

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL



APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A BASE DE ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA
LA MEJORA DE LA CONSERVACIÓN DE PAN

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

AUTOR:

Rafael Mateo Talavera

DIRECTOR:

Maite Cháfer Náchter

CODIRECTOR:

Chelo González Martínez, Clara Pastor Navarro

Valencia, Julio 2015

Resumen

La conservación de panes comerciales implica grandes pérdidas relacionados con el ataque hongos. Para evitar el deterioro fúngico, la industria alimentaria requiere del uso de aditivos de síntesis. Las preferencias actuales del mercado tienden a buscar alternativas de conservación a estos químicos a través de productos naturales que pueden tener además otras funciones una vez incorporados al alimento. En este sentido, el presente trabajo pretende evaluar la funcionalidad de la incorporación de antimicrobianos naturales en la mejora de la conservación y calidad de panes comerciales. Para ello se evaluará la viabilidad y efectividad de diferentes antimicrobianos incorporadas a dispersiones capaces de formar recubrimientos en estudios in vitro y también aplicados sobre las superficies de los panes.

Agradecimientos

Son muchas las personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de este trabajo y me gustaría agradecerélos.

En primer lugar a Maite Cháfer por darme la oportunidad de realizar el trabajo fin de grado en este grupo de desarrollo, e introducirme en el mundo de la investigación científica. También dar las gracias a Chelo Gonzalez por su involucración en el trabajo.

Muchas gracias Clara Pastor, por compartir y soportar estos largos meses de trabajo, tanto los momentos difíciles, cuando no entendíamos porque nada iba bien, como esos buenos momentos cuando hemos visto resultados, ha sido un verdadero placer. También dar las gracias Neus Bernat por la idea del trabajo, por introducirme a la investigación científica y por enseñarme todo en un inicio.

También dar las gracias a los compañeros del laboratorio por todo este tiempo de realización del trabajo, donde me habéis ayudado ofreciéndome tanto consejo, como optimismo, todo ello acompañado de una muy buena atmosfera donde trabajar.

Por último, todo esto no habría sido posible sin el apoyo recibido por mis familiares y mis amigos que a pesar de no haber contribuido presencialmente a la realización del trabajo me han permitido llegar hasta aquí. Gracias especialmente a mis padres y a mi hermano por apoyarme cada día a lo largo de mi vida y por facilitarme este último año.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Justificación e interés del trabajo	Pag 1
I.2. Almidones	Pag 2
I.2.1. Composición y estructura de los almidones	Pag 2
I.2.2. Films de almidón: obtención y propiedades	Pag 3
I.3. Adición de compuestos a los films	Pag 4
I.3.1. Aceites esenciales. Canela y orégano	Pag 5
I.3.2. Bacterias ácido lácticas	Pag 8
I.4. Pan y alteraciones en la industria panadera	Pag 9
I.4.1. <i>Aspergillus</i>	Pag 10
I.4.2. <i>Penicillium</i>	Pag 12
II. OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO	Pag 14
II.1. Objetivos	Pag 14
II.2. Plan de trabajo	Pag 14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	Pag 15
III.1. Materias primas	Pag 15
III.2. Preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	Pag 16
III.3. Caracterización microbiológica	Pag 16
III.3.1. Preparación de la suspensión del hongo e incorporación a las FFRs	Pag 16
III.3.2. Ensayo <i>In vitro</i>	Pag 17
III.3.3. Ensayo <i>in vivo</i>	Pag 17
III.4. Caracterización de calidad de los panes	Pag 19
III.4.1. Pérdida de peso	Pag 19
III.4.2. Propiedades mecánicas	Pag 19
III.5. Análisis estadístico	Pag 19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	Pag 20
IV.1. Caracterización microbiológica in vitro	Pag 20
IV.1.1. Actividad antifúngica de las FFRs con aceites esenciales	Pag 20
IV.1.2. Actividad antifúngica de las FFRs con la disolución Lr	Pag 22
IV.2. Caracterización microbiológica in vivo	Pag 22
IV.2.1. Control de <i>A. niger</i> y <i>P. expansum</i> en panes con FFR de almidón y aceites esenciales	Pag 22
IV.2.2. Control de <i>A. niger</i> y <i>P. expansum</i> en panes con FFR de almidón y disolución Lr	Pag 26
IV.3. Caracterización de calidad de los panes	Pag 27
V. CONCLUSIONES	Pag 29
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag 30

VII. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Molécula de almidón.

Figura I.2. Planta de canela y aceite esencial de canela.

Figura I.3. Planta de orégano y aceite esencial de orégano.

Figura I.4. Conidióforos de *Aspergillus* y estructura.

Figura I.5. *A. niger* inoculado en PDA y crecimiento en pan.

Figura I.6. Conidióforos de *Penicillium* y estructura.

Figura I.7. *P. expansum* inoculado en PDA y crecimiento en pan.

Figura III.1. Tabla nutricional y composición de los panes de leche industriales.

Figura III.2. Panes preparados para el proceso de inmersión en la formulación formadora de recubrimiento (FFR).

Figura IV.1. Nivel de crecimiento de los hongos *A. niger* y *P. expansum*, e imágenes representativas en las muestra control con FFR de almidón puros y FFR de almidón con los aceites esenciales de canela y orégano.

Figura IV.2. Nivel de crecimiento de los hongos *A. niger* y *P. expansum*, e imágenes representativas en las muestras control con films de almidón puros y en los films de almidón con disolución Lr a los 14 días.

Figura IV.3. Panes infectados con *A. niger*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

Figura IV.4. Panes infectados con *P. expansum*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

Figura IV.5. Panes infectados recubiertos con FFR de almidón y disolución Lr con *A. niger* y *P. expansum*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

VIII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Clasificación de los componentes de los films biodegradables.

Tabla I.2. Aceites esenciales, componentes principales y actividad antimicrobiana.

Tabla I.3. Aplicaciones de films con aceites esenciales para el control microbiano en la conservación de diferentes alimentos.

Tabla I.4. Componentes principales aceite esencial de corteza de canela

Tabla I.5. Componentes principales aceite esencial de orégano.

Tabla IV.1. Pérdidas de peso de los panes durante el almacenamiento.

Tabla IV.2 Variación de la fuerza necesaria para provocar una deformación en los panes en función del tiempo

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Justificación e interés del trabajo

Durante los últimos años existe un interés creciente de la industria alimentaria por encontrar formas y métodos más naturales para la conservación de alimentos. En los últimos años, se han identificado numerosos compuestos bioactivos naturales con capacidad antimicrobiana como aceites esenciales, extractos de plantas o microorganismos (Burt et al., 2003). Los principales problemas de estos compuestos son el coste, la baja persistencia y/o la sensibilidad a las condiciones ambientales tras su aplicación. En este sentido, la incorporación de estos compuestos junto con matrices-soporte comestibles de bajo coste, permitiría aumentar su persistencia tras la aplicación y, en consecuencia, asegurar el éxito del control, abaratando los costes de aplicación al reducir la dosis necesaria efectiva de compuesto bioactivo (Kester y Fennema, 1986).

La aplicación de recubrimientos comestibles (RC) ofrece grandes posibilidades, ya que permite la selección de componentes adaptados a las necesidades del alimento y a las exigencias de los consumidores. En el caso de la industria de la panificación, los principales problemas de deterioro son de tipo fúngico, lo que hace necesario el uso de químicos de síntesis para conseguir una conservación de bajo coste. Estos problemas aparecen, en primer lugar, en la superficie del producto, por lo que la aplicación de RC con capacidad antifúngica sería una buena alternativa para el control de éste deterioro (Soares et al., 2002).

Los componentes de estos RC deberán ser compatibles con el tipo de alimento y con el tipo de antifúngico, a la vez que tener un coste asumible en condiciones prácticas de aplicación. Desde este punto de vista, los almidones reúnen estos requisitos para su aplicación a panes (Kester y Fennema, 1986). En cuanto a los componentes bioactivos, en los últimos años la Industria de Alimentos está centrando sus esfuerzos en encontrar estrategias de conservación más saludables para el consumidor y respetuosas con el medio ambiente. En este sentido, la incorporación de microorganismos en los recubrimientos, que limiten el crecimiento de otros no deseados y produzcan metabolitos con carácter antimicrobiano que permitan alargar la vida útil de productos alimentarios, se presenta como una alternativa viable. En cuanto a antifúngicos naturales alternativos y de probada eficacia, resultaría muy interesante la aplicación de aceites esenciales de plantas. El presente trabajo aborda la selección de estos compuestos, tanto de los RC como los bioactivos, para el diseño de productos de aplicación a la industria panaria, garantizando una conservación natural y saludable.



I.2. Almidones

I.2.1. Composición y estructura de los almidones

Dentro de los polisacáridos los que más potencial de uso y aplicaciones tienen, por su alta disponibilidad y bajo coste, son los almidones. Los films de almidón presentan muy baja permeabilidad al oxígeno (Dole et al., 2004), pero presenta la desventaja de ser muy hidrofílicos y de tener pobres propiedades mecánicas. Además, los almidones de los films son inestables ya que cambian sus propiedades físicas a lo largo del tiempo, debido a la re-organización de sus moléculas o retrogradación (Rindlav et al., 1998).

La estructura del almidón (Figura I.1.) consiste en dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), en el cual pueden estar presentes algunos enlaces α (1-6). Esta molécula es soluble en agua, formando micelas hidratadas por su capacidad para formar puentes de hidrógeno, generando una conformación helicoidal (Knutzon y Grove, 1994). La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4), y en un 4-6% con uniones α (1-6). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15 o 25 unidades de glucosa. La característica principal de la amilopectina, es que es sólo parcialmente soluble en agua caliente (Guan y Hanna, 2004; Hernández-Medina et al., 2008). Los gránulos de almidón son un sistema polimérico semicristalino, donde la cristalinidad varía de 15 a 45%, y es atribuida a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, que forman dobles hélices, organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Zobel, 1988; Eerling y Delcour, 1995).

Las propiedades comercialmente significativas del almidón, tales como su resistencia mecánica y flexibilidad, dependen de la resistencia y carácter de la región cristalina, que a su vez es función de la relación de amilosa y amilopectina, y por lo tanto del origen del almidón, de la distribución de pesos moleculares, del grado de ramificación y de la conformación de cada componente de polimérico (Ruiz, 2006).

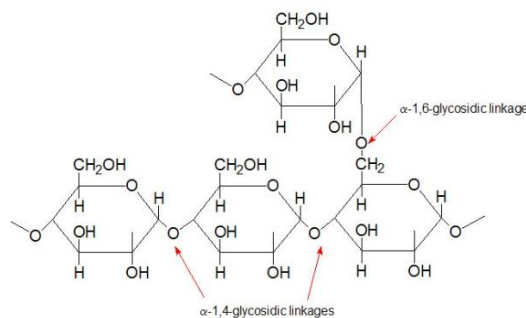


Figura I.1. Molécula de almidón

I.2.2. Films de almidón: obtención y propiedades

Las películas o films de almidón (también denominados recubrimientos), se pueden obtener por dos métodos: vía húmeda y vía seca (Romero-Bastidas et al., 2005). En el primero se ha de preparar una dispersión de almidón y someterla a calentamiento para inducir la gelatinización. La dispersión gelatinizada se extiende sobre una superficie nivelada (casting) y se seca en condiciones controladas de humedad y temperatura. Cuando se trata de procesos en seco se usan materias primas de propiedades termoplásticas que puedan ser moldeados, por procesos térmicos o mecánicos con la ayuda de plastificantes, para que los materiales obtenidos no presenten fragilidad a temperatura de ambiente (Forsell et al., 1997). El almidón gelatinizado en el que se incorpora un plastificante tiene propiedades termoplásticas (TPS) y puede, por tanto, tratarse como otros termoplásticos (Pagelle et al., 2002).

En la formación de films de almidón se producen dos fenómenos: la gelatinización y la desestructuración. La gelatinización, se define como la pérdida de la cristalinidad de los granos de almidón en presencia de calor y altas cantidades de agua, con muy poca o ninguna despolimerización. En el proceso de gelatinización, el orden molecular dentro de los gránulos es destruido gradual e irreversiblemente. Durante la gelatinización el agua penetra inicialmente en las regiones amorfas produciéndose el hinchamiento del gránulo, asociado a una disminución de la birrefringencia. Luego el agua difunde de las cadenas de almidón a la superficie de los cristales a medida que la temperatura aumenta, provocando la movilidad térmica de las moléculas y su solvatación, favorecida por las fuerzas de hinchamiento. Todo ello provoca una disminución de la cristalinidad, por el desenrollado de las dobles hélices, hasta que la estructura granular es fragmentada casi completamente, obteniéndose una solución-gel (Ruiz, 2006). La pasta de almidón obtenida después de la gelatinización no es estable, porque en el almacenamiento se producen reorganizaciones estructurales que constituyen el llamado proceso de retrogradación.

La formación de films de almidón requiere de la gelatinización previa para la liberación de los polímeros del gránulo y su reasociación para formar la matriz del film. Una vez terminado el proceso de gelatinización el siguiente paso para la formación de un film, es la homogenización, con equipos como un rotor- estator (Jiménez et al., 2012).

En la formación de films de almidón se produce la desestructuración del gránulo, que es el proceso de transformación del almidón semicristalino en una matriz homogénea de polímero con la ruptura de los puentes de hidrogeno entre las moléculas de almidón y la despolimerización parcial de las moléculas. La amilopectina se despolimeriza inicialmente y luego también la amilosa con la aplicación de mayor energía (Gaudin et al., 1999; Chang et al., 2006). La desestructuración también puede ocurrir cuando se aplica calor. El aumento de temperatura incrementa la solubilidad del almidón en agua produciéndose una despolimerización significativa alrededor de los 150°C, sin embargo, solamente por encima de 190°C puede confirmarse el incremento de la solubilidad. Cuando se aumenta el contenido de humedad de la mezcla disminuye el grado de desestructuración (Ruiz, 2006).

I.3. Adición de compuestos a los films

Los films pueden modificar sus propiedades con la adición de componentes a su formulación. Se trata de sistemas multicomponente (Tabla I.1) y están formados por dos grupos de compuestos, los mayoritarios (almidones, celulosas, proteínas o polímeros derivados del petróleo) y los minoritarios (lípidos, antioxidantes o compuestos antimicrobianos). Estos pueden dotar a los films de actividad antimicrobiana, antioxidante o mejorar las características generales de éste (Kester y Fennema, 1986).

Tabla I.1. Clasificación de los componentes de los films biodegradables (Palanca, 2014).

MAYORITARIOS		MINORITARIOS	
NATURALES	SINTESIS QUÍMICA		
*POLISACÁRIDOS Almidón Celulosa Quitano	*DE BIOMASA PLA *DE PETROQUÍMICOS PCL	*LÍPIDOS Acidos Grasos Ceras	*ANTIMICROBIANOS Aceites Esenciales Bacteriocinas
*PROTEINAS Caseínas Gluten de trigo	PVA PGA	*PLASTIFICANTES Glicerol Polietilenglicol	*ANTIOXIDANTES Resveratrol
*EMULSIONANTES			
SISTEMAS MULTICOMPONENTES			

Las características deseables que se deben tener en cuenta a la hora de incorporar componentes a la dispersión formadora de film son las siguientes (Kester y Fennema, 1986):

- Libres de tóxicos, ya que van a ser utilizados en productos alimentarios con distintos fines
- Elaboración sencilla, debido a que en el entorno alimentario industrial no es viable utilizar un método que conlleve una gran dificultad en su producción y aplicación.
- Bajo coste de materiales y proceso de producción.
- Baja permeabilidad al vapor de agua para evitar pérdida o ganancia de humedad, que a su vez puede modificar la textura, generando un rechazo por el consumidor.
- Permeabilidad selectiva a gases y volátiles, que pueden influir en gran medida en la estabilidad de alimentos sensibles especialmente a la oxidación.
- Resistencia mecánica, flexibilidad.

En cambio las siguientes características pueden considerarse deseables o no en función del objetivo y utilización del film (Kester y Fennema, 1986):

- Actividad antimicrobiana
- Insípidos e inodoros para no alterar las propiedades organolépticas de los alimentos.
- Incoloros y transparentes.

I.3.1 Aceites esenciales (AE)

Las plantas sintetizan los aceites esenciales en su superficie para protegerse de enfermedades e infecciones que les afectan, ahuyentar a los insectos depredadores y atraer a los beneficiosos (polinizadores). Estos aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad en numerosas aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos, fármaco, etc. A pesar de que la industria alimentaria ha utilizado los AE como saborizantes, en la actualidad su capacidad antimicrobiana ha centrado el interés por su alto potencial. Los AE contienen un 85-99% de sustancias volátiles y un 1-15% de componentes no volátiles. La parte volátil está constituida principalmente por terpenos, terpenoides y otros compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Sánchez-González et al., 2011).

Numerosas investigaciones (Tablas I.2 y I.3) han demostrado que los componentes de estos aceites esenciales son capaces de ejercer una acción bactericida o bacteriostática a partir de diferentes concentraciones, y en algunos casos también antifúngica como se muestra en la Tabla II para estudios *in vitro*. También se ha encontrado una buena efectividad antimicrobiana cuando estos aceites se incorporan junto a matrices poliméricas formadoras de film en aplicaciones a diferentes alimentos (Tabla I.3).

A pesar de los numerosos estudios sobre AE, su mecanismo de acción todavía no está claro. Todo indica que la clave de su actividad es su hidrofobicidad ya que los terpenos, componentes mayoritarios de los AE, tienen la habilidad de insertarse entre los lípidos que constituyen la membrana bacteriana provocando la desnaturalización de las proteínas y, consecuentemente, destruyendo la membrana celular (Turina et al., 2006). En general los AE parecen ser más efectivos frente a Bacterias Gram + que frente a Gram -, ya que su membrana celular es más sencilla (Holley et al., 2005)

Por otro lado, en el caso de las células eucariotas como es el caso de los hongos, el daño se produce a nivel de la membrana mitocondrial. Los AE provocan su despolarización disminuyendo el potencial transmembrana y aumentando la permeabilidad de la membrana a través de los canales iónicos y de la bomba de protones (Sánchez-González et al., 2011). Cabe mencionar que la actividad antimicrobiana de los AE no se puede atribuir a un único componente mayoritario, sino que se al tratarse de mezclas muy complejas, su actividad antimicrobiana es el resultado de una sinergia entre todos sus componentes. Numerosos estudios corroboran que los AE son significativamente más efectivos que sus componentes principales aislados (Gill et al., 2002, Mourey et al., 2002).

Tabla I.2. Aceites esenciales, componentes principales y actividad antimicrobiana (adaptada de Sánchez-González et al., 2011).

Aceites esenciales	Componentes mayoritarios	Propiedades antifúngicas	Referencias bibliográficas
Bergamota	Limonelo, Linalol	<i>Penicillium digitatum</i>	Fusher y Philips (2006), Mantle et al. (1998), Moufida y Mazkoug (2003)
Canela	Cinamaldehido	<i>Aspergillus</i>	Goñi et al. (2009), Mantle et al. (1998)
Cilantro	Linalol	<i>Saccharomyces</i>	Delanquis et al. (2002), Msaada et al. (2007)
Clavo	Eugenol, Acetato de eugenol	<i>Aspergillus</i>	Wenquiang et al. (2007), Goñi et al. (2009)
Limón	Limonelo, Valenceno, Ocimeno	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	Mantle et al. (1998), Moufida y Mazkoug (2003)
Orégano	Carvacrol, Timol, Terpenos	<i>Rhodotorula, Botrytis, Fusarium</i>	Souza et al. (2007), Zivanovic et al. (2005)

Tabla I.3. Aplicaciones de films con aceites esenciales para el control microbiano en la conservación de diferentes alimentos.

Polisacárido o plástico	Aceite Esencial	Microorganismo	Alimentos	Referencia
Quitosano	Bergamota, tomillo y té verde	<i>Penicillium italicum</i>	Naranjas	Cháfer et al., 2012
Gliadina	Cinamaldehido	<i>Aspergillus Niger</i>	Pan	Balaguer et al. 2013
Polietileno/Celulosa	Orégano	Enterobacterias, levaduras y bacterias Lacticas	Carne de pollo	N. Oral et al. 2009
Hidroxipropilmetil- celulosa	Extracto de propolis	Bacterias mesófilas levaduras y mohos	Uvas de mesa	Pastor et al., 2011
Aloe vera	Tomillo	<i>Penicillium digitatum, Botrytis cinerea y Rhizopus stonifer</i>	Nectarina	Navarro et al., 2011

Canela

Se encuentran alrededor de 200 especies de canela en el sudeste de Asia, Asia Oriental y las Islas del Pacífico. La canela (Figura I.2) es una planta con una fragancia bastante intensa en todas sus partes, ya que todas contienen diferentes tipos de aceite esencial, con una composición variable según la parte de la que se extraiga el aceite. En el sector alimentario, la canela se asocia comúnmente con la corteza seca del arbusto canela de Sri Lanka.

El componente principal del aceite obtenido a partir corteza de la planta de la canela es el aldehído aromático 3-fenil-2-propenal también llamado cinamaldehído (Tabla I.4.), que constituye aproximadamente el 80% del aceite esencial. Sin embargo, el aceite de las hojas del arbusto de canela contiene eugenol como componente principal, mientras el aceite de la raíz posee alcanfor en mayor concentración, por último el aceite de las flores tiene acetato de cinamilo como su componente más importante (Wang et al., 2004).

Tabla I.4. Componentes principales aceite esencial de corteza de canela (Wang et al., 2004).

Componentes	Punto ebullición (°C)	Porcentaje de composición (%)
Eugenol	256	82
Acetato de cinamilo	265	1,1
Acetato de eugenilo	268	1
Benzoato de benzilo	323	3

El aceite esencial obtenido de la corteza del arbusto de la canela tiene una mayor importancia respecto al obtenido en otras partes de la planta de la canela debido a su mayor concentración de cinamaldehído, cuya acción antimicrobiana ha sido demostrada en diversos estudios contra:

Escherichia coli, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis* (Goñi et al., 2009; Mahdi Ojagh y Rezaei, 2010); y acción antifúngica contra *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* (Mantle et al., 1998; Moufida y Marzkouk, 2003; Xing et al., 2010; Balaguer y López-Carballo et al., 2013).



Figura I.2. Planta de canela y aceite esencial de canela.

Orégano

El orégano (Figura I.3.) (*Origanum vulgare*) es una hierba aromática que pertenece a la familia de las Lamiaceas y se encuentra de forma común en Asia, Europa y el norte de África. En la medicina popular, el *O. vulgare* ha sido usado para el tratamiento de trastornos respiratorios, trastornos urinarios, menstruaciones dolorosas, tratamiento de la artritis, entre otros. En el ámbito culinario el orégano también es usado con el objetivo de otorgar sabor.

La composición del aceite esencial obtenido de las hojas de la planta de orégano (Tabla I.5.) es muy variada debido a la gran cantidad de componentes que posee, pero cabe destacar en su composición el carvacrol (45,5%), timol (19,6%) y otros monoterpenos (30%) (Teixeira et al., 2013).

Tabla I.5. Componentes principales aceite esencial de orégano (Teixeira et al. 2013).

Componentes	Punto ebullición (°C)	Porcentaje de composición (%)
Timol	233	19,6
Carvacrol	238	45,5
γ-Terpineno	183	9
P-Cimeno	177	11

Numerosos estudios han demostrado que el potencial del aceite esencial de orégano para aumentar la vida útil de alimentos, ya que ejerce un efecto antibacteriano, como en el caso de pollo contra *Pseudomonas* o Enterobacterias (Chouliara et al., 2007), pez espada (Giatrakou et al., 2008) o pulpo (Atrea et al., 2009). También se ha demostrado un efecto anti fúngico en *Rhodotorulas*, *Botrytis*, *Fusarium* o *Candida* (Kulisic et al., 2004, Souza et al., 2007, Zivanovic et al., 2005) o *A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus* (Paster et al., 1995; Viuda et al., 2006).



Figura I.3. Planta de orégano y aceite esencial de orégano.

I.3.2 Bacterias del ácido láctico (BAL)

Lactobacillus son un género de bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas denominadas de este modo debido a que son capaces de producir ácido láctico a partir de lactosa u otros monosacáridos. Dentro del género *Lactobacillus* encontramos diversas especies como *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. dellbrueckii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, muchas de las cuales son capaces de producir metabolitos secundarios de interés.

Sobolov and Smiley (1960) concluyeron que algunos *Lactobacillus* eran capaces de generar un metabolito en presencia de glicerol denominado 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA, reuterin), compuesto con alta actividad antimicrobiana. Así, numerosos estudios han demostrado la capacidad del *L. reuteri* para inhibir tanto el crecimiento de microorganismos indeseables en el tracto gastrointestinal como *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*,

Clostridium o *Staphylococcus* (Axelsson et al., 1989; Arques et al., 2004) o algunas especies fúngicas como *Fusarium graminearum* (Gerez et al., 2009).

En vistas a la aplicación de *L. reuteri*, o su metabolito reuterin, a productos alimenticios, es de particular interés conocer que factores influyen en la acumulación y la estabilidad de la molécula 3-HPA. Talarico et al. (1988) observaron que se pueden obtener 67 mM de reuterin a partir de 250 mM glicerol mediante el uso de células en reposo de *L. reuteri*. Lüthi-Peng (2002) encontró que la producción de reuterin por el *L. reuteri* era mayor al realizar su cultivo en medios con leche desnatada, leche de soja o MRS. Sin embargo las investigaciones acerca de las variables que afectan a la producción y estabilidad de la molécula de reuterin son todavía escasas.

En cuanto a las aplicaciones del *L. reuteri* a la industria de alimentos, desde 1990 una empresa biotecnológica sueca (BioGaia, Estocolmo, Suecia) ha introducido en el mercado mundial una serie de productos que contienen *L. reuteri* para el cuidado de la salud de los consumidores y animal. Adicionalmente, también se han hecho intentos para incorporar *L. reuteri* a helado con el fin de obtener un producto prebiótico (Hagen y Narvhus et al., 1999).

I.4. Problemática de conservación asociada a los productos de panadería con alto contenido en humedad.

El BOE (R.D. 1137/1984) designa pan como producto perecedero, sin otro calificativo, resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal comestible y agua potable, fermentada por especies de microorganismos propias de la fermentación panaria, como *Saccharomyces cerevisiae*. El pan de leche es definido como aquel elaborado con masa panaria a las que se han incorporado el ingrediente del que toma su nombre (leche) en una cantidad mínima y máxima de 50-100 respectivamente referida a gramos por kilogramo de harina.

En el caso de los panes de leche nos encontramos con un alto contenido en humedad, azúcares simples y complejos (almidón), además de proteínas y grasas debido al uso de leche en su formulación, por lo que se convierte en un producto muy rico en nutrientes y susceptible a contaminaciones (Soares et al., 2002). La contaminación debida a hongos es un problema muy común en la industria panadera y el crecimiento de estos determina la vida útil en la mayoría de los productos con alta humedad.

Las condiciones que favorecen la acción de los hongos en este tipo de productos están asociadas, en primer lugar, a la presencia de oxígeno. La textura porosa de los panes y/o los envases en los que habitualmente se conservan no permiten la completa eliminación del oxígeno, por lo que con el tiempo son capaces de acumular un nivel de oxígeno suficientemente elevado para el desarrollo de los hongos. En segundo lugar, los niveles de a_w habituales de panes (en torno a 0.80) son suficientes para el crecimiento de los hongos y, aunque el horneado es capaz de destruir la mayor parte de los hongos o esporas, los productos de panadería son muy susceptibles a sufrir contaminaciones secundarias durante el envasado o almacenamiento. El punto más sensible para el inicio del deterioro fúngico es la superficie de estos alimentos, ya

que además de ser muy rica en nutrientes como azúcares, se dan otras condiciones ambientales beneficiosas para el crecimiento de los hongos (Soares et al., 2002).

Entre las especies más importantes de hongos capaces de proliferar en la superficie de los productos de panadería encontramos (<http://alimentariaonline.com/2004/06/11/alteraciones-microbianas-en-el-pan>).

- *Penicillium glaucum*, *P. expansum* (producen esporas verdes).
- *Rhizopus nigricans*, vulgarmente llamado moho del pan, que presenta un micelio blanco de aspecto algodonoso con esporangios negros.
- *Aspergillus niger*, con conidios cuyo color varía de verdoso a negro y que produce un pigmento amarillo que se difunde en el pan.
- *Oidium auriantacum*, que produce manchas de color naranja.
- *Mucor mucedo*, moho blanco.
- *Monilia sitophila*, cuyos conidios rosados producen en el pan una coloración asalmonada.
- *Monilia variabilis*, que produce en el pan la llamada enfermedad del yeso

I.4.1 Aspergillus

El género *Aspergillus* contiene, en la actualidad, más de 100 especies y pertenece al grupo *Deuteromycetes* (hongos imperfectos). Las especies del género *Aspergillus* producen esporas asexuales (denominadas conidiosporas o conidios) en una estructura especializada denominada *aspergillum*. El *aspergillum* nace sobre una estructura alargada, cuya parte basal forma la denominada "célula pie" típica de este género. Al conjunto de estas estructuras se le denomina conidióforo, el cual se encuentra representado en la figura I.4. (Jay et al., 2009).

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato (Kozakiewicz, 1989).

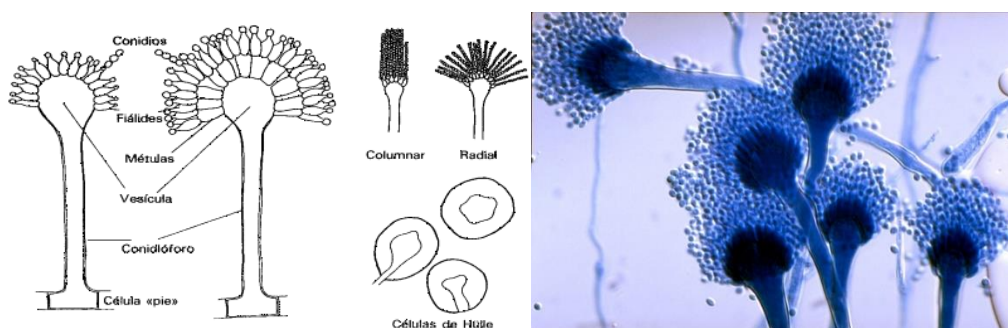


Figura I.4. Conidióforos de *Aspergillus* y estructura.

La presencia de *Aspergillus* en los alimentos depende del sustrato y de factores ambientales como la actividad de agua, temperatura, pH, potencial redox, presencia de conservantes y competencia por los nutrientes. Debido a que se trata de microorganismos de hábitat terrestre y a su capacidad de crecer con valores de a_w bajos, *Aspergillus* es un género contaminante muy habitual en cereales y alimentos deshidratados. La contaminación de derivados cárnicos es debida a la presencia del hongo como contaminante de las especias empleadas en su elaboración. La presencia de *Aspergillus* en leche y derivados es fundamentalmente debida a falta de medidas de higiene en la planta industrial, como el empleo de recipientes no suficientemente limpios o de aire no filtrado. También se encuentran frecuentemente contaminaciones superficiales en alimentos ricos en almidón (Jay et al., 2009).

Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Kozakiewicz, 1989).

Aspergillus niger

A. niger es un microorganismo aeróbico, mesófilo, heterótrofo y quimiorganotrofo. A nivel microscópico sus colonias son inicialmente blancas, posteriormente negras y con un reverso amarillo tal y como figuran en los ejemplos de la figura I.5. Los conidióforos son hialinos, pigmentados en su parte superior, lisos y de pared gruesa. Como hongo filamentoso, cada filamento crece fundamentalmente en el ápice, por extensión de la célula terminal. Cada filamento aislado consiste en hifas septadas y crece formando bolas compactas que colectivamente se denominan micelios, que pueden ser vistas fácilmente sin el microscopio. El micelio surge porque las hifas individuales al crecer se entrecruzan dando lugar a espesos aglomerados. A partir del micelio, algunas hifas pueden ir buscando la superficie, originando así un micelio aéreo que a su vez da lugar a esporas llamadas conidios. Los conidios son esporas asexuales, a menudo fuertemente pigmentados y resistentes a la desecación, siendo su misión la de dispersar el hongo a nuevos hábitats.

El rango de temperaturas en el cual es capaz de desarrollar su metabolismo es de entre 5 y 50°C, siendo el rango de temperaturas óptimas para su crecimiento entre 30 y 35°C. El pH óptimo para su desarrollo es de 5,5-6, por lo que un medio ligeramente ácido será favorable para su crecimiento (Van Tieghem et al., 1867).



Figura I.5. *A. niger* inoculado en PDA y crecimiento en pan.

1.4.2. *Penicillium*

Las especies del género *Penicillium* son muy ubicuas, oportunistas y saprofitas, siendo capaces de crecer en medios muy diferentes. Generalmente, estos hongos se encuentran en la naturaleza ligados a los procesos de descomposición de la materia orgánica, lo cual les hace jugar un papel importante en la degradación de una amplia variedad de alimentos (Jay et al., 2009).

El género *Penicillium* incluye más de 200 especies, de las cuales 50 son aisladas con mucha frecuencia. Todas las especies más comunes crecen y esporulan muy bien en los medios de cultivo habitualmente empleados en el laboratorio, produciendo colonias pequeñas y circulares con tonos gris verdoso o verde-azulados; por ello, la gran mayoría de las especies de este género son fácilmente reconocibles a nivel de género.

La clasificación del género se basa fundamentalmente en la morfología microscópica del cuerpo fructífero, denominado penicillus. El género se divide en distintos subgéneros en función del número y ramificaciones de las fiáldidas tal y como se describe en la figura 1.6. (Jay et al., 2009).

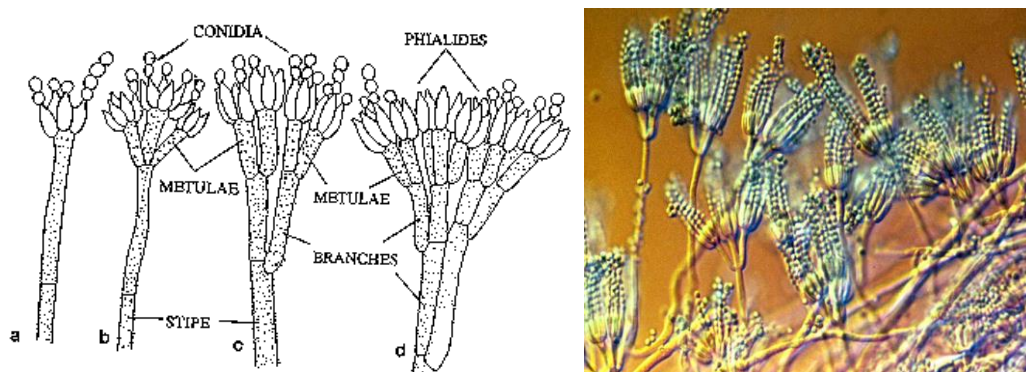


Figura 1.6. Conidióforos de *Penicillium* y estructura.

Como ya se ha indicado, es posible encontrar un elevado número de especies de *Penicillium* en alimentos; constituyendo, en la mayoría de los casos, contaminantes ocasionales y casi nunca provocando graves pérdidas económicas. Sin embargo, a veces se encuentran asociados con determinados procesos industriales y pueden jugar un papel importante en la degradación de los alimentos. Solamente unas pocas especies tienen una implicación seria en aspectos relacionados con la salud pública.

Algunas especies aisladas a partir de alimentos tienen su hábitat natural en cereales, apareciendo en ellos justo antes o después de la cosecha. En particular, *P. aurantiogriseum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* y otras especies estrechamente relacionadas se encuentran en trigo, cebada y otros cereales cuando se cultivan en regiones templadas. *P. funiculosum* y *P. oxalicum* se encuentran, en cualquier lugar del mundo, asociadas a cultivos de maíz. Por el contrario, las especies del género *Penicillium* no se detectan en el arroz durante su cultivo, llegando a este cereal durante su almacenamiento; *P. citrinum* es la especie más importante. En el caso de la industria panadera es de gran importancia las contaminaciones producidas por *P. expansum* (Jay et al., 2009).

Penicillium expansum

P. expansum es un organismo fúngico, productor de esporas azul brillante o verdes tal y como se demuestra en los ejemplos representados en la figura I.7., muy frecuente en la mayoría de cultivos y diversos alimentos como en la post-cosecha de manzanas o en el pan. Este hongo es capaz de producir al pudrir el hospedador un metabolito cancerogénico llamado patulina. Sus conidióforos son mono-verticilados, ramificados y septados con células esporuladas (fiálides). Su estructura celular es elipsoide o conidios piriformes de textura suave y forman colonias circulares de bordes lisos. Su temperatura de crecimiento óptima es de 25°C, pero es capaz de crecer a temperaturas entre -2°C hasta alrededor de los 35°C.



Figura I.7. *P. expansum* inoculado en PDA y crecimiento en pan.

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. Objetivos

El objetivo general fue estudiar diferentes estrategias para alargar la vida útil en pan de leche mediante la aplicación de films o recubrimientos (RC) comestibles/biodegradables que incorporan compuestos naturales bioactivos.

Para ello se plantean como objetivos específicos:

1. Diseñar formulaciones de estos compuestos y optimizar las condiciones prácticas de aplicación adaptadas al tipo compuesto bioactivo: aceite esencial o bacteria láctica.
2. Caracterizar la actividad antifúngica de los compuestos y RC bioactivos en ensayos in vitro.
3. Analizar la efectividad antifúngica de los RC bioactivos aplicados a panes de leche.
4. Evaluar algunos parámetros de calidad en los panes recubiertos.

II.2. Plan de Trabajo

Para la consecución de los objetivos planteados se siguió el siguiente plan de trabajo:

- 1) Selección los compuestos naturales, tanto bioactivos como de los RC, más interesantes para la aplicación a panes de leche. En los bioactivos se priorizará su actividad antifúngica y en los RC que sean una buena matriz soporte.
- 2) Obtención de una formulación estable de los componentes: matriz soporte y compuesto bioactivo correspondiente. Optimización del proceso de obtención de la formulación adaptado a las condiciones de cada compuesto bioactivo (aceite esencial y bacteria láctica).
- 3) Diseñar en panes de leche la forma y modo de aplicación más adecuado de las formulaciones.
- 4) Evaluar la actividad antifúngica in vitro de los compuestos bioactivos incorporados a los RC contra hongos seleccionados por causar deterioro en panes de leche.
- 5) Analizar la efectividad antifúngica in vivo de los compuestos bioactivos incorporados a los RC y aplicados a panes de leche infectados con los hongos seleccionados.
- 6) Evaluar el efecto de la aplicación de los RC bioactivos sobre algunos parámetros de calidad de panes de leche (pérdida de peso y textura) durante su vida útil.
- 7) Análisis estadístico y discusión de los resultados

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Materias primas

Las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) se prepararon utilizando como matriz soporte almidón de maíz pregelatinizado (AM, Pregleflo CH20) y glicerol (G) como agente plastificante. El almidón de maíz fue suministrado por la empresa Laisa Roquette España, S.A. (Valencia, España) y el glicerol por PanReac Química SLU (Barcelona, España).

Los aceites esenciales, de canela de corteza (AC) y orégano (AO), fueron suministrados por Herbes del Molí, Coop. V. (Alicante, España). Estos aceites fueron seleccionados por su demostrada acción antifúngica *contra Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* en estudios previos (Balaguer et al., 2013; Xing y Li, 2010) y por su alta compatibilidad sensorial con el producto a recubrir.

Para la obtención de reuterin a partir de *Lactobacillus reuteri* se adaptó el protocolo propuesto por Stefan Roos (US 20140057992. 2014) y Lüthi-Peng et al., (2002). En estudios previos no publicados se verificó que la metodología que a continuación se describe permite una viabilidad de las bacterias por encima de 10^7 UFC/mL. Se repartieron 1,6 g del contenido de un sobre de *Lactobacillus reuteri* Protectis DSM 17938 (Bi-OralSuero Baby, Laboratorios Casen Fleet; Zaragoza, España) en cuatro tubos de 19 mL de MRS Broth cada uno (Scharlab S.L., La Jota, Barcelona, España). A continuación se introdujeron en una jarra de anaerobiosis (AG0025A, Oxoid), condiciones generadas por un sobre de anaerobiosis (AeroGen, AN0035A, Oxoid), y se incubaron en una estufa bacteriológica (Incudigit, J.P. Selecta, España) a 37°C durante 24 horas. Tras esta primera incubación, el contenido de los tubos, previamente agitados con un agitador vortex (REAX Top, Heidolph Instruments, Alemania), fue vertido en frascos de vidrio twist-off con 780 mL de MRS Broth e incubadas 48 horas a 37°C en las mismas condiciones de anaerobiosis. Finalizado el segundo período de incubación, el cultivo obtenido se centrifugó (centrífuga Medifriger BL-S, J.P. Selecta, España) a 6610 rpm durante 10 minutos a 25°C; se eliminó el sobrenadante y se lavó con una disolución de PBS (10 mmol/L fosfato, 137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, pH 7,4). El precipitado obtenido se resuspendió en una disolución de leche desnatada (Central Lechera Asturiana, Asturias, España) y con 1,38 mg de glicerol en 100 mL leche (150 mM) (Lüthi-Peng et al., 2002). Por cada 14 mg de precipitado obtenido se añadió 1 mL de la disolución anterior. Tras agitar y disolver el precipitado se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 2 horas para que la bacteria sintetizase α -hidroxipropionaldehído (reuterin), (Lüthi-Peng et al., 2002). Se volvió a centrifugar con el objetivo de eliminar el mayor número de células posibles y concentrar el principio activo (reuterin). Y esta fue la disolución, en adelante Lr, que se añadirá después a las formulaciones FFRs.

Se llevaron a cabo ensayos previos con el objetivo de estandarizar la concentración de polímero en la FFR y el método de aplicación de las formulaciones sobre los panes de leche. La concentración óptima de almidón en la FFR fue de un 3,5% ya que a esta concentración la dispersión final mostró la viscosidad y adherencia suficientes para conseguir el recubrimiento total y homogéneo de la pieza de pan sin apreciarse mojado interno de la misma. Las muestras fueron recubiertas por inmersión, manteniéndolas sumergidas en la FFR por 2 segundos.

Se descartaron métodos como el pintado, por dar resultados muy irregulares, y la pulverización, por la elevada viscosidad de la formulación.

III.2. Preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento

En la tabla VI se resume la composición de todas las formulaciones utilizadas. La metodología de preparación de las FFRs fue estandarizada y consistió en disolver 3,5% (p/p) de AM en agua bidestilada durante 30 minutos, manteniendo una agitación constante, y esterilizar en una autoclave (Presoclave II 75, J.P. Selecta, España) a 121°C durante 15 minutos. A continuación, se añadió el aceite esencial correspondiente en un ratio polímero: aceite de 1:0,5. Finalmente, a todas las FFRs se le adicionó una disolución de glicerol 150 mM en un ratio polímero: glicerol de 1:0,4 basado en resultados anteriores no publicados, previamente autoclavada durante 15 minutos a 121°C. En el caso del *Lactobacillus reuteri*, se añadió en un ratio polímero: disolución Lr de 1:17. Todas las FFRs se homogeneizaron a temperatura ambiente en un equipo ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos. Todos los ensayos que requirieron condiciones de esterilidad se realizaron en una campana de seguridad biológica de clase II (Telstar industrial, Terrassa, España).

Tabla VI. Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

FFR	AM (%p/p)	G (%p/p)	A. Canela (%p/p)	A. Orégano (%p/p)	Lr (%p/p)
AM	3,5	1,38	-	-	-
AM-AC	3,5	1,38	1,75	-	-
AM-AO	3,5	1,38	-	1,75	-
AM-Lr	3,5	(1)	-	-	60 ⁽²⁾

(1) el glicerol incluido en la disolución Lr en el mismo ratio 1:0,4 polímero

(2) ratio polímero: disolución Lr de 1:17

III.3. Caracterización microbiológica

III.3.1 Preparación de la suspensión del hongo e incorporación a las FFRs

Para los análisis microbiológicos se utilizaron 2 cepas: *Aspergillus niger* (CECT 2574) y *Penicillium expansum* (CECT 2275), suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT, Universitat de València, España).

Estas cepas se almacenaron a -25°C en Caldo Patata Dextrosa (PDB, Scharlab, España) enriquecido con un 30% de glicerol (Panreac, España). A continuación, se inocularon los hongos en Patata Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25°C. Las esporas fueron resuspendidas en una disolución del 7% de NaCl (Panreac, España) con 0,05% Tween 85 (Sigma-Aldrich, EEUU). El recuento de las esporas se realizó mediante una placa Thoma y se obtuvo una concentración ajustando el número de esporas a 10⁶/mL (disolución madre) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{n^{\circ} \text{ esporas promedio contadas}}{n^{\circ} \text{ cuadrados pequeños}} \cdot \frac{n^{\circ} \text{ cuadrados totales cámara}}{\text{volumen cámara}} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} =$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ esporas}}{25 \text{ cuadrados}} \cdot \frac{400 \text{ cuadrados}}{0,1 \text{ mm}^3} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} = n^{\circ} \text{ esporas/mL}$$

Se estandarizó la forma de incorporar los hongos a las FFRs. Para ello se prepararon 1,35 mL de la disolución de esporas de una concentración de $10^2/\text{mL}$.

III.3.2. Ensayos *in vitro*

Se adaptó la metodología descrita por Kristo et al. (2008) y Sánchez-González et al. (2010), para la determinación de la efectividad antimicrobiana de los films. Se vertieron alícuotas de 20 g de Potato Dextrose Agar (PDA) en placas Petri. Después de que se solidificaran los medios, se inocularon en superficie con una suspensión de esporas de *Penicillium* o de *Aspergillus* (0,1 mL de la disolución de esporas previamente diluida a una concentración de 10^3 esporas/mL). Después se vertieron 7,35 g de las FFRs para controlar el espesor de los films según el procedimiento descrito por Park y Zhao (2004). Se ajustó una misma densidad de sólidos (56 g/m²) para todos los films.

Se utilizaron como controles placas de PDA sin infectar con cada uno de los films y sin film infectada con los hongos. Finalmente, todas las muestras fueron tapadas e incubadas en la estufa bacteriológica a 25°C. Se realizaron tres repeticiones de cada tipo de muestra testada.

En la evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos activos incorporados a las FFR se consideró un indicador cualitativo que aporta información acerca de la severidad en la que se extiende la infección en los medios de cultivo en placa. Así se consideró un nivel 0 en aquellas placas carentes de crecimiento fúngico; nivel 1 en aquellas con un crecimiento que ocupa hasta un 25% de las placas; nivel 2 en aquellas con un crecimiento que se extiende entre un 26-75% de las placas y nivel 3 para las placas cubiertas con un crecimiento fúngico superior al 75%.

III.3.3. Ensayos *in vivo*

La materia prima utilizada fueron panes de leche de la Bella Easo procedentes de Panrico® S.A.U. (Esplugues de Llobregat, Barcelona, España). Estos panes fueron escogidos por no tener ningún tipo de conservantes, como se indica en la figura III.1., para evitar la interacción de estos durante los análisis microbiológicos.

VALORES NUTRICIONALES MEDIOS		por 100g	por unidad (35g)
Valor energético		373 kcal 1565 kJ	130,4 kcal 547,6 kJ
Grasas		14 g	4,9 g
de las cuales:	Saturadas	7,2 g	2,5 g
Hidratos de Carbono		52 g	18,2 g
de los cuales:	Azúcares	13 g	4,6 g
Fibra Alimentaria		2,9 g	1,0 g
Proteínas		8,2 g	2,9 g
Sal		0,68 g	0,24 g

INGREDIENTES: Harinas (53%) (trigo, avena, arroz, cebada y centeno), agua, grasas vegetales y aceites vegetales (palma, coco, girasol), jarabe de glucosa y fructosa, huevo líquido pasteurizado (5,6%), azúcar, leche desnatada en polvo (2,5%)*, emulgentes (E 471 (trigo), E 481 (trigo), lecitina de girasol), aromas, masa madre líquida (trigo), levadura, sal, corrector de acidez (E 330), proteína de la leche, gluten de trigo y estabilizante (E 466) (trigo).
*Equivalente a un 20% de leche desnatada reconstituida.

Figura III.1. Tabla nutricional y composición de los panes de leche industriales.

La aplicación de las FFRs a los panes fue estandarizada como se ha comentado en el apartado III.1. Para facilitar la inmersión del pan en condiciones higiénicas se pinchó uno de los extremos del pan con un palo de madera estéril, como puede observarse en la Figura III.2. A continuación, los panes fueron secados en un horno (D-86899, Rational AG, Alemania) con calor seco a 50°C y 50% de humedad durante 40 minutos. Finalmente, los panes fueron introducidos, individualmente, en bolsas de plástico transparente tipo zip (MINI-GRIP BAG 180*250, DELTALAB, Barcelona, Spain) y se almacenaron en la estufa bacteriológica a 25°C. Se utilizaron como controles panes sin infectar y recubiertos con las FFRs sin infectar con los hongos. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tipo de muestra testada.

En la caracterización in vivo de la efectividad antifúngica de los recubrimientos aplicados a panes se tuvieron en cuenta dos tipos de parámetros, uno cualitativo y otro cuantitativo. El cualitativo aporta información sobre la severidad con la que se extiende la infección sobre la superficie de los panes. Para ello se consideraron los siguientes niveles: Así se consideró un nivel 0 en aquellos panes carentes de crecimiento fúngico; nivel 1 en aquellos con un crecimiento que ocupase hasta un 25% de los panes; nivel 2 en aquellos con un crecimiento que se extendiese entre un 26-50% de los panes y nivel 3 para los panes cubiertos con un crecimiento fúngico superior al 50%.

El indicador cuantitativo fue el número de panes en las que se observó un crecimiento fúngico apreciable visualmente, respecto al total de unidades por tratamiento (4 repeticiones), expresado en %. Este porcentaje aporta información acerca de la incidencia con la que son afectados los panes por la infección realizada con los hongos correspondientes.



Figura III.2. Panes preparados para el proceso de inmersión en la formulación formadora de recubrimiento (FFR).

III.4. Caracterización de calidad de los panes

Para caracterizar la calidad de los panes, se tomaron los principales atributos que podrían verse afectados por la aplicación de este tipo de recubrimientos, como son la pérdida de peso y las propiedades mecánicas, relacionadas con la calidad sensorial de los mismos.

III.4.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso se determinó por quintuplicado pesando los panes antes y después de la aplicación, tras el secado, y a los 21 días de almacenamiento. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al peso inicial de los panes.

III.4.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron en los panes mediante una prensa mecánica (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) con una célula de carga de 50 kg y una sonda cilíndrica de 75 mm de diámetro. Se realizó un ensayo de compresión del pan, colocado longitudinalmente, a una velocidad de 2 mm/s y hasta alcanzar una deformación máxima del 30%. El ensayo se realizó tiempo cero y tras 21 días de almacenamiento de los panes a 25°C en estufa bacteriológica. Se realizaron 5 repeticiones de cada una de las formulaciones obtenidas y se registraron los parámetros mecánicos fuerza (N) y distancia (mm).

III.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test Least Significant Difference (LSD). Los cálculos se realizaron con el Software Statgraphics Plus.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. Caracterización microbiológica *in vitro*

Se evaluó la capacidad antifúngica en medio líquido de las diferentes formulaciones de aceites esenciales y reuterin frente a *A. niger* y *P. expansum*. A continuación se muestran los resultados obtenidos a diferentes tiempos de incubación.

IV.1.1. Actividad antifúngica de las FFR con aceites esenciales

En la figura IV.1 se muestran las placas de cultivo y los niveles cualitativos de crecimiento de cada uno de los hongos sobre los que se han depositado las FFR de almidón, a dos días del ensayo, 14 y 21 días. Los niveles de crecimiento se han obtenido siguiendo una escala numérica descrita en la metodología (apartado III.3.2) y se han elegidos dos tiempos representativos del comportamiento general.

En los FFR control de almidón sin antimicrobianos, la severidad del crecimiento de *A. niger* fue muy elevada, alcanzando un nivel 3, cubriendo la mayoría de la placa y con una esporulación completa. En el caso del *P. expansum* su desarrollo fue inferior al encontrado en el *A. niger*, no cubriendo más del 75% de la placa (nivel 2) y con esporulación muy baja, sólo en los extremos de la placa. Si comparamos estos resultados de crecimiento de los FFR control con los obtenidos en placas sin FFR (únicamente con PDA infectado con *A. niger* y *P. expansum*) se observa que en el caso del *A. niger*, la presencia de FFR parece dificultar el crecimiento ya que se observa una presencia de colonias menor y una disminución en la densidad de esporas; en el caso del *P. expansum* el tamaño de las colonias disminuye y el hongo parece tener problemas para esporular, debido posiblemente a la mayor dificultad de acceso al oxígeno que ejerce el film. Numerosos estudios han mostrado que los films a base de almidón poseen una permeabilidad al oxígeno muy baja, mucho más que los films plásticos convencionales (Cano et al, 2014).

La incorporación de los aceites esenciales a las FFR de almidón aportó una potente actividad antifúngica contra los hongos del estudio, como puede observarse en los resultados de la Figura IV.1. a los 14 y 21 días. En general no se apreció crecimiento de *A. niger* y *P. expansum* a ningún tiempo de control.

Estos resultados son coherentes con trabajos *in vitro* sobre la capacidad inhibitoria en el crecimiento fúngico del aceite esencial de canela (Mantle et al., 1998; Moufida y Marzkouk, 2003), debido el alto contenido de estos aceites en cinamaldehido, y del aceite esencial de orégano (Paster y Nachman, 1995 y Viuda y Ruiz, 2006), por alto contenido en carvacrol.


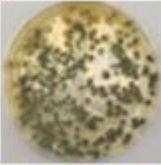






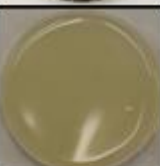







Muestras	Tiempo (días)	Nivel de crecimiento <i>A.niger</i>		Nivel de crecimiento <i>P. expansum</i>	
PDA control	14	3		2	
	21	3		2	
FFR Control	14	3		2	
	21	3		2	
Almidón+canela	14	0		0	
	21	0		0	
Almidón+orégano	14	0		0	
	21	0		0	

Figura IV.1. Nivel de crecimiento de los hongos *A. niger* y *P. expansum*, e imágenes representativas, en las muestra control con FFR de almidón puro y FFRs con los aceites esenciales de canela y orégano.

IV.1.2. Actividad antifúngica de las FFR con la disolución Lr

En la figura IV.2 podemos observar el crecimiento de los dos hongos con FFR control y con FFR que incorporan disolución de Lr, según la metodología descrita en el apartado III.3.2.

Tras su vertido en las placas y posterior almacenamiento, se apreció que las FFR generan una capa densa y sólida que puede afectar en diferente medida al crecimiento de los hongos del ensayo. Por una parte, podemos observar un cierto crecimiento favorable de *A. niger* (nivel 3), donde la densidad de colonias es la mayor, en comparación con la formulación control. Al incorporar la disolución Lr a las FFR, se observa un halo amarillento alrededor de las colonias y una disminución del crecimiento de *A. niger* (nivel 1) respecto al film control, indicando una posible acción fungistática. Por el contrario, estas FFR dificultan completamente el crecimiento del *P. expansum*, tanto en las FFR control como en las FFR formuladas con disolución Lr, no obteniendo crecimiento del hongo tras 14 días de incubación.





FFR Control con <i>A. niger</i>		FFR Control con <i>P. expansum</i>		FFR <i>L. reuteri</i> con <i>A. niger</i>		FFR <i>L. reuteri</i> con <i>P. expansum</i>	
Nivel		Nivel		Nivel		Nivel	
3		0		1		0	

Figura IV.2. Nivel de crecimiento de los hongos *A. niger* y *P. expansum*, e imágenes representativas, en las muestras control con films de almidón puros y en los films de almidón con disolución Lr a los 14 días.

IV.2. Actividad antifúngica *in vivo* de los recubrimientos

Se evaluó la capacidad antifúngica contra *A. niger* y *P. expansum* de las diferentes formulaciones, aplicadas sobre panes de leche y tras un período de conservación en condiciones controladas a 25°C. Para ello se utilizaron dos indicadores del deterioro fúngico: uno cualitativo, el nivel de severidad, y otro cuantitativo, la incidencia de la infección evaluada a través del % de panes afectados. El período máximo de conservación que alcanzaron las muestras de pan fue de 28 días en el caso de las FFR de canela y orégano, y 21 días en el caso de la FFR de reuteri. Los resultados se detallan a continuación:

IV.2.1. Capacidad antifúngica frente a *A. Niger* y *P. expansum* de recubrimientos a base de almidón y aceites esenciales aplicados a panes de leche

A. niger

La figura IV.3 muestra para panes infectados con *A. niger* y recubiertos con FFR de almidón (control) y almidón con aceites esenciales de canela y orégano, el deterioro fúngico evaluado a través del nivel de severidad, y la incidencia de la infección evaluada a través del % de panes afectados.

En los panes con FFR control e infectados con *A. niger* encontramos un crecimiento de nivel 1 a partir de los 14 días, que aumenta a nivel 2 a los 21 días y llega al máximo nivel a los 28 días. El desarrollo del hongo sólo tuvo lugar en un 50% de las piezas.



















tiempo (días)	Film Control con <i>A. niger</i>			
	Nivel	% panes afectados		
14	1	50		
21	2	50		
28	3	50		
tiempo (días)	Film Canela con <i>A. niger</i>			
	Nivel	% panes afectados		
14	0	0		
21	0	0		
28	0	0		
tiempo (días)	Film Orégano con <i>A. niger</i>			
	Nivel	% panes afectados		
14	0	0		
21	0	0		
28	0	0		

Figura IV.3. Panes infectados con *A. niger*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

En general, la incorporación de aceites esenciales a las FFR de almidón y su aplicación a los panes infectados mostró una gran efectividad antifúngica contra *A. niger*, tal y como puede observarse en la figura IV.3.

En los panes infectados con *A. niger* y recubiertos con FFR de almidón y aceite esencial de canela, no mostraron crecimiento del hongo, en coherencia con los resultados obtenidos in vitro, demostrando el efecto fungistático de los films y recubrimientos que incorporan este tipo de aceites esenciales. Estos resultados son similares a los obtenidos en frutas utilizando aceite esencial de canela o cinamaldehído por Xing et al. (2010), y Balaguer et al. 2013 con films de gliadina en pan de molde y queso, donde también obtuvieron una inhibición completa del crecimiento fúngico a concentraciones similares (entorno al 2% p/p).

Los panes infectados con *A. niger* y recubiertos con FFR de almidón y aceite esencial de orégano, no mostraron crecimiento fúngico los primeros 14 días. Sin embargo a los 21 días, un 25% de las piezas de pan mostraron un crecimiento fúngico no característico de la especie *A. niger*, que relacionado con alguna contaminación externa no controlada. La severidad de esta infección aumentó los 28 días de conservación.

Como conclusión podemos decir que ambos aceites esenciales incorporados a la FFR y aplicados a panes mostraron efectividad antifúngica contra *A. niger*, aunque esta efectividad no fue total en el caso de las muestras recubiertas con aceite esencial de orégano. La diferencia en la capacidad antifúngica de ambos aceites está relacionado con su diferente composición y volatilidad de sus componentes activos.

P. expansum

La figura IV.4 muestra para panes infectados con *P. expansum* y recubiertos con FFR de almidón (control) y almidón con aceites esenciales de canela y orégano, el nivel de severidad y la incidencia de la infección del hongo.

Los resultados obtenidos en los panes control recubiertos con la FFR de almidón e infectados con *P. expansum* muestran una severidad de nivel 1 los primeros 14 días y nivel 2 a partir de los 21 días. El desarrollo de hongos se produjo solo en el 50% de las piezas de pan infectadas. El crecimiento de este hongo tuvo un comportamiento particular ya que se desarrolló hacia el interior del pan, sin llegar a producir la coloración blanquecina o esporas de color azul/verde.

En general, la incorporación de aceites esenciales a las FFR de almidón y su aplicación a los panes infectados mostró efectividad antifúngica contra *P. expansum*, que llegó a ser fungicida en el caso de recubrimientos que incorporan aceite esencial de canela, tal y como puede observarse en la figura. En un 25% de las muestras a las que se aplicaron recubrimientos con aceite esencial de orégano se observó a los 21 días un crecimiento leve (nivel 2) de *P. expansum*, que aumentó a los 28 días hasta un nivel 2. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Viuda et al. (2006) en estudios in vitro. Según estos autores, el aceite esencial de orégano precisa de una mayor concentración que otros aceites esenciales como el de canela para lograr el mismo efecto inhibitorio.










tiempo (días)	Film Control con <i>P. expansum</i>		
	Nivel	% panes afectados	
14	1	50	
21	2	50	
28	2	50	
tiempo (días)	Film Canela con <i>P. expansum</i>		
	Nivel	% panes afectados	
14	0	0	
21	0	0	
28	0	0	
tiempo (días)	Film Orégano con <i>P. expansum</i>		
	Nivel	% panes afectados	
14	0	0	
21	1	25	
28	2	25	

Figura IV.4. Panes infectados con *P. expansum*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

IV.2.2. Capacidad antifúngica frente a *A. Niger* y *P. expansum* de recubrimientos a base de almidón y y disolución Lr aplicados a panes de leche

El ensayo de los panes con film que incorporaban disolución Lr se detuvo a los 21 días, debido a que, como se demuestra en la figura IV.5., un 100% de las piezas se vieron afectadas por el desarrollo de *A. niger*, alcanzando un nivel 2 de crecimiento. Respecto a los panes infectados con *P. expansum*, se produjo un desarrollo de este hongo y de *A. niger*, posiblemente debido a una contaminación, a partir del día 14 con un nivel 1 en un 25% de las muestras. A los 21 días la severidad de la infección avanzó, alcanzando un nivel 3 en un 25%, que además presentó una alta esporulación, un nivel 1, en un 25% y en el 50%, restante no se observó infección alguna.









tiempo (días)	Film disolución Lr con <i>A. niger</i>			
	Nivel	% crecimiento		
14	1	25		
21	2	100		
tiempo (días)	Film <i>L. reuteri</i> con <i>P. expansum</i>			
	Nivel	% crecimiento		
14	1	25		
21	3 y 1	25,25		

Figura IV.5. Panes infectados recubiertos con FFR de almidón y disolución Lr con *A. niger* y *P. expansum*: nivel de severidad de la infección e incidencia (% de panes afectados) a diferentes tiempos de conservación.

Los resultados obtenidos respecto a los infectados con *A. niger* son similares a los obtenidos en los ensayos in vitro con reuterin. La evolución del crecimiento es similar a la obtenida en los panes infectados y recubiertos con FFR control, por tanto parece que el uso de la FFR obtenida a partir de *L. reuteri* no es capaz de inhibir o reducir el desarrollo de *A. niger*, ni en los ensayos in vitro ni in vivo.

En cuanto a los resultados contra *P. expansum*, la incorporación del preparado de reuterin a films no fue capaz de inhibir su crecimiento, ya que fue capaz de desarrollarse y esporular.

Existen diversos factores que podrían explicar los diferentes resultados obtenidos in vivo e in vitro. Por un lado, la cantidad del compuesto activo, reuterin, en el ensayo in vivo seguramente sea menor que en el ensayo in vitro, por la menor densidad de material que se deposita en los panes. Por otro lado, la difusión de los compuestos en los dos tipos de ensayos son completamente diferentes, quedando mucho más limitado en el ensayo in vivo, lo que afecta directamente a su capacidad antimicrobiana.

IV.3. Caracterización de calidad en panes recubiertos

Pérdida de peso

La pérdida de peso en los panes fue evaluada antes y después del recubrimiento de los panes y al final del período de conservación en condiciones controladas (25°C y envasados). Los resultados se muestran en la tabla IV.1., en la que se aprecian pérdidas de peso significativas superiores al 5% en las muestras no recubiertas y en menor medida, perdidas mayores al 1%, en las recubiertas con FFR de disolución de Lr. Por el contrario, se observan ganancias de peso por efecto de los diferentes recubrimientos que se mantienen hasta el final del almacenamiento. Estas ganancias en los panes recubiertos son ligeramente mayores en aquellos que incorporaban aceites esenciales en las FFR, como cabría esperar por el mayor efecto barrera al vapor de agua que aporta la fracción lipídica que contienen estos recubrimientos. Esto ha sido descrito en otros trabajos de aplicación de recubrimientos con aceites esenciales a naranjas (Cháfer et al., 2012) o uvas (Pastor et al., 2011).

Tabla IV.1. Pérdidas de peso de los panes durante el almacenamiento.

Film	Pérdida de peso (%)
Control	-5,5 (0,4) ^a
Canela	2 (2) ^c
Orégano	2 (2) ^c
Reuterin	-1,4 (0,8) ^b

a,b,c: diferencias significativas entre films

Propiedades mecánicas

Los cambios en las propiedades mecánicas de los panes se evaluaron a través de un ensayo de compresión de las muestras hasta alcanzar un nivel de deformación determinado. En la figura y tabla se muestran los resultados estadísticos y valores medios del esfuerzo necesario para alcanzar el nivel de deformación para los distintos tratamientos y tiempos de control tras su conservación controlada a 25°C y en envase.

Como se puede apreciar en la tabla IV.2., los panes que registraron un mayor nivel de esfuerzo (mayor dureza) fueron los no recubiertos tanto a tiempo inicial (alrededor de 15 N) como a los 28 días de conservación (25 N). En general, el recubrimiento de las muestras disminuyó la dureza de los panes a los dos tiempos de control, como cabría esperar por el mayor efecto barrera a las

pérdidas de vapor agua que ejercen los recubrimientos. Además, el efecto del tiempo dio lugar a grandes cambios en la dureza de las muestras no recubiertas durante el periodo de almacenamiento, mientras que en las recubiertas estas diferencias fueron mucho menores.

Estos resultados son coherentes con los descritos con anterioridad para la pérdida de peso, en lo que también se observan tres grupos de comportamiento diferenciado: las muestras de pan no recubiertas (mayores pérdidas de peso y dureza), las muestras de pan recubiertas con FFR a base de aceites esenciales (menores pérdidas de peso y dureza) y las muestras de pan recubiertas con FFR con disolución Lr, que mostraron un comportamiento intermedio.

Tabla IV.2. Variación de la fuerza necesaria para provocar una deformación en función del tiempo.

Film	Tiempo Inicial F(N)	Tiempo Final F(N)
Control	15 (2) ^{c,x}	25 (3) ^{c,y}
Canela	10,82 (0,99) ^{b,x}	11 (4) ^{a,y}
Orégano	8,6 (0,7) ^{a,x}	13 (4) ^{a,y}
Reuterin	12 (1) ^{b,x}	19 (2) ^{b,y}

a,b,c: diferencias entre film x,y: diferencias entre tiempos

V. CONCLUSIONES

1. Se desarrollaron formulaciones formadoras de recubrimiento bioactivas a base almidón de maíz pregelatinizado y compuestos con potencial antifúngico (aceites esenciales de canela y orégano, y una disolución obtenida por acción del *Lactobacillus reuteri*), optimizando las variables para su aplicación (concentración y viscosidad, forma de aplicación).
2. Los films que contenían aceite esencial de canela u orégano presentaron una buena actividad antifúngica *in vitro*, mostrando un efecto fungicida ya que inhibieron totalmente la población de *A. niger* y *P. expansum* durante 28 días de cultivo en placa.
3. Los films que contenían disolución de *Lactobacillus reuteri* mostraron *in vitro* un efecto fungicida contra *P. expansum* y un cierto efecto fungistático contra *A.niger*, en los 14 días de crecimiento en placa.
4. Los resultados de los ensayos *in vivo* son comparables con los *in vitro* para los aceites esenciales. Los panes recubiertos con los dos aceites esenciales, canela y orégano, mostraron actividad fungicida contra el *A. niger* y *P. expansum*.
5. Los panes recubiertos con la disolución de *L. reuteri* no mostraron actividad fungicida contra ninguno de los hongos. Estos resultados no son coherentes con los obtenidos *in vitro*, lo que demuestra la menor actividad fungicida del preparado de *L. reuteri*.
6. Los parámetros de calidad evaluados mostraron menores pérdidas de peso y menor dureza en los panes recubiertos, en especial si incorporaban aceites esenciales por la mayor barrera al vapor de agua de la fracción lipídica. Este efecto se mantuvo durante todo el periodo de conservación ensayado de los panes.
7. En conclusión, la aplicación de la FFR de almidón de maíz con canela a los panes de leche es el que le otorga mayores propiedades antifúngicas, disminuyendo las pérdidas de peso y dureza del producto durante su conservación en condiciones controladas. En futuros trabajos se tendría que profundizar acerca de las condiciones de manejo del *L. reuteri* en aras a analizar la posible mejora de sus propiedades antifúngicas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arques, L., Fernandez, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodriguez, E., Medina, M. (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 95, Issue 2, Pag: 225-229.
- Atrea, I., Papaverogu, A., Amvrosiadis, I., Savvaidis, I.N. (2009). Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food Microbiology*. Vol. 26, Issue 2, Pag: 166-172.
- Axelsson, L.T., Chung, T. C., Dobrogosz, W.J., Liendgren, S.E. (1988). Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial ecology in health and disease*. Vol. 2, Pag: 131-136.
- Balaguer, M., López-Carballo, G., Catala, R., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P. (2013). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International journal of food microbiology*. Vol.166, Pag: 369-377.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 94, Pag: 223–253.
- Cano, A. Jimenez, A. Gonzalez-Martinez, C. Chafer, M and Chiralt, A. (2014). Effect of amylose:amylopectin ratio and rice bran addition on starch films properties. *Carbohydrate Polymers*.
- Cháfer, M., Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A. (2012). Fungal Decay and Shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and Tea Tree essential oils. *Journal of Food Science*. Vol. 77 (8) Pag.182-187.
- Chang, Y.G., Abd Karim, A., Seow, C.C. (2006). Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. *Food Hydrocolloids*. Vol. 20, Pag: 1-8.
- Chien, P., Sheu, F., Lin, H. (2005). Coating citrus (*Murcott tangor*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*. Vol. 100, Pag: 1160–1164.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. *Food Microbiol*. Vol. 24 Pag: 607-617.
- Dole, P., Joly, C., Espuche, E., Alric, I. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 58, Issue 3, Pag: 335-343.
- Eelinge, R.C., Delcour, J.A. (1995). Formation analysis structure and properties of type III, enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*. Vol. 22 N° 22 Pag: 129-138.
- Fisher, K., Philips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *J Appl Microbiol*. Vol. 101, Pag: 1232-1240.
- Forsell, P.M., Mikkila, J., Moates G.K., Parker R. (1997). Phase and glass transition behavior of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 34, Pag: 275-282.

- Gaudin, S., Lourdin D., Le Botlan D., Ilan J.L, Colonna O. (1999). Plasticization and mobility in starch-sorbitol films, *J. Cereal Sci.* Vol. 29 (3), Pag: 273-284.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G., Font de Valdez, G., (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria. *Food Control.* Vol. 20, Pag: 144-148.
- Giatrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M.G. and Savvaidis, I.N. (2008). Potential of oregano essential oil and MAP to extend the shelf life of fresh swordfish: a comparative study with ice storage. *J Food Sci.* Vol. 73, Pag: 167-173.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food. Microbiology.* Vol.73, Pag: 83-92.
- 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.* Vol. 116, Pag: 982-989.
- Guan, J., Hanna, A.M. (2004). Extruding foams from corn starch acetate and native cornstarch. *Biomacromolecules.* Vol.5, Pag: 2329-2330.
- Hagen, M., Narvhus, J.A. (1999). Production of ice cream containing probiotic bacteria. *Milchwissenschaft.* Vol.54, Pag: 265-268.
- Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., (2008). *Ciencia e Tecnología de Alimentos.* Campinas. Vol. 28 (3), Pag: 718-726.
- Holley, R. A., Patel, D., (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology.* Vol. 22, Pag: 273-292.
- Jay, M., Loessner, J., Golden A. (2005). *Modern Food Microbiology* .
- Jenkins, P.J., Donald, A.M. (1998). Gelatinization of starch: A combined sax/wax/dsc and sans study. *Carbohydrate research.* Vol. 308 Pag: 133-147.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A., (2012). Edible and Biodegradable starch films: A review. *Food bioprocess Technol.* DOI 10.1007/s11947-012-0835-4.
- Kester, J.J., Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology.* Vol. 40(12), Pag: 47-59.
- Knutzon, C., Grove, M.J. (1994). Rapid method for estimation of amylose in maize starches. *Cereal Chemistry.* Vol. 71, n. 5, Pag: 469-471.
- Kristo E, Konstantinos P. Koutsoumanis, Costas G. Biliaderis. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes* *Food Hydrocolloids.* Vol.22, Pag: 373–386.
- Kozakiewicz, Z. (1989). Ornamentation types of conidia and conidiogenous structures in fasciculate *Penicillium* species using scanning electron microscopy. *J. Linn. Soc. Bot.* Vol. 99, Pag: 273-293.
- Kulisic, T. et al. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry,* Vol. 85 Pag: 633-640.
- Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., Puhán. (2002)..Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Microbiol Biotechnol.* Vol. 60, Pag: 73-80.
- Mahdi, Ojagh, S., Rezaei, M., Hadi, Razavi, S., Mohamad Hashem, S. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry.* Vol. 122, Issue 1, Pag: 161-166.
- 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.* Vol. 121, Pag: 385-391.

- Moufida, S., Marzouk, B., (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*. Vol. 62, Pag: 1283-1289.
- Mourey, A., Canillac, N., (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*. Vol. 13, Pag: 289-292.
- Msaada, K., Hosni, K., Ben Taarit, M., Chahed, T., Marzouk, B., (2007). Variations in the essential oil composition from different parts of *Coriandrum sativum L.* cultivated in Tunisia. *Ital. J. Biochem*. Vol. 56, Pag: 47-52..
- Myllarinen, P., Partanen, R., Seppala, J., Forsell, P. (2002). Effect of glycerol on behavior of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 50, Pag: 355-361.
- Navarro, D., Díaz-Mula, H.M, Guillen, F., Zapata, P., Castillo, S., Serrano, M., Valero, D., Martínez-Romero, D. (2011). Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus Stonifer*, *Botrytis cinérea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of food Microbiology*. Vol. 151, Pag: 241-246.
- Novamont TPS for Industrial Non-Food uses (2007). www.biomatnet.org/segure/Other/S1281.
- Oral, N., Vatansever, L., Sezer, Ç. Aydnm, B., Güven, A. (2009). Effect of absorbent pads containing oregano essential oil on the shelf life extension of overwrap packed chicken drumsticks stored at four degrees Celsius. *Poultry Science*. Vol. 88 (7), Pag: 1459-1465.
- Pagelle C., Spigno G., De Faveri D.M. (2002). Characterization of starch based edible coating. *Food and Bioproducts Processing* Vol. 80 Pag: 193-198.
- Palanca, M. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias naturales en films biodegradables. (En prensa).
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B. (1995). Antifungal Activity of Oregano and Thyme Essential Oils Applied as Fumigants Against Fungi Attacking Stored Grain. *Journal of Food Protection*. Vol. 58(1), Pag: 81-85.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C. (2011). Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coating containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 60, Pag: 64-70.
- Rindlav, A., Hulleman, S.H.D. & Gatenholm, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 34, Pag: 25-30.
- Romero-Bastidas, C., Bello-Perez, L., Garcia, M.A., Martino, M.N., Solorza-Feria, J., Zaritzky, N.E.(2005). Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non –conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 60 Pag: 235-244.
- Roos, S. (2014). Controlled activation of the reuterin-production machinery of *Lactobacillus*. US 2014/0057992 A1.
- Ruiz, A.G. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Ingeniería y Ciencia* ISSN 1794-9165. Vol. 2, N° 4, Pag: 5-28.
- Ruiz, G., Montoya, C., Paniagua, M. (2009). Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. *Revista EIA*. Vol. 12, Pag: 67-78.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*. Vol. 98, Pag: 443-452.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M., (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering reviews*. Vol. 3, Pag: 1-16.

- Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.M., Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *Int J Food Microbiol.* Vol. 55, Pag: 167-170.
- Schutz, H., Radler, F. (1984) anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1, 3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol.* Vol. 5, Pag: 169-178.
- Soares, F. F., Rutishauser, D.M., Melo, N. (2002). Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. *Packaging Technology and Science.* Vol 15, Pag: 129-132.
- Sobolov, M., Smiley, K.L. (1960). Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. *J Bacteriol.* Vol. 79, Pag: 261-266.
- 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.* Vol. 18, Pag: 409-413.
- Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 32, Pag: 1854-1858.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Vol. 93, Issue 11, Pag: 2707-2714.
- Turina A.V., Nolan M.V., Zygodlo J.A., Perillo M.A., (2006). Natural terpenes: selfassembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry.* Vol: 122, Pag: 101–113
- Viuda, M., Ruiz, Y., Fernandez, J., Perez, J. A. (2009). Innovative Food Science & Emerging Technologies. Vol 10, Issue 4, Pag: 590-600.
- Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T., Can, Q. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* Vol. 101, Pag: 1558-1564.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y. (2010). Original article: 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 & Technology.* Vol 45, Issue 9, Pag: 1837-1842.
- Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science, Chicago.* Vol. 70, n. 1, Pag: 45-51.
- Zobel, H.F. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. Article published on line Wiley-vch. Vol. 40, Issue 1, Pag: 1-7.