



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE ACEITES ESENCIALES EN ACEITUNAS DE MESA COMERCIALIZADAS SIN LÍQUIDO DE GOBIERNO*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E  
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: José Garrigues López

TUTORES ACADEMICOS: Ana Fuentes López  
Pau Talens Oliag

*Curso Académico: 2016-2017*  
VALENCIA, 12 de septiembre de 2017

# APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE ACEITES ESENCIALES EN ACEITUNAS DE MESA COMERCIALIZADAS SIN LÍQUIDO DE GOBIERNO

José Garrigues López<sup>1</sup>, Ana Fuentes López<sup>1</sup>, Pau Talens Oliag<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se ha estudiado el uso de recubrimientos comestibles formulados con HMPC, alginato o una mezcla de alginato-HMPC y aceites esenciales de limón, orégano y tomillo en aceitunas envasadas en doy-pack con el objetivo de mantener su calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial durante su almacenamiento. Para ello, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas (humedad, contenido en grasa, pH,  $a_w$ , color y textura), carga microbiana y atributos sensoriales durante 14 días de almacenamiento. La aplicación de los recubrimientos desarrollados no modificó las propiedades fisicoquímicas ni la carga microbiana inicial del producto. Durante el almacenamiento, los recubrimientos evitaron la pérdida de la firmeza de aceitunas. Las aceitunas recubiertas por alginato presentaron menores recuentos de mesófilos durante todo el estudio. El recubrimiento de alginato-HPMC mejoró el brillo, así como la apreciación global de las aceitunas, siendo este producto el mejor valorado por los catadores.

**Palabras clave:** recubrimientos comestibles, alginato, HPMC, aceites esenciales, aceitunas

## RESUM

S'ha estudiat l'ús de recobriments comestibles formulats amb HMPC, alginat o una mescla d'alginat-HMPC i olis essencials de llima, orenga i timó en olives envasades en doy-pack amb l'objectiu de mantindre la seua qualitat fisicoquímica, microbiològica i sensorial durant el seu emmagatzemament. Per a això, es van avaluar les propietats fisicoquímiques (humitat, contingut en greix, pH,  $a_w$ , color i textura), càrrega microbiana i atributs sensorials durant 14 dies d'emmagatzemament. L'aplicació dels recobriments desenrotllats no va modificar les propietats fisicoquímiques ni la càrrega microbiana inicial del producte. Durant l'emmagatzemament, els recobriments van evitar la pèrdua de la fermesa d'olives. Les olives recobertes per alginat van presentar menors recomptes de mesófilos durant tot l'estudi. El recobriment d'alginato-HPMC va millorar la brillantor així com l'apreciació global de les olives, sent este producte el millor valorat pels tastadors.

**Paraules Clau:** recobriments comestibles, alginat, HPMC, olis essencials, olives

<sup>1</sup> Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

## **ABSTRACT**

The use of edible coatings formulated with HPMC, alginate or a mixture of alginate-HPMC and essential oils of lemon, oregano and thyme in olives packaged in doypack has been studied with the objective of maintaining its physico-chemical, microbiological and sensorial quality during its storage. For this, the physicochemical properties (moisture, fat content, pH,  $a_w$ , color and texture), microbial load and sensorial attributes during 14 days of storage were evaluated. The application of the developed coatings did not modify the physicochemical properties nor the initial microbial load of the product. During storage, the coatings prevented the loss of olive firmness. Alginate-coated olives had lower counts of mesophiles throughout the study. The alginate-HPMC coating improved the gloss as well as the overall appreciation of the olives, this product was the best evaluated by the tasters.

**Keywords:** edible coatings, alginate, HPMC, essential oils, olives

## 1. INTRODUCCIÓN

Se denomina aceituna de mesa al fruto de determinadas variedades del olivo cultivado (*Olea europaea sativa*), sano, obtenido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal que, sometido a las elaboraciones adecuadas, proporcione un producto listo para el consumo y de buena conservación (RD 676/2016, 2016). Los procesos básicos de elaboración a los que son sometidos los frutos están dirigidos principalmente a eliminar el amargor natural de la aceituna. Estos procesos de elaboración son aderezo (tratamiento alcalino y acondicionamiento en salmuera donde sufren una fermentación), tratamiento con salmuera (donde se produce una fermentación parcial o completa), aliñado, oxidación (ennegrecidas por oxidación en medio alcalino) y deshidratación (tratamiento con sal seca).

Los productos comerciales suelen presentarse en salmuera según sus propias características, en sal seca y/o en atmósfera modificada, consiguiendo prolongar su vida útil mediante el uso de tratamientos térmicos por el empleo de conservantes o acidificantes (COI, 2004). Estos formatos permiten prolongar la vida útil del producto durante un tiempo variable en función de las características del mismo.

España es el principal productor y exportador mundial de aceituna de mesa. La producción de España supone cerca del 21% de la producción mundial, produciéndose en Andalucía cerca del 80%, y se exporta a más de 160 países (MAPAMA, 2016). España también es un país con un consumo elevado de aceitunas de mesa, presenta el mayor consumo per cápita de la UE (COI, 2016), siendo las de mayor consumo las aceitunas rellenas, seguidas por las enteras y deshuesadas, mientras que los formatos de venta más habituales son las aceitunas enlatadas, seguido por aceitunas a granel, en tarros de cristal y en bolsas de plástico con líquido de gobierno (ASEMESA, 2011). Sin embargo, cada vez son más habituales nuevas formas de presentación como el envasado en doy-pack sin líquido de gobierno. En este formato, la eliminación de la salmuera del envase hace que el producto sea mucho más fácil de transportar y abrir, y facilita su consumo en cualquier lugar y circunstancia. Sin embargo, a nivel industrial este tipo de formato sin líquido de gobierno presenta ciertas limitaciones. La pasteurización de los envases doy-pack sin líquido de gobierno presenta importantes inconvenientes desde el punto de vista tecnológico y operativo, como el colapso de los envases o la distribución heterogénea del calor en el interior del producto, debido a la presencia de gas, en lugar de salmuera, en su interior. Por todo ello, es necesario buscar alternativas a los tratamientos térmicos para este tipo de formatos, que permitan garantizar la estabilidad y seguridad del producto durante su comercialización.

La incorporación de aceites esenciales (AEs) en este tipo de productos podría ser una alternativa interesante al proceso de pasteurización gracias a las reconocidas propiedades antimicrobianas de los mismos. Entre los AEs más utilizados por su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas y por sus propiedades antifúngicas se encuentran los aceites esenciales de canela (Goñi *et al.*, 2009), clavo (Goñi *et al.*, 2009), limón (Mantle *et al.*, 1998; Moufida *et al.*, 2003; Viuda-Martos *et al.*, 2008), orégano (Kykkidou *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2007; Zivanovic *et al.*, 2005), romero (Gachkar *et al.*, 2007; Mantle *et al.*, 1998; Sacchetti *et al.*, 2005) y tomillo (Benavides *et al.*, 2016; Jouki *et al.*, 2014; Perdonés *et al.*, 2016). Una forma interesante de incorporación de estos AEs a los alimentos es empleando recubrimientos comestibles. Actualmente, el uso de recubrimientos como vehículos de agentes antimicrobianos y antioxidantes ha sido estudiado ampliamente en una

gran variedad de productos vegetales enteros (Rojas-Argudo *et al.*, 2009; Valero *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015), vegetales troceados (Azarakhsh *et al.*, 2012; Ghidelli *et al.*, 2014; Ghidelli *et al.*, 2015; Oms-Oliu *et al.*, 2008; Pérez-Gago *et al.*, 2006; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2008; Rojas-Grau *et al.*, 2007; Sanchis *et al.*, 2016), productos cárnicos (Akcan *et al.*, 2017; Raeisi *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2011) y productos del mar (Ojagh *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2002; Salgado *et al.*, 2013).

La composición de estos films es muy diversa, siendo el componente mayoritario un polisacárido (agar, alginato, carragenato, hidroxipropilmetil celulosa, quitosano, goma arábica, goma de xantana, pectina, almidón) o sustancias de carácter proteico (gelatina bovina, gelatina de cerdo, gelatina de pescado, proteína del suero, proteína de soja) (Tavassoli-Kafrani *et al.*, 2016). Además, en su formulación estos recubrimientos suelen contener sustancias plastificantes (glicerol, cera de abejas), entrecruzantes (cloruro cálcico, lactato cálcico) y antimicrobianas como los AEs mencionados anteriormente.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la aplicación de recubrimientos comestibles elaborados con diferentes polímeros y aceites esenciales con el objetivo de mantener la calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial de aceitunas de mesa envasadas en doy-pack sin líquido de gobierno y atmósfera modificada.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Optimización de las formulaciones de los recubrimientos y establecimiento de las condiciones de aplicación.**

Las aceitunas empleadas como materia prima fueron aceitunas “estilo-español” rellenas de pimiento, suministradas por la empresa Cándido Miró S.A. (Alcoy, Alicante, España).

Con el objetivo de establecer la formulación óptima de los recubrimientos comestibles de las aceitunas se estudiaron dos polisacáridos distintos autorizados para el consumo humano: alginato de sodio (E401) y HPMC (E464) (Guinama, Valencia, España). Se emplearon en la preparación de estas formulaciones: glicerol, tween-80 y Cloruro Cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) (Scharlab, Barcelona, Spain) y aceites esenciales de limón, tomillo y orégano (Herbes del Molí, Benimarfull, España). Las formulaciones utilizadas en estos ensayos se detallan en la tabla 1.

La fase acuosa del recubrimiento se preparó dispersando el polímero (alginato, HPMC o la mezcla de ambos) en agua destilada a 80 °C, empleando un agitador magnético hasta obtener una disolución transparente. La disolución se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y, en el caso de usar alginato como polímero, se añadió glicerol o Tween-80 agitando hasta conseguir una buena homogeneización. Además, cuando se empleó únicamente alginato, se evaluó la utilización de  $\text{CaCl}_2$  para fortalecer el film.

La fase lipídica del recubrimiento consistió en una mezcla de AEs de limón/tomillo/orégano (2/1/2 p/p/p) en aceite de oliva (3/100 p/p). La selección de estos aceites y la proporción de cada uno de ellos en la mezcla de aceites esenciales fue establecida a partir de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial del producto llevada a cabo en un estudio previo. El objetivo de dicho estudio fue la obtención de un producto de aceituna de mesa aromatizado para su comercialización en doy-pack sin líquido de gobierno y sin tratamiento de pasteurización.

Se incorporó la mezcla de aceites en la disolución acuosa y se homogeneizó empleando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Germany) a 12000 r.p.m. durante 5 min. Por último, la emulsión formada se desgasificó empleando una bomba a vacío.

Con el objetivo de seleccionar el procesado óptimo de las aceitunas, se procedió a la aplicación de las emulsiones seleccionadas probando distintos métodos, tiempos y orden de aplicación, así como la incorporación de secado. Cada una de estas pruebas de combinación formulación/aplicación se realizó por duplicado empleando 30 aceitunas en cada uno de estos tratamientos. En total se llevaron a cabo más de 70 pruebas, resultado de las diferentes combinaciones.

Se llevaron a cabo 2 métodos de aplicación, inmersión de las aceitunas en la solución formadora de film y pulverización empleando un aerógrafo Elite E4182 (Wega Elite, Valencia, España) y 3 tiempos de aplicación, 1, 2 y 5 min. En el caso del recubrimiento obtenido con alginato y CaCl<sub>2</sub> se estudió el efecto del orden de aplicación de ambas disoluciones.

Por último, se consideró incorporar una etapa de secado tras la aplicación del recubrimiento con el objetivo de optimizar la adherencia del film sobre el producto. Para ello se empleó un deshidratador de alimentos (Excalibur 3900B).

**TABLA 1.** Concentraciones estudiadas de los distintos componentes empleados en la formación de los films.

Emulsión	% Alginato (p/v)	% CaCl <sub>2</sub> (p/v)	% glicerol (p/v)	% Tween - 80 (p/v)	% HPMC (p/v)	% AE (p/v)
1	0,375	0,375	0,45	-	-	1
2	0,375	0,5	0,45	-	-	1
3	0,5	0,375	0,6	-	-	1
4	0,5	0,5	0,6	-	-	1
5	0,375	0,5	-	0,5	-	2
6	0,375	-	-	0,5	-	2
7	2	2	-	0,5	-	2
8	2	-	-	0,5	-	2
9	1	-	0,2	-	-	1
10	1	-	-	-	-	1
11	1	-	0,2	-	-	2
12	1	-	-	-	-	2
13	1	-	0,2	-	-	3
14	1	-	-	-	-	3
15	1	-	0,2	-	-	5
16	1	-	-	-	-	5
17	-	-	-	-	1	1
18	-	-	-	-	1	2
19	-	-	-	-	3	1
20	-	-	-	-	3	2
21	-	-	-	-	5	1
22	-	-	-	-	5	2
23	-	-	-	-	1	3
24	-	-	-	-	1	5
25	1	-	0,2	-	1	6
26	0,5	-	0,1	-	0,5	3
27	0,75	-	0,2	-	1,25	6

## 2.2. Estudio de almacenamiento

Tras la selección de las formulaciones más adecuadas para la obtención de los recubrimientos y del modo de aplicación se llevó a cabo un estudio de almacenamiento donde se analizaron las características físico-químicas,

microbiológicas y sensoriales de las muestras durante un periodo de almacenamiento de 14 días.

Para llevar a cabo el estudio de almacenamiento se emplearon aceitunas rellenas de pimienta procedentes de un mismo lote de fabricación y suministradas por la empresa Cándido Miró S.A. Las aceitunas empleadas como materia prima se recibieron en una salmuera de acondicionamiento que fue preparada con un contenido aproximado de sal del 7% y donde no se había incorporado ningún tipo de aditivo. Estas muestras no habían sido sometidas a ningún tratamiento térmico de conservación.

Para la preparación de las muestras, en primer lugar, se eliminó la salmuera de acondicionamiento de las aceitunas y éstas se dejaron escurrir durante 5 min a temperatura ambiente. Las aceitunas se dividieron en 4 lotes, uno de los lotes se empleó como lote control, donde no se aplicó ningún tipo de recubrimiento y las aceitunas únicamente se sometieron a la etapa de secado. Cada uno de los 3 lotes restantes fue recubierto con cada una de formulaciones seleccionadas.

Tras la aplicación de los recubrimientos, las aceitunas procedentes de cada lote se envasaron en atmósfera modificada (30% CO<sub>2</sub>-70% N<sub>2</sub>) en bolsas tipo doypack sin líquido de gobierno. De cada lote se envasaron un total de 9 bolsas, con aproximadamente 30 aceitunas por bolsa. Todos los envases se mantuvieron a temperatura ambiente durante el estudio de almacenamiento, realizando muestreos a las 24 horas, 7 días y 14 días tras el envasado. Cada día de muestreo se realizaron análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales.

### **2.3. Determinaciones analíticas**

#### **2.3.1. CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES FORMADORAS DE RECUBRIMIENTOS**

Las determinaciones realizadas fueron pH, actividad de agua, reología, color y microbiología. El pH de las muestras se midió empleando un pH-metro Crison micropH 2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) con electrodo de punción. La actividad de agua se determinó empleando un higrómetro de punto de rocío Aqualab (4TEV, AquaLab). El comportamiento reológico de las emulsiones se analizó mediante un reómetro rotativo (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Karlsruhe, Alemania) con un sistema de sensores de cilindros coaxiales tipo Z34DIN Ti. Las curvas reológicas se obtuvieron después de un tiempo de estabilización de 5 min a 25 °C. El esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) se midió en función de la velocidad de cizallamiento ( $\dot{\gamma}$ ) de 0 a 512 s<sup>-1</sup>, utilizando 5 min para alcanzar la máxima velocidad de cizallamiento y otros 5 min para alcanzar una velocidad de cizallamiento nula. Se aplicó el modelo de ley de potencia para determinar el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n). El color de las emulsiones se midió empleando un espectrofotocolorímetro CM 3600-d (Minolta, Osaka, Japón) y utilizando el observador 10° e iluminante D65. La determinación se realizó introduciendo la muestra en una cubeta de plástico. Las emulsiones fueron medidas sobre fondo blanco y sobre fondo negro para comprobar la translucidez de las mismas. Se determinó las coordenadas de color L\*, a\* y b\*, y sus atributos de color: Luminosidad (L\*), tonalidad (h<sub>ab</sub>\*) y croma o pureza de color (C<sub>ab</sub>\*).

Se llevaron a cabo recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias, bacterias acidolácticas y mohos y levaduras. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se realizó mediante siembra en PCA (Agar Plate Count) y recuento tras 72

h de incubación a  $30\pm 1$  °C. Para el recuento de enterobacterias se empleó el medio VRBD (Agar Rojo de Violeta con Bilis y Dextrosa) mediante siembra en doble capa y realizando los recuentos tras incubación a  $37\pm 1$  °C durante 24-48h. En el recuento de bacterias acidolácticas se empleó el medio MRS (Man Rogosa Sharp) mediante siembra en doble capa incubando las placas a  $37\pm 1$  °C durante 72 h. El recuento de mohos y levaduras fue realizado empleando como medio de cultivo PDA (Agar Potato Dextrose) mediante siembra en superficie e incubación a  $20\pm 2$  °C durante 72 h. Todos los medios de cultivo empleados en el presente trabajo fueron suministrados por Scharlab, S.L. (Barcelona, España).

### 2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA Y ESTUDIO DE ALMACENAMIENTO

La caracterización fisicoquímica de las aceitunas empleadas como materia prima consistió en la determinación de pH,  $a_w$ , humedad, grasa, contenido en sal, acidez libre y sosa residual. Además, se determinó el color y parámetros de textura mediante ensayos de punción y de extrusión inversa. Se realizaron también análisis microbiológicos de la materia prima.

Al inicio del estudio se llevó a cabo una evaluación sensorial de los productos de aceitunas desarrollados. Para ello, se empleó un panel formado por 12 jueces entrenados que evaluaron los atributos de color, brillo, olor, firmeza al tacto y apreciación global del producto empleando una escala hedónica no estructurada de 8 cm. Además, se pidió a los catadores que ordenaran las muestras por orden de preferencia, indicando la característica que consideraron más importante en su elección.

Durante el estudio de almacenamiento, se analizó la composición del espacio de cabeza de los envases de aceitunas, así como las medidas de actividad de agua ( $a_w$ ), pH, humedad y grasa. También se llevaron a cabo las mismas determinaciones de textura, color, análisis microbiológicos y sensoriales realizadas sobre la materia prima.

El análisis de la composición del espacio de cabeza se realizó con un analizador de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Checkmate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca), perforando el film del envase con una aguja conectada al equipo. El pH,  $a_w$  y análisis microbiológicos se realizaron empleando los mismos procedimientos descritos para la caracterización de las emulsiones. La determinación del contenido en humedad y grasa se llevó a cabo según los métodos de la AOAC, 950.46 y 991.36, respectivamente (AOAC, 1997). Para determinar el contenido en sal de las aceitunas se determinó a partir del contenido en cloruros de la muestra, para ello se empleó a un analizador automático de cloruros Sherwood Ltd (Cambridge, England).

La determinación de la acidez libre y el contenido en sosa residual de las muestras se determinó utilizando un valorador Metrohm 905 titrando (Herisau, Suiza).

La determinación de las propiedades mecánicas de las aceitunas se llevó a cabo a través de un ensayo de punción y un ensayo de extrusión inversa. En ambos ensayos se empleó una prensa universal TA-XT2® (Stable Micro Systems, Surrey, UK). En el ensayo punción se utilizó émbolo cilíndrico de 2 mm de diámetro, programando el equipo hasta comprimir la muestra un 75% de su altura inicial a una velocidad constante de 1 mm/s. El valor obtenido de este ensayo fue la fuerza máxima necesaria para comprimir la muestra. En el ensayo de extrusión inversa se utilizó un disco de compresión de 35 mm de diámetro. Para cada ensayo, se depositaron cuidadosamente 4 aceitunas en recipientes cilíndricos de metacrilato (50 mm de



diámetro y altura 75 mm) y la muestra se comprimió a una velocidad constante de 2 mm/s hasta una deformación del 80% de su altura inicial. A partir de la curva fuerza-tiempo resultante se obtuvo el valor de fuerza máxima.

El color de las aceitunas se determinó con un fotocolorímetro Minolta Chroma Meter CM-3600d (Minolta, Osaka, Japón), observador 10° e iluminante D65. Se calcularon las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL\*a\*b (1976), L\*, a\* y b\*, y a partir de estos valores los valores de tono ( $h_{ab}^*$ ) y croma ( $C_{ab}^*$ ), así como la diferencia de color ( $\Delta E$ ), producidas a lo largo del periodo de almacenamiento respecto al color inicial de las aceitunas. Además, se determinó el índice de color de las aceitunas ( $i$ ) (Sánchez *et al.*, 1985) mediante la siguiente ecuación (1).

$$i = (4R_{635} + R_{590} - 2R_{560})/3 \quad (1)$$

## 2.4. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA simple para comprobar la existencia de diferencias significativas entre las muestras al inicio del estudio, tomando como variables cada uno de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos analizados. Con el objeto de evaluar el efecto del recubrimiento y del tiempo de almacenamiento, se llevó a cabo un ANOVA multifactor para cada uno de los parámetros evaluados. Se consideraron como factores el tipo de envasado y el tiempo de almacenamiento, así como la interacción entre ambos factores; y como variables los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos analizados. El procedimiento LSD (least significant difference) se utilizó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (Manugistics, Rockville, MD, USA).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Optimización de las formulaciones de los recubrimientos y establecimiento de las condiciones de aplicación.

A partir de las pruebas realizadas para seleccionar el tipo de recubrimiento más adecuado para su aplicación en las aceitunas de mesa se extrajeron los siguientes resultados respecto a las variables estudiadas.

Las concentraciones de alginato de 0,375%, 0,5% y 1% ensayadas se disolvieron fácilmente, formando correctamente la emulsión. Sin embargo, las emulsiones formuladas con un 2% de alginato resultaron excesivamente viscosas para una correcta aplicación. A partir de estos resultados, se consideró que la concentración de alginato al 1% sería la óptima para preparar una emulsión con relativa facilidad, y además permitiría incorporar una mayor cantidad de aceite a la misma comparado con las formulaciones de concentraciones más bajas de polímero.

Las emulsiones elaboradas con una concentración de HPMC entre un 3 y un 5% fueron excesivamente viscosas para su aplicación sobre las aceitunas. En cambio, las emulsiones formuladas con un 1% de HPMC presentaron unas características adecuadas para su aplicación y los recubrimientos obtenidos fueron adecuados visualmente.

La emulsión con 1% de HPMC y de alginato fue excesivamente viscosa para aplicarse con facilidad. La emulsión formulada con un 1,25% de HPMC y 0,75% de alginato dio lugar a un recubrimiento de aspecto no adecuado, formando una película heterogénea y blanquecina en la superficie de las aceitunas que se desprendía

fácilmente de la aceituna. La emulsión obtenida con la mezcla de 0,5% de HPMC y 0,5% de alginato presentó la mejor valoración visual, formando un recubrimiento homogéneo y estable sobre las aceitunas, siendo esta la formulación seleccionada para el estudio definitivo.

Las emulsiones elaboradas con ambos compuestos plastificantes presentaron una estabilidad similar; sin embargo, las formulaciones con glicerol presentaron mejor aspecto visual que las elaboradas con Tween-80.

El empleo de  $\text{CaCl}_2$  provocó la formación de grumos, independientemente del orden de aplicación de ambas disoluciones (alginato: $\text{CaCl}_2$  o  $\text{CaCl}_2$ :alginato). En el caso de la inmersión primero en la disolución de  $\text{CaCl}_2$  seguido de la aplicación de alginato, la formación de grumos fue mayor, formándose el gel principalmente en la cubeta y no sobre la aceituna. Estos resultados indican que el uso del  $\text{CaCl}_2$  no fue adecuado para este tipo de trabajo.

Tras los distintos ensayos, se descartaron las emulsiones con un 5% de aceite, ya que dieron lugar a emulsiones no estables, llegándose incluso a separar las fases durante el tiempo de desgasificación. Las emulsiones con un contenido en aceite del 3% fueron estables durante el tiempo necesario para su aplicación.

Se evaluó la aplicación de las emulsiones empleando un aerógrafo y mediante inmersión. Tras las diferentes pruebas se consideró que el método de inmersión era mejor para la formación de los recubrimientos, ya que este procedimiento era de fácil aplicación y además permitió obtener un recubrimiento más homogéneo en la superficie.

Se llevaron a cabo pruebas de inmersión durante 1, 2 y 5 min, No se observaron diferencias entre los diferentes tiempos de inmersión; sin embargo, ninguno de ellos consiguió formar un recubrimiento completo, por ello se seleccionó la aplicación de la emulsión en dos etapas de inmersión de 1 min consecutivas incluyendo una etapa de escurrido entre ellas de 45 s. Este modo de aplicación consiguió generar los mejores resultados, obteniendo un recubrimiento homogéneo y estable.

La incorporación de una etapa final de secado dio lugar a aceitunas con mejor aspecto que las aceitunas "sin secar", dando lugar a un producto con más brillo donde el recubrimiento era prácticamente inapreciable.

Debido a su mejor la estabilidad, fácil aplicación y mejor aspecto visual del film sobre el producto se seleccionaron las formulaciones de alginato 1% (con glicerol), HPMC 1% y una mezcla alginato 0,5%-HPMC 0,5%, todas ellas con un contenido total de aceite esencial de 3%. El método de aplicación seleccionado fue la inmersión directa de las aceitunas en la disolución formadora del film, empleando un proceso de inmersión en dos etapas, consistente en una primera inmersión de 1 min seguida de 45 s de escurrido y posteriormente 1 min de inmersión. Además, tras la aplicación del recubrimiento se realizó un secado para mejorar el aspecto visual.

### **3.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las emulsiones formadoras de recubrimientos seleccionadas**

Los resultados de los ensayos de color y reología realizados a en las emulsiones se muestran en la tabla 2.

**TABLA 2.** Coordenadas de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , cromía ( $C_{ab}^*$ ) y tono ( $h_{ab}^*$ ) y parámetros reológicos ( $n$  y  $k$ ) de las emulsiones (valor promedio  $\pm$  sd,  $n=3$ ).

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}^*$	$n$	$k$
<b>Alginato</b>	84,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,152 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	89,07 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,91 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>HMPc</b>	82,7 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	-0,67 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	7,58 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	7,61 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	95,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,84 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>Alginato - HMPc</b>	85,177 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	-1,038 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	2,751 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	2,940 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	110,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,85 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,29 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>
<b>p-valor</b>	***	***	***	***	***	**	***

ns: no significativo; \*  $<$  0,05; \*\*  $p <$  0,01; \*\*\*  $p <$  0,001

Como se aprecia en la tabla 2, las 3 emulsiones presentan altos valores de luminosidad y bajos valores de  $a^*$  y  $b^*$  lo que indica que las muestras presentan poca pureza de color. Los valores de tono indican que las emulsiones de alginato y HMPc presentan una tonalidad ligeramente amarilla y la emulsión de Alginato-HPMC una tonalidad amarillo-verdosa. En cuanto a la reología, todas las emulsiones presentan un comportamiento pseudoplástico, pues presentan un índice de comportamiento al flujo ( $n$ ) menor a 1. El índice de consistencia ( $k$ ) presenta diferencias entre las 3 emulsiones, siendo la emulsión de HMPc la más consistente y la emulsión de alginato la menos consistente de las 3.

En los recuentos microbiológicos realizados en las emulsiones no se encontró crecimiento microbiano. Estos resultados nos indicarían la calidad higiénica de las emulsiones y que la incorporación del film a la muestra empleando una adecuada manipulación no debería producir un aumento de la carga microbiana del producto respecto a la materia prima.

### 3.3. Caracterización fisicoquímica y microbiología de las aceitunas empleadas como materia prima

Los valores obtenidos en las determinaciones fisicoquímicas realizadas a las aceitunas rellenas de pimienta empleadas como materia prima se muestran en la tabla 3.

**TABLA 3.** Caracterización físico-química de la materia prima (valor promedio  $\pm$  sd,  $n=3$ ).

<b>Humedad (g H<sub>2</sub>O/100 g aceituna)</b>	73,0 $\pm$ 0,2
<b>Grasa (g grasa/100 g aceituna)</b>	13 $\pm$ 2
<b>Sal (g NaCl/100 g aceituna)</b>	4,39 $\pm$ 0,05
<b><math>a_w</math></b>	0,9570 $\pm$ 0,0006
<b>pH</b>	3,68 $\pm$ 0,03
<b>Acidez (g ácido láctico/100 g aceituna)</b>	0,68 $\pm$ 0,05
<b>Sosa residual (M<sub>NaOH</sub>)</b>	0,093 $\pm$ 0,006
Fuerza ensayo Extrusión inversa (N)	425 $\pm$ 56
Fuerza ensayo Punción (N)	4,7 $\pm$ 0,9
<b><math>L^*</math></b>	47 $\pm$ 1
<b><math>a^*</math></b>	3,6 $\pm$ 0,9
<b><math>b^*</math></b>	30 $\pm$ 3
<b>Tono (<math>h_{ab}^*</math>)</b>	83 $\pm$ 2
<b>Cromía (<math>C_{ab}^*</math>)</b>	30 $\pm$ 3
<b>Índice (i)</b>	20 $\pm$ 1

El contenido en humedad y grasa de las aceitunas fue del 73% y del 13%, respectivamente. Estos valores se corresponden con los obtenidos en otros estudios previos sobre aceitunas fermentadas (Ünal y Nergiz, 2003; Fernández-Díez, 1983), aunque podrían encontrarse diferencias respecto a otros estudios según el origen del fruto, el modo de preparación o el relleno empleado. El contenido en sal de las

aceitunas analizadas en este ensayo es cercano al 4,4%; este valor está dentro del límite establecido por la norma de calidad de las aceitunas de mesa (COI, 2004), que considera una cantidad de sal del 4% como valor mínimo en el caso de las aceitunas donde se van a adicionar conservantes o van a ser almacenadas en refrigeración. El contenido de sal en este tipo de producto puede ser también variable según el tipo de preparación, relleno y formato de presentación. Existen valores del contenido de sal en las aceitunas fermentadas estilo-español muy diferentes entre los diferentes valores consultados en bibliografía. Estos valores oscilan desde un contenido de sal inferior al 4% hasta valores que superan el 9% (Fernández-Díez, 1983; Montaña *et al.*, 2010; Ünal y Nergiz, 2003).

Los valores de  $a_w$  del producto son ligeramente inferiores a los dados por López-López *et al.* (2004). Estos autores analizaron aceitunas procedentes de diferentes variedades de aceitunas y rellenas con distintas preparaciones (almendras, pimiento natural, cebolla, ajo, avellanas, anchoa, queso, pastas de pimiento, salmón, atún, naranja y jalapeño, entre otros). En este estudio, se concluyó que los valores de  $a_w$  de las aceitunas rellenas estaban influenciados en mayor medida por el contenido de sal de la aceituna que por la variedad empleada o el relleno utilizado en cada caso.

El valor de pH de las aceitunas rellenas de pimiento empleadas en este trabajo se encuentra por debajo del valor máximo establecido por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2004). Según establece la norma comercial aplicable a las aceitunas de mesa, se considerará valor máximo de pH igual a 4,0 cuando el producto se conserva por sus propias características fisicoquímicas, mientras que, si las aceitunas van a ser sometidas a cualquier tratamiento térmico de conservación, como pasteurización o esterilización, este valor máximo de pH asciende hasta 4,3. Los valores de pH consultados en bibliografía para este tipo de aceituna se encuentran dentro de un amplio rango, con valores que oscilan desde 3,25 hasta 4,19 (Montaña *et al.*, 2010; López-López *et al.*, 2004; López-López *et al.*, 2007). El tipo de preparación empleada para la obtención de aceitunas fermentadas estilo español incluye un tratamiento alcalino con solución de NaOH para eliminar el sabor amargo de la aceituna verde, seguido de una etapa de lavado para eliminar el exceso de álcali y una etapa en salmuera, donde los frutos se someten a la fermentación típica por bacterias de ácido láctico (Fernández-Díez, 1983). El avance en el proceso de fermentación provoca un aumento progresivo en el contenido de ácido láctico en el producto y por tanto una reducción considerable de los valores de acidez, alcanzando valores de pH relativamente bajos, lo que favorece la conservación del producto y determina los atributos.

Respecto a los valores de acidez, los valores obtenidos están dentro del límite marcado por la norma de calidad que establece un valor mínimo de acidez titulable del 0,5 o 0,4% según el tipo de aceituna. Panagou *et al.* (2006), evaluaron aceitunas verdes de estilo español comercializadas a granel en Grecia. Estos autores encontraron que el valor medio de acidez titulable en estos productos fue 0,53%, inferior al encontrado en el presente trabajo. Los valores de acidez están ligados a las condiciones de procesado y también a las características de la materia prima. En este sentido, un menor contenido de azúcares en el fruto daría lugar a menores valores de acidez; diferentes autores han encontrado diferencias en los valores de acidez de las aceitunas de mesa entre las variedades Hojiblanca, Manzanilla y Gordal ocasionadas por variaciones en el contenido en azúcar del fruto (Montaña *et al.*, 2010).

Los valores de sosa o lejía residual se emplean como indicador de la capacidad tampón de las salmueras de fermentación. De esta forma, cuanto mayor es el valor de lejía residual, mayor será la cantidad de ácido necesaria para alcanzar un valor de

pH adecuado. Algunos autores han establecido como valor máximo para este parámetro 0,025N (Garrido *et al.*, 1997); sin embargo, los valores consultados en bibliografía son variables pudiendo llegar a ser hasta 10 veces superiores a los recomendados (Montaño *et al.*, 2010).

Las determinaciones de color indican que las muestras de aceitunas analizadas presentan una luminosidad media, una tonalidad amarillo-verdosa y valores bajos de pureza de color. En el caso de las aceitunas de mesa variedad “Manzanilla”, se considera que el mejor indicador cromático de la calidad de las aceitunas es el índice *i* por su correlación con la percepción visual del producto (Sánchez *et al.*, 1985). El índice *i* se considera un método rápido y sencillo para controlar el color de las aceitunas verdes aderezadas fermentadas. No existen referencias para este parámetro en aceitunas deshuesadas y rellenas; sin embargo, los valores obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos en otros estudios (Sánchez *et al.*, 2017) para aceitunas “Manzanilla” pasteurizadas y almacenadas en bolsas PET+MDPE/EVOH. Sánchez *et al.* (2017) indicaron que valores de  $i < 20$ , corresponden a muestras de aceitunas donde empieza a evidenciarse visualmente cierta decoloración del producto.

Respecto a la evaluación de las propiedades mecánicas del producto, es posible decir que la firmeza o fuerza máxima obtenida en los ensayos de punción fue superior a los valores obtenidos por otros estudios de aceitunas fermentadas estilo español (Cano *et al.*, 2015). La firmeza de las aceitunas de mesa no solo depende del procedimiento de elaboración y manipulación del producto, si no que podría estar influenciado por otros factores como el estado de madurez de la aceituna en el momento de recogida, variedad de aceituna y grado de humedad del fruto (Cano *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en los recuentos microbianos de la materia prima se recogen en la tabla 4.

**TABLA 4.** Valores de los recuentos microbiológicos de la materia prima (valor promedio  $\pm$  sd, n=3).

	Log ufc/g
<b>Mesófilos totales</b>	4,7 $\pm$ 0,2
<b>Bacterias acidolácticas</b>	4,1 $\pm$ 0,1
<b>Enterobacterias</b>	nd
<b>Mohos y levaduras</b>	4,2 $\pm$ 0,1

nd: no detectado ( $< 2$  log ufc/g)

En los análisis microbiológicos llevados a cabo a partir de las aceitunas rellenas de pimiento antes de la aplicación de los recubrimientos se observó crecimiento de mesófilos totales, bacterias acidolácticas, mohos y levaduras. Los recuentos microbianos obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos en otros estudios (Aponte *et al.*, 2010; Randazzo *et al.*, 2017; Ruiz-Bellido *et al.*, 2016). En general, durante la fermentación los microorganismos mayoritarios en este tipo de elaboración son las bacterias ácido lácticas con valores superiores entre 5-6 log ufc/g, cuyo papel en la preparación del producto es determinante. Las bacterias ácido-lácticas están presentes desde el inicio de la fermentación, independientemente de la variedad empleada, aunque la carga microbiana de estos microorganismos puede estar influenciada por la variedad de aceituna, condiciones de cultivo, recolección, etc. El hecho de que la población de bacterias ácido-lácticas sea superior a la de levaduras es un signo de que la fermentación procede adecuadamente (Sánchez *et*

*al.*, 2017). Únicamente al finalizar el proceso de fermentación los valores de los recuentos de mohos y levaduras podrían llegar a superar al de bacterias acidolácticas. Aponte *et al.* (2010) encontraron recuentos de mohos y levaduras cercanos a 2 log ufc/g al inicio de la fermentación alcanzando recuentos de 6 log ufc/g al finalizar el proceso. En los ensayos llevados a cabo por Randazzo (2017) y Ruiz-Bellido *et al.* (2016) los recuentos de mohos y levaduras fueron aumentando progresivamente durante el proceso de fermentación hasta alcanzar valores de 6 log ufc/g al finalizar la fermentación. En todos los casos, los recuentos de mohos y levaduras aumentan ligeramente a lo largo del proceso de fermentación, mientras que los de bacterias acidolácticas se mantienen o incluso llegan a reducirse. Este hecho lleva a muchos productores a incorporar sorbatos en el líquido de gobierno de las aceitunas, lo que combinado con los valores bajos de acidez de las salmueras consigue mantener la población de estos microorganismos dentro de un límite aceptable para el producto; sin embargo, esta práctica resulta imposible en el tipo de producto empleado en este estudio debido a la ausencia de líquido de gobierno en el envase.

En las aceitunas empleadas en este estudio no se observó desarrollo de enterobacterias, resultados que coinciden con algunos estudios de fermentación (Aponte *et al.*, 2010, Ruiz-Bellido *et al.*, 2016). Sin embargo, en los ensayos realizados por Randazzo *et al.* (2017) se encontraron valores en los recuentos de enterobacterias desde el primer día de fermentación. Este recuento de enterobacterias puede estar ocasionado por un pH en la salmuera elevado (superior a 5) o por una baja concentración salina (inferior al 6%), pues se ha demostrado que un pH reducido (Garrido *et al.*, 1997) así como una elevada concentración salina (Hurtado *et al.*, 2010) inhiben el crecimiento de enterobacterias.

### **3.4. Estudio de almacenamiento**

La caracterización físico-química de las aceitunas a distintos tiempos de almacenamiento se recoge en la tabla 5.

Se observa que la composición del espacio de cabeza de los envases no presentó variaciones durante el estudio de almacenamiento ( $p > 0,05$ ), lo que significa que el proceso de envasado de las muestras fue adecuado. Respecto a los valores de pH, todas las muestras presentaron una reducción significativa del pH a lo largo de su estudio de almacenamiento ( $p < 0,001$ ). Las muestras no recubiertas presentaron los mayores valores de pH y las muestras recubiertas con alginato-HPMC presentaron los valores más bajos de pH. Resultados similares se han observado en otros trabajos llevados a cabo para evaluar la viabilidad de los films para mantener la estabilidad de diferentes alimentos (Fagundes *et al.*, 2014; Valero *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

En cuanto a los valores de  $a_w$  de las aceitunas durante el periodo de estudio, se observaron valores de  $a_w$  significativamente superiores en las aceitunas recubiertas con alginato que en el resto de muestras ( $p < 0.001$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas entre el resto de muestras ni entre los distintos tiempos de almacenamiento.

Los resultados obtenidos en los análisis de humedad y grasa realizados mostraron que no hubo diferencias significativas entre las muestras sometidas a los diferentes tratamientos ni entre los distintos tiempos de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio de almacenamiento de aceitunas en atmósfera modificada (Dourtoglou *et al.*, 2005), donde se observó que el contenido en humedad y grasa no se vió afectado durante el almacenamiento. Sin embargo, estudios previos de almacenamiento de frutas recubiertas, en refrigeración, pero sin

envasar, con films de HPMC (Fagundes *et al.*, 2014; Valencia-Chamorro *et al.*, 2011) y films de alginato (Valero *et al.*, 2013) mostraron una mayor pérdida de peso en frutas sin recubrir que en las muestras recubiertas. Estos resultados podrían indicar el efecto protector de la atmósfera de envasado para evitar la pérdida de humedad del producto.

**TABLA 5.** Caracterización físico-química de las aceitunas recubiertas (valor promedio  $\pm$  sd, n=4).

	Tiempo (días)	% O <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>	pH	a <sub>w</sub>	Humedad (g/100 g producto)	Grasa (g/100g producto)	$\Delta E^*$	Fuerza extrusión inversa (N)	Fuerza punción (N)
Control	1			3,86 $\pm$ 0,03	0,954 $\pm$ 0,001	71,9 $\pm$ 0,2	15,7 $\pm$ 0,8	0	425 $\pm$ 56	4,7 $\pm$ 0,9
	7	0,0 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,2	3,71 $\pm$ 0,00	0,960 $\pm$ 0,004	70,5 $\pm$ 0,2	19 $\pm$ 3	0.371	374 $\pm$ 25	3,6 $\pm$ 0,9
	14	0,0 $\pm$ 0,0	29,0 $\pm$ 0,4	3,71 $\pm$ 0,01	0,956 $\pm$ 0,002	71,2 $\pm$ 0,1	14 $\pm$ 6	1.295	243 $\pm$ 46	3,4 $\pm$ 0,9
Alginato	1	0,3 $\pm$ 0,1	29,5 $\pm$ 0,3	3,85 $\pm$ 0,01	0,963 $\pm$ 0,001	72,7 $\pm$ 0,2	16,3 $\pm$ 0,3	0.693	377 $\pm$ 39	3,6 $\pm$ 0,5
	7	0,0 $\pm$ 0,0	28,9 $\pm$ 0,2	3,75 $\pm$ 0,01	0,962 $\pm$ 0,001	72,2 $\pm$ 0,4	14 $\pm$ 3	1.303	346 $\pm$ 12	3,8 $\pm$ 0,7
	14	0,0 $\pm$ 0,0	29,0 $\pm$ 0,4	3,69 $\pm$ 0,01	0,963 $\pm$ 0,001	72,5 $\pm$ 0,2	14 $\pm$ 6	0.829	332 $\pm$ 27	3,7 $\pm$ 0,6
HPMC	1	0,1 $\pm$ 0,0	29,8 $\pm$ 0,2	3,85 $\pm$ 0,01	0,9582 $\pm$ 0,002	71,6 $\pm$ 0,5	16,8 $\pm$ 0,6	0.793	357 $\pm$ 7	4,1 $\pm$ 0,9
	7	0,0 $\pm$ 0,0	29,3 $\pm$ 0,5	3,71 $\pm$ 0,01	0,959 $\pm$ 0,001	71,8 $\pm$ 0,3	14 $\pm$ 6	1.298	355 $\pm$ 22	5,0 $\pm$ 0,9
	14	0,0 $\pm$ 0,0	29,5 $\pm$ 0,1	3,69 $\pm$ 0,01	0,959 $\pm$ 0,001	71,8 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,6	0.482	315 $\pm$ 36	3,8 $\pm$ 0,5
Alginato-HPMC	1	0,1 $\pm$ 0,1	30,1 $\pm$ 0,2	3,79 $\pm$ 0,01	0,957 $\pm$ 0,001	72,6 $\pm$ 0,1	15,5 $\pm$ 0,2	0.598	400 $\pm$ 17	4,5 $\pm$ 0,8
	7	0,0 $\pm$ 0,0	29,1 $\pm$ 0,2	3,70 $\pm$ 0,01	0,958 $\pm$ 0,001	71,3 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 5	0.466	416 $\pm$ 20	5,1 $\pm$ 0,6
	14	0,0 $\pm$ 0,0	29,3 $\pm$ 0,2	3,67 $\pm$ 0,01	0,958 $\pm$ 0,001	71,4 $\pm$ 0,4	16,4 $\pm$ 0,7	0.599	372 $\pm$ 33	4,4 $\pm$ 0,8

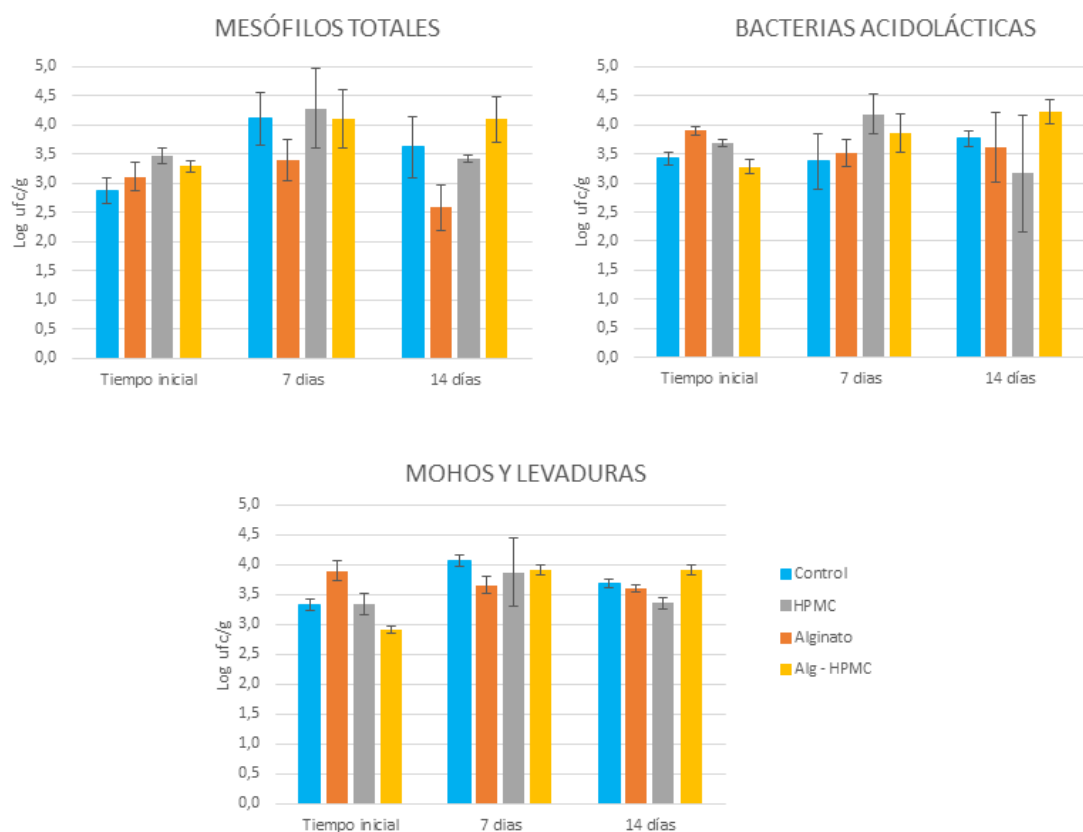
\* $\Delta E$ : diferencia de color calculada respecto a la materia prima.

En la evaluación del color de las aceitunas durante el almacenamiento se determinaron las componentes L\*a\*b\* así como el índice de color (i) y la diferencia de color de las aceitunas a cada tiempo respecto al color inicial ( $\Delta E$ ) (datos no mostrados). Las muestras no presentaron diferencias de color entre las muestras durante el estudio de almacenamiento ni respecto a la materia prima ( $p > 0,05$ ). Estudios previos sobre el cambio de color en frutas recubiertas con films de alginato (Valero *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2015) y films de HPMC (Fagundes *et al.*, 2014) mostraron como el uso de recubrimientos disminuye el cambio de color de las muestras. En otros estudios previos sobre almacenamiento de aceitunas sin líquido de gobierno (Dourtoglou *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2013) se comprobó que las coordenadas L\*, a\* y b\* permanecieron prácticamente constantes a lo largo del almacenamiento. Puesto que la atmósfera modificada ejerce un efecto protector en el color de las aceitunas, el uso de recubrimientos no supondría un beneficio extra para mantener el color de las mismas. Las principales causas del cambio del color en las aceitunas son transformaciones de clorofilas y carotenoides, alteraciones producidas durante la fermentación (Saúde *et al.*, 2017) y oxidaciones de compuestos fenólicos que producen colores pardos si no son tratadas con álcalis (Sánchez *et al.*, 2017). El efecto protector de la atmósfera modificada estaría asociado a la ausencia de oxígeno dentro del envase.

Se encontraron diferencias en cuanto a la firmeza de cada tipo de muestra ( $p < 0.001$ ) (tabla 5). Se observó cierta pérdida de firmeza durante el tiempo de almacenamiento ( $p > 0.001$ ) en todos los casos, siendo esta pérdida más acusada en el caso del control. Estos resultados parecen indicar que el uso de films mantiene la firmeza de las aceitunas durante el almacenamiento. El efecto positivo de los

recubrimientos de HPMC (Valencia-Chamorro *et al.*, 2011) y alginato (Valero *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2015) ha sido observado previamente en otros estudios. Este aspecto es interesante, ya que otros autores han evidenciado la pérdida de firmeza de las aceitunas (sin recubrir) durante su almacenamiento en atmósfera modificada (Argyri *et al.*, 2015).

Los recuentos de mesófilos totales, bacterias acidolácticas y mohos y levaduras se muestran en la figura 1.



**FIGURA 1.** Recuento de mesófilos totales, bacterias acidolácticas y mohos y levaduras durante en estudio de almacenamiento.

No hubo crecimiento de enterobacterias durante todo el estudio de almacenamiento en ninguno de los tratamientos evaluados, lo que indicaría las buenas prácticas de manipulación de las muestras durante la aplicación de los recubrimientos y las operaciones de llenado de los envases y el envasado en atmósfera modificada.

Se observaron diferencias significativas en la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos según el tipo de muestra ( $p < 0.001$ ). Las aceitunas recubiertas por la alginato presentaron los menores recuentos durante todo el estudio de almacenamiento, no observándose diferencias significativas entre el resto de muestras.

Respecto a los recuentos de bacterias acidolácticas, hay que indicar que la aplicación de los recubrimientos no supuso una mejora respecto a las muestras control, ya que no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. ( $p > 0.05$ ).



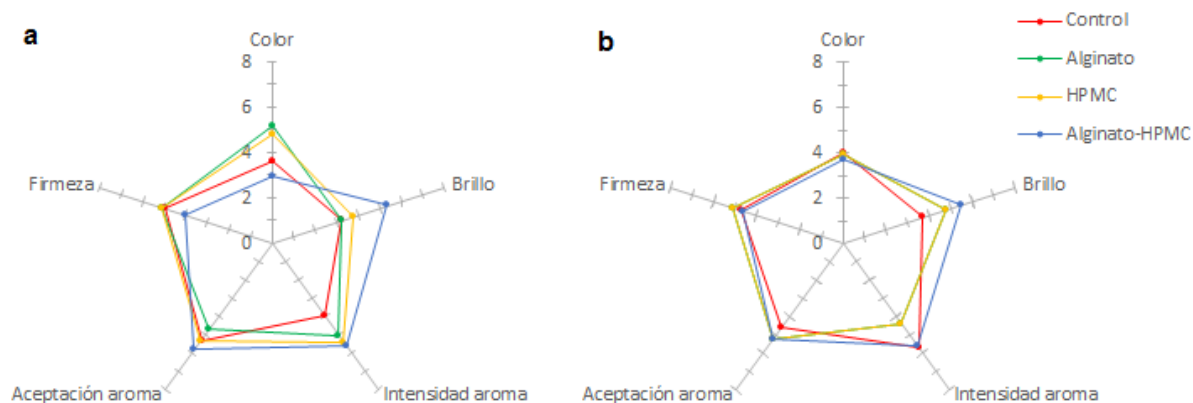
Hubo variaciones en los recuentos de mohos y levaduras durante el periodo de estudio ( $p < 0.01$ ). Las muestras recubiertas por HPMC (sólo o combinándolo con alginato) presentaron los menores recuentos de mohos y levadura durante el periodo de estudio. Sin embargo, la variabilidad observada en estos recuentos durante el estudio de almacenamiento, no permite asegurar que las formulaciones empleadas tengan un marcado efecto antimicrobiano

En ningún caso los recubrimientos con aceites esenciales consiguieron la inhibición del crecimiento microbiano, únicamente en el caso de los recubrimientos formulados con HPMC se observó un ligero efecto sobre el crecimiento de mohos y levaduras y en el caso de recubrimientos de alginato para mesófilos. El efecto de los AE sobre el crecimiento microbiano ha sido descrito por numerosos autores (Benavides *et al.*, 2016; Kykkidou *et al.*, 2009; Mantle *et al.*, 1998; Perdones *et al.*, 2016; Viuda-Martos *et al.*, 2008; Zivanovic *et al.*, 2005), sin embargo, la concentración de AE empleada en el presente trabajo no fue lo suficientemente elevada para conseguir evidenciar esta acción conservante. Hay que indicar que las concentraciones de AE empleadas en este trabajo se determinaron en base a un análisis sensorial previo, donde la concentración de aceite establecida fue la cantidad máxima que era aceptable por un panel de consumidores.

### **3.5. Evaluación sensorial**

Al inicio del estudio se realizó una evaluación sensorial de las aceitunas recubiertas y de la muestra control empleando una prueba de ordenación con el objetivo de establecer el nivel de aceptación de las muestras, así como establecer la influencia del tipo de recubrimiento sobre la preferencia hedónica del producto. Se emplearon también escalas de intensidad para la evaluación del brillo, intensidad de aroma, firmeza y color. En la valoración hedónica, las aceitunas recubiertas con HPMC y con alginato-HPMC presentaron mayores puntuaciones que las muestras recubiertas con alginato y las muestras control. En cuanto a la aceptación del aroma, las aceitunas con recubrimiento presentaron puntuaciones significativamente superiores a las muestras control, sin encontrarse diferencias según el tipo de recubrimiento, lo que indicaría que la selección de los diferentes aceites esenciales y la proporción de ellos en la emulsión fueron adecuadas. El análisis sensorial de la textura no reveló diferencias entre muestras. Estos resultados indicarían que la aplicación de recubrimientos con HPMC o con la mezcla de alginato-HPMC mejora la apariencia de las aceitunas de mesa y que la incorporación de aceites esenciales a los recubrimientos aporta un aroma apreciado por los catadores.

Durante el almacenamiento, los catadores evaluaron las muestras de aceitunas con y sin recubrimiento respecto a los atributos de aroma, color, brillo y firmeza empleando escalas cuantitativas. En esta evaluación, los jueces evaluaron los perfiles de intensidad de estos atributos con el objetivo de seguir la evolución sensorial de las muestras durante el almacenamiento en función de la formulación empleada. Los resultados obtenidos para los diferentes días de almacenamiento se muestran en la figura 2.



**FIGURA 2.** Puntuaciones promedio dadas por los catadores en los atributos evaluados en las aceitunas recubiertas con distintas emulsiones y en la muestra de control: (a) tras 7 días de almacenamiento; (b) tras 14 días de almacenamiento.

Las aceitunas recubiertas con la emulsión alginato-HPMC presentaron una puntuación en intensidad de brillo superior ( $p < 0.001$ ) al resto de muestras durante todo el estudio de almacenamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias entre muestras recubiertas respecto al resto de parámetros evaluados ( $p > 0.05$ ). Los resultados obtenidos en la evaluación sensorial mediante el uso de las escalas de intensidad y pruebas de ordenación mostraron que el recubrimiento de alginato-HPMC fue la formulación mejor valorado durante todo el periodo de almacenamiento.

#### 4. CONCLUSIONES

El uso de los recubrimientos estudiados no varía las propiedades fisicoquímicas de las aceitunas, pero evita la pérdida de firmeza asociada al almacenamiento de aceitunas sin líquido de gobierno.

El uso de recubrimientos comestibles de alginato, HPMC o alginato-HPMC no consiguió inhibir el crecimiento microbiano. A pesar de ello, el empleo de recubrimientos formulados alginato permitió ralentizar el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, sin embargo, la variabilidad observada en los resultados no permite establecer un efecto antimicrobiano para ninguna de las formulaciones.

Todas las aceitunas recubiertas fueron sensorialmente aceptables, especialmente los recubrimientos de alginato-HPMC mejoran el brillo y la aceptación general.

La aplicación de los recubrimientos evaluados en el presente trabajo ha conseguido mantener las características fisicoquímicas del producto durante su almacenamiento; sin embargo, nuevas experiencias deben realizarse para mejorar la estabilidad microbiológica durante un periodo más prolongado. El uso de recubrimientos comestibles en las aceitunas de mesa es una estrategia interesante para incorporar aceites esenciales en este tipo de alimento con el fin de obtener aceitunas aromatizadas que van a ser comercializadas sin líquido de gobierno.

#### 5. REFERENCIAS

A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.

- Akcan, T., Estévez, M., & Serdaroğlu, M. (2017). Antioxidant protection of cooked meatballs during frozen storage by whey protein edible films with phytochemicals from *Laurus nobilis* L. and *Salvia officinalis*. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 323-331.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., & Moschetti, G. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food microbiology*, 30(1), 8-16.
- Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., ... & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food microbiology*, 27(1), 162-170.
- Argyri, A. A., Nisiotou, A. A., Pramateftaki, P., Doulgeraki, A. I., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2015). Preservation of green table olives fermented with lactic acid bacteria with probiotic potential under modified atmosphere packaging. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 783-790.
- ASEMESA (2011). Table olives consumers' profile in Spain. Disponible en: [www.asesmesa.es](http://www.asesmesa.es). [Consulta: 12/07/2017]
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., & Mohd Adzahan, N. (2012). Optimization of alginate and gellan-based edible coating formulations for fresh-cut pineapples. *International Food Research Journal*, 19(1).
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food chemistry*, 204, 77-83.
- Cano-Lamadrid, M., Girón, I. F., Pleite, R., Burló, F., Corell, M., Moriana, A., & Carbonell Barrachina, A. A. (2015). Quality attributes of table olives as affected by regulated deficit irrigation. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 19-26.
- COI (2004). Norma de calidad Aplicacable a las aceitunas de mesa. Res-2/91-IV/04. OOC, Madrid.
- COI (2016). Disponible en: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures> [Consulta: 12/07/2017]
- Dourtoglou, V. G., Mamalos, A., & Makris, D. P. (2006). Storage of olives (*Olea europaea*) under CO<sub>2</sub> atmosphere: Effect on anthocyanins, phenolics, sensory attributes and in vitro antioxidant properties. *Food chemistry*, 99(2), 342-349.
- Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A. R., & Pérez-Gago, M. B. (2014). Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. *Postharvest biology and technology*, 92, 1-8.
- Fernández-Anchuela, A. H. (2010). Estudio de la microbiota asociada al proceso de fermentación de las aceitunas arbequinas de mesa. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili.
- Fernández-Diez, M.J. (1983). Olives. In G. Reed: Food and feed production with microorganisms. Verlag.Chemie, (Eds.), Deerfield Beach, Fla.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food chemistry*, 102(3), 898-904.
- Garrido Fernandez, A., Fernandez-Diez, M. J., & Adams, M. R. (1997). Table Olives: Production and Processing. CHAPMAN & HALL. Production and Processing. Springer, 495, 1-10.
- Ghidelli, C., Mateos, M., Rojas-Argudo, C., & Pérez-Gago, M. B. (2015). Novel approaches to control browning of fresh-cut artichoke: Effect of a soy protein-based coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest biology and technology*, 99, 105-113.
- Ghidelli, C., Mateos, M., Rojas-Argudo, C., & Pérez-Gago, M. B. (2014). Extending the shelf life of fresh-cut eggplant with a soy protein–cysteine based edible coating and modified atmosphere packaging. *Postharvest biology and technology*, 95, 81-87.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food chemistry*, 116(4), 982-989.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozès, N. (2010). Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. Arbequina natural green olives. *Food microbiology*, 27(6), 731-740.
- Jouki, M., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Koocheki, A. (2014). Characterization of antioxidant–antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate polymers*, 99, 537-546.
- Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 115(1), 169-175.
- López, A., Garrido, A., Montañó, A., 2007. Proteins and amino acids in table olives: relationship to processing and commercial presentation. *Ital. J. Food Sci.* 19, 217–228.

López-López, A., 2006. Composición y valor nutricional de la aceituna de mesa. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

López-López, A., García-García, P., Durán-Quintana, M.C., Garrido-Fernández, A., 2004. Physicochemical and microbiological profile of packed table olives. *J. Food Prot.* 67, 2320–2325.

López-López, A., Jiménez-Araujo, A., García-García, P., Garrido-Fernández, A., 2007. Multivariate analysis for the evaluation of fiber, sugars, and organic acids in commercial presentations of table olives. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10803–10811.

Mantle, D., Anderton, J. G., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P., & Perry, E. K. (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121(4), 385-391.

MAPAMA (2016). Diagnóstico sobre el sector de la aceituna de mesa en España. Disponible en: [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/160427diagnosticoaceituna demesadefinitivo\\_tcm7-419526.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/160427diagnosticoaceituna demesadefinitivo_tcm7-419526.pdf) [Consulta: 12/07/2017]

Montaño, A., Sanchez, A. H., Lopez-Lopez, A., De Castro, A., & Rejano, L. (2010). Chemical composition of fermented green olives: acidity, salt, moisture, fat, protein, ash, fiber, sugar, and polyphenol. *Olives and olive oil in health and disease prevention*, 291-297.

Moufida, S., & Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62(8), 1283-1289.

Ojagh, S. M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin–lignin film. *Food chemistry*, 125(2), 595-606.

Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest biology and Technology*, 50(1), 87-94.

Ou, C.Y., Tsay, S.F., Lai, C.H., Weng, Y.M., 2002. Using gelatin-based antimicrobial edible coating to prolong shelf-life of tilapia fillets. *J. Food Qual.* 25, 213–222

Panagou, E. Z. (2006). Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20 C. *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 323-330.

Perdones, Á., Chiralt, A., & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57, 271-279.

Pereira, A. P., Pereira, J. A., Bento, A., & Estevinho, M. L. (2008). Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects. *Food and chemical toxicology*, 46(8), 2895-2902.

Perez-Gago, M. B., Serra, M., & Del Rio, M. A. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), 84-92.

Raeisi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., & Behnampour, N. (2016). Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, *Cinnamomum zeylanicum*, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration. *International journal of food microbiology*, 238, 139-145.

Ramírez, E., Medina, E., García, P., Brenes, M., & Romero, C. (2017). Optimization of the natural debittering of table olives. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 308-313.

Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., & Caggia, C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of *Nocellara Etnea* table olives. *Food Microbiology*, 65, 136-148.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2008). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3), 313-327.

Real Decreto 679/2016. Boletín Oficial del Estado. Madrid, España, 16 de diciembre de 2016.

Rojas-Argudo, C., Del Río, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2009). Development and optimization of locust bean gum (LBG)-based edible coatings for postharvest storage of 'Fortune' mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 227-234.

Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest biology and Technology*, 45(2), 254-264.

Ruiz-Bellido, M. A., Romero-Gil, V., García-García, P., Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., & Garrido-Fernández, A. (2016). Assessment of table olive fermentation by functional data analysis. *International journal of food microbiology*, 238, 1-6.

- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, 91(4), 621-632.
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74-84.
- Sánchez, A. H., de Castro, A., López-López, A., Cortés-Delgado, A., Beato, V. M., & Montaña, A. (2017). Retention of color and volatile compounds of Spanish-style green table olives pasteurized and stored in plastic containers under conditions of constant temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 685-691.
- Sánchez, A. H., Rejano, L., & Montaña, A. (1985). Determinaciones del color en las aceitunas verdes aderezadas de la variedad Manzanilla. *Grasas y aceites*, 36, 258-261.
- Sánchez, A. H., Romero, C., Ramírez, E., & Brenes, M. (2013). Storage of mechanically harvested Manzanilla olives under controlled atmospheres. *Postharvest biology and technology*, 81, 60-65.
- Sanchís, E., González, S., Ghidelli, C., Sheth, C. C., Mateos, M., Palou, L., & Pérez-Gago, M. B. (2016). Browning inhibition and microbial control in fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) by apple pectin-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 186-193.
- Saúde, C., Barros, T., Mateus, T., Quintas, C., & Pires-Cabral, P. (2017). Effect of chloride salts on the sensory and nutritional properties of cracked table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *Food Bioscience*.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food control*, 18(5), 409-413.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate polymers*, 137, 360-374.
- Ünal, K., & Nergiz, C. (2003). The effect of table olive preparing methods and storage on the composition and nutritive value of olives. *Grasas y Aceites*, 54(1), 71-76.
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Del Rio, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2011). Performance of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)-lipid edible coatings with antifungal food additives during cold storage of 'Clemenules' mandarins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2342-2348.
- Valero, D., Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Serrano, M. (2013). Effects of alginate edible coating on preserving fruit quality in four plum cultivars during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 1-6.
- Vargas, M., Albors, A., & Chiralt, A. (2011). Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. *Procedia Food Science*, 1, 39-43.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, 85(3), 568-576.
- Zapata, P. J., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., & Serrano, M. (2008). Use of alginate or zein as edible coatings to delay postharvest ripening process and to maintain tomato (*Solanum lycopersicon* Mill) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1287-1293.
- Zhang, Y., Ma, Q., Critzer, F., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2015). Effect of alginate coatings with cinnamon bark oil and soybean oil on quality and microbiological safety of cantaloupe. *International journal of food microbiology*, 215, 25-30.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1).