

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



**RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE BIOPOLÍMEROS Y
ACEITES ESENCIALES. APLICACIÓN A SALMÓN**

Máster en Gestión y Seguridad Alimentaria

Iris van Beest

Directoras académicas:
María Vargas Colás
Lorena Atarés Huerta

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE BIOPOLÍMEROS Y ACEITES ESENCIALES. APLICACIÓN A SALMÓN

Iris van Beest, Maria Vargas¹, Lorena Atarés¹

Resumen: Se elaboran películas comestibles utilizando quitosano (CH) y metilcelulosa (M) con y sin aceite esencial de tomillo (T) u orégano (O). Se caracterizaron propiedades de las películas (permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, actividad antioxidante, propiedades mecánicas y ópticas, humedad, microestructura) obtenidas por extensión y secado, equilibradas a una humedad relativa (HR) del 85% a 10°C. El impacto de la incorporación de aceite esencial sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas dependió de la matriz. Las películas, se aplicaron sobre muestras de salmón y se determinó la evolución de la oxidación lipídica y el crecimiento microbiano, en diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Los ensayos indican que las películas de CH presentaron menor permeabilidad al oxígeno y mayor carácter antioxidante, que las películas de M. Esto se manifestó en una ralentización del deterioro oxidativo de las muestras recubiertas con la matriz CH en congelación. Los resultados del estudio microbiológico, mostraron menores recuentos en las muestras recubiertas con película de CH, almacenadas en congelación. Mientras que la incorporación de aceite esencial no supuso una mejora en la calidad microbiológica.

Palabras clave: Películas comestibles, quitosano, metilcelulosa, salmón, tomillo, orégano, oxidación lipídica, actividad antioxidante, recuentos microbiológicos,

Resum: S'elaboren pel·lícules comestibles utilitzant quitosano (CH) i metilcelulosa (M) amb i sense oli essencial de timó (T) o orenga (O). Es van caracteritzar propietats de les pel·lícules (permeabilitat al vapor d'aigua i a l'oxigen, activitat antioxidant, propietats mecàniques i òptiques, humitat, microestructura) obtingudes per extensió i assecat, equilibrades a una humitat relativa (HR) del 85% a 10°C. L'impacte de la incorporació d'oli essencial sobre les propietats fisicoquímiques de les pel·lícules va dependre de la matriu. Les pel·lícules, es van aplicar sobre mostres de salmó i es va determinar l'evolució de la oxidació lipídica i el creixement microbià, en diferents temps i temperatures d'emmagatzemament. Els assajos indiquen que les pel·lícules de CH van presentar menor permeabilitat a l'oxigen i major caràcter antioxidant, que les pel·lícules de M. Açò es va manifestar en una ralentització del deteriorament oxidatiu de les mostres recobertes amb la matriu CH en congelació. Els resultats de l'estudi microbiològic, van mostrar menors recomptes en les mostres recobertes amb pel·lícula de CH, emmagatzemades en congelació.

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo.
Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n

Mientras que la incorporació d'oli essencial no va suposar una millora en la qualitat microbiològica.

Paraules clau: Pel·lícules comestibles, quitosano, metilcelulosa, salmó, timó, orenga, oxidació lipídica, activitat antioxidant, recomptes microbiològics.

Abstract: Chitosan and methylcellulose were used to make edible films with or without essential oil of thyme (T) or oregano (O). Properties of these films were characterized (oxygen and water vapor permeability, antioxidant effect, optical and mechanical properties, humidity, microstructure) obtained by extending and drying films, these are balanced in relative humidity (RH) of 85% at 10°C. The impact of incorporating essential oil on the physicochemical properties of the films depended on the matrix. The films were applied on salmon samples and it has been determined the development of lipid oxidation and microbial growth in different storage times and temperatures. Tests indicate that CH films had lower oxygen permeability and a higher antioxidant character than M films. This was manifested in a slowing oxidation degradation of the samples coated with CH matrix in freezing. The microbiological tests showed lower counts in the samples coated with CH film, stored in frozen. While incorporating essential oil didn't improve microbiological quality.

Key words: Edible films, chitosan, methylcellulose, salmon, thyme, oregano, lipid oxidation, antioxidant effect, microbiological count.

INTRODUCCIÓN

Los productos procedentes del mar son altamente demandados por el consumidor, puesto que éste los asocia con un elevado valor nutritivo y los consiguientes beneficios para la salud (Pereira de Abreu *et al.*, 2010). Por otro lado, uno de los inconvenientes de estos productos es que son altamente perecederos debido a varios procesos (degradación autolítica, contaminación microbiana y oxidación lipídica), que repercuten sobre el valor nutricional y comercial del producto (Aubourg *et al.*, 2007).

El salmón noruego de piscifactoría se caracteriza por un elevado contenido en grasa (10-20%) en el músculo blanco, lo que limita la vida útil del producto en función de la cinética de oxidación lipídica (Erikson *et al.*, 2011). Junto con el crecimiento microbiano, la oxidación de la grasa es uno de los procesos más importantes que provocan el deterioro de los productos alimentarios (Pereira de Abreu *et al.*, 2010). La oxidación de los lípidos reduce la vida útil del producto, puesto que provoca cambios negativos en el sabor y/o olor, además del deterioro de la textura del músculo y la pérdida de calidad nutricional (Pereira de Abreu *et al.*, 2010).

A medida que este proceso químico tiene lugar, inicialmente se generan los llamados productos primarios de la oxidación (hidroperóxidos). En esta fase inicial, el oxígeno molecular y las grasas insaturadas se combinan en presencia de un catalizador, como puede ser hierro, cobre, enzimas, calor, luz, etc. (Pereira de Abreu *et al.*, 2010). En la última etapa, se generan compuestos de oxidación secundaria, alcanos, alquenos, aldehídos y

cetonas, los responsables del olor a rancio debido a su volatilidad (Pereira de Abreu *et al.*, 2010).

Los antioxidantes se aplican a los alimentos con la finalidad de disminuir la velocidad de reacción de oxidación (Tironi, 2010). Es necesario determinar la concentración adecuada antioxidante para evitar una posible acción prooxidante (Pereira de Abreu *et al.*, 2010). Entre los posibles antioxidantes naturales de uso alimentario se encuentran los extractos de plantas y aceites esenciales. Los aceites esenciales se pueden vehiculizar a través de películas comestibles biodegradables preparadas a base de polisacáricos (Bonilla *et al.*, 2012), como podrían ser el quitosano y la metilcelulosa.

La metilcelulosa (M) es un éter de celulosa con excelentes propiedades de formación de películas (Persini *et al.*, 2003). El quitosano (CH) se puede obtener del caparazón de crustáceos y es un material interesante para la elaboración de películas y recubrimiento comestibles, debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de barrera al oxígeno (Sathivel *et al.*, 2007).

Estudios previos han mostrado que el efecto antimicrobiano y antioxidante del quitosano puede ser mejorado por la incorporación de aceites esenciales (Mahdi *et al.*, 2010; Bonilla *et al.*, 2012; Bonilla *et al.*, 2013a).

El objetivo de este trabajo fue: obtener y caracterizar películas comestibles de CH o M y aceites esenciales de orégano o tomillo, y evaluar el efecto de las películas cuando se aplican en muestras de salmón picado durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las películas comestibles

Se elaboraron 6 formulaciones diferentes a base de polímeros puros (CH o M) combinados o no con dos aceites esenciales: orégano (O) o tomillo (T), ambos suministrados por Herbes del Molí (Alicante, España). Estas formulaciones se denominaron: CH, CHO, CHT, M, MO y MT.

Se dispersó CH, (Sigma Aldrich, Islandia) al 1%w/w en agua destilada, se añadió ácido acético glacial al 1% (v/w) y se agitó durante 24h a 390rpm. A continuación, se incorporó Tween 85 (Sigma Aldrich Fluka, Alemania) al 0.05% (v/w) y, para las formulaciones CHO y CHT, el correspondiente aceite esencial al 0.25% (w/w). Seguidamente se homogenizó mediante un rotor-estator (Ika® T-25, Alemania) durante 4 minutos a 13500rpm. Se desgasificó mediante bomba de vacío (Vacubrand ME4, 3.7m³/h, Alemania). Para obtener las formulaciones a base de M (VWR, Inglaterra), el polímero se dispersó al 1% (w/w) en agua destilada y se calentó hasta 80°C con agitación. Tras enfriar la dispersión, se incorporó Tween 85 al 0.05% (v/w) y para las formulaciones MO y MT, el correspondiente aceite esencial al 0.25%w/w. Seguidamente se homogenizó y desgasificó de acuerdo al procedimiento ya descrito.

Una vez obtenidas las formulaciones formadoras de recubrimiento, éstas se vertieron en placas de teflón de 150 mm de diámetro, o bien en placas petri de 9mm de diámetro. En ambos casos se mantuvo una densidad de sólidos constante de 56.59g/m². La etapa de secado (48-72h) tuvo lugar a 22°C (±1°C) y una humedad relativa de 45% (±2%). Después del secado, las películas se retiraron cuidadosamente de las placas y se almacenaron en un desecador a 10°C y una humedad relativa (HR) del 85% utilizando disoluciones saturadas de KCl (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona).

Caracterización de las películas

Microestructura

Se obtuvieron imágenes transversales y superficiales de las películas mediante el microscopio JEOL® (modelo JSM-5410, Tokio, Japón), a partir de muestras de películas previamente almacenadas en desecadores con P₂O₅ (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona) durante 2 semanas.

Para observar la estructura interna de las películas, éstas se sumergieron en nitrógeno líquido y se criofracturaron. Todas las muestras se colocaron sobre portas, se recubrieron con oro y se observaron a 10kV (imágenes transversales) y 5kV (imágenes superficiales).

Propiedades mecánicas

El comportamiento mecánico de las películas se evaluó a través de ensayos de tensión (método estándar D882), utilizando una prensa universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus Haslemere, Inglaterra).

Por cada formulación, se cortaron 12 muestras rectangulares (25mm por 100mm) y se acondicionaron a 85% HR y a 10°C. En cada muestra se midió el espesor en cuatro puntos distintos, utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). Cada muestra se montó en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación fueron 50mm y 50mm/min, respectivamente.

Las curvas de fuerza frente a distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ) frente a deformación de Henky (ϵ_H) utilizando las ecuaciones 1 y 2:

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S(t)} = \frac{F(t) \cdot (L_0 + d(t))}{b \cdot e \cdot L_0} \quad (1)$$

$$\epsilon_H = \ln\left(\frac{L_0 + d(t)}{L_0}\right) \quad (2)$$

Donde: L₀= longitud inicial de la película (m); b= base de la muestra rectangular (m); e= espesor de la película (m); d(t)= longitud de la muestra a

cada tiempo (m); S(t): área transversal de la muestra a cada tiempo (m²); F(t)= fuerza de tensión a cada tiempo (N).

De las curvas σ vs. ϵ_H se obtuvieron los parámetros TS (tensión de fractura, MPa), EM (módulo de elasticidad o modulo de Young, pendiente de la zona lineal de la curva, MPa) y E (deformación de Henky en el punto de fractura, expresada en porcentaje).

Humedad de equilibrio

La humedad de las películas equilibradas a 10°C y 85% de HR se determinó gravimétricamente. Se eliminó la humedad de las películas, previo pesado, manteniéndolas en una estufa a vacío (Vaciotem-TV, Selecta, Barcelona, España) a 60°C durante 48h, tras lo cual se almacenaron en un desecador de vidrio con P₂O₅ hasta peso constante.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Se determinó la PVA de las películas para un gradiente de humedad relativa 85%-100% y a una temperaturas de 10°C, aplicando el método ASTM E-96-95 modificado (Gennadios et al., 1994). Para cada formulación, se recortaron 4 muestras circulares, previo acondicionamiento a 85% HR y 10°C. Una vez acondicionadas, se midió el espesor en 6 puntos por cada muestra. Éstas se colocaron sobre celdas de aluminio (3.5cm diámetro, Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica) que contenían 5mL de agua destilada. La superficie que había estado en contacto con el aire durante la etapa de secado de la película, se colocó hacia el exterior de la celda. Se aseguró la hermeticidad del sistema colocando un anillo de caucho y 3 mordazas.

Cada celda se colocó en un soporte con ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados que contenían soluciones saturadas de KCl (85%HR). Los desecadores se almacenaron en una cámara (Hotcold UL, Selecta, Barcelona, España) a la temperatura de ensayo. Durante 24-48 horas y a intervalos de 3-6 horas se monitorizó la masa de las celdas utilizando una balanza analítica (ME235P Sartorius, Alemania).

La pendiente de la curva de pérdida de masa frente al tiempo, se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua. La presión de vapor de agua en la cara interior de la película se obtuvo con el método propuesto por Gennadios et al. (1994) para corregir el efecto del gradiente de concentración establecido en el espacio de cabeza de la celda.

Propiedades ópticas: transparencia, color y brillo

Para caracterizar las propiedades ópticas de las películas se obtuvieron los espectros de reflexión entre 400 y 700nm sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R₀), utilizando un espectrocolorímetro (3600d, Minolta, Tokio, Japón). Los datos se completaron con el espectro del fondo blanco (R_g). Las

mediciones se realizaron sobre la cara que había estado en contacto con el aire durante el secado.

Se calcularon los espectros de R_{∞} (reflectancia de una lámina infinita de muestra cuyo grosor sea suficiente como para anular el efecto del fondo), utilizando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999), con las ecuaciones 3-5. La transmitancia interna (T_i), como indicador de la transparencia de las películas, se calculó utilizando la ecuación 6:

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (3)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (4)$$

$$R_{\infty} = a - b \quad (5)$$

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (6)$$

A partir de los espectros de R_{∞} , se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIE – $L^*a^*b^*$ (CIE, 1986), utilizando como sistema de referencia observador 10° e iluminante D_{65} . El tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) se calcularon mediante las ecuaciones 7 y 8:

$$h_{ab}^* = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (7)$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (8)$$

El brillo de las películas se midió con un brillómetro Multi Gloss 268 (Minolta, Alemania) a diferentes ángulos de incidencia (20, 60 y 85°). Las películas se colocaron sobre una superficie negro mate, de acuerdo con la norma (ASTM, 1999). Se realizaron diez mediciones por formulación y ángulo, en la cara de la película que había estado en contacto con el aire durante el secado. Las medidas se expresaron en unidades de brillo relativas a una superficie de vidrio negro con un valor próximo a 100.

Permeabilidad al oxígeno

Se determinó la capacidad de transmisión de oxígeno de los recubrimientos acondicionados a 10°C y 85%HR mediante el equipo OX-TRAN (1/50, Mocon, Minneapolis, USA). Se midieron tres películas por formulación.

Actividad antioxidante de las películas

Se determinó la actividad antioxidante de las películas utilizando un método espectrofotométrico (Re et al., 1999) basado en comparar la

actividad antioxidante de la sustancia analizada con la de un patrón antioxidante, el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Aldrich, Alemania), derivado de la vitamina E. Con este fin, se utiliza como sustrato ABTS (ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) (Sigma, Alemania) oxidado previamente al radical catiónico ABTS^{•+}, de coloración azul.

Se preparó una disolución acuosa de ABTS (7mM) y persulfato potásico (2.45 mM) (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona), que permaneció en oscuridad durante unas 16h, obteniéndose el radical catiónico coloreado. Se diluyó en etanol hasta una absorbancia inicial de 0.70 (±0.02) a 734 nm (A₀). Todas las determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro (Termo Scientific Evolution 201, China), utilizando etanol como blanco, y a esa misma longitud de onda.

Con el fin de obtener extractos a partir de las películas, aquellas preparadas a base de M se disolvieron con agua destilada, y las de CH utilizando agua destilada con ácido acético glacial (1% v/w). 10µL de los extractos obtenidos, así como de sus diluciones, se mezclaron con 990µL de la dilución de ABTS^{•+} y se registró el valor de la absorbancia a los 6 minutos (A₆). El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó con la ecuación (9):

$$\% \text{ reducción A} = \frac{A_0 - A_6}{A_0} \cdot 100 \quad (9)$$

Se repitió el procedimiento con diferentes diluciones de trolox como agente antioxidante (0mg/L hasta 50mg/L), para obtener una recta de calibrado que relacionara el porcentaje de reducción de A con la concentración de agente antioxidante presente a los 6 minutos. La capacidad antioxidante de las películas se expresó en equivalentes de trolox (TEAC: *trolox equivalent antioxidant capacity*).

Aplicación de las películas sobre muestras de salmón

Obtención de las muestras de salmón

Las muestras se prepararon a partir de salmón entero eviscerado de piscifactoría adquirido en un supermercado local. Una vez retirada la piel del salmón se extrajo el músculo evitando las espinas. El triturado se llevó a cabo con una picadora (FW 3782 Severin, Sunder, Alemania). Se prepararon muestras de 50 g sobre tapas de placas Petri (9cm de diámetro). Cada muestra se cubrió por ambos lados con las correspondientes películas, manteniendo hacia el exterior la cara de la película que había estado en contacto con el aire durante el secado. Además, se elaboraron muestras control sin recubrimiento.

Las muestras de salmón se almacenaron en refrigeración (10°C) una semana o en congelación (-20°C) durante un máximo de 13 semanas y se evaluaron distintos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del productos a diferentes tiempos. Las muestras se descongelaron en condiciones de refrigeración durante 3h, antes de realizar las determinaciones.

Análisis del color

Las variaciones ópticas producidas en las muestras se midieron mediante un espectrocolorímetro (3600d, Minolta, Tokio, Japón), utilizando como sistema de referencia el observador 10° e iluminante D₆₅.

Previamente se había retirado la película de la superficie de la muestra. Se tomaron varias medidas sobre la misma muestra. A partir de las coordenadas L*, a*, b* se calcularon los parámetros cromáticos tono (h_{ab}^*), y croma (C_{ab}^*) respecto a las muestras no recubiertas para un mismo tiempo de almacenamiento.

Índice de peróxidos

Se determinó el índice de peróxidos (IP) del aceite extraído de las muestras de salmón a lo largo del almacenamiento en congelación, de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 3960:2001. Para extraer la grasa, la muestra previamente liofilizada se sumergió en éter de petróleo (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona) y se mantuvo en agitación durante 2h. A continuación se eliminó el disolvente en rotavapor (Laborota 4000 efficient, Heidolph, Alemania) a 40°C.

Para realizar el ensayo, se tomaron 0.5g de aceite y se disolvió en una mezcla 6:4 de ácido acético glacial e isooctano (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona). Se añadió disolución saturada de yoduro potásico y, tras un minuto de reacción, se diluyó con agua destilada. Se valoró con tiosulfato (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona) utilizando almidón como indicador. El índice de peróxidos se expresó como miliequivalentes de oxígeno/ kg de aceite.

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Se retiró la película de la superficie de las muestras y se pesaron unos 18g de salmón, que se homogeneizaron junto con 40mL de ácido tricloroacético (TCA) (Panreac Castellar del Vallés, Barcelona) al 7.5% (p/v) en un rotor-estator (Yellow Line, IKA®, Alemania) a 13500rpm durante 1 minuto. Se centrifugó (Centrolit II-BL, Selecta, Barcelona, España) a 5°C y 4500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtró a vacío. Se tomaron 5mL de filtrado y se añadieron 5mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich, Alemania) 0.02M en tubos de ensayo. Éstos se mantuvieron sumergidos 40 minutos en un baño (Precisidig, Selecta, Barcelona, España) de agua a 95°C y se enfriaron con agua corriente. Se realizó un ensayo blanco con agua destilada. Se midió la absorbancia resultante de la reacción del malonaldehído (MA) con el TBA a 532nm.

La concentración de MA se determinó por comparación con una recta de calibrado obtenida a partir de disoluciones seriadas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, Alemania).

Análisis microbiológico

Para obtener los inóculos, se obtuvieron cepas de *Listeria innocua* (CECT 910) suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjassot, Valencia). Las cepas fueron revividas en caldo de Triptona y soja (TSB) (Scharlab, S.L., Barcelona, España) siguiendo las instrucciones de la CECT, Estas se suplementaron con un 30% de glicerol para conservarlas en congelación.

Los cultivos se revivieron transfiriendo con un asa de siembra a caldo TSB y se incubaron durante 24h a 37°C. Se tomó una alícuota de 1mL de este caldo que se añadió a 10mL de TSB y se incubó a 37°C durante 24h.

Para evaluar el efecto de las películas sobre el deterioro microbiológico de las muestras de salmón, se realizaron recuentos microbiológicos en diferentes condiciones de almacenamiento en muestras sin inocular. Adicionalmente, se evaluó el deterioro en muestras inoculadas con 1 mL de una suspensión de *Listeria innocua* (10^5 ufc/mL) que fueron almacenadas durante 1 semana a 10°C.

Para realizar los análisis microbiológicos durante el almacenamiento, las muestras se introdujeron en una bolsa de Stomacher (Seward, Reino Unido) con agua peptonada tamponada (Scharlab, S.L., Barcelona, España) y se homogenizaron en Stomacher (BagMixer® 100MiniMix® P CC®) durante 1 minuto. Se prepararon las diluciones decimales necesarias para realizar los recuentos microbiológicos.

Para el recuento de aerobios mesófilos, se sembró 1mL de las diluciones en una placa Petri (Sterilin, Reino Unido) completándolo con 25-30mL de Agar de Recuento en placa (Scharlab, S.L., Barcelona, España). Las placas se introdujeron en una estufa (Incudigit, Selecta, Barcelona) a 37°C y se realizaron los recuentos transcurridas 48h.

Para el análisis de coliformes, se siguió el mismo procedimiento anteriormente expuesto pero utilizando en este caso el medio de cultivo Agar Rojo Bilis Violeta (Scharlab, S.L., Barcelona, España). En cada placa, se aplicó una segunda capa de medio una vez hubo solidificado la primera capa para crear una cierta anaerobiosis. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C y a continuación se realizó el recuento.

En las muestras inoculadas, se realizó un recuento de *Listeria innocua*. Para ello se procedió de forma semejante a lo anteriormente expuesto pero utilizando agar base Palcam (Scharlab, S.L., Barcelona, España) completado con suplemento selectivo. En las muestras no inoculadas, se recontó el número de colonias que mostraron aspecto típico de *Listeria* (puntos o halo negro) en un recuento en placas con medio selectivo Palcam.

Análisis estadístico

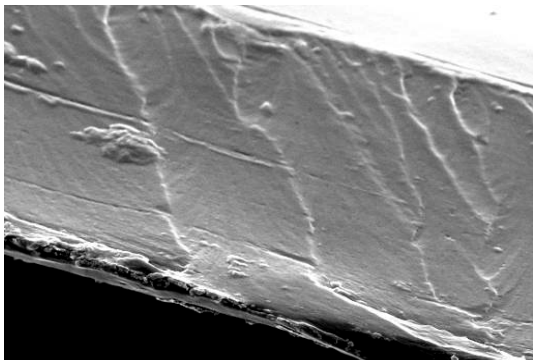
Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

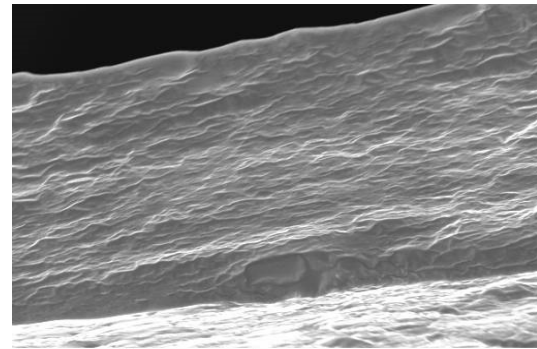
Caracterización de las películas

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

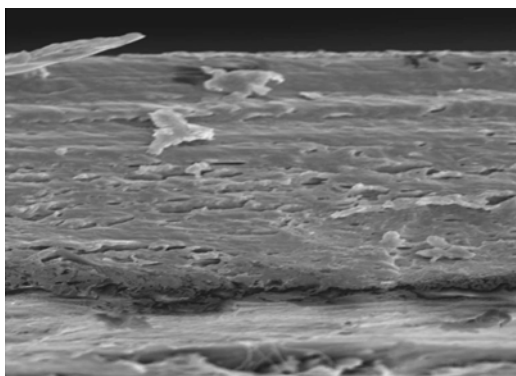
La estructura final del recubrimiento está influenciada por la distribución de los diferentes componentes de la película, la interacción entre ellos y las condiciones durante el secado (Vargas et al., 2009a). La Figura 1 muestra imágenes de la sección transversal. Las películas CH presentan una superficie homogénea y continua, tal y como ha sido observado en estudios previos (Vargas et al., 2011). En el caso de la sección de la película M, se observa una morfología más fibrosa, coherente con lo observado por Pinotti et al. (2007). La incorporación de aceites esenciales a las matrices, se refleja en la presencia de gotas de aceite que se integran en la película, y que se pueden distinguir en las imágenes de la sección transversal. Las partículas de aceite se integran de diferente manera según el tipo de matriz. En las películas de M se observan gotas de aceite más grandes que en el caso de la matriz de CH.



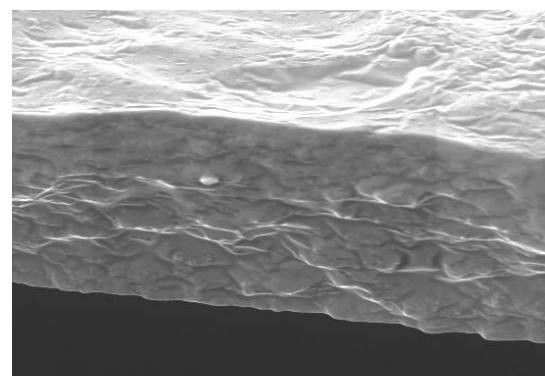
CH



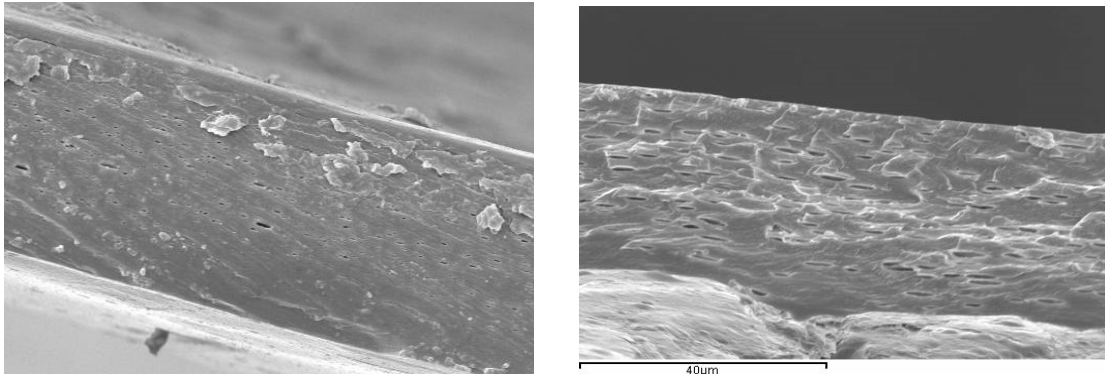
M



CHO



MO

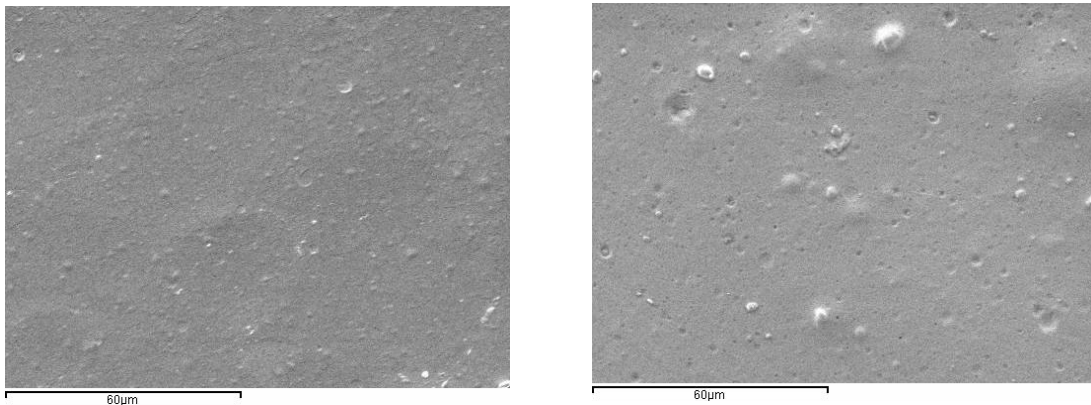


CHT

MT

FIGURA 1. Micrografías SEM de la sección transversal de las películas.

La Figura 2 muestra dos imágenes de la superficie de películas con aceite esencial. No se detectaron diferencias destacables en función del tipo de aceite y matriz. En todos los casos, se observaron las gotas de aceite embebidas en la superficie de la matriz.



CHO

MO

FIGURA 2. Micrografías por SEM de la superficie de las películas.

Propiedades mecánicas

Los parámetros obtenidos, a partir de la curva de esfuerzo de tracción frente a deformación, son los siguientes: módulo de elasticidad (EM), relacionado con la rigidez; tensión de fractura (TS), que representa la resistencia a la deformación de la película en el momento de la rotura, y porcentaje de deformación (E%), que es el porcentaje de deformación de la película hasta la fractura y por tanto una medida de su elasticidad. Los valores para estos parámetros junto con la humedad de equilibrio de las películas se recogen en la Tabla 1.

TABLA 1. Modulo de elasticidad (EM), esfuerzo de fractura (TS), porcentaje de deformación en la fractura (E%) y humedad de equilibrio (g agua/ g película seca). Medias (desviación estándar entre paréntesis).

Película	EM(MPa)	TS(MPa)	E(%)	Humedad (b.s)
CH	668 (314) ^a	21 (5) ^a	6.3 (1.7) ^a	0.221 (0.016) ^b
CHO	873 (218) ^{bc}	32 (7) ^d	10.3 (1.6) ^c	0.24 (0.08) ^b
CHT	1045 (349) ^c	29 (5) ^{cd}	8 (3) ^{bc}	0.237 (0.005) ^b
M	726 (309) ^{ab}	26 (9) ^{bcd}	8 (3) ^b	0.073 (0.004) ^b
MO	961 (220) ^{bc}	24 (8) ^{ab}	7 (2) ^{ab}	0.064 (0.004) ^a
MT	872 (277) ^{bc}	24 (8) ^{abc}	7 (2) ^{ab}	0.07 (0.04) ^a

Superíndices distintos (^{a, b, c, d}) indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las películas de CH puro se mostraron menos rígidas y significativamente menos deformables y resistentes que las de M. Tendencias similares fueron obtenidas por García et al. (2004). La adición de aceites esenciales no tuvo un impacto significativo en el caso de las películas M. En las películas de CH, la adición de ambos aceites se reflejó en un aumento significativo de todos los parámetros mecánicos. Estudios previos reportaron un aumento de la tensión de fractura debido a la incorporación de aceites esenciales en la matriz de la película (Atarés et al. 2010, Ojagh et al. 2010).

Propiedades ópticas

La transmitancia interna (T_i) de las películas en función de la longitud de onda se muestra en la Figura 3. Los valores altos de T_i se corresponden con muestras menos opacas.

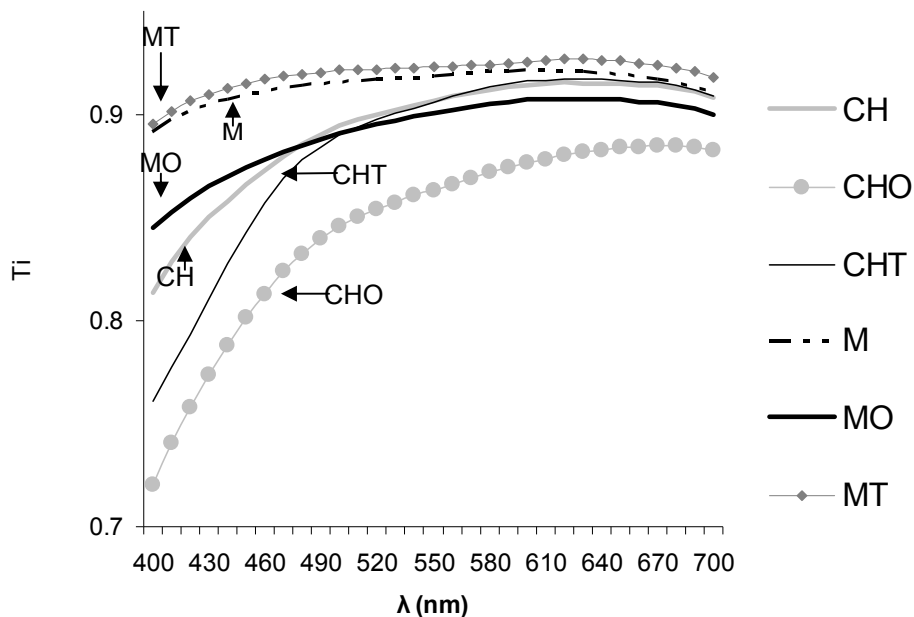


FIGURA 3. Transmitancia interna de las películas acondicionadas a HR 85% y 10°C.

Las películas M son menos opacas que las CH. Además, se observa que las películas que contienen aceite esencial presentan una mayor opacidad, lo que puede ser debido a un aumento de la reflexión difusa por la pérdida de homogeneidad que genera la incorporación de la fase aceite. Un efecto similar fue obtenido por Sánchez-González et al. (2011a) en películas a base de CH o de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) con diferentes proporciones de aceite esencial de bergamota o de limón

En la Tabla 2, se recogen los parámetros cromáticos (luminosidad, croma y tono) así como el brillo de las películas medido a 60°.

TABLA 2. Luminosidad, croma, tono y brillo a 60° de las películas equilibradas a HR 85% y 10°C. Medias (desviación estándar entre paréntesis).

Película	L*	C* _{ab}	h* _{ab}	BRILLO 60°
CH	78.12 (0.13) ^c	16.3 (0.3) ^c	89.8(0.2) ^b	35 (2) ^b
CHO	71.4 (0.8) ^a	17.3 (0.8) ^c	85.12 (0.63) ^a	38 (4) ^b
CHT	75.7 (0.5) ^b	22 (0.7) ^d	88.9 (0.6) ^b	39 (5) ^b
M	83.6 (0.6) ^e	3.2 (0.3) ^a	99 (3) ^d	73 (3) ^d
MO	82.2 (0.4) ^d	8.8 (0.5) ^b	90.6 (0.5) ^b	52 (3) ^c
MT	84.07 (0.42) ^e	2.8(0.3) ^a	95.9 (1.6) ^c	26 (4) ^a

Superíndices distintos (^{a, b, c, d, e}) indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Las películas formadas con M tienen mayor luminosidad, croma y tono que aquéllas elaboradas a partir de CH. Al añadir aceite esencial, generalmente se produjo una disminución de la luminosidad, excepto en el caso de MT. Las películas de CH presentaron valores de croma significativamente superiores ($p < 0.05$) que las de M. La incorporación de aceite esencial provocó un aumento significativo de la pureza de color en las películas CHT y MO. Todas las formulaciones presentaron valores de tono próximas a 90, lo que es coherente con el tono amarillento de las películas.

El brillo de las películas está relacionado con la homogeneidad de la superficie obtenida tras el secado (Ward et al., 1997). Los resultados muestran que las películas M son las más brillantes y que la incorporación de aceites a la matriz redujo significativamente dicha propiedad. Esta tendencia coincide con lo observado previamente en películas de HPMC Sánchez-González et al. (2011a). Por el contrario, el brillo de las películas CH no se ve significativamente afectado por la adición de aceites esenciales.

Permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua

En la Tabla 3, se muestra la permeabilidad al oxígeno (PO_2) y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas a 10°C y 85% HR. Las películas M presentaron una alta PO_2 , significativamente mayor que las de CH. La incorporación de aceites esenciales tuvo un efecto diferente en función de la matriz polimérica. En el caso de CH, los aceites esenciales no dieron lugar a un cambio en las propiedades barrera al oxígeno de las

películas. Sin embargo, las películas de M experimentaron un aumento en su PO_2 significativo cuando se incorporó aceite esencial de tomillo.

La permeabilidad al vapor de agua de las películas CH fue mayor que las películas de M, aunque las diferencias no fueron significativas. Resultados similares fueron obtenidos por Vargas et al. (2011). En general, los aceites esenciales no mejoraron las propiedades barrera al vapor de agua de las películas.

TABLA 3: Películas equilibradas a HR 85% y 10°C. PO_2 ($cm^3 mm m^{-2} atm^{-1} día^{-1}$) 85%HR-10°C y PVA ($g Pa^{-1} s^{-1} m^{-1} \times 10^7$) 85%/100% HR-10°C. Medias (desviación estándar entre paréntesis).

Película	PO_2	PVA
CH	1.05 (0.08) ^a	12 (2) ^{ab}
CHO	1.12 (0.14) ^a	15 (5) ^b
CHT	1.09 (0.12) ^a	12 (3) ^{ab}
M	8.08 (0.23) ^b	8.9 (0.8) ^a
MO	9.6 (1.5) ^c	7.1 (0.3) ^a
MT	11.66 (1.15) ^{bc}	8.3 (1.3) ^a

Superíndices distintos (^{a, b, c}) indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Actividad Antioxidante de las películas

La actividad antioxidante (AA) de películas comestibles se ve influenciada en gran medida por la disponibilidad de agua, el cual a su vez se ve afectada tanto por la humedad del producto como por la humedad relativa del ambiente. Los resultados de la AA de las películas se expresaron en equivalentes de Trolox (concentración de película que presenta la misma AA que una disolución 1 mM de Trolox). Las películas de CH presentaron una AA mayor que las de M. La incorporación de aceites esenciales a las películas de CH (TEAC = 0.017 mg/mL) supuso un ligero incremento de su AA (TEAC = 0.010 mg/mL). Estas películas fueron las que mostraron una mayor AA. Por otro lado, las películas de M mostraron una actividad menor (TEAC = 0.146 mg/mL), y la incorporación de aceite esencial de tomillo no dio lugar a cambios. Por el contrario, el aceite esencial de orégano dio lugar a un aumento de las propiedades AA (TEAC = 0.041 mg/mL). El aceite esencial de orégano ha sido descrito como un agente antioxidante fuerte, con una AA significativamente superior al de tomillo (Teixeira et al., 2013). En una matriz que ejerce una actividad antioxidante moderada como la M, fue posible detectar el efecto de la presencia del aceite esencial de orégano. Por el contrario, cuando dicho aceite se incorpora en una matriz con una mayor AA, como es el caso de CH, el efecto antioxidante del aceite esencial de orégano es menos relevante.

Aplicación de las películas sobre muestras de salmón

Color

Los cambios de color de las muestras de salmón picado recubiertas y no recubiertas, a distintos tiempos de almacenamiento en congelación se muestran en la Tabla 4.

Los valores de tono de las muestras control y recubiertas se mantuvieron durante el almacenamiento en torno al valor inicial (h_{ab}^{*} -inicial = 47.8). Todas las muestras presentaron un descenso en la luminosidad y croma con respecto a los valores iniciales (L^{*} -inicial = 61.6, C^{*} -inicial = 31.9). Estos cambios pueden estar relacionados con la deshidratación superficial y decoloración de la muestra (Vargas et al, 2009b). Al final del almacenamiento, las muestras recubiertas mostraron en general un color más saturado y más luminoso que las no recubiertas (control), no existiendo diferencias significativas en función de la película aplicada.

TABLA 4. Luminosidad, croma y tono del salmón picado, descongelado previamente. Medias (desviación estándar entre paréntesis).

Película		Tiempo (semanas)		
		6	11	13
L^{*}	C	56.54 (1.04) ^{b,y}	53.62 (1.2) ^{c,x}	61.6 (0.2) ^{d,z}
	CH	51 (2) ^{c,x}	57.6 (1.2) ^{d,y}	54.9 (1.7) ^{b,y}
	CHO	45.7 (0.5) ^{b,x}	53.99 (0.08) ^{c,y}	53 (3) ^{b,y}
	CHT	43.44 (1.13) ^{a,x}	48.9 (0.3) ^{a,y}	58.2 (0.6) ^{c,z}
	M	47 (3) ^{b,x}	52 (3) ^{b,y}	63.5 (1.2) ^{d,z}
	MO	49.4 (0.4) ^{c,x}	49.8 (0.4) ^{a,x}	55.3 (0.6) ^{b,y}
	MT	47.23 (0.14) ^{b,x}	50.12 (0.12) ^{ab,y}	50.8 (1.2) ^{a,y}
C_{ab}^{*}	C	26.9 (0.2) ^{a,y}	27.6 (0.7) ^y	23.8 (1.5) ^{b,x}
	CH	32.7 (1.6) ^{cd,y}	30.4 (1.9) ^{cd,y}	27.2 (0.4) ^{de,x}
	CHO	28.6 (0.4) ^{d,y}	28.5 (1.4) ^{bc,y}	21.7 (1.2) ^{a,x}
	CHT	34.0 (1.5) ^{de,z}	25.4 (0.5) ^{a,a}	27.5 (0.6) ^{d,y}
	M	28.6 (0.4) ^{b,y}	25.1 (1.7) ^{a,x}	26.8 (0.5) ^{cd,xy}
	MO	35.408 (1.105) ^{e,z}	24.4 (0.9) ^{a,x}	29.9 (0.8) ^{e,y}
	MT	33.13 (0.24) ^{cd,z}	27.85 (0.10) ^{b,y}	25.5 (1.6) ^{b,z}
h_{ab}^{*}	C	47.7 (0.2) ^{a,x}	48.9 (0.6) ^{c,y}	48.2 (0.3) ^{c,xy}
	CH	49.7 (0.2) ^{b,z}	48.2 (0.2) ^{c,y}	46.3 (0.7) ^{ab,x}
	CHO	46.9 (0.5) ^{a,y}	47.8 (1.3) ^{bc,y}	45.4 (0.5) ^{a,x}
	CHT	48.904 (0.013) ^{b,y}	45.6 (0.3) ^{a,x}	50.7 (0.2) ^{d,z}
	M	49.4 (1.2) ^{b,y}	46.0 (1.2) ^{a,x}	46.0 (1.2) ^{a,x}
	MO	49.5 (0.6) ^{b,y}	46.7 (1.2) ^{ab,x}	49.5 (1.3) ^{cd,y}
	MT	49.6 (0.2) ^{b,y}	46.25 (0.07) ^{a,x}	45.9 (1.5) ^{a,x}

Superíndices distintos (^{a, b, c, d, e} en función de la formulación, ^{x, y, z} en función del tiempo de almacenamiento) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Índice de peróxidos

El valor inicial de índice de peróxidos (IP) de las muestras de salmón fue de 1.45 meq O₂/kg. La Figura 4 muestra la evolución del IP de muestras de salmón, no recubiertas (C) y recubiertas con las películas, durante el almacenamiento en congelación. A las 6 semanas se observó un aumento en el nivel de oxidación de las muestras control, mientras que las recubiertas en general mostraron valores de IP del orden del inicial. Así, a tiempos cortos de almacenamiento en congelación, parece que las películas protegen frente a la oxidación lipídica.

Para tiempos más largos, las muestras sin recubrir continuaron mostrando valores relativamente elevados de IP. Tras 11 semanas de almacenamiento se observó que todas las muestras recubiertas tenían valores de IP significativamente menores que las no recubiertas. Se observó también que, a las 13 semanas de almacenamiento, las películas de CH seguían ejerciendo una importante acción protectora, probablemente debido a su baja permeabilidad al oxígeno y a su marcado carácter antioxidante, tal y como se ha comentado anteriormente. Por el contrario, las películas elaboradas con M, de mayor permeabilidad al oxígeno, no ejercieron tal efecto a tiempos prolongados, con la excepción de MO, que como ya se ha comentado, exhibe una AA significativamente mayor que M y MT.

En algunos casos, se observó una tendencia hacia valores menores de IP a 13 semanas de almacenamiento en comparación con el tiempo anterior. Este descenso es consecuencia de la menor disponibilidad de lípidos oxidables y la inestabilidad de los peróxidos (Pereira de Abreu et al., 2010).

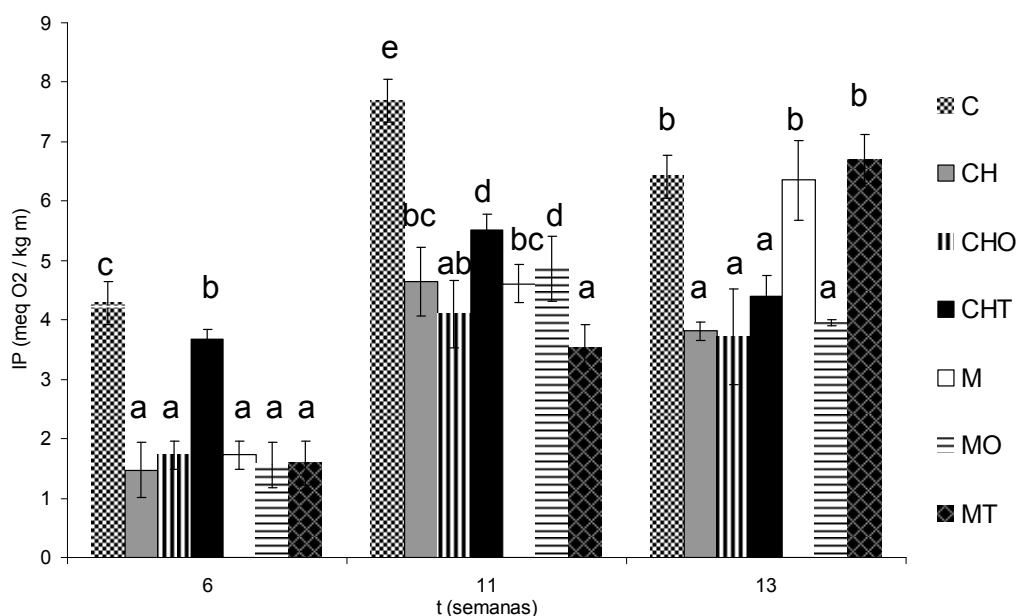


FIGURA 4. Evolución del Índice de peróxidos de las muestras de salmón picado durante el almacenamiento en congelación. La línea discontinua representa el valor de IP inicial. Valores medios y desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas por efecto de las películas a cada tiempo de almacenamiento (^{a, b, c}) ($p < 0.05$).

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Las muestras presentaron un valor medio inicial de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de 0.05 mg de malonaldehído/kg. En la Figura 5 se muestra la evolución del valor de TBARS durante el almacenamiento en congelación. Las muestras designadas como C (control) son muestras no recubiertas. Los valores de TBARS tienden a aumentar con el tiempo en las muestras no recubiertas, lo que coincide con lo observado por Pereira de Abreu (2010) en cortes de salmón. Los valores obtenidos son similares a otros reportados para otros tipos de pescado almacenado en congelación (Pereira de Abreu, 2011).

Las muestras recubiertas por las películas CH, presentaron valores de TBARS menores que las muestras no recubiertas ($p < 0.05$), lo que revela el poder protector de las películas de CH frente a la oxidación secundaria. Resultados similares fueron obtenidos por Sathivel (2005) en filetes de salmón recubiertos con películas de CH. Al final del almacenamiento, las películas de CH que incorporan aceites esenciales dieron lugar a un menor valor de TBARS, poniéndose de manifiesto el efecto antioxidante de los aceites esenciales.

Las muestras recubiertas con las películas M, mostraron valores de TBARS mayores o similares a los controles y a las recubiertas con CH. En la matriz de M, los aceites esenciales no exhibieron un efecto inhibitorio sobre el nivel de oxidación de las muestras.

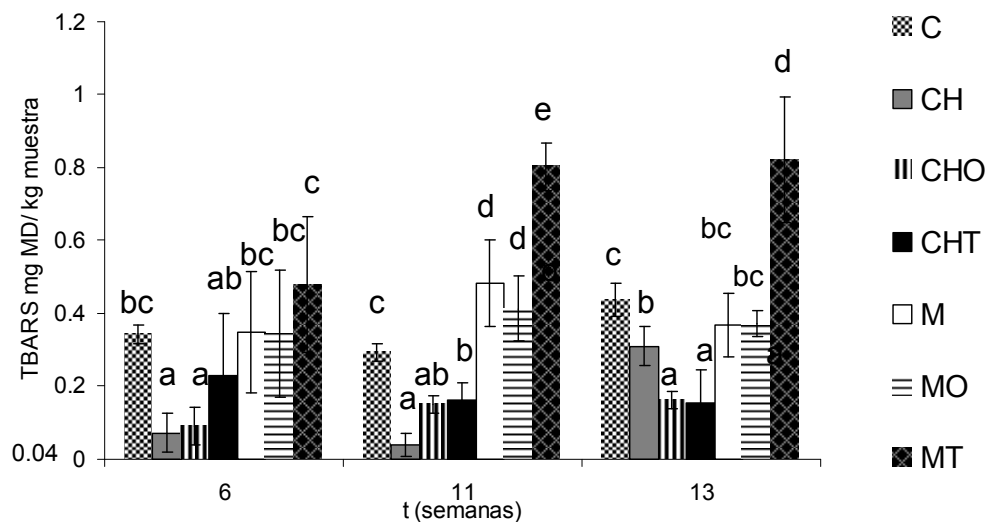


FIGURA 5. Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de las muestras de salmón picado durante el almacenamiento en congelación. Valores medios y desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c, d, e) indican diferencias significativas por efecto de las películas a cada tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$).

Análisis microbiológicos

Los valores medios iniciales para las muestras de salmón fueron de 3 ufc/g y 2.8 ufc/g para los recuentos de aerobios mesófilos y coliformes, respectivamente. La Tabla 5, muestra los valores de dichos recuentos en las muestras recubiertas con las películas de CH y M así como en las no recubiertas (control) a diferentes condiciones de almacenamiento.

En condiciones de almacenamiento en refrigeración, se obtuvo un aumento significativo de los recuentos tanto de aerobios mesófilos como coliformes. Las diferentes películas aplicadas no presentaron ningún efecto. La adición de aceite esencial de orégano produjo una ligera reducción de los recuentos microbiológicos, en comparación con las muestras recubiertas con películas de polímeros puros. En cuanto a *Listeria*, se observa que en las muestras recubiertas con M, los recuentos son ligeramente superiores que los correspondientes al control.

Los resultados del estudio realizado con muestras inoculadas con la cepa de *Listeria innocua*, muestran que las películas M no tuvieron efecto antibacteriano. Por el contrario, la aplicación de películas de quitosano provocó un descenso significativo en el recuento de *Listeria* ($p < 0.05$) que se vio limitado por la incorporación de aceites esenciales. Esto es debido a un efecto de dilución del CH, tal y como ha sido observado por otros autores (Sánchez-González et al., 2011b).

TABLA 5. Recuentos microbiológicos de muestras de salmón no inoculadas e inoculadas con *Listeria innocua* después de 1 semana en refrigeración y 11 semanas en congelación.

Muestras	Recuentos (log ufc/g)					
	1 semana / 10°C				11 semanas / -20°C	
	Aerobios mesófilos	Coliformes	<i>Listeria</i>	<i>L. innocua</i>	Aerobios mesófilos	Coliformes
Control	3.6 (0.9) ^{ab}	3.98 (0.12) ^d	1.5 (0.3) ^{ab}	5.4 (0.5) ^c	2.54 (0.09) ^b	2.23 (0.04) ^c
CH	3.9 (0.5) ^b	3.36 (0.09) ^a	1.1 (0.4) ^a	nd ^a	1.5 (0.7) ^a	1.33 (0.02) ^{ab}
CHO	3.1 (0.5) ^a	3.43 (0.14) ^{ab}	1.5 (0.1) ^{ab}	1.9 (0.2) ^b	2.31 (0.05) ^b	1.17 (0.14) ^a
CHT	3.57 (0.05) ^{ab}	3.61 (0.15) ^{bc}	1.23 (0.07) ^a	2.0 (0.2) ^b	2.52 (0.04) ^b	1.4 (0.3) ^{abc}
M	4.96 (0.09) ^d	4.77 (0.09) ^e	2.4 (0.3) ^c	4.23 (0.14) ^c	1.54 (0.08) ^a	1.5 (0.2) ^{ab}
MO	4.2 (0.5) ^{bc}	3.69 (0.12) ^c	2.2 (0.5) ^{ab}	4.9 (0.3) ^c	2.32 (0.08) ^b	1.7 (0.4) ^{bc}
MT	4.93 (0.19) ^{cd}	4.86 (0.16) ^e	2.1 (0.6) ^{bc}	4.92 (0.16) ^c	1.6 (0.3) ^a	2.32 (0.15) ^{bc}

Superíndices distintos (^{a, b, c, d, e}) indican diferencias significativas en una misma columna ($p < 0.05$). nd: no detectado crecimiento

El almacenamiento en congelación tuvo un efecto bacterioestático, puesto que los recuentos de microorganismos en las muestras control se

mantuvieron similares a los valores iniciales. En el caso de las muestras recubiertas, se observó un ligero descenso en el recuento de coliformes, ligeramente más marcado cuando se aplicaron películas de quitosano. Resultados similares se obtuvieron con muestras de carne picada de cerdo recubiertas con películas de CH (Bonilla et al., 2013b). Las muestras recubiertas con películas de CH y aceites esenciales mostraron unos recuentos de aerobios mesófilos más elevados, lo que podría ser debido al efecto de dilución del CH comentado anteriormente.

CONCLUSIÓN

La incorporación de aceites esenciales de tomillo (T) o de orégano (O) en películas de metilcelulosa (M) o quitosano (CH) dio lugar a una estructura emulsionada en la que se pudieron distinguir gotas de aceite embebidas en la matriz polimérica. El impacto de la incorporación en las propiedades fisicoquímicas de las películas dependió de la matriz.

En las películas CH, la adición de aceites esenciales supuso un aumento de la rigidez, dureza y elasticidad sin cambios en el brillo. Para ambas matrices, la adición de aceites supuso un aumento de la opacidad de las películas y no mejoró las propiedades de barrera al vapor de agua.

La permeabilidad al oxígeno de las películas de CH fue significativamente menor que la de las M. La adición de aceites en la matriz M supuso un aumento de la permeabilidad al oxígeno. Además, las películas CH mostraron un mayor carácter antioxidante que las M. Esto se manifestó, en una ralentización del deterioro oxidativo de muestras de salmón picado. Las películas de CH dieron lugar a recuentos menores de microorganismos en las muestras almacenadas en congelación, y la adición de aceites esenciales no supuso una mejora en la calidad microbiológica.

REFERENCIAS

- Ahmadi E., Sareminezhad S., Hossein M. 2011. The effect of ultrasound treatment on some properties of methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 25(5)1399–1401.
- ASTM, 1999. Standard test method for specular gloss. In: Designation (D523). Annual Book of ASTM Standard, vol. 06.01. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Atarés L., De Jesús C., Talens P., Chiralt A. 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384–391.
- Aubourg S.P., Quiral V., Larraín A., Rodríguez A., Gómez j., Maier L., Vinagre J. 2007. Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during chilled storage. *Food Chemistry*, 104, 369–375.
- Bonilla J., Atares L., Vargas M., Chiralt A. 2012. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110, 208–213.

- Bonilla J., Talón E., Atarés L., Vargas M., Chiralt A. 2013a. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch–chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 118, 271-278.
- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. 2013b. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering*, 114 (3), 303–312.
- Erikson U., Misimi E., Gallart L. 2011 Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality, *Food Chemistry*, 127, 1427–1437
- Garcia M.A., Pinotti A., Martino M.N., Zaritzky N.E. 2004. Characterization of composite hydrocolloids films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 339-345.
- Gennadios A., Weller C.L., Goodong C.H. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- Hutchings, J.B., 1999. Food Color and Appearance, 2nd ed. Ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Mahdi, S. Rezaei M., Hadi Sb, Mohamad S. 2010. Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry* 120, 193–198.
- Ojagh S.M., Rezaei M., Razavi S.H., Hashem Hosseini S.M. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161–166.
- Pereira de Abreu D., Paseiro P., Maroto J., Cruz J.M. 2010. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Food Research International*, 43,277–1282.
- Pereira de Abreu D. A, Paseiro Losada P., Maroto J., Cruz J.M. 2011. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 50–55.
- Peressini D., Bravin B., Lapasin R., Rizzotti C., Sensidoni A. 2003 Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59(1), 25–32.
- Pinotti A., García M.A., Martino M.N., Zaritzky N.E. 2007. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66–72.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Sánchez-González L., Pastor C., Vargas M., Chiralt A., González-Martínez C., Cháfer M. 2011a. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57–63.
- Sánchez-González L., Cháfer M., Hernández M., Chiralt A., & González-Martínez C. 2011b. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, 22, 1302-1310.

- Sathivel S. 2005. Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorboscha*) Fillets During Frozen Storage. *Journal of Food Science* E455, 70(8).
- Sathivel S., Quan B., Jiaqi A., Witoon C. 2007. The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorboscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83, 366–373.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N.R., Nogueira J.M.F, Saraiva J.A, Nunes M.L. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587–595.
- Tironi V., Tomás M., Añón M. 2010. Quality loss during the frozen storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L. extract. *Food Science and Technology*, 43, 263–272.
- Vargas M., Albors A., Chiralt A., González-Martínez C. 2009a. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536–54.
- Vargas M., Perdonés Á, Chiralt A., Cháfer M., González-Martínez C. 2011. Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Science and Technology*, 44, 2290-2295.
- Vargas M., Chiralt A., Albors A., González-Martínez C. 2009b. Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 263–271.
- Ward G., Nussinovitch A. 1997. Characterizing the gloss properties of hydrocolloid films. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 357–365.