

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EMULSIONES COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES EN ALIMENTOS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: PAULA FERNÁNDEZ-SERRANO BELLOCH

TUTOR: PAU TALENS OLIAG

TUTORA EXPERIMENTAL: SUSANA RIBES LLOP

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, Septiembre 2015



EMULSIONES COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES EN ALIMENTOS

RESUMEN

Se formularon diferentes emulsiones aceite/agua, preparadas con aceite esencial de canela en rama y goma xantana, con el objetivo de obtener un sistema de liberación de agentes antimicrobianos naturales para su posterior aplicación en alimentos. Se evaluó la capacidad antifúngica del aceite esencial puro y en emulsión frente a 5 cepas de hongos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii*), y se estudiaron diferentes técnicas de elaboración de la emulsión (Ultraturrax y homogeneización con altas presiones frente a agitación magnética y homogeneización con altas presiones). Tras la evaluación microbiológica de las emulsiones, aquellas que conseguían la inhibición de las distintas cepas, fueron incorporadas en confituras de fresa. Se realizó un estudio de vida útil acelerado y una evaluación sensorial de las mismas. Los resultados obtenidos indican una mayor capacidad antifúngica para el aceite puro que cuando se encuentra en emulsión, debido a las pérdidas producidas del mismo durante el proceso de emulsificación. Se obtuvieron mejores resultados combinando la agitación magnética con homogeneización con altas presiones y trabajando a 400 bares de presión. Los componentes activos del aceite esencial son más efectivos en los medios de cultivo que en la confitura de fresa, posiblemente debido a la mayor complejidad estructural de la misma. Por otra parte, la incorporación del aceite a las concentraciones establecidas en los ensayos *in vitro* influye de forma significativa ($p < 0,05$) al aroma, sabor y aceptación general del producto. En base a ello, otras alternativas como la combinación de los aceites esenciales con otros compuestos, como sales de zinc o compuestos fenólicos, sería necesaria para inhibir el crecimiento microbiano en sistemas reales, permitiendo una reducción de la concentración de aceite utilizado, con la consiguiente mejora sensorial del producto final.

PALABRAS CLAVE: antimicrobiano natural, emulsión, homogeneizador de altas presiones, aceite esencial, confitura de fresa

EMULSIONS AS DELIVERY SYSTEMS OF ANTIMICROBIAL NATURAL AGENTS IN FOODS

ABSTRACT

Different oil/water emulsions were formulated using cinnamon bark essential oil and xanthan gum in order to obtain a delivery system of antimicrobial natural agents for their application in foods. Antimicrobial capacity was evaluated against 5 fungitopes (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii*). Different emulsion techniques were studied (Ultraturrax and high pressure versus magnetic agitation and high pressure). After the microbiological evaluation of the emulsions, those that managed the inhibition of the fungi were incorporated into strawberry jam and self-life studies and sensory analysis were done. The results indicated that the antifungal activity was higher for the pure oil than for the emulsion, probably due to oil losses occurred during the emulsification processes. Best results were obtained combining magnetic agitation and high pressure, working at 400 bars of pressure. The active components of the essential oils were more effective in the culture media than in the strawberry jams due to the complex structure of them. The incorporation of cinnamon bark essential oil to the jams at those concentrations established in the *in vitro* tests, influenced significantly ($p < 0,05$) in the aroma, flavour and general acceptance of the product. Other alternatives such as the combination of essential oils with other compounds like zinc salts or phenolic compounds, would be necessary to disable the microbial growth in real systems, allowing a reduction of the used essential oil concentration, with the consequent sensory improvement in the final product.

KEY WORDS: natural antimicrobial, emulsion, high pressure homogenizer, essential oil, strawberry jam

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido de una manera u otra en la realización de este trabajo. A mis padres, mi hermana, mis amigos, a Laura y a Iván, por confiar siempre en mí. También a Susana Ribes, por el tiempo dedicado en este trabajo. Y en especial, a D. Pau Talens Oliag por su ayuda y apoyo en todo momento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Microorganismos alterantes de los alimentos.....	1
1.2. Aceites esenciales	3
1.2.1. Capacidad antimicrobiana de los AEs.....	4
1.2.2. Aceite esencial de canela en rama	4
1.3. Emulsiones aceite-agua (O/W).....	5
1.3.1. Preparación de emulsiones (AE/W).....	6
1.4. Confituras como ejemplo de producto susceptible de deterioro microbiano	7
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	9
2.3. Plan de trabajo.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Preparación de las emulsiones O/W	11
3.2. Caracterización de las emulsiones O/W	12
3.3. Evaluación de la capacidad antifúngica	12
3.3.1. Actividad antifúngica del AECR.....	12
3.3.2. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W	13
3.4. Preparación de la confitura	14
3.5. Estudio de vida útil acelerada de confitura de fresa	14
3.6. Análisis sensorial.....	15
3.7. Análisis estadístico.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Preparación de las emulsiones O/W	16
4.1.1. Caracterización del AECR.....	16
4.1.2. Optimización del método de preparación de emulsiones O/W estables	17
4.2. Caracterización de la emulsiones O/W	19
4.3. Evaluación de la capacidad antifúngica del AECR	21
4.3.1. Actividad antifúngica del AECR.....	21
4.3.2. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W	26

4.4.	Estudio de vida útil acelerada de confitura de fresa	32
4.5.	Análisis sensorial	35
5.	CONCLUSIONES.....	37
6.	REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cromatograma del AECR obtenido mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.....	16
FIGURA 2. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones O/W, preparadas con goma xantana (GX) y AECR a 400 bar y 800 bares. Valores medios (n=3) y desviación estándar.....	20
FIGURA 3. Potencial- ζ de las emulsiones de AECR-GX (0,06, 0,08, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g AECR-5 mg/g GX) obtenidas tras agitación continua (5 min) con varilla magnética y HAP a 400 y 800 bares. Valores medios (n=3) y desviación estándar.....	21
FIGURA 4. Evaluación del crecimiento micelial (cm) de <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus flavus</i> , según concentración de AECR (mg/g), tras 1, 3, 5 y 7 días de incubación a 25±1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.	22
FIGURA 5. Actividad antifúngica del AECR frente a <i>Penicillium expansum</i> , en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.	23
FIGURA 6. Actividad antifúngica del AECR frente a <i>Aspergillus niger</i> , en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.	24
FIGURA 7. Actividad antifúngica del AECR frente a <i>Aspergillus flavus</i> , en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.	24
FIGURA 8. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) del AECR frente a <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 48 h de incubación a 25±1 °C.	25
FIGURA 9. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) del AECR frente a <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 48 h de incubación a 25±1 °C.	26
FIGURA 10. Evaluación del crecimiento micelial (cm) de <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus flavus</i> , en las emulsiones O/W preparadas a 400 y 800 bar, tras 1, 3, 5 y 7 días de incubación a 25±1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.....	27
FIGURA 11. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a <i>Penicillium expansum</i> , en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.....	28
FIGURA 12. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a <i>Aspergillus niger</i> , en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.....	29
FIGURA 13. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a <i>Aspergillus flavus</i> , en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.....	30

FIGURA 14. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 48 horas de incubación a 25±1 °C.	31
FIGURA 15. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 48 horas de incubación a 25±1 °C.	32
FIGURA 16. Evolución de los recuentos (UFC/g) de <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus flavus</i> en confitura de fresa control y con la emulsión O/W tras 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a 25±1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.	34
FIGURA 17. Evolución de los recuentos (UFC/g) de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> y <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , inoculadas en confituras de fresa control y con la emulsión O/W tras 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a 25±1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.	34
FIGURA 18. Perfil sensorial de las confituras de fresa control y con emulsión O/W. Valores medios (n=30).	35
FIGURA 19. Diagrama circular de elección de compra del producto, con respuestas afirmativas y negativas.	36

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Componentes del AECR obtenidos mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas, tiempo de retención y área. Valores medios (n=2).....	17
TABLA 2. % de pérdida de los componentes activos del AECR tras el proceso de homogeneización de las emulsiones mediante el uso de distintas técnicas (Ultraturrax y su combinación con altas presiones). Valores medios (n=2) y desviación estándar.	18
TABLA 3. % de pérdida de los componentes activos del AECR tras el proceso de homogeneización de las emulsiones mediante el uso de distintas técnicas (agitación magnética y altas presiones). Valores medios (n=2) y desviación estándar.	19
TABLA 4. Valores medios y desviación estándar (n=3) de pH, densidad, $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ de las emulsiones O/W sometidas a tratamiento de altas presiones.	20

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, hay una creciente preocupación por parte del consumidor por los aditivos químicos y, como consecuencia de ello, la sociedad ha empezado a demandar productos naturales. Por ello, el presente trabajo se realiza con el fin de obtener nuevos alimentos libres de conservantes químicos, presentados en botellas PET. Este tipo de envase no puede ser rellenado con el producto a temperaturas superiores a 60°C, evitando de esta forma su deformación, y por lo tanto, tampoco puede ser autoclavado. Por ello, el uso de aditivos naturales permitiría la obtención de un producto saludable y con bajo riesgo de contaminación microbiológica.

El uso de conservantes químicos es una de las técnicas más antiguas utilizada para el control de infecciones y la contaminación y deterioro microbiano de los alimentos. Entre los aditivos químicos más utilizados por parte de la industria agroalimentaria se encuentran el ácido sórbico, el ácido benzoico y sus sales (Kocevski *et al.*, 2013; Stratford *et al.*, 2013). Sin embargo, en los últimos años se ha observado una creciente demanda de productos naturales libres de compuestos químicos por parte de los consumidores. Antimicrobianos naturales como los aceites esenciales (AEs), obtenidos de diferentes plantas y frutos, han sido utilizados como agentes antimicrobianos frente a bacterias, mohos y levaduras (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Kocevski *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2015).

Los AEs pueden ser empleados en cualquier alimento, ya que están reconocidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Tyagi *et al.*, 2014; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Además, en Europa se han catalogado como saborizantes a través de la European Decision 2002/113/EC del 23 de Enero de 2002. Por esta razón, los AEs se proponen como alternativa a los agentes químicos en la industria alimentaria (Manso *et al.*, 2013).

1.1. MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LOS ALIMENTOS

Los hongos (mohos y levaduras) se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, como flora normal de un alimento o como sus contaminantes. Se manifiestan en alimentos con bajo nivel de pH y humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, etc. Por lo tanto, pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos

fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y, alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, confituras, etc.

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares y se reconocen fácilmente en la superficie de los alimentos por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado (Camacho *et al.*, 2009). Son difíciles de inhibir debido a su estructura compleja y se reproducen mediante esporas, a partir de las cuales crecen en forma de filamentos llamados hifas (Manso *et al.*, 2013).

Los mohos del género *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran frecuentemente en alimentos, y en particular *P. expansum*, *A. niger* y *A. flavus*, los cuales pueden causar enfermedades en plantas. Aunque sólo algunos de ellos invaden tejidos vegetales, se encuentran frecuentemente como contaminantes en productos de la post-cosecha (Varga *et al.*, 2008).

El género *Aspergillus* es muy abundante en la naturaleza, pudiéndose encontrar alterando alimentos o en la preparación de éstos. Este es el caso de *A. niger*, el cual se emplea en la producción industrial de ácido cítrico y glucónico, mientras que *A. flavus* se utiliza en la fabricación de ciertos alimentos orientales y obtención de enzimas.

Los mohos del género *Penicillium* también tienen fuerte incidencia en los alimentos. *P. expansum* produce la podredumbre blanda de las frutas (Camacho *et al.*, 2009).

Ambos géneros son capaces de contaminar frutas y productos vegetales en diferentes etapas como la cosecha, procesado y manipulación. Por ello, se pueden encontrar en confituras, como consecuencia de las operaciones de procesado (Varga *et al.*, 2008).

En cuanto a las levaduras, el término hace referencia a hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares, de forma ovoide o esferoide. Su intervalo de temperaturas de crecimiento es parecido al de los mohos (25 y 30°C) (Camacho *et al.*, 2009). Las levaduras también están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son responsables de la contaminación microbiológica de numerosos alimentos refrigerados y mantenidos a temperatura ambiente, como es el caso de vinos, leche, queso, productos de panadería y confituras o mermeladas. A pesar de ello, pocos estudios se han llevado a cabo acerca del efecto antimicrobiano de los AEs sobre éstas. Las alteraciones producidas por levaduras se caracterizan

por la producción abundante de gas, que puede deformar o hacer explotar los envases, la formación de sedimentos o películas, y sabores y olores extraños.

Algunas de las levaduras de gran importancia en la industria de alimentos son del género *Zygosaccharomyces*, entre otras (Tyagi *et al.*, 2014). Levaduras de este género se caracterizan por su capacidad de crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar. Se encuentran alterando la miel, jarabes, melazas, salsa de soja y algunos vinos (Camacho *et al.*, 2009).

Z. bailii es una levadura que se encuentra de forma natural en frutas desecadas, es osmotolerante y crece preferentemente en presencia de fructosa. Otra levadura del género *Zygosaccharomyces* es *Z. rouxii*, a la cual se le asocia con la contaminación microbiana de productos con elevados contenidos en azúcares como la miel, jarabes y concentrados de frutas. Esto es debido a su extrema osmotolerancia y habilidad para adaptarse a elevadas concentraciones de glucosa. Esta levadura además, está relacionada con el olor característico de la salsa de soja (Wang *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha observado que determinadas levaduras están desarrollando resistencia frente a conservantes que provienen de ácidos débiles orgánicos, lo que promueve la búsqueda de nuevos antimicrobianos, como es el caso de los AEs (Stratford *et al.*, 2013; Tyagi *et al.*, 2014).

1.2. ACEITES ESENCIALES

El término “aceite esencial” (AE) deriva del siglo XVI, cuando Paracelso le dio al componente efectivo de una droga el nombre de *Quinta essentia*. Aproximadamente unos 3000 aceites esenciales son conocidos y unos 300 comercializados, como saborizantes o fragancias (Burt, 2004). Éstos se encuentran en las hojas de las plantas, semillas, corteza, tallo, raíces, ramas, brotes, flores y frutas. Los AEs están formados por una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios y con aromas individuales (Rivera *et al.*, 2015; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Tienen un aroma y gusto distintivo y característico, por lo que se han empleado en las industrias farmacéuticas, de aromatizantes y perfumes, saborizantes y con propósitos medicinales. Se obtienen mediante técnicas de extracción, como la destilación, presión en frío o maceración. Estos compuestos consisten químicamente en terpenos (mono-, sesqui- y diterpenos), alcoholes, ácidos, ésteres, epóxidos, aldehídos, cetonas, aminas y sulfidas (Rivera *et al.*, 2015).

1.2.1. Capacidad antimicrobiana de los AEs

La actividad antimicrobiana de los AEs podría deberse a la presencia de sustancias bioactivas, como ya se ha comentado con anterioridad. Estas sustancias difieren unas de otras dependiendo del tipo y parte de la planta de la que provengan, del hábitat, temporada de cosecha y métodos de extracción utilizados (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2015). Aunque está comprobado que los AEs tienen un efecto antimicrobiano marcado frente a bacterias, mohos y levaduras (Omidbeygi *et al.*, 2007; Perdonés *et al.*, 2012), y se ha demostrado en numerosos estudios la capacidad de disminución en el crecimiento de agentes patógenos, no se ha podido definir con total seguridad el mecanismo de acción sobre las células de los microorganismos (Manso *et al.*, 2013). Numerosas teorías se han propuesto y se cree que la acción antimicrobiana de estos aceites se debe a su habilidad a la hora de penetrar en el interior de la célula, a través de la membrana, y ejercer una actividad inhibitoria en sus propiedades funcionales y lipofílicas (Rivera *et al.*, 2015). Muchos autores atribuyen esta función a los compuestos fenólicos de los aceites, que penetran a través de las membranas de las células microbianas, causando fugas del contenido del interior de la célula (iones y contenido citoplasmático) (Burt, 2004; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Estos compuestos tienen la habilidad de alterar la permeabilidad de la célula, de dañar las membranas citoplasmáticas e interferir en el sistema de generación de energía celular (ATP), y finalmente puede llevar a la muerte celular (Rivera *et al.*, 2015).

1.2.2. Aceite esencial de canela en rama

La canela pertenece a la familia de las *Lauráceas* y es una hierba medicinal de importante tradición, ampliamente distribuida en China, Vietnam, Sri Lanka, Madagascar, Seychelles e India (Li *et al.*, 2013). Concretamente en China, la canela en rama se utiliza como principal sustancia medicinal. De la canela, mediante determinados procesos de extracción, se obtiene el AE de canela, el cual ha sido utilizado durante siglos para proteger los alimentos de infecciones microbiológicas. En los últimos 10 años, se ha incorporado en los envases a modo de agente antimicrobiano (Manso *et al.*, 2013).

El AE de canela puede provenir de la rama o de la hoja, variando en cada caso, el contenido en cinamaldehído, componente mayoritario del aceite esencial de canela en rama (AEER) (Li *et al.*, 2013). Otros componentes que se encuentran también en cantidades

destacables son el limoneno y copaeno. Son muchos los estudios que demuestran la eficacia del AECR en la inhibición microbiana de *A. niger* y *A. flavus* (Tiziana *et al.*, 1998). En un estudio llevado a cabo por Kocevski *et al.* (2013), aplicado a uvas de mesa, se observó que el AECR tenía un efecto de supresión en el crecimiento de colonias del género *Aspergillus*, a 0,025, 0,05 y 0,075 mg/g. También se evaluó el efecto de otros AEs, siendo el AECR el más efectivo, debido a su fuerte efecto inhibitorio.

1.3. EMULSIONES ACEITE-AGUA (O/W)

Generalmente, una emulsión consiste en al menos dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite y agua), en la que uno de los líquidos se dispersa en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (Dickinson, 1992; Friberg *et al.*, 2004 y McClements, 2005).

En general, las emulsiones se clasifican de acuerdo a la organización espacial relativa de las fases de aceite y agua. Un sistema que contiene pequeñas gotas de aceite dispersadas en agua se denomina una emulsión aceite-en-agua (O/W), mientras que un sistema que contiene pequeñas gotas de agua dispersas en aceite recibe el nombre de emulsión agua-en-aceite (W/O). Además, es posible preparar estructuras de emulsión más complejas, por ejemplo, emulsiones aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O), agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) o aceite-en-agua-en-agua (O/W/W) (Benichou *et al.*, 2004; Van der Graaf *et al.*, 2005).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente desfavorables que tienden a romper con el tiempo, mediante una variedad de mecanismos fisicoquímicos, incluyendo la separación gravitacional (formación de crema o sedimentación), la agregación de gotas (floculación y/o coalescencia) y el crecimiento de las mismas (maduración de Ostwald) (Friberg *et al.*, 2004; McClements, 2005). Es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables durante un periodo de tiempo razonable mediante la inclusión de sustancias conocidas como estabilizadores, por ejemplo; emulsionantes, agentes de ponderación, inhibidores de maduración, o modificadores de textura. Es importante distinguir claramente los diferentes mecanismos físico-químicos involucrados en la promoción de estabilidad de la emulsión, para estas diferentes categorías de estabilizadores. Los emulsionantes son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas recién formadas durante la homogenización, formando una capa protectora que evita la agregación de las pequeñas gotas. Los agentes de ponderación son componentes hidrófobos densos, que se agregan a los aceites de baja

densidad, evitando la separación gravitacional. Los inhibidores de maduración son componentes insolubles en agua, añadidos a los aceites polares, para evitar la maduración de Ostwald. Los modificadores de textura son sustancias utilizadas para aumentar la viscosidad de las soluciones acuosas o gel, retardando de este modo, o impidiendo, el movimiento de las gotas. La selección del estabilizador más adecuado, para una aplicación particular, es uno de los factores más importantes que determinan las propiedades de vida útil y fisicoquímicas de las emulsiones (Piorkowski y McClements, 2014).

1.3.1. Preparación de emulsiones (AE/W)

Los AEs presentan una elevada volatilidad, sensibilidad al oxígeno y a la luz, y escasa solubilidad en agua (Rivera *et al.*, 2015; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Obtener sistemas de liberación que permitan su incorporación al alimento, hace que se perfeccione y/o aumente su actividad antimicrobiana y estabilidad en el producto, a la vez que minimiza el impacto en los atributos de calidad del producto final (Donsì *et al.*, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Por ello, se puede decir que los agentes antimicrobianos y en concreto los aceites esenciales, formando una emulsión AE/W, mejoran su compatibilidad con la matriz de los alimentos, facilitan el almacenamiento y utilización, retrasan la degradación química, enmascaran olores extraños y/o aumentan su eficacia (McClements, 2012).

Se han empleado diferentes técnicas desde hace años con el fin de obtener emulsiones estables mediante la reducción del tamaño de partícula del AE. Entre ellas, cabe destacar el uso de homogeneizadores de altas presiones. En función de la presión utilizada en la preparación de sistemas coloidales, se consigue la obtención de emulsiones con distintos tamaños de partícula, dando lugar a la obtención de sistemas estables en el tiempo (Donsì *et al.*, 2011). La reducción en el tamaño de partícula no sólo mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

La obtención de estas emulsiones empleando biopolímeros, constituye una técnica sencilla y de fácil aplicación en la industria de los alimentos (Sánchez-González *et al.*, 2010; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Los biopolímeros utilizados en la formación de la emulsión (quitosano, alginato, almidón modificado, goma xantana, etc.), actúan de material de protección de los aceites (Donsì *et al.*, 2011).

La goma xantana (GX, (E-415)) es un heteropolisacárido natural que se obtiene a partir de la fermentación de un carbohidrato producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* (Sharma *et al.*, 2006). Su cadena principal consiste en unidades de β -D-glucosa, unidas en las posiciones 1 y 4 (García-Ochoa *et al.*, 2000). Es un aditivo soluble en agua caliente o fría y se utiliza como espesante, ya que proporciona una elevada pseudoplasticidad. Se hidrata rápidamente una vez dispersa y facilita la retención de agua, produciendo soluciones altamente viscosas a baja concentración. Es muy estable en un amplio rango de pH y temperatura y también se utiliza como gelificante. La viscosidad de la solución de GX no se ve afectada con la temperatura, desde el punto de congelación hasta el punto de ebullición del agua pura. Por ello, las propiedades reológicas de los productos finales permanecen estables independientemente de si se almacenan en el refrigerador, a temperatura ambiente o en área caliente. Además, la excelente solubilidad y estabilidad de la GX bajo condiciones ácidas o alcalinas, su estabilidad en presencia de sales y su resistencia a enzimas comunes, la ha convertido en unos de los principales polímeros industriales y alimenticios (Sharma *et al.*, 2006).

1.4.CONFITURAS COMO EJEMPLO DE PRODUCTO SUSCEPTIBLE DE DETERIORO MICROBIANO

Según el BOE núm 160 de 5 de Julio de 2003, el término «Confitura» hace referencia a la mezcla, con la consistencia gelificada apropiada, de azúcares, de pulpa o de puré de una o varias especies de frutas y de agua. No obstante, se podrá obtener confitura de cítricos a partir del fruto entero, cortado en tiras o en rodajas.

La cantidad de pulpa o de puré utilizada para la elaboración de 1000 gramos de producto acabado no será inferior a:

- ✓ 350 gramos en general
- ✓ 250 gramos en el caso de las grosellas rojas, las serbas, la uva espina, las grosellas negras, los agavanzos y los membrillos.
- ✓ 150 gramos en el caso del jengibre.
- ✓ 160 gramos en el caso de los anacardos.
- ✓ 60 gramos en el caso de la granadilla.

Asimismo, también quedan establecidos los grados Brix (°Brix) de las confituras, indicando que deberán tener un contenido de materia seca soluble, determinada por

refractómetro, igual o superior al 60 por 100, excepto para los productos en los que los azúcares hayan sido sustituidos total o parcialmente por sustancias edulcorantes.

La conservación de este tipo de productos se basa en las características de las materias primas que se emplean y en varios factores que ejercen su acción sobre los microorganismos potencialmente deteriorantes de las confituras.

En primer lugar el pH ácido de las frutas, que suele oscilar entre 2,8-3,8, limita el desarrollo de microorganismos patógenos, siendo las confituras atacables por mohos y levaduras. En segundo lugar, el tratamiento de concentración, realizado a altas temperaturas (90°C) durante períodos de 15-30 minutos, elimina de manera importante formas vegetativas de microorganismos. Un tercer efecto conservante es la alta concentración de sólidos solubles que alcanza el producto final. La alta presión osmótica actúa de conservador, por lo que la confitura no precisa de ningún método de esterilización para su conservación.

A pesar de ello, existen diferentes tipos de envasado de este tipo de productos, destacando el uso de botellas PET por su potencial riesgo de contaminación debido a la necesidad de adición del producto final a temperaturas inferiores a 60°C, con el fin de evitar la deformación del envase. En la actualidad, se están empleando aditivos químicos con el fin de evitar el deterioro de este tipo de productos. Sin embargo, la creciente demanda de productos “libres” de estas sustancias, por parte de los consumidores, ha favorecido un cambio en las industrias agroalimentarias, posibilitando la obtención de productos más naturales (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Kocevski *et al.*, 2013; Manso *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2013).

La producción de sabores no deseados y aromas fuertes limita el uso del AECR, como conservante alimentario, para aumentar la seguridad y vida útil de productos alimenticios. Sin embargo, Kocevski *et al.* (2013) afirma que el AECR representa una prometedora aplicación en alimentos, ya que presenta un fuerte efecto inhibitorio incluso a concentraciones bajas. Esto es favorable para el análisis sensorial, sobre todo en productos con sabor compatible, como es el caso de las confituras de frutas.

2. Objetivos y plan de trabajo

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1.OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo es la obtención de emulsiones aceite/agua, preparadas con aceite esencial de canela en rama (AEER) y goma xantana (GX), y evaluar su posible uso en la industria alimentaria como conservante natural.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para conseguir el objetivo general, se plantearon diferentes objetivos específicos:

- ✓ Optimización del método de preparación y homogeneización de las emulsiones O/W con el fin de reducir las pérdidas del aceite esencial empleado.
- ✓ Evaluación de la actividad antifúngica del AEER y de las emulsiones O/W, preparadas con AEER-GX, en medios de cultivo.
- ✓ Evaluación de la actividad antifúngica de las emulsiones O/W, preparadas con AEER-GX, incorporadas en confitura de fresa.

2.3.PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo y las tareas específicas para el logro de los objetivos propuestos son:

- ✓ Revisión bibliográfica acerca de la efectividad antifúngica de los aceites esenciales, y en concreto del AEER, del uso de la goma xantana como material protector y de la utilización de las altas presiones como técnica de obtención de emulsiones estables.
- ✓ Evaluación de la actividad antifúngica del AEER frente a mohos y levaduras.
- ✓ Diseño y preparación de emulsiones AEER-GX y evaluación de pérdidas de AEER durante el proceso de preparación y, caracterización del mismo, mediante Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.
- ✓ Caracterización de las emulsiones en base a su pH, densidad, tamaño de partícula y potencial- ζ .
- ✓ Evaluación de la actividad antifúngica de las emulsiones O/W, que en su formulación contienen AEER y goma xantana.

- ✓ Preparación de confitura de fresa e incorporación de las emulsiones O/W a las mismas.
- ✓ Estudio de vida útil acelerado de confitura de fresa, que contiene la emulsión AECR-GX.
- ✓ Evaluación sensorial de confituras de fresa a las que se les incorporó la emulsión O/W.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES O/W

Para la preparación de las emulsiones aceite-agua (O/W), 5 mg/g de Goma Xantana (GX) (Satiaxane™ CX 911, Cargill, Barcelona, España) fueron dispersados en agua destilada, durante toda la noche, para asegurar la correcta hidratación del polímero. Tras la dilución del polímero, se añadió el aceite esencial de canela en rama (AECR) (Ernesto Ventós S.A., Barcelona, España) en las siguientes concentraciones: 0,06, 0,08, 0,1, 0,12, 0,18 mg/g. La mezcla fue sometida a un proceso de agitación con una varilla magnética durante 5 min, seguido de un tratamiento de homogeneización de altas presiones a 400 y 800 bar, utilizando un homogeneizador de altas presiones (HAP) (Gea NiroSoavi S. p. A., Parma, Italia).

Previo al proceso de obtención de la emulsión, y con el fin de cuantificar las pérdidas de aceite esencial (AE) que podían producirse durante la incorporación del aceite a la disolución de GX en agua, se realizó una caracterización del AECR antes y después de su incorporación, obteniendo con ello la composición química del mismo y pudiendo conocer los componentes mayoritarios del aceite. Se trabajó con una concentración de aceite de 0,5 mg/g. Concretamente, se evaluaron dos posibles procesos: un primer proceso (y que finalmente fue el seleccionando) usando una varilla magnética durante 5 minutos, y un segundo proceso haciendo uso de un Ultraturrax (IKA®, Alemania) a 10.000 rpm durante 1 min y a 20.000 rpm durante 3 min. Para dicha caracterización, se hizo uso de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (CG-EM) (6890/5975, Agilent Technologies, EE.UU). Con el objetivo de extraer el AE de la emulsión O/W, 20 mL de n-hexano fueron añadidos a 2 g de emulsión. La muestra fue agitada con el uso de un vórtex durante un total de 5 min y, posteriormente, fue filtrada y evaporada a 40°C en un rota-vapor. Al producto obtenido tras la evaporación, se le añadieron 2 mL de n-hexano para su posterior análisis con el CG-EM (Donsi *et al.*, 2011).

El análisis fue llevado a cabo en un CG-EM 6890/5975 con una columna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). La temperatura inicial del horno era de 60°C y se mantuvo constante durante 3 min, aumentado la misma hasta alcanzar los 100°C a una velocidad de 10°C/min. A continuación, la temperatura subió hasta los 140°C a una velocidad de 5°C/min y, finalmente, la temperatura del horno alcanzó los 240°C a una velocidad de 20°C/min. El gas portador empleado en el análisis fue el Helio (He), a un flujo constante de 1 mL/min. El inyector y el EM se

encontraban a 250 y 230°C, respectivamente. El análisis de las distintas muestras se llevó a cabo por duplicado (Xiao *et al.*, 2011).

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES O/W

El pH de las emulsiones se midió haciendo uso de un pH-metro (Crison Basic 20+, S.A. Barcelona, España) previamente calibrado con tres soluciones tampón (pH 4, 7 y 9) y, la densidad de las emulsiones, se determinó mediante el uso de un picnómetro.

El análisis del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante el uso de un difractómetro láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Las muestras se diluyeron en agua destilada a 2.000 rpm hasta alcanzar un ratio de oscuración del 10%. La teoría de Mie fue aplicada considerando un índice de refracción de 1,50 y un índice de absorción de 0,01 para las emulsiones (Sánchez-González *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo el análisis del potencial- ζ de las emulsiones, éstas fueron diluidas con agua destilada hasta alcanzar una concentración de las gotas del 0,02% de AE. El equipo empleado para determinar el potencial- ζ de cada una de las emulsiones fue el Zetasizer nano-Z (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El modelo matemático de Smoluchowsky fue empleado con el fin de convertir las mediadas de la movilidad electroforética en potencial- ζ (Sánchez-González *et al.*, 2010).

Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado a 25°C.

3.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA

La evaluación de la capacidad antifúngica frente a mohos y levaduras, tanto del AECR como de las distintas emulsiones, fue realizada mediante el método de dilución en agar.

3.3.1. Actividad antifúngica del AECR

La metodología empleada para determinar la actividad antifúngica del AECR, fue adaptada del trabajo llevado a cabo por Viuda-Martos *et al.* (2008). Las cepas de *Aspergillus flavus* (CECT 2685), *Aspergillus niger* (CECT 20156) y *Penicillium expansum* (CECT 20140) fueron compradas al *Centro Español de Cultivos Tipo* (CECT, Burjassot, España). Las 3 cepas se inocularon e incubaron en *Potato Dextrose Agar* (PDA, Scharlab, Barcelona, España) a 25°C durante 7 días. Diferentes concentraciones de AECR fueron añadidas al medio de cultivo seleccionado, el cual contenía un 0,1% de Tween 80. Las concentraciones de AE evaluadas

fueron las siguientes: 0,03, 0,04 y 0,05 mg/g. Como control, se utilizaron placas Petri con PDA y un 0,1% de Tween 80. Seguidamente, se sembraron 0,1 mL de la solución de esporas ($1 \cdot 10^6$ esporas/mL) de cada uno de los mohos en PDA y, con la ayuda de un sacabocados (7 mm de diámetro) y unas pinzas estériles, fueron situados en el centro de cada placa. Finalmente, las placas fueron selladas con Parafilm® y se incubaron a 25°C durante 7 días. Se determinó el crecimiento micelial de cada placa después de 1, 3, 5 y 7 días de incubación, mediante el uso de una regla. Los resultados fueron expresados en centímetros (cm). El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Para evaluar la actividad frente a levaduras, la metodología empleada fue adaptada del trabajo de Matan *et al.* (2006). *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 1229) y *Zygosaccharomyces bailii* (CECT 12001) fueron compradas al *Centro Español de Cultivos Tipo* (CECT, Burjassot, España). Las cepas de levaduras se inocularon e incubaron en *Yeast Peptone Dextrose Broth* (YPDB, Scharlab, Barcelona, España) a 25°C durante 48 horas, utilizando para ello un agitador orbital a 120 rpm. Diferentes concentraciones de AECR fueron añadidas al medio de cultivo con un 0,1% de Tween 80. Las concentraciones de AE evaluadas fueron las siguientes: 0,03, 0,04 y 0,05 mg/g. Como control, se utilizaron placas Petri con YPD agar y un 0,1% de Tween 80. Seguidamente, se sembró 0,1 mL de la solución de células ($1 \cdot 10^5$ células/mL), de cada una de las levaduras, en YPD agar. Finalmente, las placas fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 25°C durante 48 h. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

3.3.2. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W

Para evaluar la actividad antifúngica frente a mohos de las emulsiones, 0,5 g de cada una de las emulsiones O/W (0,06, 0,08, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g de AECR y 5 mg/g de GX) fueron añadidas al medio de cultivo seleccionado (PDA). Como control, se utilizaron placas Petri con PDA y GX. Seguidamente, se sembraron 0,1 mL de la solución de esporas ($1 \cdot 10^6$ esporas/mL) de cada moho en PDA y, con la ayuda de un sacabocados (7 mm de diámetro) y unas pinzas estériles, fueron situados en el centro de cada placa. Finalmente, las placas fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 25°C durante 7 días.

Se determinó el crecimiento micelial de cada placa después de 1, 3, 5 y 7 días de incubación, mediante el uso de una regla. Los resultados fueron expresados en cm. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

Para evaluar su actividad antifúngica frente a levaduras, 0,5 g de las emulsiones O/W (0,06, 0,08, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g de AECR y 5 mg/g de GX) fueron añadidas al medio de cultivo seleccionado (YPD agar). Como control, se utilizaron placas Petri con el medio de cultivo y GX. Seguidamente, se sembró 0,1 mL de la solución de células de *Z. bailii* y *Z. rouxii* ($1 \cdot 10^5$ células/mL) en YPD agar. Finalmente, las placas fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 25°C durante 48 h. El ensayo se llevó a cabo por duplicado.

3.4. PREPARACIÓN DE LA CONFITURA

Con el fin de preparar la confitura de fresa, se mezcló la fruta y el azúcar en la proporción 65:35 y se cocinó durante 30 min a 100°C en una Thermomix (Thermomix™ 31, Vorwerk, España) (Iguar *et al.*, 2010). El producto final alcanzó los 60°Brix, cumpliendo, de esta forma, la normativa de calidad española para confituras de frutas, aprobada en el RD 863/2003 (BOE núm. 160, 5 Julio 2003). La confitura de fresa elaborada, se almacenó a 4°C en recipientes estériles hasta su posterior análisis.

3.5. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL ACELERADA DE CONFITURA DE FRESA

0,5 g de las emulsiones preparadas con 0,08 y 0,1 mg/g de AECR y 5 mg/g de GX, homogeneizadas a 400 bares, fueron añadidas a 49,5 g de confitura de fresa. Seguidamente, se inocularon 0,1 mL de la solución con esporas y células, en 15 g de confitura de fresa con la emulsión añadida como aditivo natural. Las placas Petri fueron selladas con Parafilm® e incubadas a 25°C durante 42 días.

La determinación de la vida útil acelerada del producto se evaluó según el método descrito por Pascual y Calderón (2000). Se pesaron 5 gramos de la muestra inoculada en una bolsa de *Stomacher*. Seguidamente, se añadieron 45 mL de agua de peptona estéril, para conseguir la proporción 1:10, y se homogeneizó la muestra durante un minuto en el *Stomacher*. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas de la muestra homogeneizada. Para ello, se pipeteó 1 mL de la dilución 10^{-1} y se añadió en un tubo con 9 mL de agua de peptona estéril (dilución 10^{-2}). Este proceso se repitió sucesivamente hasta obtener la dilución deseada. 0,1 mL de las diluciones de interés fueron sembrados en PDA y YPD agar, para mohos y levaduras respectivamente. Finalmente, las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 h. Tras el período de incubación establecido, se llevó a cabo el recuento de las placas y, aquellas que contenían un

número de UFC entre 30 y 150, fueron consideradas en el estudio. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

3.6. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial de las confituras de fresa se llevó a cabo mediante un panel formado por 30 catadores inexpertos con edades comprendidas entre los 21 y 50 años. Los atributos evaluados por los catadores fueron: color, sabor, aroma, consistencia y aceptación general, en una escala hedónica de nueve puntos, en la que el 9 indicaba la aceptación extrema del producto y el 1 el rechazo extremo del mismo (Basu *et al.*, 2011).

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados del estudio se llevó a cabo mediante un ANOVA Multifactorial con un nivel de significación del 95% utilizando como software, Statgraphics Centurion XVI.

4. Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES O/W

4.1.1. Caracterización del AECR

La identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica del AECR es posible mediante su determinación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). Mediante esta determinación, es posible identificar los componentes mayoritarios y minoritarios de los aceites esenciales (AEs) (Figura 1). 15 compuestos activos fueron identificados, destacando el cinamaldehído como componente mayoritario (80%), seguido por el cariofileno (7%), el β -linalool (2,4%) y el eugenol (2,17%) (Tabla 1). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (López *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Goni *et al.*, 2009).

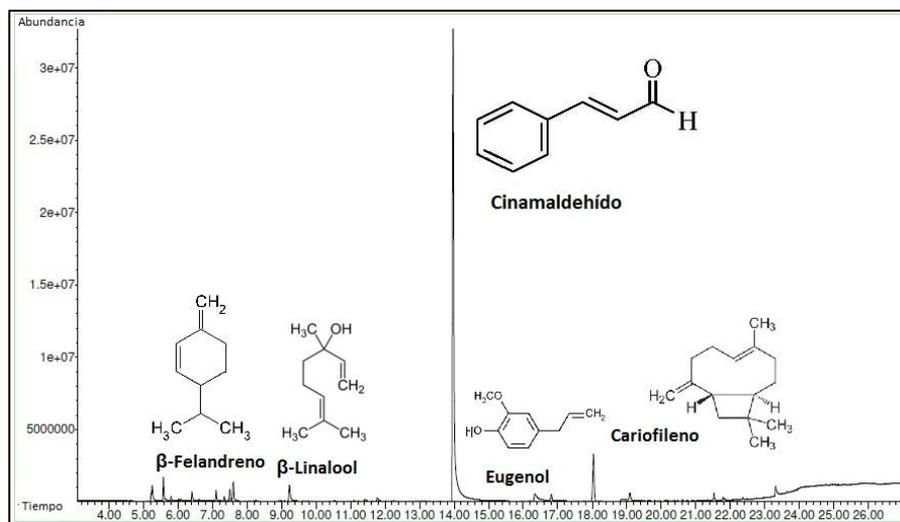


FIGURA 1. Cromatograma del AECR obtenido mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

El ratio de compuestos activos presentes en los aceites esenciales depende del origen del AE, como ya se ha comentado con anterioridad. En el caso del AE de canela, el componente mayoritario del aceite proveniente de las hojas es el eugenol, mientras que si el aceite proviene de la rama, el componente activo mayoritario es el cinamaldehido. Ambos son responsables de la actividad antimicrobiana (Matan *et al.*, 2006). El cinamaldehído, o trans-cinamaldehído, se caracteriza por poseer un doble enlace conjugado y una larga cadena hidrocarbonada,

proporcionándole mayor actividad antimicrobiana. Además, los grupos hidroxilo pueden formar enlaces de hidrógeno con enzimas, afectando a la biosíntesis de micotoxinas (Xing *et al.*, 2010).

TABLA 1. Componentes del AECR obtenidos mediante Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas, tiempo de retención y área. Valores medios (n=2).

Componentes	Tiempo de Retención	Área
α -felandreno	7,113	12058697
α -terpinoleno	7,343	4796562
o-cimeno	7,502	13780225
β -felandreno	7,603	25266792
β -linalool	9,228	30176103
1-terpinen-4-ol	11,413	2309034
α -terpineol	11,776	5449008
cinamaldehído	13,972	1003344513
eugenol	16,337	27376604
copaeno	16,814	10416769
cariofileno	18,035	89156960
α -cariofileno	18,889	7680208
cinamilacetato	19,091	15208701
β -guaiano	20,615	1657211
óxido de cariofileno	21,524	10227075

4.1.2. Optimización del método de preparación de emulsiones O/W estables

Con el objetivo de reducir las pérdidas de AE producidas durante el proceso de obtención de las emulsiones, se llevó a cabo un análisis por CG-EM del AECR puro y del aceite obtenido de las emulsiones, preparadas mediante el uso del Ultraturrax y combinación de Ultraturrax y altas presiones (Tabla 2) y combinación de agitación magnética y altas presiones (Tabla 3). Los resultados del estudio muestran una reducción en el contenido de AE presente en las emulsiones, siendo esta reducción menor en aquellas muestras sometidas a homogeneización mediante el uso de agitación magnética combinada con las altas presiones. En las emulsiones en las cuales se utilizó el Ultraturrax como técnica de homogeneización, el porcentaje de pérdidas total de los compuestos mayoritarios fue de un $59\pm 4\%$, siendo ligeramente superiores al combinar esta técnica con altas presiones. Por el contrario, las pérdidas observadas en las emulsiones obtenidas mediante combinación de agitación magnética y de las altas presiones HAP (a 400 y 800 bar) fueron menores. Cabe destacar que a mayores presiones de homogeneización de las muestras, mayores son las pérdidas de los agentes activos del AECR; presentando un porcentaje de pérdida total de $8\pm 2\%$ y $18\pm 4\%$ a 400 y 800 bar, respectivamente

(Tabla 3). Esta reducción en el contenido de compuestos activos del AE extraído de las emulsiones, podría deberse al estrés y calentamiento sufrido por las mismas durante los diferentes procesos de homogeneización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Donsi *et al.* (2011).

TABLA 2. % de pérdida de los componentes activos del AECR tras el proceso de homogeneización de las emulsiones mediante el uso de distintas técnicas (Ultraturrax y su combinación con altas presiones). Valores medios (n=2) y desviación estándar.

Tratamiento	Componente AECR	% de pérdida	sd
Ultraturrax	α -Felandreno	0,71	0,05
	α -Terpinoleno	0,31	0,02
	o-Cimeno	0,90	0,07
	β -Felandreno	1,55	0,29
	β -Linalool	1,44	0,07
	1-Terpinen-4-ol	0,15	0,05
	α -Terpineol	0,32	0,01
	Cinamaldehído	42,86	2,07
	Eugenol	2,23	0,00
	Copaeno	2,17	0,13
	Cariofileno	5,42	0,85
	α -Cariofileno	0,68	0,13
	Óxido de cariofileno	0,54	0,06
Ultraturrax + HAP 400 bar	α -Felandreno	0,71	0,34
	α -Terpinoleno	0,33	0,10
	o-Cimeno	0,94	0,10
	β -Felandreno	1,69	0,23
	β -Linalool	1,71	0,30
	1-Terpinen-4-ol	0,16	0,00
	α -Terpineol	0,36	0,00
	Cinamaldehído	47,62	0,60
	Eugenol	2,10	0,16
	Copaeno	0,61	0,06
	Cariofileno	5,27	0,31
	α -Cariofileno	0,64	0,02
	Óxido de cariofileno	0,46	0,30
Ultraturrax + HAP 800 bar	α -Felandreno	0,77	0,04
	α -Terpinoleno	0,36	0,05
	o-Cimeno	0,97	0,07
	β -Felandreno	1,73	0,11
	β -Linalool	1,35	0,60
	1-Terpinen-4-ol	0,14	0,01
	α -Terpineol	0,30	0,01
	Cinamaldehído	47,66	1,11
	Eugenol	1,86	0,11
	Copaeno	0,65	0,19
	Cariofileno	5,75	0,82
	α -Cariofileno	0,67	0,25
	Óxido de cariofileno	0,52	0,06

TABLA 3. % de pérdida de los componentes activos del AECR tras el proceso de homogeneización de las emulsiones mediante el uso de distintas técnicas (agitación magnética y altas presiones). Valores medios (n=2) y desviación estándar.

Tratamiento	Componente AECR	% de pérdida	sd
Imán Agitación + HAP 400 bar	α-Felandreno	0,19	0,07
	α-Terpinoleno	0,01	0,32
	o-Cimeno	0,44	0,08
	β-Felandreno	0,98	0,30
	β-Linalool	0,02	0,15
	1-Terpinen-4-ol	0,15	0,09
	α-Terpineol	0,04	0,02
	Cinamaldehído	1,62	0,06
	Eugenol	1,17	0,27
	Copaeno	0,16	0,07
	Cariofileno	2,67	0,38
	α-Cariofileno	0,01	0,06
Óxido de cariofileno	0,14	0,00	
Imán Agitación + HAP 800 bar	α-Felandreno	0,34	0,02
	α-Terpinoleno	0,27	0,03
	o-Cimeno	0,70	0,10
	β-Felandreno	1,31	0,12
	β-Linalool	0,33	0,07
	1-Terpinen-4-ol	0,04	0,00
	α-Terpineol	0,01	0,04
	Cinamaldehído	9,74	2,32
	Eugenol	0,55	0,05
	Copaeno	0,35	0,24
	Cariofileno	3,66	1,22
	α-Cariofileno	0,21	0,22
Óxido de cariofileno	0,13	0,00	

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA EMULSIONES O/W

Tras la optimización del método de preparación de las emulsiones, diferentes formulaciones fueron preparadas mediante agitación magnética y HAP a 400 y 800 bares, y posteriormente caracterizadas, con el objetivo de conocer las propiedades físico-químicas de las mismas. Las concentraciones de AE fueron seleccionadas en base a las pérdidas obtenidas durante el proceso de obtención de las muestras y los resultados microbiológicos. Las medidas de pH, densidad, $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ se muestran en la Tabla 4. Los valores de pH de las emulsiones preparadas a 400 bar de presión se encuentran entre $6,86 \pm 0,02$ y $7,30 \pm 0,05$ mientras que los valores de pH de las emulsiones sometidas a 800 bar de presión se encuentran entre $7,30 \pm 0,60$ y $7,40 \pm 0,00$, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos cambios podrían deberse a la degradación del polímero. Los cambios producidos en las muestras tras la aplicación del tratamiento de altas presiones podrían ocasionar una mayor hidratación debido a la

desestructuración del polímero (Paquín, 1999). En cuanto a los valores de densidad, todos están alrededor del valor de densidad del agua, sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes emulsiones. Respecto al tamaño de partícula ($d_{3,2}$ y $d_{4,3}$) de cada una de las emulsiones, únicamente en el caso de las emulsiones preparadas con 0,06 mg/g de AE y sometida a altas presiones, presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de $d_{3,2}$ y el $d_{4,3}$ (Tabla 4). Estos resultados quedan confirmados en la Figura 2, la cual muestra la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones, donde se puede observar una distribución monomodal sin cambios en la intensidad de los picos para todas las formulaciones.

TABLA 4. Valores medios y desviación estándar ($n=3$) de pH, densidad, $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ de las emulsiones O/W sometidas a tratamiento de altas presiones.

Muestra	pH	ρ (g/cm ³)	$d_{3,2}$ (μm)	$d_{4,3}$ (μm)
0,06 mg/g AE CR 400 bar	7,30 \pm 0,05 ^b	1,001 \pm 0,001 ^a	3,022 \pm 0,164 ^c	6,719 \pm 0,441 ^b
0,06 mg/g AE CR 800 bar	7,37 \pm 0,02 ^b	1,002 \pm 0,001 ^a	2,245 \pm 0,040 ^a	4,979 \pm 0,213 ^a
0,08 mg/g AE CR 400 bar	7,28 \pm 0,02 ^b	1,001 \pm 0,001 ^a	2,705 \pm 0,267 ^b	6,432 \pm 0,303 ^b
0,08 mg/g AE CR 800 bar	7,34 \pm 0,02 ^b	1,001 \pm 0,001 ^a	2,747 \pm 0,182 ^b	5,684 \pm 0,182 ^{ab}
0,10 mg/g AE CR 400 bar	7,12 \pm 0,03 ^{ab}	1,001 \pm 0,000 ^a	2,347 \pm 0,007 ^a	5,161 \pm 0,038 ^a
0,10 mg/g AE CR 800 bar	7,28 \pm 0,02 ^b	1,001 \pm 0,000 ^a	2,550 \pm 0,018 ^{ab}	5,138 \pm 0,099 ^a
0,12 mg/g AE CR 400 bar	7,06 \pm 0,05 ^{ab}	1,001 \pm 0,001 ^a	2,844 \pm 0,094 ^b	7,022 \pm 0,604 ^b
0,12 mg/g AE CR 800 bar	7,40 \pm 0,00 ^b	1,001 \pm 0,002 ^a	2,907 \pm 0,109 ^{bc}	6,607 \pm 0,974 ^b
0,18 mg/g AE CR 400 bar	6,86 \pm 0,02 ^a	1,002 \pm 0,001 ^a	2,776 \pm 0,063 ^b	6,441 \pm 0,215 ^b
0,18 mg/g AE CR 800 bar	7,35 \pm 0,56 ^b	1,001 \pm 0,001 ^a	2,937 \pm 0,206 ^{bc}	6,404 \pm 1,040 ^b

^{a, b, c} Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre emulsiones en función de la presión utilizada ($p < 0,05$).

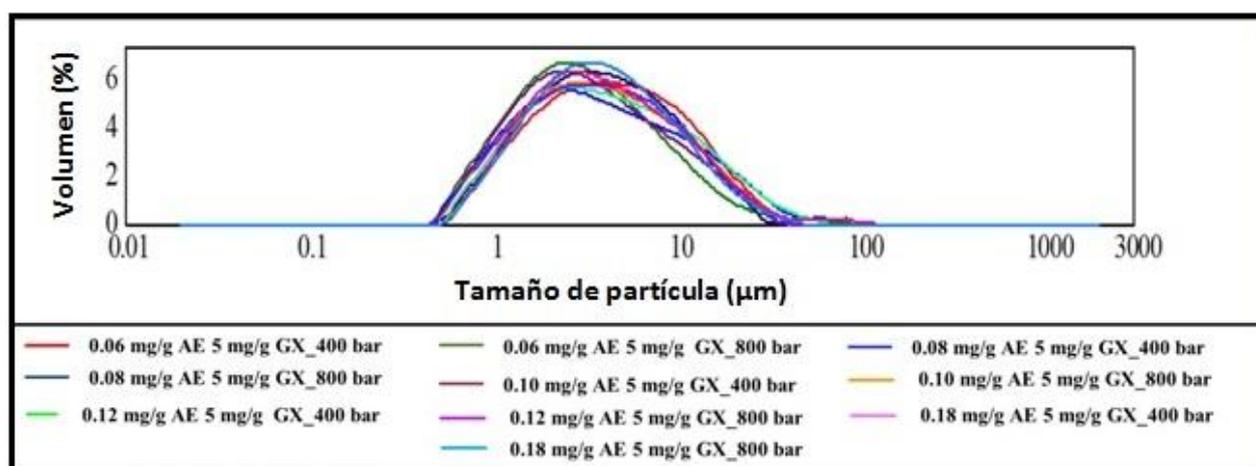


FIGURA 2. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones O/W, preparadas con goma xantana (GX) y AE CR a 400 bar y 800 bares. Valores medios ($n=3$) y desviación estándar.

En relación a la estabilidad de las emulsiones O/W, valores de potencial- ζ por encima de -30mV muestran una fuerte repulsión electrostática de las gotas de aceite en la fase acuosa, considerándose sistemas menos estables (Heurtault *et al.*, 2003; Salvia-Trujillo *et al.*, 2015). Los resultados muestran un descenso en los valores de potencial- ζ de aquellas emulsiones sometidas a una mayor presión, es decir, las preparadas a 800 bar; mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) en las emulsiones de 0,06, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g de AECR (Figura 3). A pesar de ello, está reducción de la carga de las partículas no conduce a la obtención de emulsiones inestables en el tiempo. Resultados similares fueron presentados por otros autores (Vargas *et al.*, 2011).

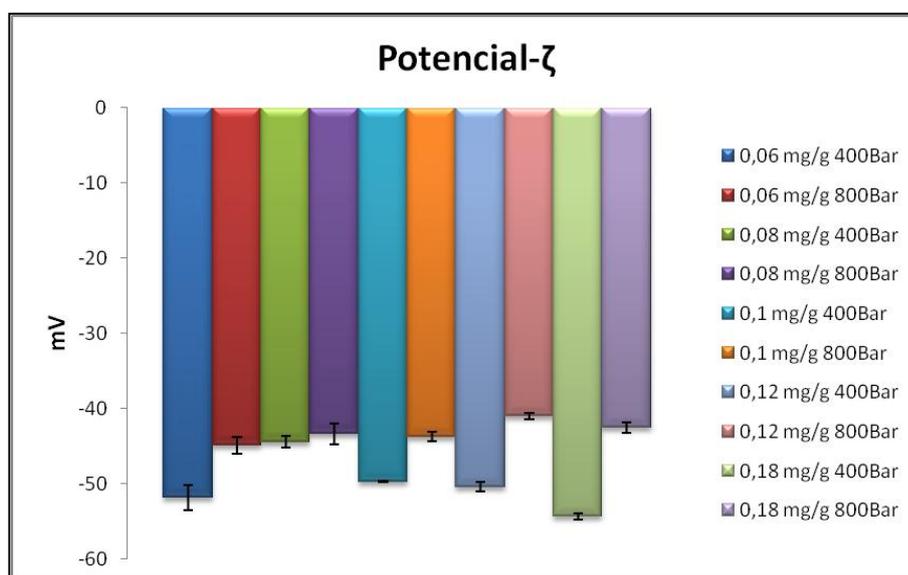


FIGURA 3. Potencial- ζ de las emulsiones de AECR-GX (0,06, 0,08, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g AECR-5 mg/g GX) obtenidas tras agitación continua (5 min) con varilla magnética y HAP a 400 y 800 bares. Valores medios (n=3) y desviación estándar.

4.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DEL AECR

4.3.1. Actividad antifúngica del AECR

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos tras la evaluación de la actividad antifúngica, de diferentes concentraciones de AECR. Los datos se expresan en función del crecimiento micelial (cm) de las tres cepas de mohos evaluadas en el estudio, tras 1, 3, 5 y 7 días de incubación a 25 ± 1 °C. Los resultados reflejan la capacidad de *Penicillium expansum*,

Aspergillus niger y *Aspergillus flavus* para crecer en medio de cultivo (PDA), con 0,03 y 0,04 mg/g de AECR, y en la muestra control. Sin embargo, el AECR a la máxima concentración testada (0,05 mg/g), inhibe el crecimiento micelial de las tres cepas de mohos mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo *P. expansum* y *A. niger* más sensibles al AECR que *A. flavus*. De los resultados obtenidos, se podría establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los tres mohos entre 0,04 y 0,05 mg/g de AECR.

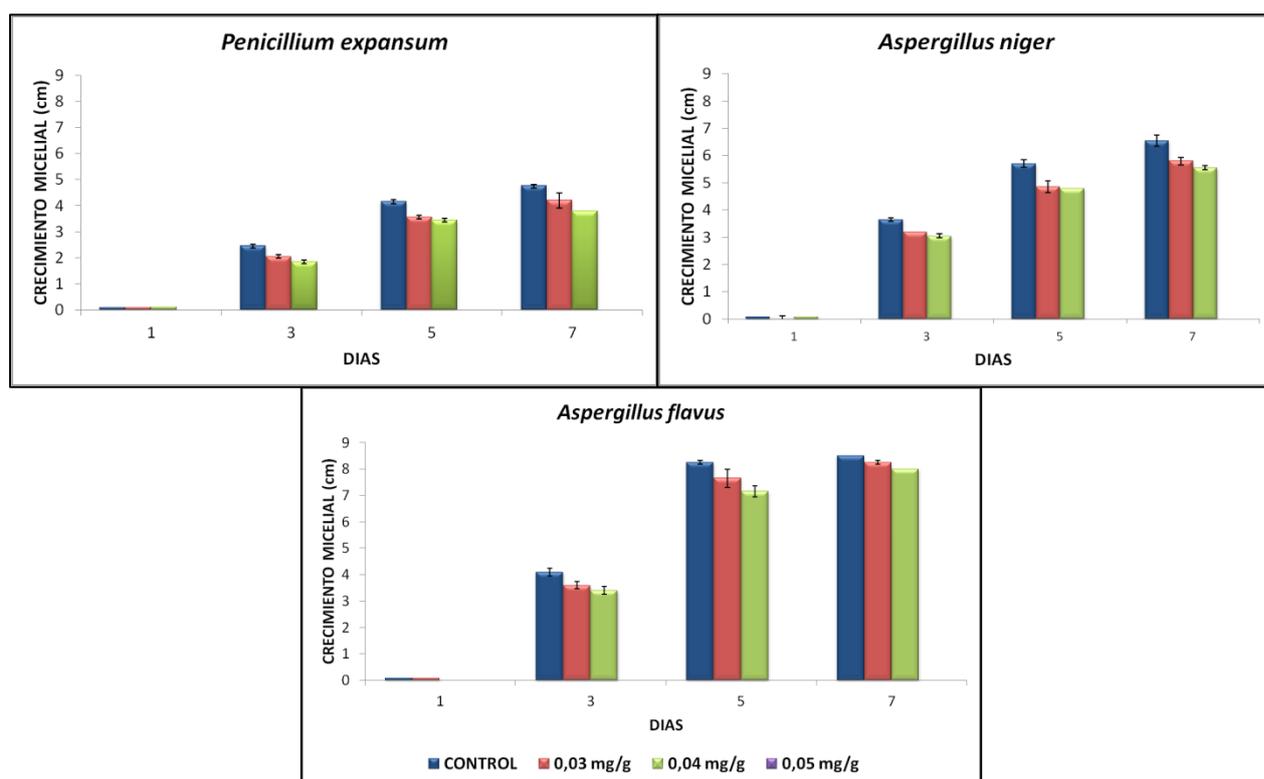


FIGURA 4. Evaluación del crecimiento micelial (cm) de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, según concentración de AECR (mg/g), tras 1, 3, 5 y 7 días de incubación a 25 ± 1 °C. Valores medios ($n=2$) y desviación estándar.

La eficacia del AECR se atribuye a su componente mayoritario, el cinamaldehído y, la inhibición del crecimiento de mohos del género *Apergillus* y *Penicillium*, ha sido evidenciada por diversos autores (Matan *et al.*, 2006; López *et al.*, 2007; Goni *et al.*, 2009). Como se ha comentado anteriormente, no se conoce con total certeza el modo de acción de los AEs sobre los microorganismos, aunque muchos investigadores atribuyen la causa a su habilidad de penetrar, a través de las membranas, en el interior de la célula y exhibir una actividad inhibitoria

en las propiedades funcionales y lipofílicas de ésta. Esto podría deberse a los compuestos fenólicos de los AEs, que alteran la permeabilidad de las membranas de las células, causando fugas del contenido interior (Rivera *et al.*, 2015).

Las Figuras 5, 6 y 7 muestran el crecimiento de los mohos a día 7. En ellas se puede distinguir un crecimiento en forma de halo. Como queda reflejado en las imágenes de las placas, aquellas en las cuales la concentración empleada de AEER fue de 0,05 mg/g, no se observó crecimiento filamentoso del moho.

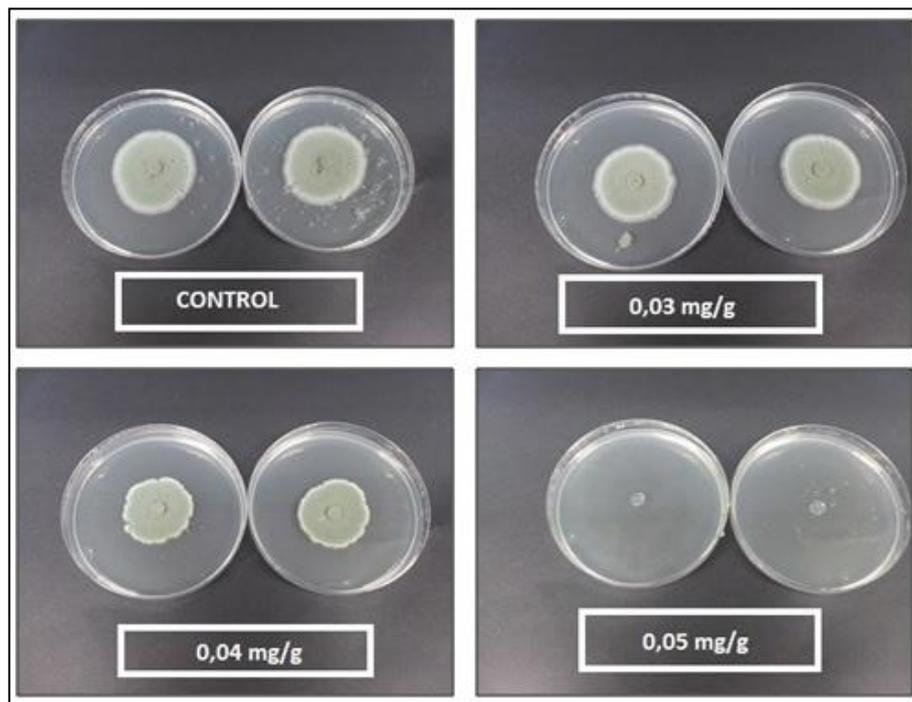


FIGURA 5. Actividad antifúngica del AEER frente a *Penicillium expansum*, en función de la concentración de AEER utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25±1 °C.

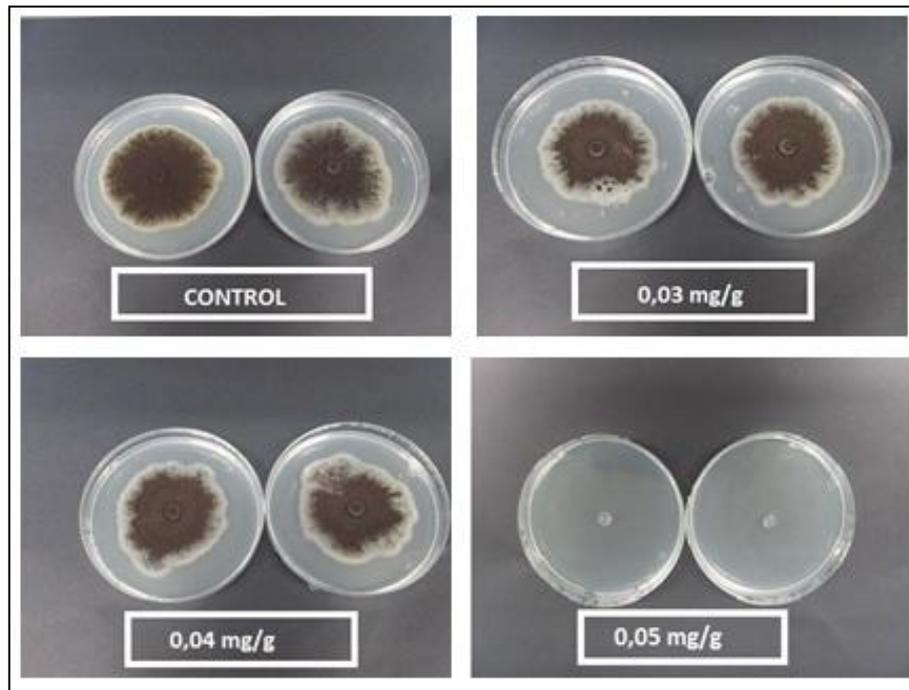


FIGURA 6. Actividad antifúngica del AECR frente a *Aspergillus niger*, en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25 ± 1 °C.

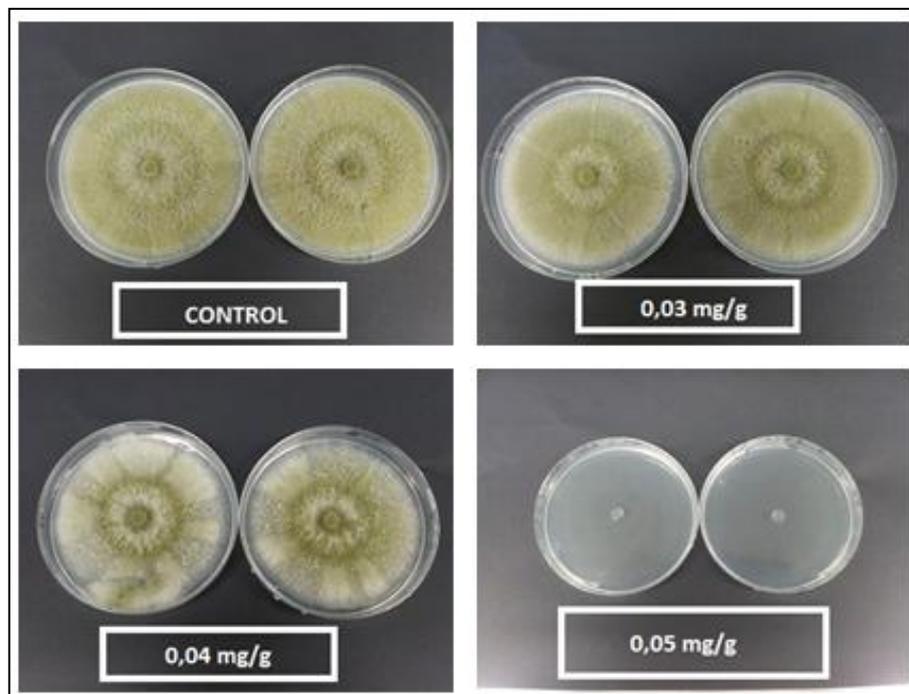


FIGURA 7. Actividad antifúngica del AECR frente a *Aspergillus flavus*, en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25 ± 1 °C.

En cuanto a la actividad antifúngica del AECR, por contacto directo, frente a las levaduras del género *Zygosaccharomyces*, se realizó un seguimiento del desarrollo de las mismas tras 48 h de incubación a 25 ± 1 °C, determinando la ausencia o presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figuras 8 y 9). Los resultados muestran crecimiento por contacto directo con el agente antifúngico, en el caso de *Z. bailii*, en aquellas placas en las cuales se ha utilizado una menor concentración de AECR (0,03 y 0,04 mg/g), transcurrido el período de incubación establecido. En cambio, *Z. rouxii* no presenta crecimiento para ninguna de las concentraciones de AECR evaluadas (Figura 8), mientras que en el caso de *Z. bailii*, no se detecta crecimiento mediante el uso de la concentración de AECR más alta evaluada (0,05 mg/g) (Figura 9). Al igual que en el caso de los mohos, la CMI del AECR se encuentra entre 0,04 y 0,05 mg/g para *Z. bailii* y, es inferior a 0,03 mg/g para *Z. rouxii*.

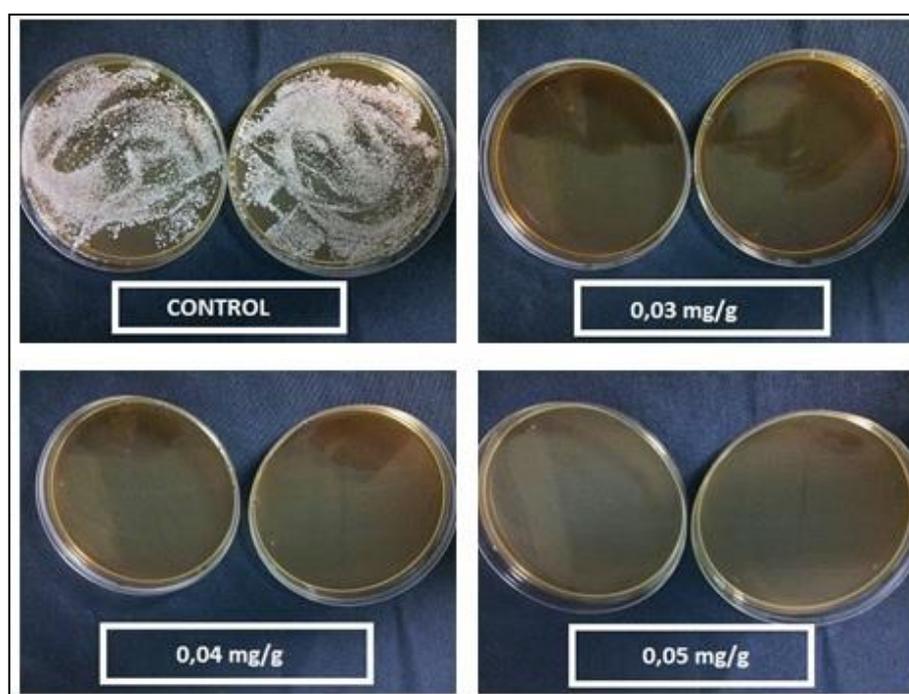


FIGURA 8. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) del AECR frente a *Zygosaccharomyces rouxii*, en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 48 h de incubación a 25 ± 1 °C.

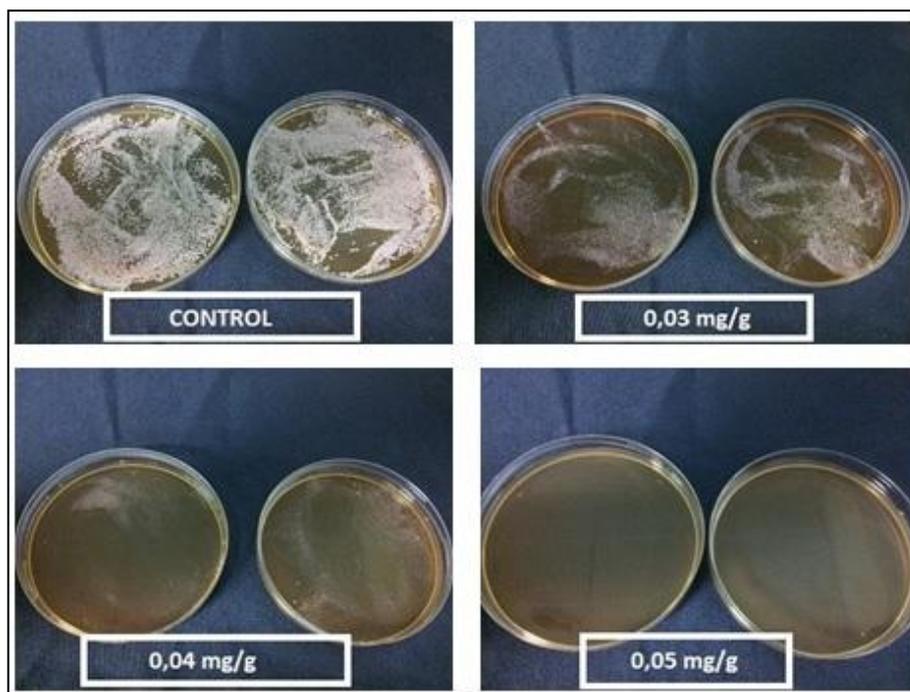


FIGURA 9. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) del AECR frente a *Zygosaccharomyces bailii*, en función de la concentración de AECR utilizada. Imágenes tomadas tras 48 h de incubación a 25 ± 1 °C.

En base a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con una concentración superior de 0,05 mg/g de AECR, ya que es la mínima concentración a la cual no se observa crecimiento de ninguna de las 5 cepas de microorganismos. Con esta concentración, de forma *in vitro*, aseguramos la ausencia de cualquiera de los microorganismos nombrados anteriormente.

4.3.2. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W

La actividad antifúngica de las emulsiones preparadas con distintas concentraciones de AECR, 5 mg/g de goma xantana y, a dos presiones (400 y 800 bar), fue evaluada frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*. Las concentraciones de AECR utilizadas en la preparación de las emulsiones fueron 0,06, 0,08, 0,1, 0,12 y 0,18 mg/g. La metodología utilizada, fue la misma que en el caso de la determinación de la actividad antifúngica del AECR. En la Figura 10, se presentan los resultados de la evaluación del crecimiento micelial (cm) a día 1, 3, 5 y 7 de análisis, de las tres cepas de mohos estudiadas tras la incubación de las mismas a 25 ± 1 °C.

Los resultados reflejan la capacidad de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* para crecer en aquellas placas con PDA y emulsión, la cual fue preparada con 0,06 mg/g de AECR, y homogeneizada mediante la combinación del imán de agitación y altas presiones (400 y 800 bar). También se observa la capacidad de los mohos para crecer en el medio con 0,08 mg/g de AECR y la misma cantidad de polímero, utilizando una presión de 800 bares; pero no hubo crecimiento para las emulsiones preparadas a 400 bares (Figura 10). Estos resultados, podrían confirmar las pérdidas ocasionadas en el AE debido al ligero calentamiento y estrés al que se somete la muestra durante el proceso de homogeneización de las emulsiones.

Por otro lado, sólo *A. niger* logró crecer en presencia de 0,1 mg/g de AECR en la emulsión, preparada a 800 bares, mostrando una menor sensibilidad al AECR que *Aspergillus flavus* o *Penicillium expansum*. Finalmente, el AECR a las máximas concentraciones utilizadas (0,12 y 0,18 mg/g), es capaz de inhibir el crecimiento micelial de las tres cepas estudiadas.

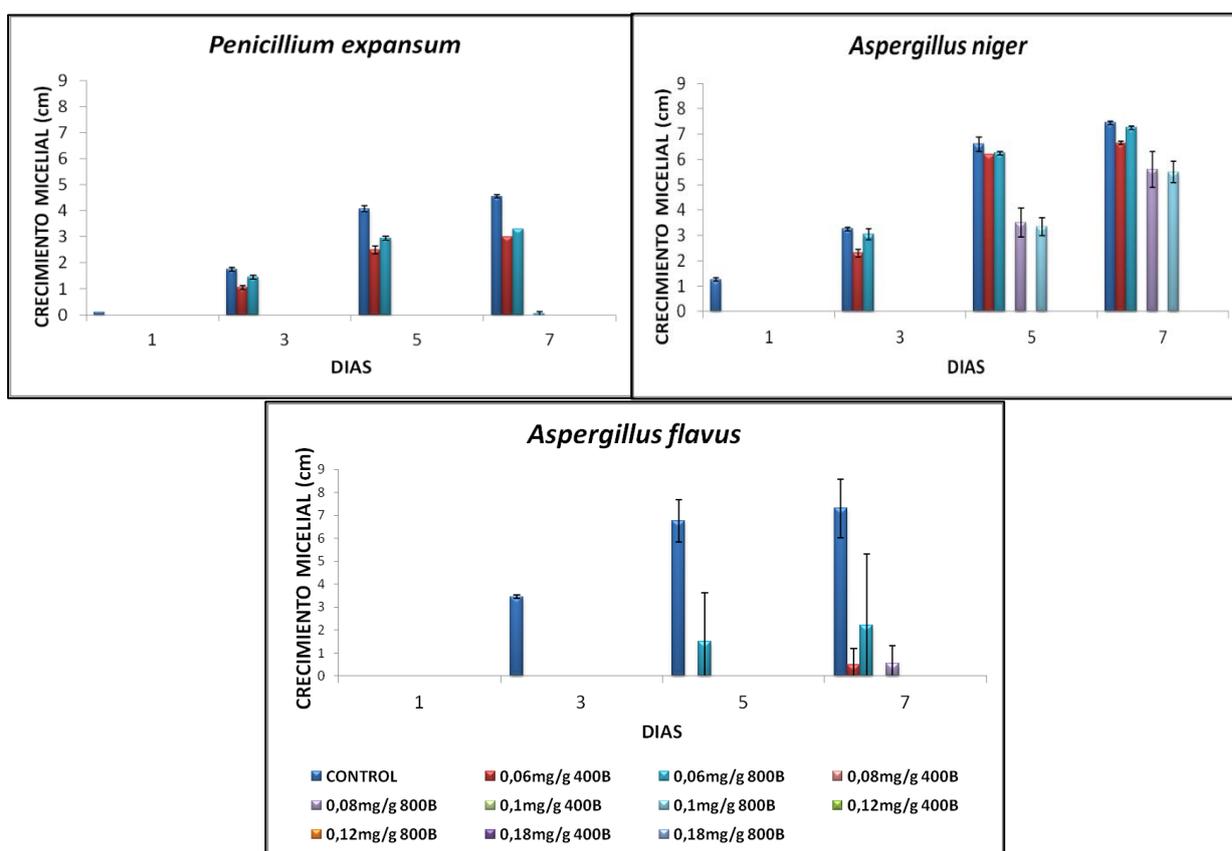


FIGURA 10. Evaluación del crecimiento micelial (cm) de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, en las emulsiones O/W preparadas a 400 y 800 bar, tras 1, 3, 5 y 7 días de incubación a 25±1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.

Las Figuras 11, 12 y 13, muestran el crecimiento de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* a día 7 de análisis. En ellas se puede distinguir un crecimiento en forma de halo como se veía en el apartado 4.3.1. Las placas donde el crecimiento es mínimo o inapreciable, están remarcadas con un círculo en rojo.

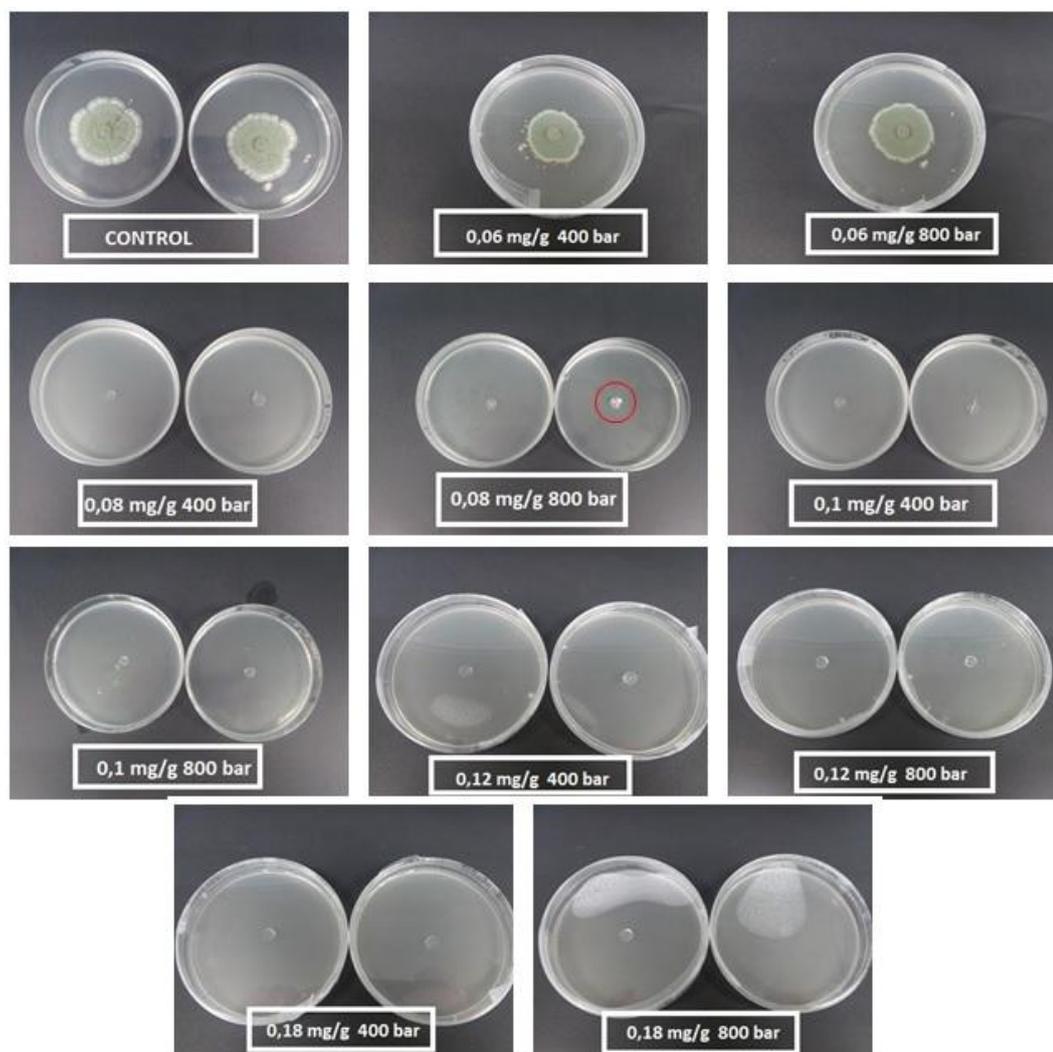


FIGURA 11. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AEGR y GX frente a *Penicillium expansum*, en función de la concentración de AEGR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25 ± 1 °C.

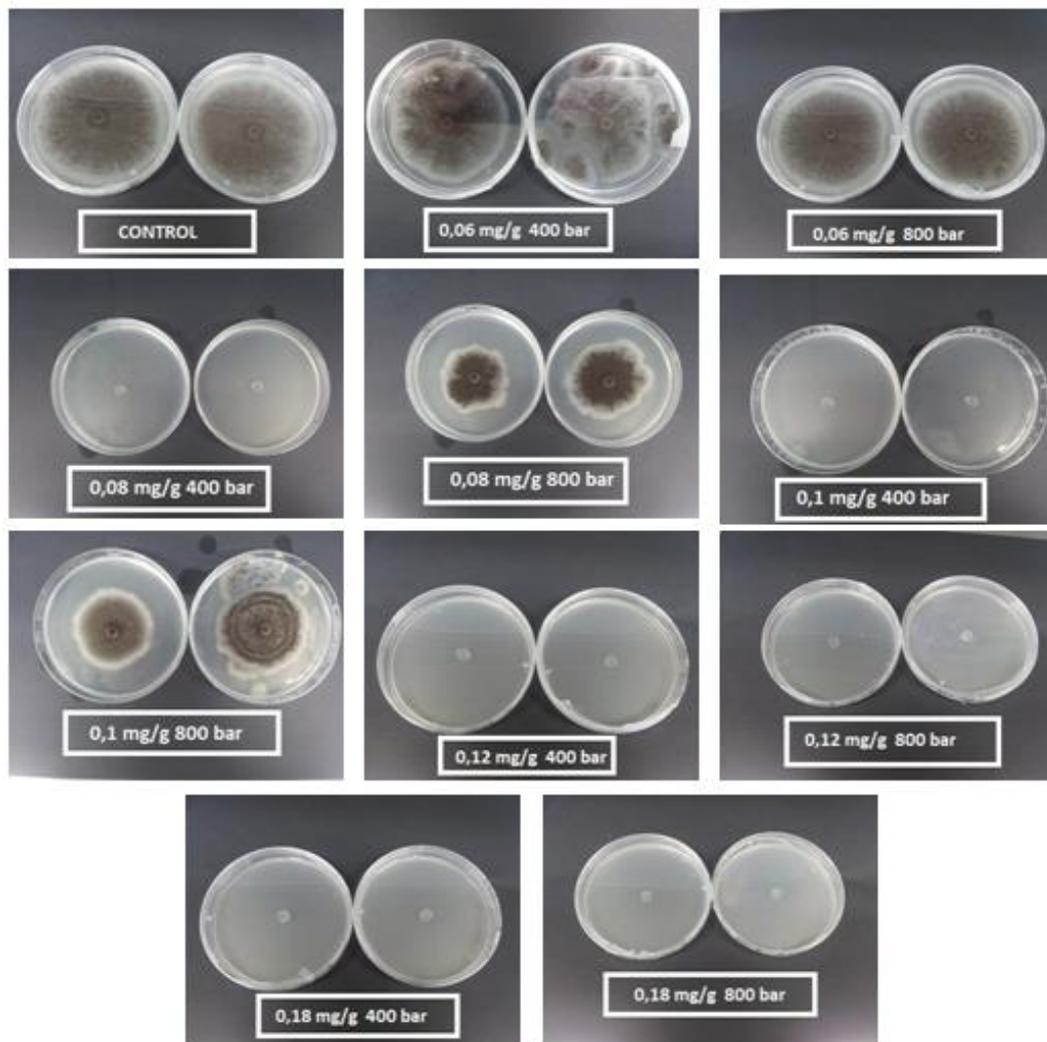


FIGURA 12. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a *Aspergillus niger*, en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25 ± 1 °C.



FIGURA 13. Actividad antifúngica de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a *Aspergillus flavus*, en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 7 días de incubación a 25 ± 1 °C.

En cuanto a la actividad antifúngica de las emulsiones O/W, por contacto directo, frente a las levaduras del género *Zygosaccharomyces*, se realizó un seguimiento del desarrollo de las mismas tras 48 h de incubación a 25 ± 1 °C, de la misma forma que se hizo con el AECR, determinando la ausencia o presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figuras 14 y 15). Los resultados muestran crecimiento por contacto directo con el agente antifúngico, para el caso de ambas levaduras, en aquellas placas en las cuales se utilizaron 0,06 mg/g de AECR. En el caso de la utilización de mayores concentraciones de AE, se observa crecimiento en las placas con un 0,08 y 0,1 mg/g de AECR en el caso de las emulsiones O/W obtenidas a 800 bares de presión. Sin embargo, no hay presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) cuando la

presión utilizada es de 400 bares (Figuras 14 y 15). Asimismo, los resultados no muestran crecimiento por contacto directo con las emulsiones preparadas con 0,12 y 0,18 mg/g de AEGR, tras 48 h de incubación a 25 ± 1 °C, para ninguna de las dos levaduras del género *Zygosaccharomyces* estudiadas.

Por ello, a partir de los resultados obtenidos, se establecieron las concentraciones de 0,08 y 0,1 mg/g de AEGR como las de referencia en la preparación de las emulsiones O/W a 400 bares de presión, puesto que no mostraron crecimiento microbiano. Estas emulsiones fueron las utilizadas con posterioridad en la preparación de las confituras de fresa y, posterior evolución de la vida útil de las mismas.



FIGURA 14. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) de las emulsiones O/W de AEGR y GX frente a *Zygosaccharomyces rouxii*, en función de la concentración de AEGR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 48 horas de incubación a 25 ± 1 °C.

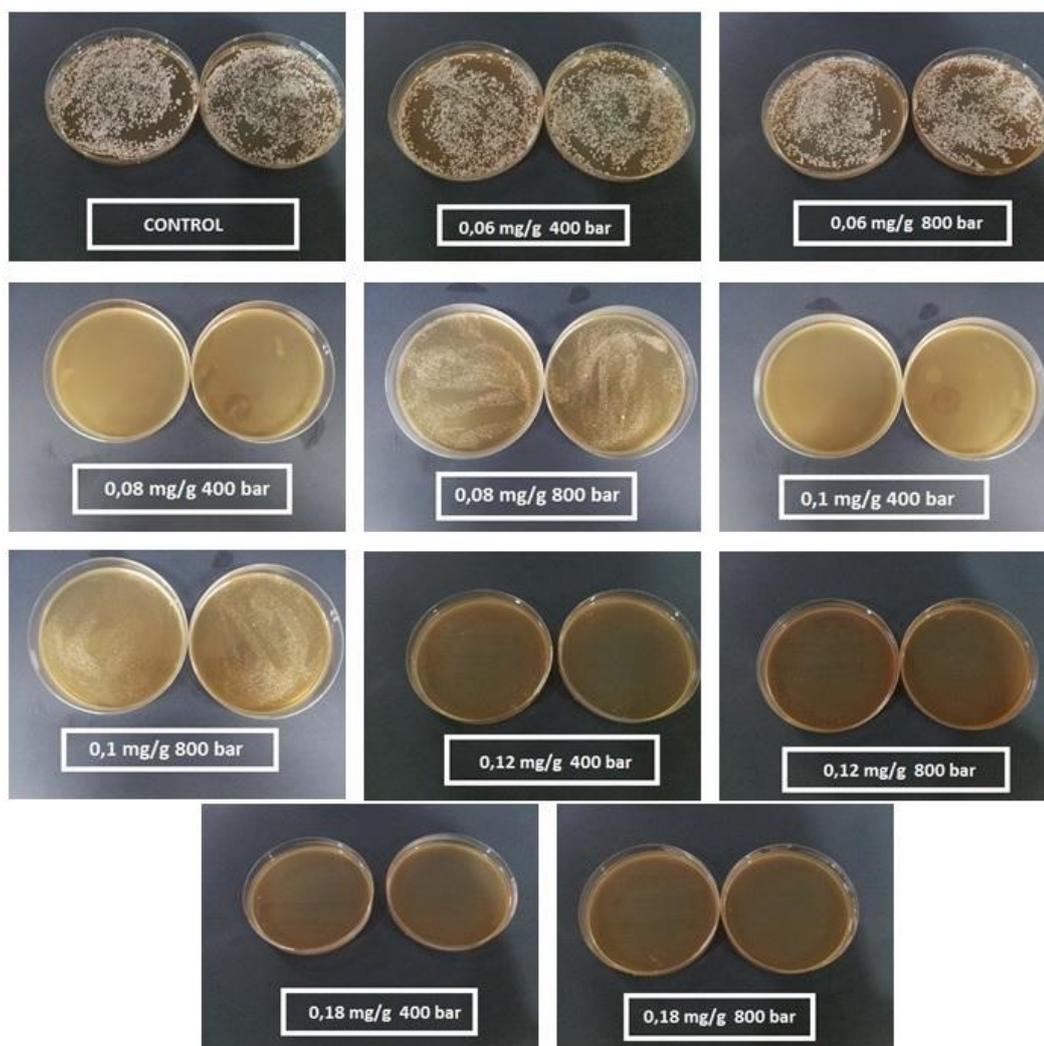


FIGURA 15. Actividad antifúngica (ausencia/presencia) de las emulsiones O/W de AECR y GX frente a *Zygosaccharomyces bailii*, en función de la concentración de AECR y presión utilizadas. Imágenes tomadas tras 48 horas de incubación a 25 ± 1 °C.

4.4. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL ACELERADA DE CONFITURA DE FRESA

La actividad antifúngica de las emulsiones O/W frente a *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* en confitura de fresa control y, confitura de fresa con emulsión almacenada fue evaluada durante 28 días a 25 ± 1 °C (Figuras 16 y 17). La emulsiones utilizadas fueron las preparadas con 0,08 mg/g y 0,1 mg/g de AECR, 5 mg/g de GX y, homogeneizadas con la combinación del imán de agitación y el HAP a 400 bares.

Los resultados reflejan la evolución de los mohos y las levaduras en un sistema real, como es la confitura de fresa. Las muestras de confitura, a las cuales se les incorporó la emulsión, presentan menor desarrollo fúngico que la confitura control, siendo inferior el desarrollo en el caso de *Penicillium expansum* y *Aspergillus flavus*. A mayores concentraciones de AECR presentes en la emulsión, menor desarrollo fúngico ($p < 0,05$). Sin embargo, en el caso de *Aspergillus niger*, el desarrollo fúngico de las muestras control y las preparadas con la emulsión presentan una evolución similar.

En cuanto a la evolución de las levaduras en la confitura, los resultados muestran una mayor sensibilidad a la emulsión O/W (Figura 17). En el caso de *Z. rouxii*, se observa la completa inhibición del crecimiento de la misma durante todo el período de almacenamiento, para la muestra preparada con la emulsión que contenía 0,1 mg/g de AECR. En el caso de *Z. bailii*, la inhibición es completa tanto para la muestra preparada con la emulsión que contenía 0,08 de AECR como para la que contenía 0,1 mg/g de AECR.

Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* e *in vivo* reflejan una mayor difusión de los componentes activos de los AE en medio de cultivo que en las confituras de fresa, debido a la compleja estructura de estas últimas, confiriendo una mayor dificultad en la transferencia y acción del AE sobre los microorganismos (Perdones *et al.*, 2012). Así mismo, Firouzi *et al.* (2007), indicaron en uno de sus trabajos realizados con AE de orégano y nuez moscada, el uso de una mayor cantidad de AE (1-3% superior), en aquellos casos en los que se utilizaban alimentos.

Por ello, las concentraciones estudiadas, desde el punto de vista microbiológico, deberían ser ligeramente superiores para conseguir la conservación de la confitura de fresa, pudiendo modificar de esta manera el perfil sensorial del producto. Son muchos los autores que reflejan la posibilidad de recurrir a otras alternativas como la combinación con otros compuestos como las sales de zinc, ácidos orgánicos o compuestos fenólicos entre otros (Friedly *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2015). Con ello, se permitiría una reducción en la concentración de AE, dando lugar a mejoras en la calidad sensorial del producto final (Burt, 2004).

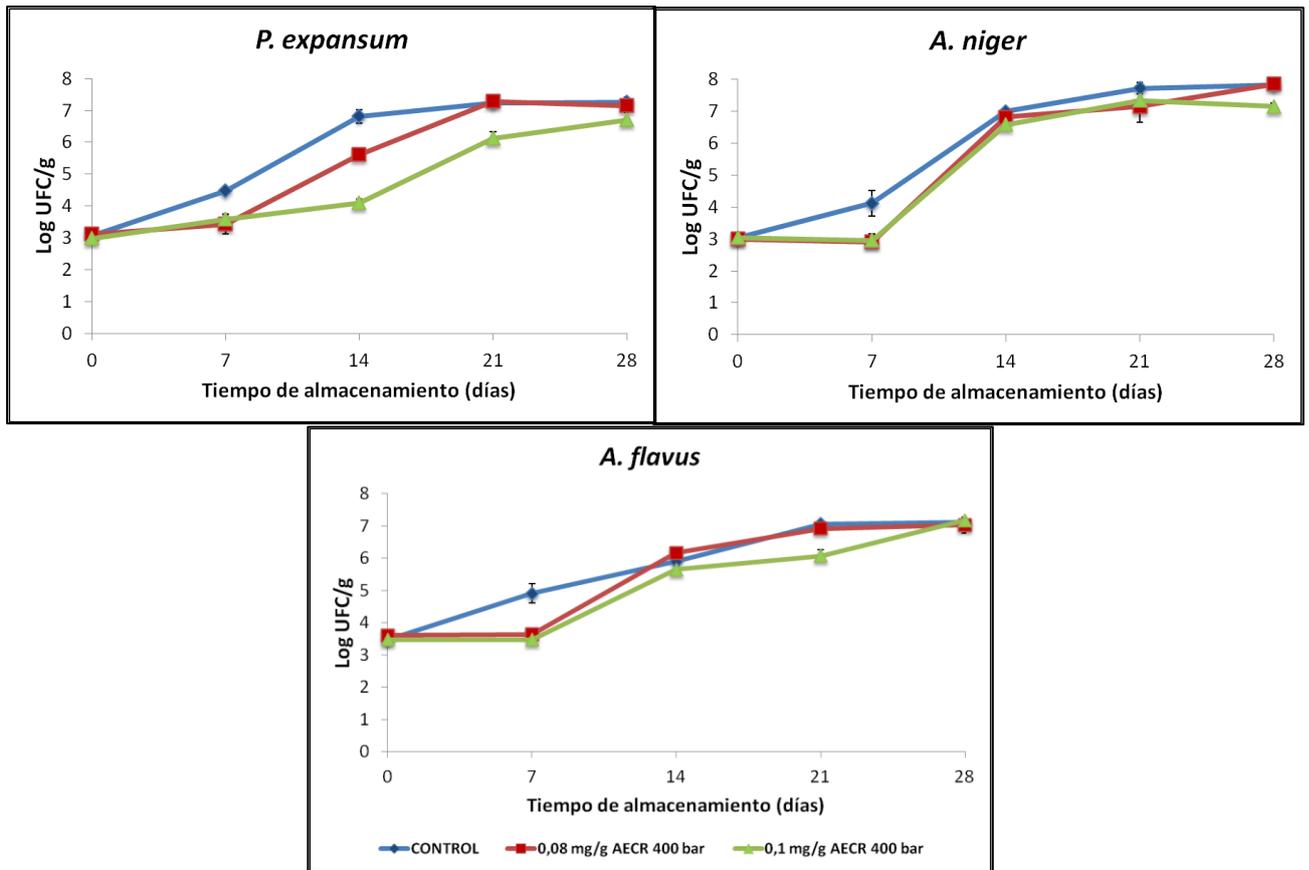


FIGURA 16. Evolución de los recuentos (UFC/g) de *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* en confitura de fresa control y con la emulsión O/W tras 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a 25 ± 1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.

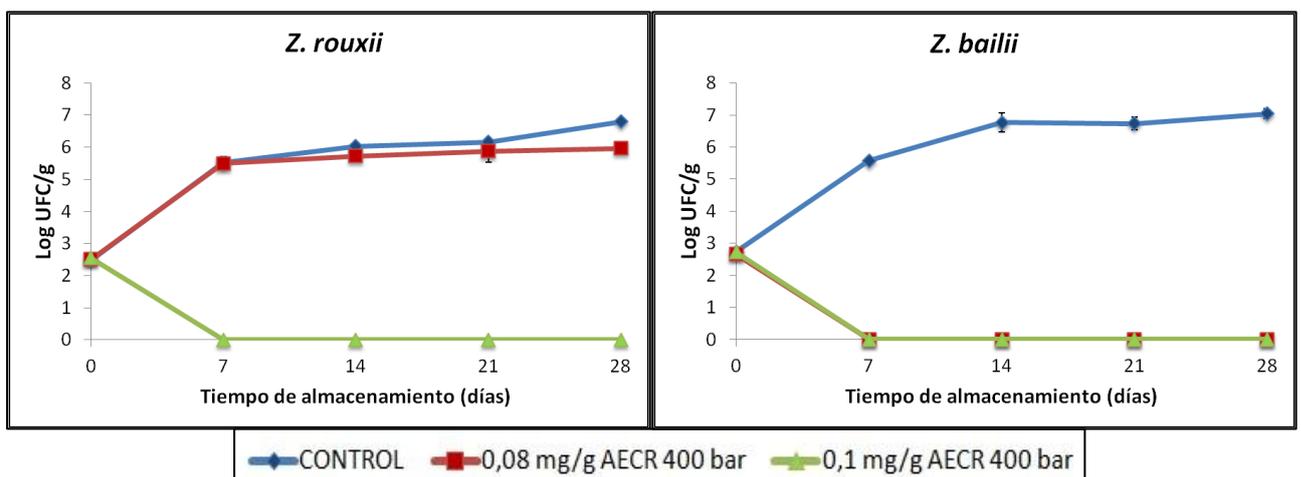


FIGURA 17. Evolución de los recuentos (UFC/g) de *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii*, inoculadas en confituras de fresa control y con la emulsión O/W tras 0, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a 25 ± 1 °C. Valores medios (n=2) y desviación estándar.

4.5. ANÁLISIS SENSORIAL

Con el objetivo de determinar la aceptabilidad sensorial de confituras de fresa a las cuales se les incorporó la emulsión O/W, se llevó a cabo un análisis sensorial. Las muestras evaluadas por los panelistas fueron las confituras de fresa con la emulsión a las concentraciones establecidas (0,08 y 0,1 mg/g de AECR), junto con una muestra control. Los resultados del análisis sensorial, en base a la puntuación establecida por los catadores para cada uno de los atributos evaluados, se muestra en la Figura 18.

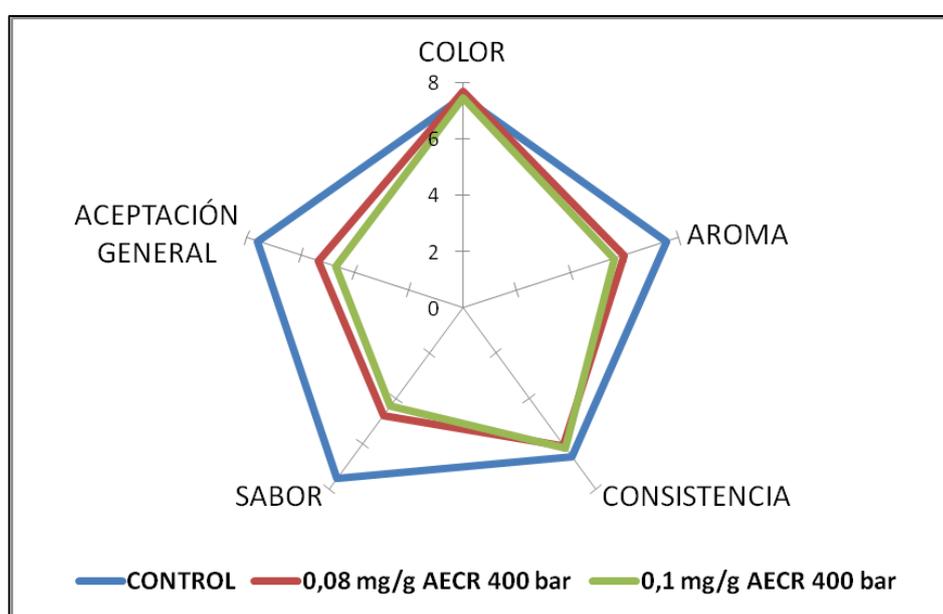


FIGURA 18. Perfil sensorial de las confituras de fresa control y con emulsión O/W. Valores medios (n=30).

La incorporación de AECR a confituras de fresa, en las concentraciones establecidas en los ensayos *in vitro*, influyen de forma significativa ($p < 0,05$) al aroma, sabor y aceptación general de producto respecto a la muestra control. Los panelistas, no encontraron ninguna diferencia en cuanto a la consistencia y color de las muestras. A pesar de los resultados obtenidos en el perfil sensorial de la confitura de fresa control y con emulsión, llevando a cabo el análisis de los datos de elección de compra por parte de los catadores (Figura 19), se observa que el 50% los catadores estaría dispuesto a comprar el producto correspondiente a la muestra preparada con

0,08 mg/g de AECR a 400 bar. En cuanto a la muestra preparada con 0,1 mg/g de AECR, únicamente un 17% de los panelistas, compararía el producto.

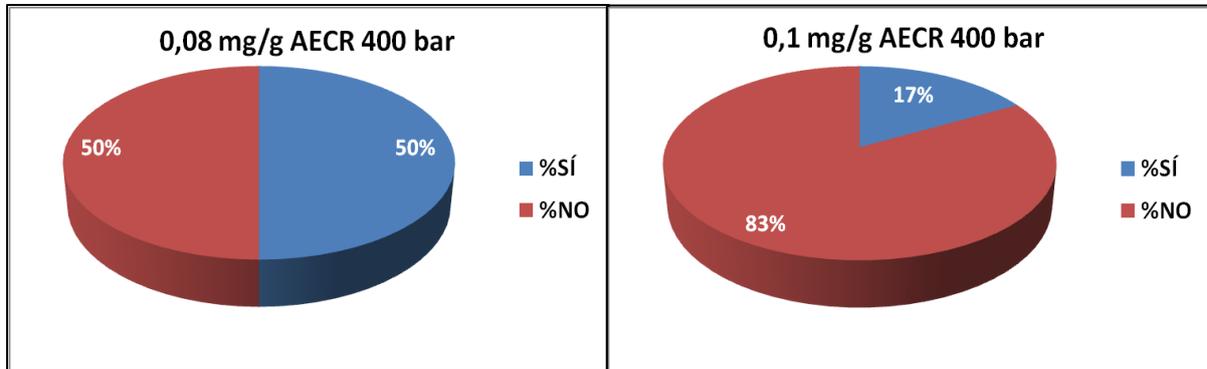


FIGURA 19. Diagrama circular de elección de compra del producto, con respuestas afirmativas y negativas.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- ✓ La técnica o proceso empleado en la preparación de las emulsiones es el factor que condiciona el % de pérdidas de los compuestos activos del aceite esencial de canela en rama. En base a los métodos empleados para la obtención de la emulsiones, el más efectivo es el uso combinado de agitación magnética y homogeneización con altas presiones, trabajando a 400 bares.
- ✓ Los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula y potencial- ζ reflejan la obtención de emulsiones O/W estables.
- ✓ Los estudios llevados a cabo con el fin de determinar la actividad antifúngica de las emulsiones O/W, tanto *in vitro* como *in vivo*, reflejan una mayor difusión de los componentes activos del aceite esencial en el medio de cultivo que en la confitura de fresa, posiblemente debido a la mayor complejidad estructural que presenta la misma, dificultando la transferencia y acción del aceite esencial sobre los microorganismos.
- ✓ La incorporación del aceite esencial de canela en rama a la confitura de fresa a las concentraciones establecidas en los ensayos *in vitro*, influyen de forma significativa ($p < 0,05$) al aroma, sabor y aceptación general de producto.
- ✓ Estudiar otras alternativas como la combinación de aceites esenciales con otros compuestos, como sales de zinc o compuestos fenólicos, sería necesario para inhibir el crecimiento microbiano en sistemas reales, permitiendo una reducción de la concentración del aceite esencial utilizado, con la consiguiente mejora sensorial del producto final.

6. Referencias

6. REFERENCIAS

BASU, S.; SHIVHARE, U. S.; SINGH, T. V.; BENIWAL, V. S. (2011). Rheological, textural and spectral characteristics of sorbitol substituted mango jam. *Journal of Food Engineering*, 105: 503 – 512.

BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109: 29 – 41.

BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223 – 253.

CAMACHO, A.; GILES, M.; ORTEGÓN, A.; PALAO, M.; SERRANO, B.; VELÁZQUEZ, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Decisión de la Comisión, de 23 de Enero de 2002, por la que se modifica la Decisión de la Comisión 1999/217/EC que se refiere al repertorio de sustancias aromatizantes utilizadas en o sobre los productos alimenticios. Official Journal L049, 20/02/2002: 1 – 160.

DICKINSON, E. (1992a). Introduction to food colloids. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT – Food Science and Technology*, 44: 1908 – 1914.

FIROUZI, R.; SHEKARFOROUSH, S.S.; NAZER, A.H.K.; BORUMAND, Z.; JOOYANDEH, A.R. (2007). Effects of Essential Oils of Oregano and Nutmeg on Growth and Survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in Barbecued Chicken. *Journal of Food Protection*, 11: 2460 – 2694.

FRIBERG, S.; LARSSON, K.; SJOBLUM, J. (2004). Orthokinetic Stability of Food Emulsions, en: *Food emulsions*. 4ª Edición. New York, Marcel Dekker: 327 – 352.

FRIEDLY, E.C.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C.; ROMAN, M.; O'BRYAN, C.; CHALOVA, V.I. (2009). In vitro Antilisterial Effects of Citrus Oil Fractions in Combination with Organic Acids. *Journal of Food Science*, 74(2): 67 – 72.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18: 549 – 579.

GONI, P.; LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; GOMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERIN, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4): 982 – 989.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. (2003). Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24(23): 4283 – 4300.

IGUAL, M.; CONTRERAS, C.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2010). Non-conventional techniques to obtain grapefruit jam. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 335 – 341.

KOCEVSKI, D.; DU, M.; KAN, J.; JING, C.; LACANIN, I.; PAVLOVIC, H. (2013). Antifungal Effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* Essential Oils and Their Components Against Population of *Aspergillus* Species. *Journal of Food Science*, 78: 731 – 737.

LI, Y.; KONG, D.; WU, H. (2013). Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41: 269 – 278.

LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. (2007). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11): 4348 – 4356.

MANSO, S.; CACHO-NERIN, F.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control*, 30: 370 – 378.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A.J.; CHOMPREEA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 180 – 185.

MCCLEMENTS, D.J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press, BocaRaton, FL.

MCCLEMENTS, D.J. (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems, en: *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing. Massachusetts: 3 – 18.

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518 – 1523.

PAQUIN, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9: 329 – 335.

PASCUAL, M. Y CALDERÓN, V. (2000). Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas, en: *Microbiología Alimentaria*. 2ª Edición. Editorial Díaz de Santos S.A. Madrid, España.

PERDONES, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70: 32 – 41.

PIORKOWSKI, D.T. Y MCCLEMENTS, D.J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. Review. *Food Hydrocolloids*, 42: 5 – 41.

REAL DECRETO 863/2003, de 4 de Julio de 2003, por el que se aprueba la Norma de calidad para la elaboración, comercialización y venta de confituras, jaleas, «marmalades» de frutas y crema de castañas. Boletín Oficial del Estado núm. 160, 5/07/2003: 26175 – 26178.

RIVERA CALO, J.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C.A.; RICKE, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54: 111 – 119.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43: 547 – 556.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate polymers*, 82: 277 – 283.

SHARMA, B.R.; NARRES, L.; DHULHOYA, N.C.; COMERCIANTE, S.U.; COMERCIANTE LUCID, U.C. (2006). La Goma Xantana en la Industria Alimentaria. *Food Promotion Chronicle*, 1(5): 27 – 30.

STRATFORD, M.; STEELS, H.; NEBE-VON-CARON, G.; NOVODVORSKA, M.; HAYER, K.; ARCHER, D.B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 126 – 134.

TIZIANA BARATTA, M.; DAMIEN DORMAN, H. J.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Frangance Journal*, 13: 235 – 244.

TYAGI, A. K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M.E. (2014). Chemical composition, *in vitro* anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT-Food Science and Technology*, 57: 731 – 737.

VAN DER GRAAF, S.; SCHROEN, C.G.P.H.; BOOM, R.M. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification e a review. *Journal of Membrane Science*, 251(1-2): 7 – 15.

VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. (2008). Molecular Diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* Species on Fruits and Vegetables, en: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 1ª Ed. (Barkai-Golan R, Paster N) Academic Press: 205 – 223.

VARGAS, M.; PERDONES, A.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. (2011). Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Hydrocolloids*, 25: 1158 – 1164.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19: 1130 – 1138.

WANG, C.Y.; WANG, S.Y.; YIN, J.J.; PARRY, J.; YU, L.L. (2007). Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 6527 – 6532.

WANG, H.; HU, Z.; LONG, F.; GUO, C.; NIU, C.; YUAN, Y.; YUE, T. (2016). Combined effect of sugar content and pH on the growth of a wild strain of *Zygosaccharomyces rouxii* and time for spoilage in concentrated apple juice. *Food Control*, 59: 298 – 305.

XIAO, J.X.; YU, H.Y.; YANG, J. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4): 1267 – 1272.

XING, Y.; LI, X.; XU, Q.; YUN, J.; LU, Y. (2010). Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and *in vivo* fruit test. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 1837 – 1842.