



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

2012-2013

**“EFECTO DE FILMS COMESTIBLES Y ALTAS PRESIONES
SOBRE LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE TRUCHA”**

TESIS DE MÁSTER

IRENE ALBERTOS MUÑOZ



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DPTO. DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

DÑA. ISABEL JAIME MORENO PROFESORA TITULAR Y DÑA. ANA M. DIEZ MATÉ PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL ÁREA DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS.

CERTIFICAN: Que el proyecto de investigación titulado: "EFECTO DE FILMS COMESTIBLES Y ALTAS PRESIONES SOBRE LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE TRUCHA" del que es autora Dña. Irene Albertos Muñoz, ha sido realizado bajo su tutela dentro del Máster en Seguridad y Biotecnología Alimentarias.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Burgos, a veintinueve de enero de dos mil trece.

Firma manuscrita en azul de Isabel Jaime Moreno.

Fdo.: Isabel Jaime Moreno

Firma manuscrita en azul de Ana M. Diez Maté.

Fdo.: Ana M. Diez Maté



INSTITUTO
TECNOLÓGICO
AGRARIO

Junta de Castilla y León
Consejería de Agricultura y Ganadería

Ctra. Burgos Km. 119
FINCA ZAMADUEÑAS
47071 Valladolid
España

T +34 983 414 769
F +34 983 412 040
www.itacyl.es

Dr. Daniel Rico Bargues Y Dra Lucía González Arnáiz, INVESTIGADOR Y TÉCNICO, RESPECTIVAMENTE, DE LA PLANTA PILOTO DE PRODUCTOS Y PROCESOS ALIMENTARIOS INNOVADORES DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO AGRARIO, ADSCRITO A LA CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA DE LA JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN

CERTIFICAN: Que han tutelado a Dña. Irene Albertos Muñoz en el Instituto Tecnológico Agrario durante la realización del proyecto de investigación titulado: "Efecto de films comestibles y altas presiones sobre la vida útil de filetes de trucha"

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valladolid, a veinticinco de enero de dos mil trece.

Fdo.: Dr. Daniel Rico Bargues

Dra. Lucía González Arnáiz

INDICE

1. Introducción	2
2. Objetivos	5
3. Material y métodos	
3.1 Elaboración de films de quitosano.....	5
3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los films de quitosano.....	6
3.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los films de quitosano	
3.3.1 Preparación de muestras para la determinación de la capacidad antioxidante de los Films.....	7
3.3.2 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).....	7
3.3.3 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	8
3.3.4 Determinación de polifenoles totales.....	8
3.4 Estudio del efecto de los films de quitosano con aceite de clavo y de las altas presiones sobre la vida útil del pescado	
3.4.1 Preparación de muestras y tratamiento de alta presión y cocinado.....	9
3.4.2 pH.....	9
3.4.3 Aw.....	9
3.4.4.Drip loss (merma).....	10
3.4.5 Evaluación microbiológica de los diferentes tratamientos.....	10
3.5 Análisis estadístico.....	10
4. Resultados	
4.1 Actividad antimicrobiana de los films de quitosano.....	10
4.2 Capacidad antioxidante de los films de quitosano.....	13
4.3 Estudio del efecto conservador de los films de quitosano con aceite de clavo y de las altas presiones sobre la vida útil del pescado	
4.3.1 pH.....	16
4.3.2 Aw.....	18
4.3.3 Drip loss (merma).....	18
4.4.4. Evaluación microbiológica de los diferentes tratamientos.....	19
5. Conclusiones	20
6. Bibliografía	21

1. INTRODUCCIÓN

Los países industrializados están cada vez más interesados en los alimentos “mínimamente procesados”. Este concepto describe las estrategias para garantizar la seguridad alimentaria y la conservación de los alimentos al mismo tiempo que mantiene sus propiedades de frescura y características “naturales”. La tecnología de barreras es una técnica de procesado mínimo que aprovecha el sinergismo entre métodos de conservación con el objetivo de que con menor intensidad de los mismos se potencien los efectos antimicrobianos, mientras que el impacto en las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos se minimice (Ross et al., 2003). El concepto de “tecnología de barrera” (hurdle technology) fue introducido por primera vez por Leistner en 1978 y es importante, sobre todo, en la conservación de alimentos de humedad media y alta (Leistner, 2000).

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos mínimamente procesados ha supuesto que uno de los mayores desafíos por parte de la industria sea la reducción de los aditivos sintéticos por otros naturales (Sánchez-González et al., 2011).

Los aceites esenciales han sido utilizados desde la antigüedad como agentes flavorizantes, sin embargo hoy en día están ganando interés por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Entre ellos uno de los más efectivos ha sido el aceite de clavo (Holley y Patel, 2005). El aceite de clavo se compone mayoritariamente por eugenol en un 75-85% (Burst, 2004). Una de las limitaciones que presenta es su intenso aroma, que puede provocar cambios organolépticos que podrían no ser aceptados por el consumidor. Además los aceites esenciales tienen un elevado precio. Actualmente se pretende minimizar estos problemas incorporándolos a films comestibles (Sánchez-González et al., 2011). Al adicionar el aceite en los films se consiguen varias ventajas, por una parte se reduce la cantidad necesaria de aceite utilizado, además de conseguir una liberación progresiva a lo largo de su vida útil (Campos et al., 2011) así como una mayor efectividad, ya que sobre la superficie del alimento es donde se produce un mayor crecimiento microbiano (Marcos et al., 2013).

Los propios films actúan como barrera al oxígeno y al agua, reduciendo las reacciones de oxidación y reteniendo la humedad, mejorando la calidad y aumentando la vida útil (Ojagh, 2011). Uno de los compuestos que se utiliza en la elaboración de los films es el quitosano, un polisacárido obtenido por desacetilación de la quitina, que es abundante en los exoesqueletos de crustáceos (cangrejo, langosta, gambas...) y cuya capacidad antibacteriana, antioxidante y de formación de films hace que tenga un

interés creciente como aditivo alimentario (Campos et al., 2011). De hecho, se ha aprobado su uso como aditivo en países como Japón y Corea (Fernández-Saiz et al., 2009). Los films de quitosano tienen una permeabilidad selectiva a los gases (O_2 y CO_2) y presentan buenas propiedades mecánicas. El único inconveniente de este tipo de film es su naturaleza hidrofílica, siendo una escasa barrera para la humedad. El control de la humedad es una propiedad de los films deseable en muchos productos. En este sentido, el uso de aceites esenciales en los films de quitosano previsiblemente mejoraría la barrera al agua debido a su naturaleza hidrofóbica (Ruiz-Navajas et al., 2013).

Por otra parte, la tecnología de altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing - HPP) mejora la seguridad y alarga la vida útil de los alimentos sin la adición de aditivos porque es capaz de inactivar microorganismos y enzimas endógenas, mientras que los compuestos termolábiles sufren una degradación limitada en comparación con la producida por los tratamientos térmicos convencionales (Yagiz, et al., 2007). La causa principal del daño en la célula vegetativa por alta presión es la permeabilización de la membrana celular debido a los cambios irreversibles en la estructura de las macromoléculas de la membrana como las proteínas. La permeabilización de la célula es también afectada por la compresión de la bicapa de fosfolípidos de la membrana (Ross et al., 2003).

A pesar de la amplia aceptación que han tenido las altas presiones, para muchas de sus potenciales aplicaciones se requieren largos tiempos de tratamiento para garantizar una adecuada inactivación de microorganismos patógenos y alterantes. (Gayán, 2012). Aunque la calidad de los alimentos tratados con alta presión sea superior comparada con la de los que han sufrido tratamiento térmico convencional, algunos productos sufren una significativa pérdida de calidad. Una de las posibles estrategias para aunar la deseada inactivación microbiana junto con la retención de niveles óptimos de calidad es el uso de las tecnologías de barrera (Rauche et al., 2011).

El sinergismo entre las altas presiones y agentes antimicrobianos es debido a que las altas presiones, como ya se ha señalado, provocan cambios en la estructura de la membrana, y por ello se incrementa la eficiencia de los compuestos antimicrobianos ya que la presión provoca que los compuestos antioxidantes sean absorbidos por los microorganismos dañados subletalmente por las altas presiones (Rauche et al., 2011). Por otra parte, Ross et al. (2003) señalaron que el tratamiento con agentes antimicrobianos sensibiliza a las bacterias resistentes a las altas presiones y por tanto

estos autores destacan que el agente antimicrobiano debe estar presente cuando se haga el tratamiento con alta presión y no adicionarse después.

Otro de los posibles mecanismos de sinergismo entre altas presiones y aceites esenciales es según Gayán et al. (2012) la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción en la fuerza de los protones y en el flujo de electrones y alteración en la interacción proteína-lípido de la membrana celular repercutiendo en las funciones celulares. Estos autores concluyen como la efectividad del sinergismo entre un determinado aceite esencial y la inactivación microbiana alcanzada con el tratamiento de alta presión depende de la ecología microbiana del producto, los mecanismos moleculares de inactivación microbiana por las altas presiones y el modo de actuación del propio aceite esencial.

Existen varios estudios sobre la combinación de films con altas presiones (Gómez-Estaca et al., 2007; Marcos et al., 2008; Bolumar et al., 2011; Ojagh et al., 2011; Marcos et al., 2013), la mayoría de ellos con films de gelatina incorporados a productos cárnicos. Los principales objetivos que han tenido los films en pescado según la bibliografía consultada han sido aumentar la vida útil previniendo la contaminación con la microflora alterante, inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, evitar el deterioro oxidativo e impedir la pérdida de humedad en el producto (Campos et al., 2011). El uso de altas presiones permite aumentar la vida útil de los productos, pero presenta inconvenientes como son el cambio de color y el posible aumento de la oxidación. Estos efectos negativos se intentan mitigar con los films comestibles (Ojagh et al., 2011), además de buscar un efecto sinérgico entre films y alta presión en la estabilidad microbiológica y oxidativa del producto aumentando su vida útil (Gómez-Estaca et al., 2007).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) tiene buena digestibilidad y un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega 3. Al ser un producto altamente perecedero, debido al crecimiento microbiano y a su contenido en ácidos grasos poliinsaturados fácilmente oxidables, es importante encontrar tecnologías de conservación que permitan aumentar su vida útil. Una posible estrategia es la utilización de films a los que se incorpore un aceite esencial, que ya ha sido estudiada por otros autores con films de gelatina y canela (Andevári y Rezaei, 2011). En este trabajo se aplicarán además altas presiones, ya que según se ha descrito pueden tener un efecto sinérgico y nunca se ha estudiado su efecto en esta especie de pescado.

2. OBJETIVOS

En este trabajo se pretende conocer la eficacia sobre la conservación de pescado fileteado, en particular trucha, de films de quitosano con distintas concentraciones de aceite de clavo combinados con la aplicación de altas presiones hidrostáticas. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo (0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 5%).
2. Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo (0; 0,5; 1; 1,5; 2 y 5%).
3. Determinar el efecto tanto de los films de quitosano con aceite de clavo como de las altas presiones sobre la conservación del pescado, así como el posible efecto sinérgico de los dos métodos. Este estudio se realizará en comparación con los tratamientos térmicos convencionales.

La tesis de máster constituye una parte del estudio global. En ella se incluye el estudio del efecto de los films y las altas presiones sobre las características microbiológicas del pescado a lo largo del almacenamiento en refrigeración. De forma paralela se ha realizado el estudio del efecto de las mismas técnicas de conservación sobre las características sensoriales y la estabilidad a la oxidación del pescado

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Elaboración de films de quitosano

Los films se prepararon añadiendo 1,5 g de quitosano (Sigma Aldrich Chemical Co Steinheim, Alemania) a 100 mL de una solución acuosa de ácido acético (E-260 aditivo) al 1% (v/v) (Panreac Química, Barcelona, España). Se mantiene en agitación en baño de agua a 40°C (GDE digestor enzimático, Velp Scientifica, Italia) hasta su completa disolución durante dos horas. A continuación se añade 0,5 g de glicerol (E-422 aditivo) (Panreac) por gramo de polímero. Se agita a temperatura ambiente durante media hora. Posteriormente se adiciona 0,2% de tween 80 (E-433 aditivo) (Panreac) y el aceite de clavo (Panreac) en las siguientes proporciones 0,5%, 1%, 1,5%, 2% y 5%. A continuación se homogenizan las soluciones con ultraturrax (Ultraturrax IKA T25 digital, IKA-Werke, Alemania) manteniéndolas en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de las soluciones. Posteriormente, se desgasifican a temperatura ambiente usando un baño de ultrasonidos (Selecta SA, España) durante media hora y se dejan en oscuridad una noche. Se dispensan 20 mL de la solución en placas petri.

Se secan durante 15 horas a 42°C en un incubador con aire forzado (Biosan ES-20, Biogen Científica SL, Madrid, España). Antes de la realización de los análisis los films son acondicionados en desecadores con sal saturada de KBr (Panreac) consiguiendo una humedad relativa del 58%

3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los films de quitosano

La actividad antimicrobiana se determinó mediante un **ensayo de difusión en agar**. Los microorganismos seleccionados fueron cinco específicos del pescado (*Shewanella putrefaciens*, *Lactobacillus sakei*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fragi* y *Vibrio alginolyticus*) y cinco generales (*Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus warneri*, *Enterococcus faecalis* y *Leuconostoc mesenteroides*). Se inocularon 100µL de concentración 7 log ufc/ml de los cultivos bacterianos seleccionados en las condiciones descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de cultivo de los distintos microorganismos para el estudio de la actividad antimicrobiana

Microorganismo	Número CECT	Medio	Temperatura	Tiempo	Dilución inóculo de partida
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT 481	BHI (Oxoid, Basingstone, Hampshire, England)	37°C	24 horas	10 ⁻¹
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CECT 5173	TSA (Oxoid)	30°C	48 horas	1
<i>Lactobacillus sakei</i>	CECT 4808	MRS (Oxoid)	30°C	24 horas (CO ₂)	1/2
<i>Pseudomonas fragi</i>	CECT 378	NA II (Oxoid)	30°C	24 horas	10 ⁻¹
<i>Shewanella putrefaciens</i>	UPNA 5346	NA II (Oxoid)	25°C	48 horas	10 ⁻¹
<i>Staphylococcus warneri</i>	CECT 236	NAI (Oxoid)	37°C	24horas	1
<i>Vibrio alginolyticus</i>	UPNA 521	NAI+3%NaCl (Oxoid)	26°C	24horas	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 219	MSR (Oxoid)	30°C	24 horas	10 ⁻²
<i>Escherichia coli</i>	CECT 434	TSA (Oxoid)	37°C	48 horas	10 ⁻²
<i>Listeria innocua</i>	-	BHI (Oxoid)	37°C	48 horas	10 ⁻²

CECT: Colección Española de Cultivos tipo. UPNA: Universidad Pública de Navarra

Una vez que el inóculo distribuido en el medio correspondiente mediante el empleo de asas de Digrafsky estaba seco, se cortaron trozos de los films de quitosano (0, 0,5 1,

1,5, 2 y 5% de aceite de clavo) con un diámetro de 13 mm y se colocaron sobre las placas petri (90 mm de diámetro) que previamente habían sido inoculadas. Se realizaba una placa control sin película para asegurar el crecimiento de la bacteria diana. Las placas eran incubadas en las condiciones descritas en la tabla 1. Los resultados de la actividad antimicrobiana se expresaron de dos formas: diámetro de inhibición (mm) y porcentaje de inhibición (%). Los ensayos se hicieron por triplicado.

3.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los films de quitosano

3.3.1 Preparación de muestras para la determinación de la capacidad antioxidante de los films

Como preparación previa a la evaluación de la capacidad antioxidante de los films, se introdujeron 200 mg de cada film en 30 mL de metanol (Panreac), se agitaron a 400 rpm a temperatura ambiente durante 90 minutos en un incubador (Biosan ES-20, Biogen Científica SL). Después se centrifugaron a 5.500 rpm y se recogió el sobrenadante.

3.3.2 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Este ensayo estima la capacidad para reducir el radical $ABTS^{\cdot+}$, que es generado por oxidación con persulfato potásico ($K_2S_2O_8$) del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica), obteniendo un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm. La capacidad antioxidante es medida como habilidad de los compuestos para disminuir el color reaccionando directamente con el radical $ABTS^{\cdot+}$.

El análisis se llevó a cabo según describen Re et al. (1999). Se preparó una solución 7 mM de ABTS (Sigma Aldrich Co) con $K_2S_2O_8$ (Sigma Aldrich Co) 2,45 mM en agua ultrapura, y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 h para la formación del radical. Seguidamente, se diluye hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,2$) a 730 nm.

Las muestras, preparadas según el apartado anterior, se diluyeron en etanol (1:100 w:w) (Panreac). En placas de 96 pocillos de poliestireno transparente se añadieron 20 μ L de cada muestra por duplicado, las soluciones correspondientes a la curva de estándares de trolox (Sigma Aldrich Co) (240 μ M a 60 μ M) y etanol para el blanco. La solución de radical $ABTS^{\cdot+}$ era aplicada automáticamente por el lector de placas (FluOstar Omega, BMG) y la absorbancia medida a 730 nm. Los resultados se expresaron en μ moles equivalentes de Trolox/g de film.

3.3.3 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Este ensayo se fundamenta en que los radicales peróxidos atacan una sonda fluorescente (fluoresceína), reacción que es fácilmente cuantificada por una pérdida de fluorescencia (Ou et al., 2001). Los antioxidantes suprimen esta reacción por el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno, inhibiendo la degradación oxidativa de la señal de fluorescencia.

La curva de estándares de trolox (de 240 μM a 15 μM) y las muestras fueron diluidas en buffer de fosfato (10mM, pH 7,4) (Sigma Aldrich Co). En cada pocillo de la microplaca se añadió 150 μL de fluoresceína (Sigma Aldrich Co) y 25 μL de los estándares de trolox, de las muestras o de buffer para el blanco. Las muestras, los controles y el estándar se incubaron con la solución de fluoresceína a 37°C durante 4 minutos antes de adicionar el generador de radicales AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) (Sigma Aldrich Co), iniciándose la reacción. La intensidad de la fluoresceína fue monitorizada usando 485 nm excitación y 528 nm emisión cada minuto durante 35 minutos en el lector de placas. A medida que la reacción progresa, la fluoresceína es consumida y la intensidad de la misma disminuye.

La capacidad antioxidante es proporcional al área bajo la curva (AUC) de decaimiento de la fluorescencia. Se obtiene una curva estándar con la AUC de una curva patrón de trolox. Los resultados se expresaron en μmoles equivalentes de Trolox/g de film.

3.3.4 Determinación de polifenoles totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co).

Las diluciones de las muestras 1/10 (w/w) se realizaron con una mezcla etanol/agua 1:1 (v:v). Se mezclaron 140 μL de la muestra con 280 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich Co) diluido (1/10) y 980 μL de disolución de sodio carbonato 42,86 mM (Sigma Aldrich Co). Tanto la dilución del reactivo de Folin-Ciocalteu como la de carbonato se realizan en agua destilada. Se agita y se deja en reposo y oscuridad durante 100 minutos. Después se centrifuga durante 3 minutos a 13.500 rpm. La absorbancia es medida a 760 nm en lector de placas. Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico por gramo de muestra usando una curva de calibración de ácido gálico (70 μM a 9,8 μM) (Sigma Aldrich) (Slinkard y Singleton, 1977).

3.4 Estudio del efecto de los films de quitosano con aceite de clavo y de las altas presiones sobre vida útil del pescado

3.4.1 Preparación de muestras y tratamiento de alta presión y cocinado

Las truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron suministradas evisceradas por la piscifactoría IPEASA (Villa de Fuentidueña, Segovia). Tras ser fileteadas, fueron cortadas en trozos de 5,7 x 2,5 cm y asignadas aleatoriamente a los 7 tratamientos elegidos: pescado sin tratar (pescado), con film de quitosano (film), con film de quitosano con clavo al 2% (clavo), cocinado (cook), alta presión (HPP), con film de quitosano y sometidas a alta presión (HF) y con film de quitosano con clavo al 2% y sometidas a alta presión (HC).

El film fue aplicado sobre las muestras: film, clavo, HF y HC con la ayuda de unas pinzas en condiciones higiénicas. Posteriormente todas las muestras fueron envasadas en condiciones de 75% de vacío en bolsas flexibles usando una envasadora (Tecnotrip, Barcelona, España) con la excepción de las muestras que iban a sufrir el tratamiento térmico (cook).

Las muestras HPP, HC y HF fueron presurizadas en una máquina de alta presión 6000/135 (NC Hyperbaric, Burgos, España) durante 10 minutos a 300 MPa.

El cocinado de las muestras se llevó a cabo en las propias bolsas sin cerrar en un horno de convección a 90°C, se enfriaron a 4°C en un abatidor de temperatura (Acfri C-80, Bondoufle, Francia) y se sellaron al vacío.

Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su análisis en los distintos puntos de muestreo.

3.4.2 pH

Se homogenizaron en 100 mL de agua destilada diez gramos de la correspondiente muestra previamente triturada y se filtró la mezcla obtenida. El pH del filtrado fue medido con un pH metro CRISON modelo 507 (CRISON, Barcelona, España) a temperatura ambiente. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

3.4.3 Aw

La actividad del agua fue medida con el equipo Aqualab 4TE (Decagon Devices Inc, Pullman, WA, USA). Las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado.

3.4.4 Drip loss (merma)

Drip loss o merma del producto (%) se determinó gravimétricamente tomando la

diferencia de peso entre el trozo de pescado al inicio y al final del tiempo de almacenaje (Mexis et al., 2009)

3.4.5 Evaluación microbiológica de los diferentes tratamientos

Las muestras se manipularon con la ayuda de pinzas y tijeras en condiciones de esterilidad. Se introdujeron en una bolsa estéril (Microgen, Surrey, Reino Unido) 10 gramos de muestra con 90 mL de agua de peptona tamponada (AES Cambourg, Francia) adicionados con diluidor automático (Dilumac AES). Se homogenizó en Pulsifier (Pul 100E, Microgen, Surrey, Reino Unido) durante 1 minuto y medio. A partir de esta dilución madre (1/10) se prepararon las diluciones seriadas apropiadas para los siguientes microorganismos: (i) Aerobios mesófilos según norma ISO 4833:2003; (ii) bacterias lácticas según norma ISO15212:1998 y (iii) coliformes totales siguiendo norma ISO 4832:2006. Todos los medios utilizados eran Biolife (Milán, Italia). Las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado en cada uno de los dos ensayos realizados.

3.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la varianza multifactorial para cada variable teniendo en cuenta como factores el tratamiento y el tiempo. En aquellos casos en los que existían diferencias significativas, se utilizó el test LSD (Least Significant Difference) para la separación de los niveles de cada factor. En todos los casos, el nivel de confianza seleccionado fue de 95%. El software utilizado fue Statgraphic Centurium XVII.

4. RESULTADOS

4.1 Actividad antimicrobiana de los films de quitosano

La actividad antimicrobiana de los films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo frente a los microorganismos seleccionados se muestra en la figura 1.

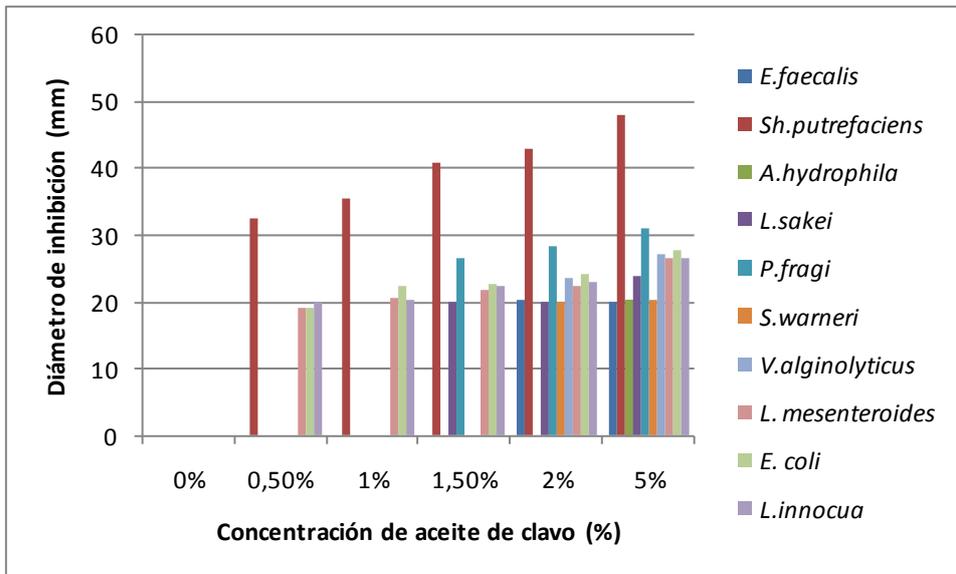


Figura 1: Actividad antimicrobiana, expresada en diámetro de halo de inhibición (mm), de films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo

Los films de quitosano no mostraron zonas de inhibición aunque sí que impidieron el crecimiento microbiano en el área que se cubrió directamente con el film de quitosano. Wang et al. (2011) obtuvieron similares resultados y sostienen que solamente las moléculas de quitosano disueltas pueden difundirse por el gel de agar y cómo resultado crear zonas de inhibición. Puesto que las moléculas de quitosano se encuentran en el film, no pueden difundirse y crear zonas de inhibición. Para que el quitosano tenga poder antimicrobiano necesita cargas positivas en los grupos amino de sus unidades monoméricas que podrán reaccionar con los grupos aniónicos de la superficie microbiana celular. Por otra parte, los films que contienen aceite de clavo son muy hidrofílicos, por lo que absorben agua rápidamente y como resultado se hinchan. Este hecho hace que los componentes activos de los filmes comiencen a migrar (Hosseini et al., 2009).

En estudios previos se demostró que el aceite de clavo presentaba buena actividad antimicrobiana tanto frente a microorganismos patógenos como alterantes (Burt, 2004). En este trabajo, como era de esperar, se observó que el aceite de clavo a mayor concentración presentaba un mayor efecto antimicrobiano, tal y como publicaron Wang et al. (2011). Hosseneni (2009) vio como el aceite de clavo era efectivo frente todas las cepas bacterianas por él probadas (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *Ps. aeruginosa*) a 1,5%. En nuestro caso no se encontró actividad antimicrobiana a esta concentración frente a *E. faecalis*, *A. hydrophila*, *S. warneri* y *V. alginolyticus*, por lo que se seleccionó una concentración de 2% de aceite de clavo en los ensayos de vida útil sobre el producto. Según los criterios de efectividad de Ponce

et al. (2003), *A. hydrophila* no es sensible a los films seleccionados (2% de aceite de clavo) siendo muy sensibles *E. faecalis*, *S. warneri* y *V. alginolyticus* y extremadamente sensibles el resto de las cepas bacterianas testadas. En el ensayo de vida útil también se evaluó el efecto de los films de quitosano sin aceite de clavo porque la nula actividad antimicrobiana de estos films *in vitro*, como hemos mencionado anteriormente, se debe a problemas de difusión en el agar y es por ello por lo que aunque no produjeron halos de inhibición sí que inhibían el crecimiento sobre la superficie de la placa donde se situaban.

Los aceites esenciales ejercen su función antimicrobiana actuando sobre la membrana citoplasmática, alterando su función y su estructura. Una observación contrastada es que incrementa el contenido de potasio en la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la membrana plasmática como respuesta al agente microbiano. Esto causa una despolarización en la membrana alterando el transporte de iones. Finalmente aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática como consecuencia de una pérdida del gradiente de pH celular, produciéndose un decremento de los niveles de ATP que lleva a la muerte de la célula (Holley y Patel, 2005).

Varios autores (Outtara et al., 1997; Hosseini et al., 2008; Gómez-Estaca et al., 2009) han postulado que los aceites esenciales son más efectivos contra los microorganismos Gram positivos que contra los Gram negativos. Estos resultados son debidos a los lipopolisacáridos de la membrana celular de los microorganismos Gram negativos que impiden que los agentes activos alcancen la membrana citoplasmática. Sin embargo, en la selección de cepas efectuada, el aceite de clavo presenta la mayor inhibición frente a *S. putrefaciens*, que es una bacteria Gram negativa. Por el contrario, entre los microorganismos frente a los que presenta una menor efectividad aparecen algunas bacterias Gram positivas como *E. faecalis*, *St. warneri* y *Lb. sakei*. Esto es debido a que el comportamiento de los microorganismos frente a los aceites esenciales no sólo depende de diferencias estructurales sino también metabólicas. Holley y Patel (2005) detallaron como entre las Gram positivas las bacterias ácido lácticas (LAB) eran las más resistentes debido a su habilidad para generar ATP y una mayor capacidad para afrontar condiciones de estrés osmótico, respondiendo más eficientemente al flujo de potasio causado por los aceites esenciales. No obstante, no todos los autores comparten esta opinión de que las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas a la acción de los aceites esenciales. Chaieb et al. (2007) indican como el aceite de clavo es efectivo tanto en los microorganismos Gram positivos como en los Gram negativos. Dorman y Deans (2000) defienden que la

susceptibilidad de las bacterias a los aceites esenciales y su morfología (Gram positivo y Gram negativo) tienen muy poca influencia en la inhibición de su crecimiento.

Gómez-Estaca et al. (2009) demostraron la eficacia de films de gelatina con clavo al 6% frente a cuatro microorganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. Al igual que en nuestros resultados *E. coli* se mostró más sensible a la acción del clavo que *L. innocua*, *P. fluorescens* fue el microorganismo más resistente. En cambio en nuestro trabajo *P. fragi* fue el segundo microorganismo más sensible a la acción del clavo, a pesar de que el género *Pseudomonas* ha sido calificado como bacterias con alta resistencia a las sustancias antimicrobianas por Holley y Patel (2005).

Gómez-Estaca et al. (2010) analizaron además de los anteriores microorganismos, *S. putrefaciens*, que como en este caso fue el microorganismo que presentó el mayor porcentaje de inhibición (%). En general, los porcentajes de inhibición tanto en el trabajo anterior como en éste eran bastante similares a los obtenidos en nuestro caso con la excepción del género *Lactobacillus*, si bien es cierto que Gómez-Estaca et al. (2009 y 2010) usaron *Lactobacillus acidophilus* en lugar de la especie utilizada en nuestro caso que fue *Lactobacillus sakei*. Las diferencias pueden ser debidas a la variabilidad entre especies al igual de lo que pudo ocurrir con el género *Pseudomonas*.

En el caso de la inhibición del crecimiento de *Aeromonas hydrophila* y *Enterococcus faecalis* se precisaron concentraciones muy altas de aceite clavo si lo comparamos con la literatura (Dorman y Deans, 2000; Chaieb et al., 2007). Al tener una inhibición tan reducida de estas bacterias, sobre todo de *Aeromonas hydrophila*, se pensó que podía deberse a la dificultad del clavo para difundir al estar atrapado en los films. Se optó por llevar a cabo un ensayo de difusión en agar sustituyendo los films por discos de papel (Whatman nº 40, 6 mm de diámetro) sobre dos microorganismos: *A. hydrophila* y *E. coli*. No se encontraron diferencias significativas entre los halos formados con los discos de papel y los resultados anteriores del film a una misma concentración de aceite de clavo, por lo que se concluyó que el clavo no tenía dificultad para difundir en los films de quitosano.

4.2 Capacidad antioxidante de los films de quitosano

Los resultados de los diferentes métodos de evaluación de la capacidad antioxidante TEAC-ABTS (figura 2) y ORAC (figura 3) junto con los polifenoles totales (figura 4) muestran como a medida que aumenta el nivel de inclusión de aceite de clavo

aumenta la actividad antioxidante. Sin embargo, tal y como reflejan las figuras, a partir del 2% se produce un incremento mucho menor en la actividad antioxidante. Se determinó, por tanto, seleccionar los films que incluyen un 2% de aceite de clavo para realizar los ensayos de vida útil sobre el producto. No se han encontrado en la literatura estudios de capacidad antioxidante en films con aceite de clavo, por lo que no se pueden comparar los mismos.

A partir de estos resultados se pone de manifiesto que los films de quitosano tienen por sí mismos cierta actividad antioxidante. La capacidad del quitosano de capturar radicales libres se debe a que éstos reaccionan con el grupo amino libre del polisacárido (NH_2^+) para formar radicales estables (NH_3^+) (Ruiz-Navajas Y et al., 2013).

En cuanto a la acción antioxidante del aceite de clavo, Jirovetz et al. (2006) y Chaieb et al. (2007) coinciden en que se basa tanto en interrupción de la reacción oxidativa en cadena como en la quelación de los metales precursores de la oxidación especialmente Fe^{+3} .

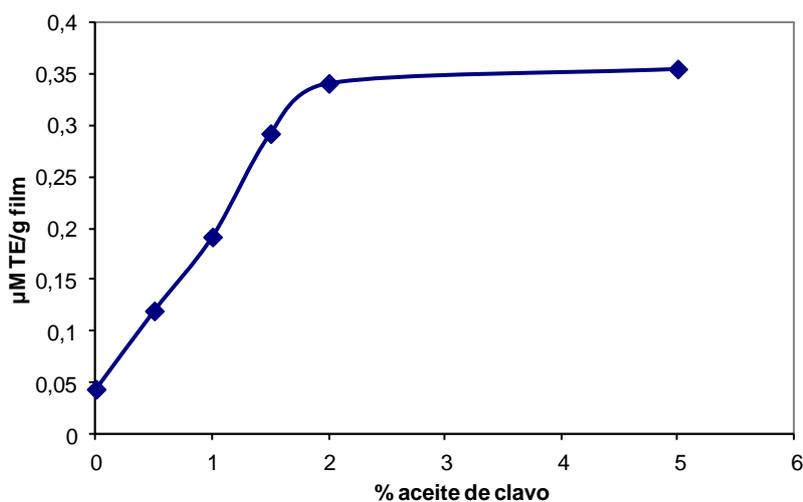


Figura 2: Capacidad antioxidante ABTS-TEAC (expresado en μM equivalentes de Trolox/g de film) de films de quitosano con diferentes concentraciones

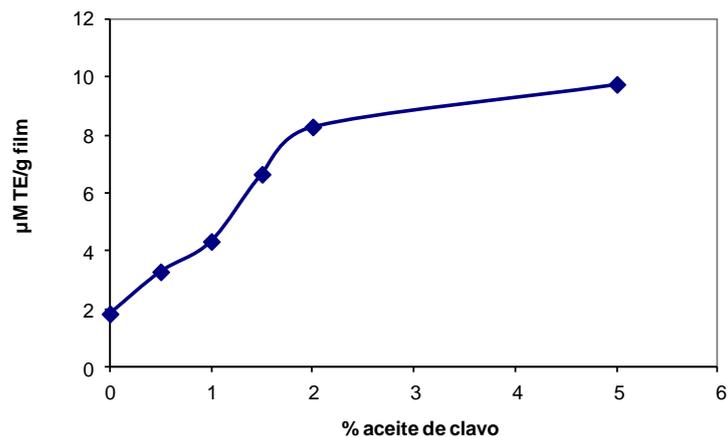


Figura 3: Capacidad antioxidante ORAC (expresado en μM equivalentes de Trolox/g de film) de films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo.

Los fenoles son unos importantes constituyentes del aceite de clavo y tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres gracias a sus grupos hidroxilos. Además, actúan quelando iones metálicos y estabilizando la peroxidación lipídica (Gülçin et al., 2004). Los compuestos fenólicos se han vinculado a la actividad antioxidante, en ocasiones se llega a considerar la concentración de fenoles determinada mediante el método de Folin-Ciocalteu un ensayo de capacidad antioxidante más, ya que se fundamenta en una reacción oxidación/reducción (Huang et al., 2005). No obstante, existe controversia sobre su selectividad, si mide sólo fenoles o fenoles más otros agentes reductores posiblemente quelantes de metales (Prior et al., 2005).

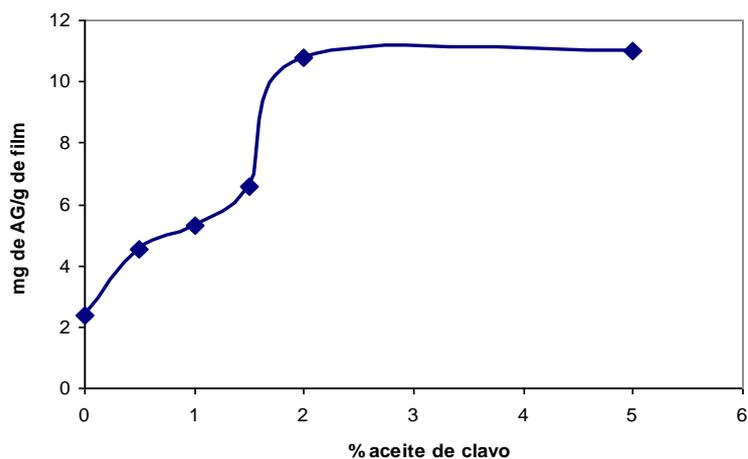


Figura 4: Concentración de polifenoles totales (expresados en mg de ácido gálico (AG)/g de film) de films de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de clavo.

Se han encontrado buenas correlaciones en especies vegetales entre los polifenoles totales y la actividad antioxidante determinada mediante diversos ensayos (Gülçin et al., 2004; Huang et al., 2005).

La correlación entre ORAC ($\mu\text{M Trolox/g}$) y los fenoles totales (mg GA/g) se ha observado en varias matrices alimentarias. En nuestro caso, como se puede observar en la figura 5, obtuvimos una regresión lineal con una buena correlación $R^2=0,992$ entre el ORAC y los fenoles totales, tal como describen Casettari et al., (2012).

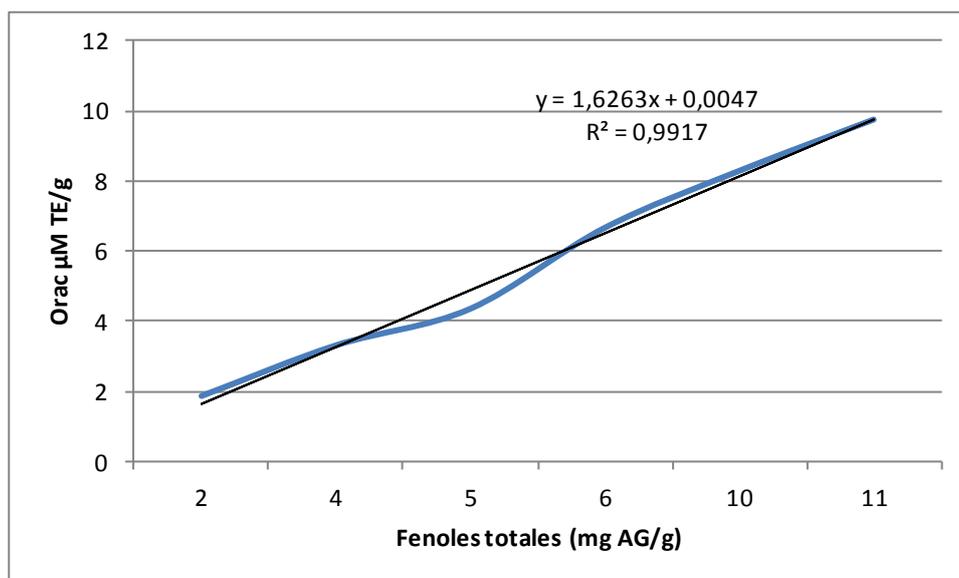


Figura 5: Relación entre capacidad antioxidante ORAC ($\mu\text{M Trolox/g film}$) y fenoles totales (mg AG/g film)

4.3 Estudio del efecto conservador de los films de quitosano con aceite de clavo y de las altas presiones sobre la vida útil del pescado

4.3.1 pH

La evolución del pH a lo largo de tiempo (tabla 2) tiene la misma tendencia que la descrita por Mexis et al (2009). El pH disminuye en torno al día 5 y aumenta a partir de ese día. Este incremento se puede deber a la formación de compuestos básicos provenientes de la descomposición proteica y la producción de metabolitos producidos en el músculo por las bacterias durante el período post-mortem descrito por Mexis et al (2009). En la última semana de almacenamiento, a partir del día 15, se produce una caída en el pH, que puede deberse al crecimiento de bacterias ácido lácticas y por tanto producción de ácido láctico (Picouet et al., 2011).

Tabla 2: Evolución del pH, Aw y drip loss a lo largo del almacenamiento en refrigeración de los filetes de trucha

	pH	aw	Drip loss
Día 0	7,01a±0,03	0,9879a±0,0003	4,31a±0,50
Día 6	6,82c±0,03	0,9876a±0,0003	5,67ab±0,50
Día 9	6,91b±0,03	0,9879a±0,0003	4,79ab±0,50
Día 15	7,01a±0,03	0,9897b±0,0003	5,26ab±0,50
Día 22	6,54d±0,03	0,9894b±0,0003	6,11b±0,50

a-d: medias con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0,05).

Existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) en el pH en función del tratamiento que ha sufrido el pescado (tabla 3). El tratamiento de alta presión provoca un aumento de pH en el pescado sometido a este tratamiento con film de quitosano (HF) o sin film (HPP) frente al equivalente no tratado denominados “film” y “pescado” respectivamente. Este aumento del pH después del tratamiento de HPP es explicado por Cruz-Romero et al., (2008) por una disminución de los grupos ácidos disponibles como consecuencia del desdoblamiento de las proteínas. Sin embargo, en el caso de los films que contienen aceite de clavo, el tratamiento de alta presión tiene el efecto contrario.

El tratamiento térmico por su parte produce un incremento significativo (p<0.05) del pH. Similares resultados fueron obtenidos por Picouet et al., (2011) que observaron un ligero incremento del pH en filetes de salmón que habían sufrido un tratamiento sous-vide.

Tabla 3: pH, Aw y drip loss del pescado sometido a diferentes tratamientos de conservación

	pH	aw	Drip loss
Pescado	6,87b±0,03	0,9903a±0,0003	5,93b±0,59
Film	6,84b±0,03	0,9879b±0,0003	1,33c±0,59
Cocinado	6,98a±0,03	0,9899a±0,0003	15,76a±0,59
Clavo	6,81b±0,03	0,9878b±0,0003	2,22c±0,59
HPP	6,96a±0,03	0,9899a±0,0003	2,22b±0,59
HF	7,02a±0,03	0,9878b±0,0004	6,45c±0,59
HC	6,52c±0,04	0,9859c±0,0003	2,01c±0,59

a-c: medias con diferentes letras en la misma columna son significativamente diferentes (p<0,05).

Los valores iniciales de pH son más altos que los encontrados en la literatura, si bien es cierto que estos se referían a otras especies piscícolas, 6,5 salmón y 6,7 en bacalao (Gómez-Estaca et al., 2010; Ojagh et al., 2011).

4.3.2 Aw

Como se puede ver en la tabla 2, la actividad de agua aumenta significativamente en los dos últimos puntos de muestreo (día 15 y 22). Respecto a las diferencias entre tratamientos (tabla 3), los que tienen una mayor actividad del agua son el pescado sin tratar, la sometida a alta presión (HPP) y la cocinada (cook). Se produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el pescado con film con aceite de clavo sometido a alta presión (HC) y el resto de las muestras con films (clavo, film y HF). La actividad del agua, que está influenciada por la composición de los alimentos, tiene una gran influencia sobre su velocidad de deterioro, favoreciendo los altos valores de actividad de agua el crecimiento microbiano. Este parámetro también ejerce una gran influencia en el efecto inhibitorio de las altas presiones según Marcos et al., (2013) valores bajos de actividad de agua protegen a los microorganismos contra la inactivación inducida por la presión.

4.3.3 Drip loss (merma)

Con respecto a la evolución a lo largo del tiempo del porcentaje de pérdida de peso (tabla 2) cabe señalar que aunque hay un ligero aumento progresivo sólo se observa una merma significativamente mayor que el primer día al final del almacenamiento (22).

Sí se aprecian diferencias significativas para este parámetro dependiendo del tratamiento que hayan sufrido las muestras (tabla 3). Las pérdidas más altas se producen en pescado cocinado (cook), seguido por pescado control y el sometido a alta presión (HPP). Entre los pescados con films (clavo y film) y los sometidos a altas presiones (HC y HF) no se producen diferencias significativas. De estos resultados se deduce que el tratamiento de cocinado, como era de esperar, produce un aumento de merma respecto al pescado control. Por el contrario, el tratamiento de alta presión no determina diferencias con respecto a la trucha control. Se aprecia un papel protector de los films en la conservación del pescado, puesto que los altos valores de pérdida de peso se traducen en un pescado de baja calidad, no sólo por los efectos negativos en la textura sino también porque el exudado que se pierde puede provocar un rápido crecimiento de microorganismos, al ser usado por ellos los nutrientes que contiene (Mexis et al., 2009).

4.3.5 Evaluación microbiológica de los diferentes tratamientos

En la figura 6 se puede ver que los recuentos iniciales eran muy bajos, lo que pone de manifiesto que partíamos de un pescado fresco y que la manipulación del mismo ha sido la adecuada. Concretamente el valor inicial de mesófilos aerobios se situó en 1,28 log cfu/g. Se produce un aumento significativo ($p < 0,05$) del crecimiento microbiano en el día 9 para aerobios totales y bacterias ácido-lácticas. Mientras que en el caso de los coliformes el incremento se produce a partir del día 6. Estos resultados son similares a los obtenidos por Chytiri et al. (2004) que ponen de manifiesto como la población de género *Enterobacteriaceae*, dentro del cual están los coliformes totales no aumenta a partir de ese mismo punto.

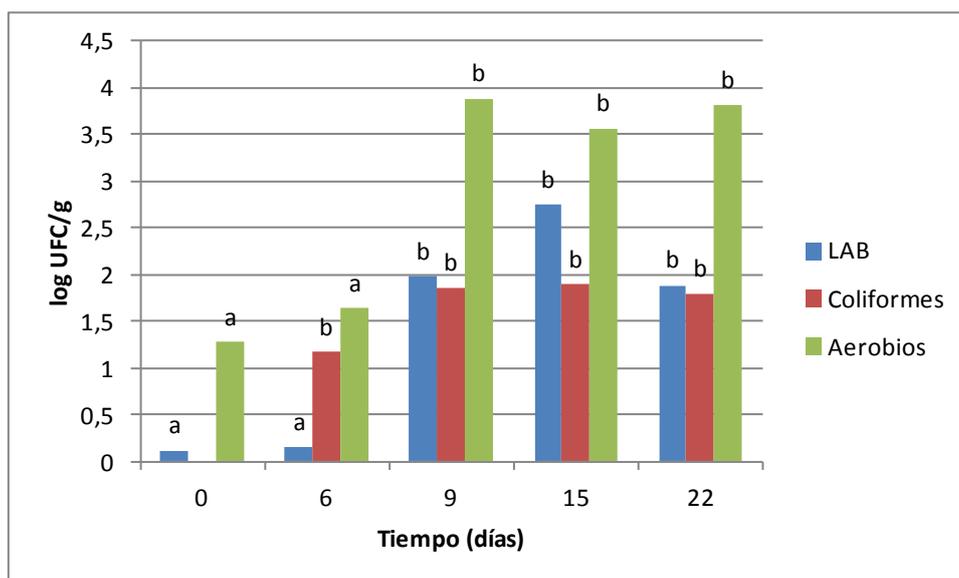


Figura 6: Evolución microbiológica a lo largo del almacenamiento de los filetes de trucha en refrigeración. a-b: medias con diferentes letras para las columnas correspondientes al mismo parámetro son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los microorganismos analizados en el caso del pescado y las altas presiones (HPP) frente al resto de muestras (figura 7). Como puede observarse en la figura, el pescado control (pescado) tiene los mayores recuentos microbianos, seguido por el pescado tratado con alta presión (HPP). La alta presión aplicada fue de 300 MPa y según Yagiz et al. (2007) la reducción más efectiva en microorganismos aerobios ocurre a presiones más altas, de 450 y 600 MPa. En todos los casos, los films ejercen un efecto conservador comparándolos con el pescado sin tratar (pescado) y las altas presiones (HPP), aunque la adición de clavo parece aumentar la inhibición microbiana este efecto no es significativo. El papel inhibitor del crecimiento microbiano de los films con clavo durante el almacenamiento del pescado fue puesto de manifiesto por Gómez-Estaca et al. (2010). El pescado sometido al tratamiento térmico convencional (cook) presenta unos recuentos similares a los del film con clavo (clavo) en aerobios mesófilos y coliformes totales. En cuanto al

efecto sobre las bacterias ácido lácticas, la reducción es inferior con el tratamiento térmico (cook) que con el film con clavo. En este caso, el efecto del cocinado no presenta diferencias significativas ($p>0.05$) con el film de quitosano sin aceite de clavo (film).

En general, la combinación de alta presión-film (HF) tiene un efecto positivo reduciendo el crecimiento de los aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas y coliformes totales, aunque esta mejora no es estadísticamente significativa

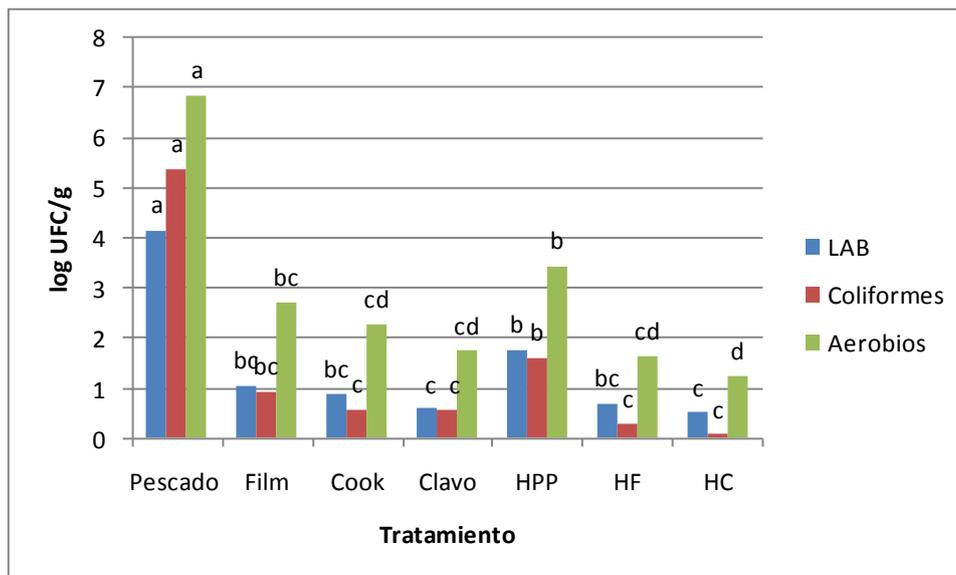


Figura 7: Efecto del tratamiento en el crecimiento microbiano de los filetes de trucha en refrigeración.

a-d: medias con diferentes letras para las mismas columnas correspondientes al mismo parámetro son significativamente diferentes ($p<0,05$).

5. Conclusiones

En los ensayos *in vitro* de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de los films de quitosano con aceite de clavo se determinó que los films de quitosano presentaban ambas capacidades a muy baja concentración, y ambas aumentaban a medida que lo hacía la concentración de aceite de clavo adicionada al film.

- En lo que respecta a la actividad antimicrobiana se observó que la sensibilidad de los microorganismos no estaba relacionada sólo con sus propiedades gram positivo o negativo, siendo tanto el microorganismo más sensible *Shewanella putrefaciens* como el más resistente *Aeromonas hydrophila*, bacterias gram negativas. Los films con una concentración de clavo de 2% inhibían a las 10 cepas estudiadas, excepto *Aeromonas hydrophila*.

- La actividad antioxidante aumentó con la concentración de clavo del film, independientemente del método utilizado para determinarla, no observándose un claro incremento con concentraciones superiores a 2% de aceite de clavo.
- Se seleccionó como concentración óptima un 2% de aceite de clavo en el film.

Los distintos tratamientos aplicados sobre el pescado permitieron alargar su vida útil.

- El tratamiento con alta presión (300 MPa, 10 minutos), como era de esperar redujo el crecimiento de microorganismos, pero fue menos efectivo que la aplicación de los films.
- El uso de films de quitosano además de reducir el crecimiento microbiano, redujo la pérdida de agua del pescado durante el almacenamiento y disminuyó la actividad de agua respecto al pescado control, el cocinado y el tratado con alta presión.
- La aplicación de films desde el punto de vista microbiológico es comparable a la cocción convencional y más efectivo que la misma cuando se adiciona clavo al film o se combina con alta presión.
- La combinación de films y alta presión presentó un efecto sinérgico en la inhibición de aerobios mesófilos, bacterias ácido-lácticas y coliformes.

6. Bibliografía

Andevari GT y Rezaei M. (2011). Effect of gelatin coating incorporated with cinnamon oil on the quality of fresh rainbow trout in cold storage. *International Journal of Food Science and Technology* 46: 2305–2311.

Bolumar T, Andersen ML y Orlien V. (2001). Antioxidant active packaging for meat processed by high pressure treatment. *Food Chemistry* 129:1406-1462.

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

Campos CA, Gerchenson LN y Flores SK. (2011). Development of Edible Films and Coating with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technology* 4:849-875.

Casettari L, Gennari L, Angelino D, Ninfali P y Castagnino E. (2012). Orac and chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids* 28:243-247.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K y Bakhrouf A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata*, L. *Myrtaceae*: A short Review. *Phytotherapy Research* 21:501-506.

Chytiri S, Chouliara I, Savvaidis IN y Kontominas MG. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology* 21:157-165.

Cruz-Romero MC, Kerry JP y Kelly AL. (2008). Fatty acids, volatile compounds and color changes in high-pressure treated oyster (*Crassostrea gigas*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:56-61.

Dormans HJD y Deans SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatiles oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316.

Fernández-Saiz P, Lagaron JM y Ocio MJ. (2009). Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids* 23:913-921.

Gayán E, Torres JA, Paredes-Sabia D. (2012). Hurdle Approach to Increase the Microbial Inactivation by High Pressure Processing: Effect of essential oils. *Food Engineering Reviews* 4:141-148.

Gómez Estaca J, Montero P, Jiménez B y Gómez Guillén MC. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoke sardine. *Food Chemistry* 105: 511-520.

Gómez-Estaca J, López de la Lacey A, Gómez-Guillén MC, López-Caballero ME y Montero P. (2009). Antimicrobial Activity of Composite Edible Films based on Fish Gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 18:46-52.

Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC y Montero P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 27: 889-896.

Gülçin I, Güngör I, Beydemir S, Elmastas M, Küfrevioğlu I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L). *Food Chemistry* 84:393-400.

Holley R A y Patel D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable food by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22:273-292.

Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi SMA, Yasaghi SAS y Hasansaraei A G. (2008). Improving antibacterial of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 8(16):2895-2900.

Hosseini MH, Ravazi SH y Mousavi MA. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation* 33:727-743.

Huang D, Ou B y Prior RL. (2005). The Chemistry behind of Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.

Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A y Schmidt E. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6303-6307.

Leistner L. (2000). Review. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181-186.

Marcos B, Aymerich T, Monfort JM y Garriga M. (2008). High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology* 25:177-182.

Marcos B, Aymerich T, Garriga M y Arnau J. (2013). Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control* 30:325-330.

Mexis SF, Chouliara E y Kontominas MG. (2009). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on the shelf life extension of the rainbow trout fillets stored at 4°C. *Food Microbiology* 26:598-605.

Ojagh SM, Núñez-Flores R, López-Caballero ME, Montero MP y Gómez-Guillén MC. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by combined use of a fish gelatine-lignin film. *Food Chemistry* 125: 595-606.

Ou B, Hampsch-Woodill M y Prior RL. (2001). Development and Validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4619-4626.

Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Bégin, A. (1997). "Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms". *International Journal of Food Microbiology* 37:155-162.

Picouet PA, Cofan- Carbo S, Vilaseca H, Carboné-Balbe L y Castells P. (2011). Stability of sous-vide cooked salmon loins processed by high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12:26-31.

Ponce AG, Fritz R, Valle del C y Roura SI. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 36:679-684.

Prior RL, Wu X y Schaich K. (2005), Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.

Rauche S, Mauricio-Iglesias M, Peyron S, Guillard V y Gontard N. (2011). Combined effect of high pressure treatment and anti-microbial bio-sourced material on microorganism growth in model food during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 426-434.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231-1237.

Ross AIV, Griffiths MW, Mittal GS y Deeth HC. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganism. Review. *International Journal of Food Microbiology* 89:125-138.

Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Pérez-Álvarez JA y Fernández-López J. (2013). *In Vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control* 30:386-392.

Sanchez-González L, Vargas M, González-Martinez C, Chiralt A y Cháfer M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering Reviews* 3:1-16.

Slinkard K y Singleton VL. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28:49-55.

Yaviz Y, Kristinsson HG, Balaban MO y Marshall MR. (2007). Effect of high pressure treatment on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Mahi Mahi (*Coryphaena hippurus*). Journal of Food Science 72:509-515.

Wang L, Liu F, Jiang Y, Chai Z, Li P, Cheng Y, Jing H y Leng X.(2011). Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 12411-12419