

Volátiles de aceite esencial de Romero logran...**Pesantez, Gisell y cols. (2016)**

VOLÁTILES DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO LOGRAN UNA MEJOR CALIDAD DE TOMATE FRESCO CORTADO ALMACENADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA

Pesantez, Gisell¹; León, Angela²; Laurella, Sergio³; Zabala, Lucía¹; Viña, Sonia^{1,4}; Lemoine, Ma. Laura^{1,4}; Concellón, Analía^{1,5}.

¹CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos). CCT La Plata- CONICET y Facultad de Ciencias Exactas-Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Calles 47 y 116. CP 1900-La Plata, Buenos Aires, Argentina; ²Cátedra de Microbiología, Fac. Cs. Exactas, UNLP. Calles 47 y 115. CP 1900-La Plata, Argentina; ³CEQUINOR (Centro de Química Inorgánica). CCT La Plata CONICET y Fac. Cs. Exactas, UNLP. Calles 47 y 115. CP 1900-La Plata, Argentina; ⁴LIPA (Laboratorio de Investigación en Productos Agroindustriales). Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP. Calles 60 y 119. CP 1900-La Plata, Argentina; ⁵CIC-PBA (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires). E-mail: aconcell@quimica.unlp.edu.ar

Palabras clave: 1,8-cineol, L-canfor, *Aspergillus fumigatus*, *Candida guilliermondii*, *Kloeckera* spp.

RESUMEN

Los aceites esenciales de plantas y especias poseen un reconocido efecto antimicrobiano y se los emplea como preservadores naturales de alimentos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de aceite esencial (AE) en tomate fresco cortado almacenado en atmósfera modificada y refrigerado. Se realizaron ensayos con tomates cortados en rodajas (7 mm), colocando 6 rodajas por bandeja y aceites esenciales (AE) de romero o laurel (0, 15, 30, 50 y 100 μ L) en un papel de filtro sobre un lateral de la bandeja y se envasaron con film PD 961 (Cryovac®) para almacenarlos a 5°C por 13 d. Los respectivos controles no se envasaron con AE. El AE de romero (30 y 50 μ L) y laurel (30 μ L) mostraron un menor índice de deterioro respecto de los controles, aunque el más efectivo fue el AE de romero (30 μ L). Esta condición se empleó en un segundo ensayo en cual se identificó (por CG-MS) la presencia de los compuestos volátiles α -pineno, canfeno, p-cimeno, 1,8-cineol y L-canfor en el AE de romero empleado. Mientras que, luego de 4 d de almacenamiento, el 1,8-cineol y L-canfor fueron los compuestos mayoritarios en la atmósfera de las bandejas tratadas y los únicos presentes en las rodajas de tomate. Por otro lado, el empleo de AE de romero (30 μ L) retrasó el ablandamiento y desarrollo de bacterias, hongos y levaduras. Se aisló un hongo filamentoso y se identificó mediante claves taxonómicas como *Aspergillus fumigatus* y dos levaduras que se identificaron como *Candida guilliermondii* y *Kloeckera* spp. Mediante el kit API® 20C AUX. Se analizaron distintos volúmenes de AE frente a una determinada concentración de microorganismos, hallándose que dichos % de inhibición se incrementaban con la cantidad de AE. Los resultados muestran que el AE de romero ejerce un efecto antimicrobiano en diferentes volúmenes para *A. Fumigatus*, *Candida guilliermondii* y *Kloeckera* spp., y permite incrementar el tiempo de vida útil del tomate fresco cortado almacenado en atmósfera modificada.

VOLATILE OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL ACHIEVE A GOOD QUALITY OF FRESH CUT TOMATOES STORED IN MODIFIED ATMOSPHERE

Keywords: 1,8-cineole, L-camphor, *Aspergillus fumigatus*, *Candida guilliermondii*, *Kloeckera* spp.

ABSTRACT

The essential oil of herbs and spices has an antimicrobial effect and the natural used as food preservatives is recognized. The aim of this work was to study the effect of the application of essential oil (EO) in fresh cut tomato and refrigerated stored in modified atmosphere. Trials with sliced tomatoes (7mm) were performed by placing six slices per tray and essential oils (AE) rosemary or laurel (0, 15, 30, 50 and 100 μ L) in a filter paper on one side of the tray and film were packaged with PD 961 (Cryovac®) for storage at 5 °C for 13 d. Controls were packaged without EO. The rosemary (30 and 50 μ L) and laurel EO (30 μ L) showed a lower deterioration index compared to the controls, but the most effective was the rosemary EO (30 μ L). This condition was used in a second trial where volatile compounds as α -pinene, camphene, p-cymene, 1,8-cineole and L-camphor were

identified (by GC-MS) in rosemary EO employed. While, after 4 d of storage, 1,8-cineole and L-camphor were the main compounds in the atmosphere of the treated trays and only ones present in the tomato slices. Furthermore, the use of rosemary EO (30 μ L) delayed softening and decay caused by bacteria, fungi and yeasts. Microorganisms were isolated and a filamentous fungus was identified by taxonomic keys as *Aspergillus fumigatus* and two yeasts were identified as *Candida guilliermondii* and *Kloeckera* spp. using the kit API 20C AUX[®]. Different volumes of EO were analyzed against a concentration of microorganisms, where it was found that inhibition % being increased with the amount of AE. The results show that the AE rosemary exerts an antimicrobial effect on different volumes for *A. fumigatus*, *Candida guilliermondii* and *Kloeckera* spp., and allows to increase the shelf life of fresh cut tomatoes stored in modified atmosphere.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas (*Solanaceae*). El fruto de tomate es una baya de pulpa tierna y jugosa. Es un producto muy consumido en la Argentina, principalmente trozado para ensaladas o en forma de rodaja para sándwiches o su empleo en pizzas. La posibilidad de comercializar este producto ya cortado lo clasifica como un producto mínimamente procesado o fresco cortado. Estos productos son conservados y distribuidos en refrigeración, y están listos para ser consumidos crudos sin ningún tipo de operación adicional (Kader, 2002).

Debido a la manipulación durante su procesado los vegetales frescos cortados sufren varios cambios en su estructura y composición, el corte aumenta la superficie de tejido susceptible de contaminación microbiana. Por lo tanto resulta indispensable combinar tecnologías poscosecha con una adecuada refrigeración para extender el período de vida útil para su comercialización. Algunas de estas tecnologías pueden ser atmósfera modificada y aplicación de preservadores químicos.

La demanda de alternativas a los antibióticos y productos químicos en alimentos ha incrementado la investigación sobre los extractos vegetales, especialmente de los aceites esenciales como preservadores de la calidad y antimicrobianos. Los aceites esenciales (AE) están formados por productos orgánicos volátiles insolubles en agua (principalmente terpenos) que existen en diversas partes de las plantas y que son

obtenidos a partir de las mismas mediante destilación en corriente de vapor. En particular, en el aceite esencial de romero se han hallado compuestos como: α - y β -pineno, canfeno, p-cimeno, β -felandreno, 1,8-cineol, L-canfor, β -mirceno, entre otros (Turek y Stintzing, 2012).

Es así que en el presente trabajo se estudió el efecto de la aplicación de aceite esencial en forma de vapor sobre la calidad de tomate fresco cortado almacenado en atmósfera modificada y refrigerado. Así mismo se identificaron los volátiles del AE y aislaron e identificaron microorganismos nativos de las rodajas de tomate para finalmente analizar el efecto inhibitorio del AE sobre los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron tomates (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Redondo, los cuales fueron preseleccionados, lavados, sumergidos en NaClO (150 ppm) por 5 min, secados; se cortaron en rodajas de 7 mm.

Selección del tipo y concentración de aceite esencial

Se ensayaron AE de laurel y romero. En cada bandeja de telgopor se colocó una tira de papel de filtro, fijada en un lateral, impregnada con distintos volúmenes de AE (0, 15, 30, 50 y 100 μ L). Las muestras control no se tratan con AE. Se seleccionó una condición óptima según el menor deterioro observado para, en un segundo ensayo, analizar la composición de volátiles y desarrollo de microorganismos.

Envasado y almacenamiento

Las bandejas con 6 rodajas de tomate y con tira de papel impregnada o no en AE se envasaron con film PD961 (Cryovac®) y se almacenaron a 5 °C durante 16 días.

Índice de deterioro

Se estableció un índice que abarcaba presencia de microorganismos y deterioro general en cada rodaja de tomate, usando una escala de 1 a 5, siendo: 1=sin deterioro, 2=deterioro leve, 3=deterioro moderado, 4=deterioro regular, 5=deterioro severo. Se calculó según la siguiente ecuación

$$\text{Índice de deterioro} = \frac{\sum \text{índice} * \text{Nº de rodajas puntuadas}}{\text{Nº total de rodajas}}$$

Determinación de compuestos volátiles por cromatografía gaseosa

Se analizaron y cuantificaron compuestos volátiles presentes en el AE de romero, rodajas de tomate y en atmósfera de bandejas controles y tratadas, empleando un CG-FID (Agilent Technologies 7890 A), columna HP-5 (30 m, 0.320 mm de ID, 6.25 µm) y tiempo total de corrida de 41 min. La identidad de los picos mayoritarios fue comprobada mediante CG-MS (HP 5890 Series II Plus, detector de espectrometría de masas HP 5972A, columna HP5-MS, (30 m, 0.25 mm, 5 µm) y compuestos patrones. Se inyectaron en cada caso: i) 2 µL de una mezcla de AE de romero diluido en diclorometano; ii) 500 µL de la atmósfera gaseosa que rodea las rodajas de tomate empacadas; iii) 500 µL de headspace del vial de 60 mL conteniendo 20 g de rodajas de tomate trituradas incubado a 70 °C durante 60 min.

Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, hongos y levaduras

Las rodajas de tomate de bandejas control y tratadas se procesaron y 25 g del triturado se homogenizaron en 225 mL de agua peptona estéril 0.1 %.

Tanto para el recuento de bacterias aerobias mesófilas como de hongos y levaduras se realizaron diluciones por duplicado entre 10^{-1} y 10^{-3} para el día 0, y diluciones entre 10^{-2} y 10^{-5} para los días siguientes. La dilución 10^{-1} se sembró en profundidad y las demás en superficie. Para el recuento de bacterias aerobias mesófilas se utilizó medio PCA y se incubaron 2 d a 37 °C. En el caso de hongos y levaduras, se utilizó medio YGC y se incubaron 5 d a 20 °C. De estos recuentos se aislaron dos levaduras y un hongo filamentoso para su identificación, y sensibilidad al AE de romero seleccionado.

Identificación de microorganismos:

a-Hongo filamentoso: se aisló por repiques sucesivos en medio DRBC y se clasificó morfológicamente (Pitt y Hocking, 1999).

b-Levaduras: se aislaron por la técnica de estriado y se identificaron empleando el sistema API 20 C Aux (Bio Merieux, Francia).

Efecto inhibitorio del aceite esencial de romero frente a microorganismos aislados

a) Preparación de microorganismos: El hongo filamentoso, se inoculó en agar papa dextrosa PDA inclinado durante 5 días a 30 °C. Después se añadieron 10 mL de solución de esporas (0,01 % lauril sulfato de sodio, y 1% de glucosa) a los tubos. Los conidios se aflojaron raspando suavemente con un anza y se realizaron diluciones seriadas. A fin de determinar el número total de conidios se sembraron en superficie de agar malta, (extracto de malta 1%, extracto de levadura 2% y agar agar 2%) 100 uL de tres diluciones consecutivas, los cuales se homogenizaron con perlas estériles. Las cajas se incubaron por 5 días a 30 °C y una vez terminada la incubación se procedió a hacer el recuento de conidios mL^{-1} . El número de conidios totales se corroboró mediante un recuento en cámara de Neubauer.

Para la preparación del inóculo de levaduras, se siguió la misma metodología que

en el hongo filamentoso pero empleando como medio de cultivo agar YGC® (BIOKAR, Beauvais, Francia) y agua de peptona (0,1% p/v) para las diluciones seriadas.

b) Variación de volúmenes de AE de romero: Se seleccionó una concentración tanto de hongo filamentoso como de cada levadura, se sembraron en medio malta para hongos e YGC para levaduras y se incubaron sobre las bandejas empleado el mismo sistema diseñado anteriormente, pero se impregnó la cinta de papel de filtro con diferentes concentraciones de AE de romero (0, 15, 30, 50 y 100 μ L). Se incubaron 5 d a 30 °C.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo a un diseño factorial. Los resultados se analizaron por ANOVA y las medias se compararon mediante el test LSD de Fisher con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de concentración y tipo de aceite esencial

Las rodajas de tomate control y tratadas con las distintas concentraciones y tipos de AE se almacenaron durante 16 d y se analizó visualmente el avance del deterioro, considerando el producto como no consumible cuando mostrara un índice ≥ 4 . El deterioro observado contempló desarrollo de microorganismos, exudado en bandejas, y deshidratación superficial en las rodajas. En la Figura 1 se observa que en general el empleo de AE de laurel y romero logró un menor o igual índice de deterioro respecto del control luego de 11 y 16 d de almacenamiento refrigerado. La concentración de romero 30 μ L fue la que logró el menor índice. El AE de laurel en concentraciones de 30 y 50 μ L mostraron un marcado retraso del deterioro frente al control pero la efectividad no fue mejor respecto del AE de romero. Estos resultados permitieron elegir el AE de romero

de 30 μ L para efectuar los ensayos posteriores.

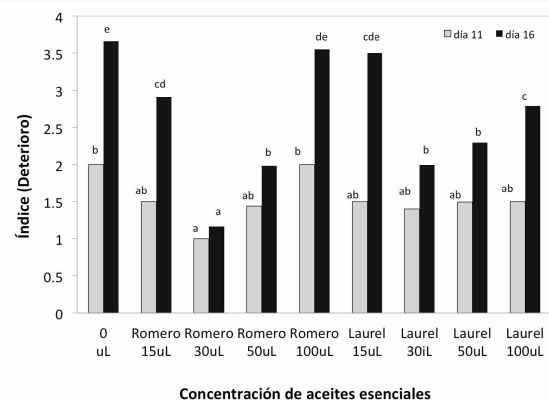


Figura 1: Índice de deterioro de rodajas de tomate control y tratadas con aceites esenciales de romero y laurel a diferentes concentraciones durante el almacenamiento a 5 °C por 11 y 16 días. Letras distintas indican diferencias significativas en un test de LSD de Fisher a un nivel de significancia de 0,05.

Efecto del AE de romero (30 μ L) Índice de deterioro

Se evidenció mayor deterioro en las rodajas controles que en las rodajas tratadas luego de 8 y 13 días de almacenamiento, sin embargo al día 13 se observó desarrollo microbiano en ambos grupos, aunque con menor porcentaje en las rodajas tratadas con aceite esencial (Figura 2)

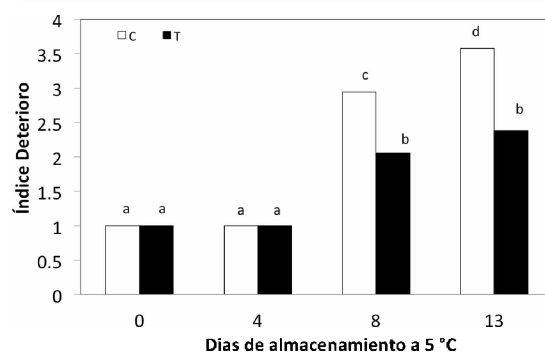


Figura 2: Índice de deterioro de rodajas de tomate control (C) y tratadas (T) con aceite esencial de romero 30 μ L y almacenadas a 5 °C por 13 días. Letras distintas indican diferencias significativas en un test de LSD de Fisher a un nivel de significancia de 0,05.

Compuestos volátiles de AE de romero

En primer lugar se analizó el perfil cromatográfico de AE de romero (Figura 3). Se lograron identificar 7 picos mayoritarios que se numeraron según su tiempo de retención. En la tabla 1 se detallan los compuestos identificados. Al igual que en otros trabajos (Jiang *et al.*, 2011), el 1,8-cineol fue uno de los compuestos mayoritarios. También es rico en el compuesto 3, el cual no pudo ser identificado pero se sospecha que puede ser β-pineno o mirceno de acuerdo al perfil de iones moleculares observados, aunque no se contaron con patrones para confirmar su identificación. Y en un segundo grupo de importancia estarían L-canfor y α-pineno.

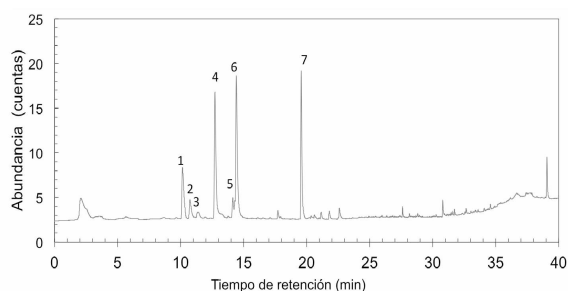


Figura 3: Perfil cromatográfico del aceite esencial de romero. Picos 1 a 7 detallados en Tabla 1.

Tabla 1: Compuestos mayoritarios detectados por CG-MS en el aceite esencial de romero, tiempos de retención (TR) y cantidad relativa (%).

Pico	Compuesto	TR (min)	%
1	α-pineno	10.1	9.13
2	Canfeno	10.7	3.40
3	X1	11.4	0.81
4	X2: β-pineno o Mirceno	12.7	33.10
5	p-cimeno	14.1	4.37
6	1,8-cineol	14.4	31.19
7	L-canfor	19.6	18.0
	TOTAL		100

En una segunda instancia se analizó cuáles de los compuestos del AE de romero eran retenidos tanto en las rodajas de tomate como en la atmósfera que las rodea. No se hallaron compuestos volátiles al analizar los empaques y rodajas controles, al menos en las condiciones de trabajo del CG-FID y CG-MS. Sin

embargo, al analizar los empaques tratados con el AE se observó que el compuesto 1=α-pineno y 2=canfeno disminuyen al día 4 hasta que prácticamente desaparecieron en el día 13 (Figura 4A).

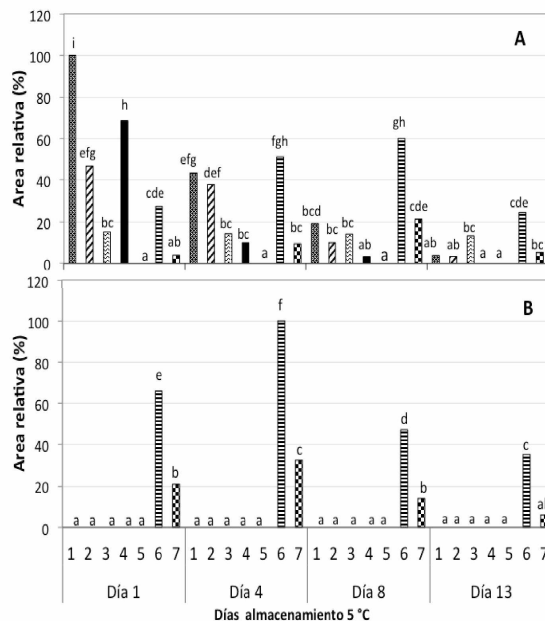


Figura 4: Area relativa (%) de compuestos volátiles (picos 1 a 7) de AE de romero presentes en: A) la atmósfera del envase B) rodajas (de tomate; tratadas con aceite esencial de romero 30 μL) durante 13 días de almacenamiento a 5 °C. Pico: 1 = α-pineno, 2= canfeno 3= X1, 4= X2: β-pineno o mirceno, 5= p-cimeno, 6= 1,8-cineol, 7= L-canfor

El pico 3=X1, presente en baja concentración, se mantuvo constante durante todo el almacenamiento. El pico 4=X2 presentó una concentración alta al inicio del almacenamiento pero rápidamente disminuyó debido tal vez a una gran permeabilidad a través del film PD961. El pico 5=p-cimeno no se acumuló en la atmósfera, mientras que los compuestos 6=1,8-cineol y 7=L-canfor se incrementan a los días 4 y 8, y disminuyen al día 13. Finalmente, al analizar las rodajas de tomate tratadas (Figura 4B) se observa que los compuestos 6=1-8 cineol y 7=L-canfor fueron los únicos adsorbidos por el tejido presentando un máximo al día 4 y fueron detectados hasta el final del almacenamiento.

Pintore *et al.*, (2002) y Prabuseenivasan *et al.*, (2006) reportaron resultados positivos en cuanto a la actividad antimicrobiana, antibacterial y antifúngica del AE de romero siendo esta propiedad atribuida a compuestos como: 1,8-cineol, α -pineno, limoneno, canfeno, L-canfor. Por lo que se podría pensar que la presencia mayoritaria de 1,8-cineol y L-canfor en las rodajas de tomate actuaron como preservantes logrando un menor desarrollo de microorganismos.

Análisis microbiológico

Como resultado del recuento de microorganismos efectuado, en la figura 5A se observa que el desarrollo de bacterias muestra un incremento durante el almacenamiento, aunque los valores hallados son significativamente menores en tomates tratados. De igual forma ocurre con el desarrollo de hongos y levaduras (Figura 5B), sin embargo se observa un menor crecimiento en rodajas tratadas con AE de romero 30 μ L a partir del día 4 hasta el día 13 de almacenamiento.

Identificación morfológica de microorganismos

El hongo filamentoso se identificó morfológicamente como *Aspergillus fumigatus* mediante claves taxonómicas y las levaduras se identificaron como *Candida guilliermondii* y *Kloeckera* spp. mediante el kit API® 20C AUX.

Efecto inhibitorio del AE de romero

Variación en los volúmenes de AE de romero: el AE de romero ejerció un efecto inhibitorio ya al emplear 15 μ L (Tabla 2) reduciendo el crecimiento de *A. fumigatus* y *Kloeckera* spp. de forma significativa, con respecto al control, logrando un 12.7 y 7.3 % de inhibición. Mientras que, para *C. guilliermondii* se necesitó 30 μ L de aceite esencial para producir una reducción significativa y llegar a un 13.2% de inhibición.

Estudios previos demuestran que los vapores generados por los aceites esenciales retrasan el ciclo de vida de algunos mohos en la etapa de germinación (Dao *et al.*, 2008).

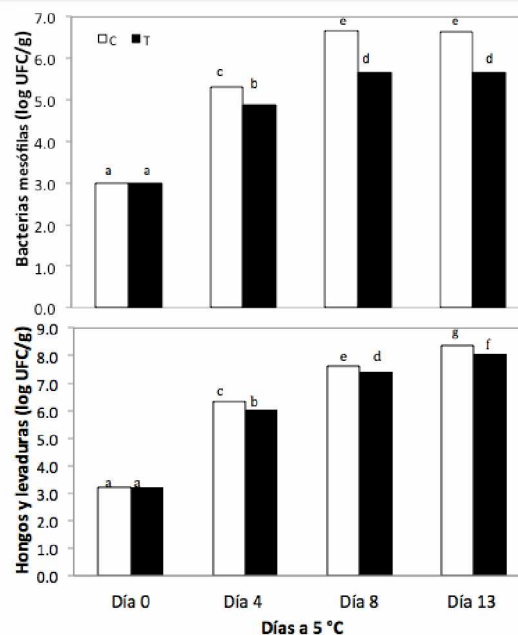


Figura 5: Recuento de: A) bacterias aerobias mesófilas; B) hongos y levaduras durante el almacenamiento a 5 °C de rodajas de tomates control (C) y tratadas (T) con aceite esencial de romero 30 μ L. Letras distintas indican diferencias significativas en un test de LSD a un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 2: Porcentaje de inhibición de AE de romero en diferentes concentraciones frente a microorganismos aislados.

Aceite Esencial (μ L)	Inhibición (%)		
	<i>Aspergillus fumigatus</i> (10^3 conid./mL)	<i>Candida guilliermondii</i> (10^4 UFC/mL)	<i>Kloeckera</i> spp. (10^4 UFC/mL)
15	12.7 ^a	3.0 ^a	7.3 ^a
30	41.9 ^b	11.9 ^b	12.0 ^a
50	44.1 ^b	13.2 ^b	24.3 ^b
100	54.7 ^c	14.5 ^b	25.0 ^c

CONCLUSIONES

El empleo de 30 μ L de aceite esencial de romero permitió prolongar la vida útil del tomate mínimamente procesado retrasando la

aparición de síntomas de daño y microorganismos. Se halló presencia de casi todos los compuestos volátiles del AE en la atmósfera del empaque, mientras que sólo el 1,8-cineol y L-canfor se hallaron en las rodajas de tomate. Las concentraciones relativas fueron variando a lo largo del almacenamiento refrigerado.

El retraso en el crecimiento de mohos indica que el AE de romero es una alternativa para la conservación de tomate fresco cortado. Se aislaron e identificaron la presencia de *A. fumigatus*, *Candida guilliermondii* y *Kloeckera* spp. Si bien el AE de romero ejerce un efecto inhibitorio diferente sobre el hongo respecto de las levaduras puede ser aplicado para lograr el incremento de la vida útil del tomate en rodajas.

REFERENCIAS

- Dao, T., Bensoussan, M., Gervais, P., Dantigny, P. 2008. Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by ethanol solutions and vapours. *Int. J. Food Microbiol.* 122(1-2): 68-73.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Protect.* 65:1545–1560.
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y., Wang, W., Luo, Meng., Zhao, C., Zu, Y., Liu., X. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Phar.* 32: 63-68
- Kader, A.A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Third edition. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, 535 p.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. *Flav. Fragr. J.* 17, 15-19.
- Pitt J.I., Hocking A. 1999. *Fungi and Spoilage*. 2a Ed. Aspen.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 6: 39-46.
- Turek, C., Stintzing, F.C. 2012. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food. Res. Int.* 46,341–353.