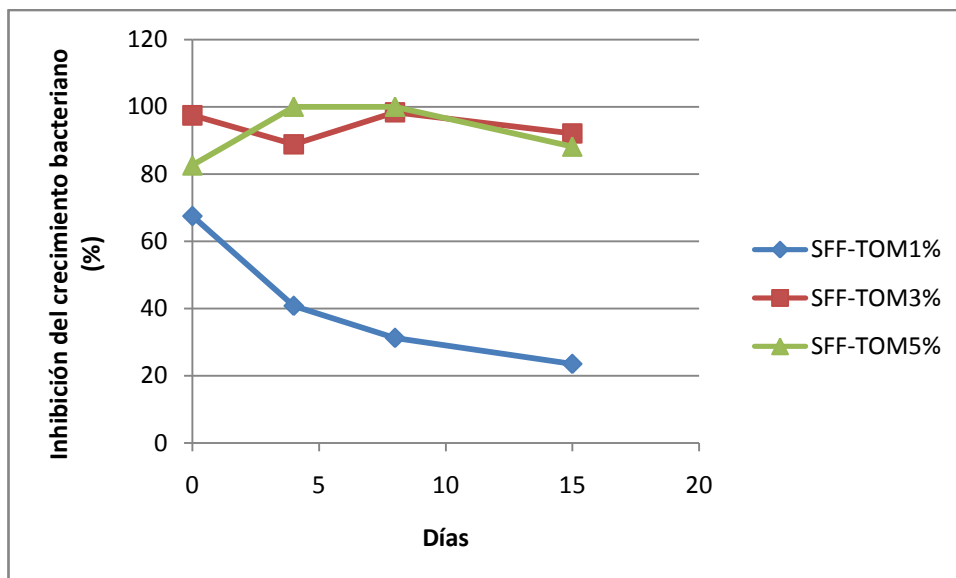
#### 4.1.2.4. Evolución de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales durante el almacenamiento de los filetes de merluza

La evolución de la actividad antibacteriana de las SFF con aceites esenciales incorporados a lo largo del experimento discurrió de forma similar para ambos aceites (figuras 14 y 15). Las soluciones con un 3% de aceite presentaron una inhibición del crecimiento bacteriano casi constante durante los 15 días que duró el experimento. Las soluciones con un 1% de aceite, por el contrario, mostraron una alta inhibición del crecimiento bacteriano el día 0, pero disminuyó más de un 20 % en ambos casos en el día 4, y en los días sucesivos siguió descendiendo en el caso del tomillo. Sin embargo, la solución con orégano al 1% experimentó un repentino aumento de su actividad antibacteriana el día 15.



**Figura 14.** Evolución de la ICB de las soluciones con SFF y aceite esencial de orégano durante los días de análisis.

El hecho de que las soluciones con concentraciones al 3 y 5% no mostrasen una disminución de su actividad antibacteriana a lo largo del experimento, como lo hicieron en el caso del tratamiento de envasado en aire, probablemente se deba a la acción del tratamiento MAP. Al no aumentar la carga bacteriana tan rápidamente los aceites esenciales siguen siendo eficaces en esas concentraciones.



**Figura 15.** Evolución de la ICB de las soluciones con SFF y aceite esencial de orégano durante los días de análisis.

## 4.2. Caracterización de la microbiota superficial

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales depende en gran medida del tipo de microorganismos sobre los que se van a utilizar, ya que no todos son igualmente sensibles a los compuestos activos presentes en ellos. Con el fin conocer las principales bacterias responsables del deterioro de la merluza presentes en las muestras, y observar cómo evolucionaron durante el periodo de almacenamiento en distintas condiciones de envasado, se realizó una caracterización de la microbiota superficial mediante recuentos en placa de bacterias aerobias mesófilas, ácido lácticas, psicrotrofas y *Pseudomonas* spp.

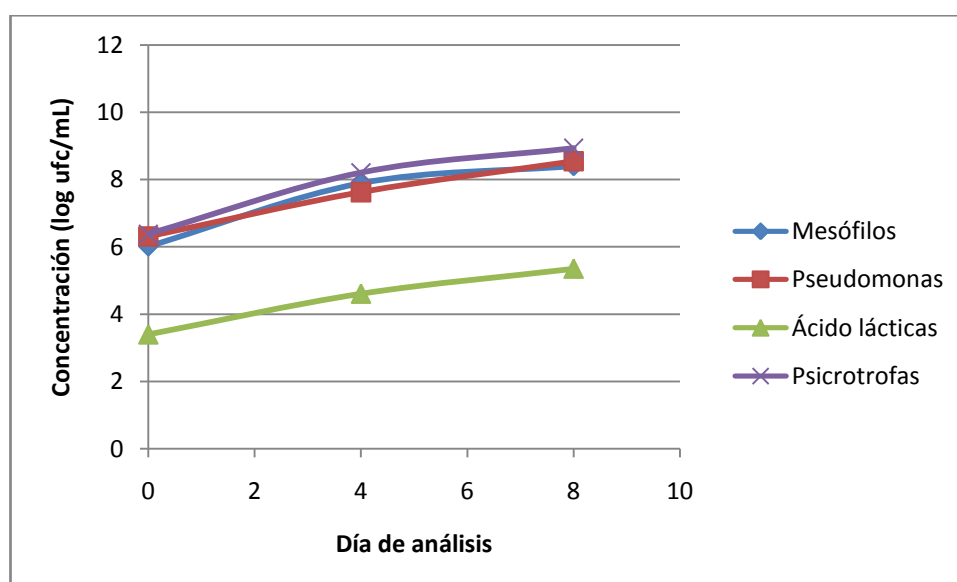
### 4.2.1. Tratamiento de envasado en aire

En la tabla 16 se muestran los recuentos bacterianos obtenidos a partir del inóculo que contenía la microbiota superficial de los filetes de merluza envasados en atmósfera aerobia. La carga bacteriana correspondiente al día 0 fue bastante elevada, sobrepasando en el caso de las bacterias mesófilas el límite de calidad establecido en la legislación europea.

**Tabla 16.** Concentración de las distintas bacterias aisladas de la superficie de los filetes de merluza durante el periodo de conservación en atmósfera aerobia.

Día	Mesófilos (ufc/mL)	Pseudomonas spp. (ufc/mL)	Bacterias ácido lácticas (ufc/mL)	Bacterias psicrotrofas (ufc/mL)
0	1.04E+06	2.04E+06	2.50E+03	2.40E+06
4	7.80E+07	4.22E+07	4.05E+04	1.61E+08
8	2.52E+08	3.48E+08	2.24E+05	8.59E+08

En la figura 16 se muestra la evolución de cada uno de los grupos bacterianos caracterizados durante el transcurso del experimento. Todos ellos aumentaron su número de forma exponencial, aunque las bacterias mesófilas dejaron de crecer tan rápidamente a partir del día 4, probablemente porque fueron desplazadas por otras bacterias mejor adaptadas a las condiciones de almacenamiento en refrigeración como las bacterias psicrotrofas. Entre las bacterias psicrotrofas se encuentran también *Pseudomonas* spp. y las bacterias ácido lácticas. Estas últimas son de crecimiento más lento que el resto, por lo que su número permaneció bajo en comparación con otras bacterias. *Pseudomonas* spp. es sin lugar a dudas la que mayor presencia tiene en la microbiota superficial de la merluza envasada en atmósfera aerobia y refrigeración, como ha sido descrito por diversos autores previamente.

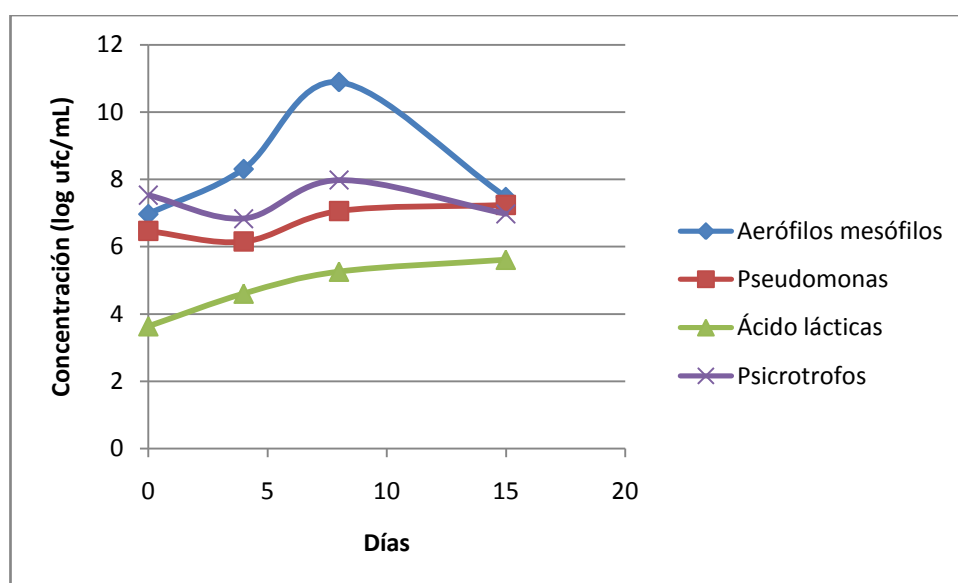


**Figura 16.** Caracterización de la microbiota superficial de los filetes de merluza durante el periodo de almacenamiento en atmósfera modificada y refrigeración.

#### 4.2.2. Tratamiento de envasado en atmósfera modificada

En las muestras de merluza envasadas en atmósfera modificada la microbiota inicial es prácticamente igual a la caracterizada en el tratamiento de envasado en aire, ya que todas las muestras estuvieron en las mismas condiciones de almacenamiento hasta llegar al laboratorio. Sin embargo, la evolución que siguen en los días sucesivos es muy diferente debido a la baja concentración de oxígeno en la atmósfera. Las bacterias ácido lácticas crecen también lentamente, pero en este caso su presencia en la microbiota total el día 15 es mucho mayor ya que *Pseudomonas* spp. ve limitado su crecimiento en estas condiciones.

El pico de crecimiento de las bacterias mesófilas el día 8 probablemente se deba a un error durante el recuento, ya que el día 15 vuelve a haber una concentración similar a la del día 4 (Figura 17).



**Figura 17.** Caracterización de la microbiota superficial de los filetes de merluza durante el periodo de almacenamiento en atmósfera modificada y refrigeración.

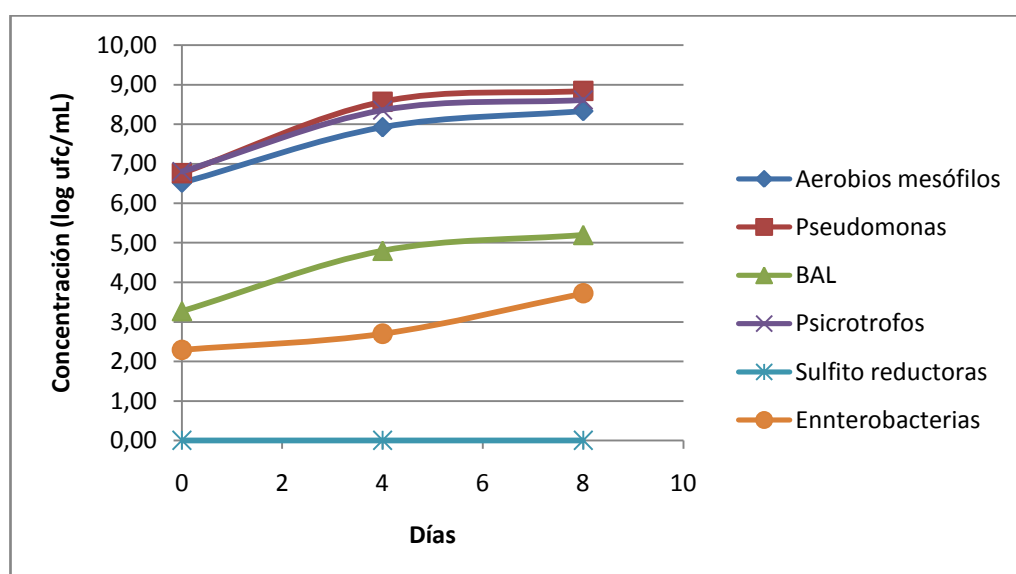
### 4.3. Control de calidad

Se cuantificaron los principales grupos bacterianos indicadores de la calidad del pescado durante el periodo de almacenamiento de las muestras. Los grupos de bacterias analizados fueron: bacterias mesófilas, ácido lácticas, psicrotrofas, sulfito reductoras, *Pseudomonas* spp. y enterobacterias.

#### 4.3.1. Tratamiento de envasado en aire

La carga bacteriana inicial fue muy elevada, sobrepasando los límites de calidad establecidos en la legislación para bacterias mesófilas totales, lo que indica que las muestras con las que se trabajó habían sido capturadas algunos días antes. Otros autores han reportado concentraciones iniciales alrededor de  $10^3$  log ufc/mL de bacterias mesófilas (Kostaki et al., 2009) en muestras de lubina.

Por otra parte, la proporción de cada grupo en la microbiota fue la esperada en muestras de merluza que se habían conservado en atmósfera aerobia y refrigeración hasta llegar al laboratorio.



**Figura 18.** Evolución de los indicadores de calidad de la de merluza durante el periodo de almacenamiento en atmósfera aerobia y refrigeración.

En la figura 18 puede observarse la evolución de cada grupo bacteriano durante el periodo de almacenamiento. *Pseudomonas* spp. fue el principal

colonizador de la microbiota, aumentando su concentración en dos órdenes de magnitud durante los 8 días que fueron almacenadas las muestras. Por otra parte, las bacterias ácido lácticas también aumentaron su concentración en dos órdenes de magnitud, aunque su presencia en la microbiota total siguió siendo baja en comparación con *Pseudomonas* spp.

Por otra parte, las enterobacterias que son utilizadas como indicador de la higiene de los alimentos presentaron una concentración inicial baja ( $10^2$  ufc/g de merluza) y, aunque su concentración aumentó durante el almacenamiento, lo hizo de forma discreta debido a la competencia con otras bacterias mejor adaptadas para crecer en condiciones de refrigeración.

Las bacterias sulfito reductoras no crecieron en ninguno de los días de análisis, por lo que no se pudo estimar su presencia en los filetes de merluza.

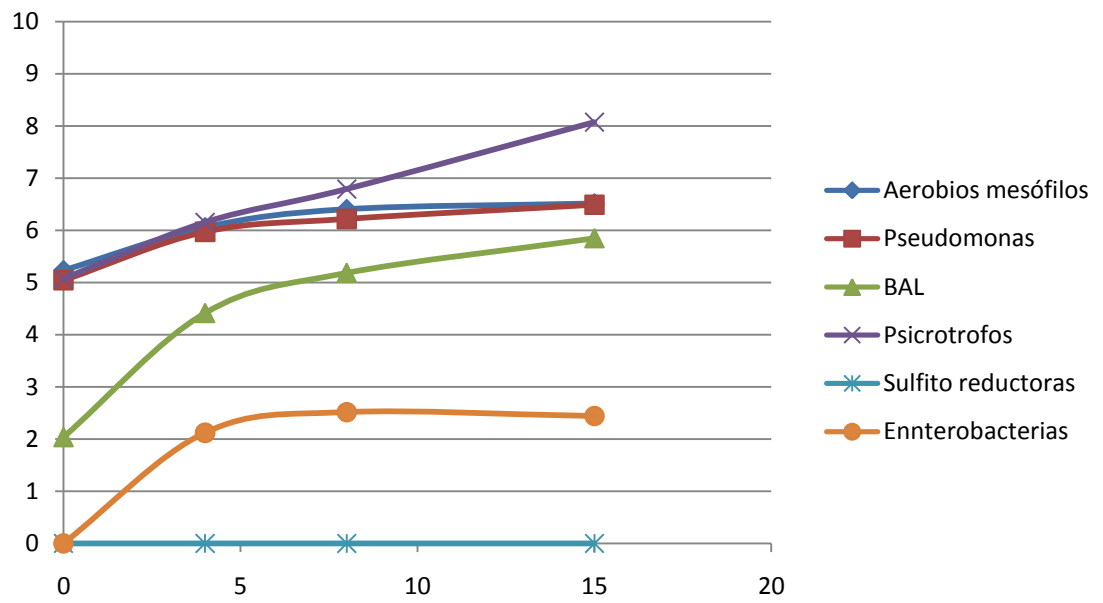
#### 4.3.2. Tratamiento de envasado en atmósfera modificada

La carga bacteriana presente en los filetes de merluza el día 0 fue relativamente baja (en comparación con las muestras envasadas en aire) para todos los grupos bacterianos analizados (Figura 19). La evolución que siguieron durante el periodo de almacenamiento fue la esperada, ya que las bacterias mesófilas y *Pseudomonas* spp. no fueron capaces de crecer en gran número, mientras que las bacterias psicrotrofas y las bacterias ácido lácticas crecieron aumentando su concentración en casi 3 y 4 órdenes de magnitud respectivamente.

La concentración de enterobacterias aumentó durante los primeros 4 días de almacenamiento, pero posteriormente su población se mantuvo constante debido a la presión competitiva ejercida por las bacterias ácido lácticas y otros psicrotrofos.

No se obtuvieron recuentos de las bacterias sulfito reductoras ya que no crecieron ninguno de los días de análisis.





**Figura 19.** Evolución de los indicadores de calidad de la de merluza durante el periodo de almacenamiento en atmósfera modificada y refrigeración.



## 5. Conclusiones

Los aceites esenciales de orégano y tomillo han demostrado ser eficaces inhibidores de la microbiota superficial de los filetes de merluza, especialmente cuando son incorporados en soluciones formadoras de films en concentraciones del 3% o superiores.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la inhibición del crecimiento bacteriano al aplicar los aceites esenciales incorporados en soluciones formadoras de films o en una mezcla acuosa, aunque en los datos obtenidos se aprecia una clara tendencia que apunta a que al aplicarlos incorporados a soluciones formadoras de films poseen un mayor efecto inhibitorio. Por lo tanto es necesario realizar pruebas con un mayor número de observaciones para poder realizar una afirmación concluyente.

La inhibición del crecimiento bacteriano es casi total para las concentraciones de aceite esencial del 3 y 5% mientras la carga bacteriana en la superficie de los filetes de pescado no supere los  $10^7$ - $10^8$  ufc/g. Cuando la carga bacteriana es mayor, la inhibición del crecimiento se ve reducida.

La aplicación de tratamientos barrera adicionales como el envasado en atmósfera modificada potencian la actividad antibacteriana de los aceites esenciales al retrasar el crecimiento de los microorganismos, permitiendo que los aceites de orégano y tomillo mantengan su actividad durante más tiempo.



## 6. Bibliografía

Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49(4), 369-377.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 223-253.

Bourtoom, T. (2009). Review article. Edible protein films: Properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16, 1-9.

Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.

Fernández Cervera, M., Karjalainen, M., Airaksinen, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinämäki, J., et al. (2004). Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 69-76.

Fernandez-Pan, I., Mendoza, M., & Mate, J. I. (2013). Whey protein isolate edible films with essential oils incorporated to improve the microbial quality of poultry. *J Sci Food Agric*, 93(12), 2986-2994.

Fornari, T., Vicente, G., Vazquez, E., Garcia-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A*, 1250, 34-48.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Food Microbiology*, 33, 121-137.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 79-97.

- Guilbert, S., Gontard, N., and Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **29**: 10–17.
- Gutierrez, J., Rodríguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection*, *71*(9), 1846-1854.
- Hulankova, R., Borilova, G., & Steinhauserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Science*, *95*(2), 190-194.
- Iturriaga, L., Olabarrieta, I., & de Marañon, I. M. (2012). Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *Int J Food Microbiol*, *158*(1), 58-64.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiol*, *26*(5), 475-482.
- Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chemistry*, *115*(1), 169-175.
- Perez-Gago, M. B. and Krochta, J. M. (1999). Water permeability of whey protein emulsion films as effected by pH. *J. Food Sci.* **64**: 695–698.
- Ramos, O. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *52*(6), 533-552.

Royo, M., Fernandez-Pan, I., & Mate, J. I. (2010). Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *J Sci Food Agric*, 90(9), 1513-1519.

Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.

Stammen, K., Gerdes, D., & Caporaso, F. (1990). Modified atmosphere packaging of seafood. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 29(5), 301-331.