



Interacciones especiales envase-alimento: alta temperatura y envase activo antimicrobiano

Patricia López Sánchez

Interacciones especiales envase-alimento: alta temperatura y envase activo antimicrobiano

Patricia López Sánchez

LÓPEZ SÁNCHEZ, Patricia
Interacciones especiales envase-alimento : alta temperatura y envase activo antimicrobiano.–
1ª ed. – Zaragoza : Consejo Económico y Social de Aragón , 2008.– 232 p. , 24 cm.
ISBN 978-84-691-8607-7
Alimentos - envases
664.8.036.52

CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN
COLECCIÓN TESIS DOCTORALES

**Premio Tesis Doctoral del
Consejo Económico y Social de Aragón 2007**

Autor de la tesis doctoral:

Patricia López Sánchez

Directores de la tesis:

Dra. D.ª Cristina Nerín de la Puerta

Dr. D. Ramón Batlle Almorín

Calificación obtenida

Sobresaliente cum laude

La responsabilidad de las opiniones expresadas en las publicaciones editadas por el CES de Aragón incumbe exclusivamente a sus autores y su publicación no significa que el Consejo se identifique con las mismas.

La reproducción de esta publicación está permitida citando su procedencia.

Primera edición: Diciembre 2008

© Consejo Económico y Social de Aragón, 2008

Derechos reservados conforme a la Ley

Edita:

CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN

C/ Costa, nº 18. 50071 Zaragoza (España)

Teléfono: 976 71 38 38 - Fax: 976 71 38 41

E-mail: cesa@aragon.es

Información internet: <http://www.aragon.es/>

ISBN: 978-84-691-8607-7

D.L.: Z-369-2009

Impresión:

INO Reproducciones, S.A.

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo a través de la beca predoctoral B006/2003.

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos AGL 2001-1808 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, P060-2001 DGA y 2004/245 del Gobierno de Aragón, CAL 03-080-04-1 del Instituto Nacional de Investigaciones Agroalimentarias (INIA) e Interreg IIIA I3A-2-326-C.

Premios a tesis doctorales CESA 2007

El CES de Aragón con el fin de promover y divulgar la investigación en las materias relacionadas con sus funciones convoca anualmente los Premios a Tesis Doctorales, en cuya convocatoria del año 2007, efectuada por Resolución de 22 de agosto de 2007, de la Presidencia del Consejo Económico y Social de Aragón (BOA nº 107, de 10 de septiembre de 2007), pudieron participar las tesis doctorales presentadas para la colación del grado de doctor, leídas y calificadas de sobresaliente “cum laude”, por unanimidad, entre el 1 de octubre de 2006 y el 30 de septiembre de 2007.

Por Resolución de 14 de diciembre de 2007, de la Presidencia del Consejo Económico y Social de Aragón (BOA nº 153, de 28 de diciembre de 2007), se otorgó el premio como tesis doctoral ganadora, dotado con 4.000 euros, a la tesis doctoral “Interacciones especiales envase-alimento: alta temperatura y envase antimicrobiano”, realizada por D^a. Patricia López Sánchez, quedando desierto el accésit conforme a lo dispuesto en la base novena de la convocatoria.

El Jurado ha estado compuesto por los siguientes miembros:

Presidenta: D^a. M^a. José González Ordovás

Secretaria: D^a. Belén López Aldea

Vocales: D. José Luis Briz Velasco (en representación del Gobierno de Aragón)

D. Ricardo Rodrigo Martínez (en representación de las Organizaciones Sindicales)

D^a. Beatriz Callén Escartín (en representación de las Organizaciones Empresariales)

Consejo Económico y Social de Aragón

COMPOSICIÓN DEL PLENO (a 30/06/2008)

PRESIDENCIA

D^a. Ángela Abós Ballarín (en representación del Gobierno de Aragón)

VICEPRESIDENTES

D. Jorge Arasanz Mallo (en representación de las Organizaciones Sindicales)

D. José Luis López Garcés (en representación de las Organizaciones Empresariales)

SECRETARIA GENERAL

D^a. Rosa Bernal Delgado (en representación del Gobierno de Aragón)

VOCALES

En representación del Gobierno de Aragón

Titulares

D^a. Ángela Abós Ballarín

D^a. Rosa Bernal Delgado

D. José Luis Gracia Abadía

D. Emilio Manrique Persiva

D. Antonio Mostalac Carrillo

D. Mariano Ramón Gil

D. José Félix Sáenz Lorenzo

D. Marcos Sanso Frago

D^a. Eva Pardos Martínez

Suplentes

D. José Aixala Pasto

D. José Luis Briz Velasco

D. Javier Celma Celma

D. Jesús Diez Grijalvo

D^a. María José González Ordovas

D^a. Carmen Magallón Portolés

D. José Montón Zuriaga

D. Jorge Pardo Navarro

D. Elisardo Sanchís Sancho

En representación de las Organizaciones Sindicales

Designados por la Unión General de Trabajadores (UGT Aragón):

Titulares

D. Daniel Alastuey Lizáldez

D^a. Carmen García Nasarre

D. Julián Lóriz Palacio

D. Agustín Redondo Aínsa

D. Luis Tejedor Cadenas

Suplentes

D. Javier Asensio Galdeano

D. Luis Laguna Miranda

D. Raúl Machín Lapeña

D^a. Carmina Melendo Vera

D. Ricardo Rodrigo Martínez

Designados por la Unión Sindical de Comisiones Obreras (CC.OO. Aragón):

D. Jorge Arasanz Mallo

D^a. Marta Arjol Martínez

D. Julián Buey Suñén

D. Eduardo Navarro Villarreal

D. Carmelo Javier Asensio Bueno

D^a. Margarita Lasmarias Bustín

D. Manuel Pina Lasheras

D. Javier Sánchez Ansó

En representación de las Organizaciones Empresariales

Designados por la Confederación Regional de Empresarios de Aragón (CREA):

Titulares

D. José Luis López Garcés
 D. Carlos Mor Sanz
 D. Jesús Morte Bonafonte
 D. José Enrique Ocejo Rodríguez
 D^a. Rosa Santos Fernández

Suplentes

D. Jorge Alonso Vallejo
 D^a. Beatriz Callén Escartín
 D. Juan Carlos Dehesa Conde
 D. José María García López
 D. Víctor Hinojosa Luna

Designados por la Confederación de la Pequeña y Mediana Empresa Aragonesa (CEPYME ARAGÓN):

Titulares

D. Enrique Bayona Rico
 D. Salvador Corede Bergua
 D. Aurelio López de Hita
 D. Carmelo Pérez Serrano

Suplentes

D^a. Pilar Elícegui Motis
 D^a. Pilar Gómez López
 D. Antonio Hinojal Zubiaurre
 D. Carlos Salcedo Merino

COMISIÓN PERMANENTE

PRESIDENCIA

D^a. Ángela Abós Ballarín

VICEPRESIDENTES

D. Jorge Arasanz Mallo
 D. José Luis López Garcés

SECRETARIA GENERAL

D^a. Rosa Bernal Delgado

VOCALES

D^a. Marta Arjol Martínez
 D. Antonio Mostalac Carrillo
 D. Carmelo Pérez Serrano
 D. Agustín Redondo Aínsa
 D. Marcos Sanso Frago
 D^a. Rosa Santos Fernández

COMISIONES DE TRABAJO

COMISIÓN DE TRABAJO SOCIAL Y RELACIONES LABORALES

- PRESIDENTA:** D^a. Ángela Abós Ballarín
SECRETARIO: D. Agustín Redondo Aínsa
VOCALES: D. José María García López
D. Antonio Hinojal Zubiaurre
D^a. Marta Arjol Martínez
D. José Félix Sáenz Lorenzo
TÉCNICOS: D^a. Ana María Penacho Gómez
D. Jorge Ibarbuen Villarig
D. Jesús Platero Briz

COMISIÓN DE TRABAJO DE ECONOMÍA

- PRESIDENTE:** D. Marcos Sanso Frago
SECRETARIA: D.^a Pilar Elícegui Motis
VOCALES: D. Carmelo Asensio Bueno
D. José María García López
D^a. Eva Pardos Martínez
D. Agustín Redondo Aínsa
TÉCNICOS: D. Antonio Madrona Pérez
D. Jorge Monge Pérez
D. Sergio Pérez Páramo

COMISIÓN DE TRABAJO SOBRE COMPLEMENTARIEDAD TERRITORIAL EN EL SECTOR DEL TURISMO

- PRESIDENTE:** D. Antonio Mostalac Carrillo
SECRETARIO: D. José M.^a García López
VOCALES: D. José Aixalá Pasto
D. Carmelo Asensio Bueno
D. Carmelo Pérez Serrano
D. Agustín Redondo Aínsa

SECRETARIA TÉCNICA: D.^a Belén López Aldea

SERVICIO DE DOCUMENTACIÓN: D^a. Concha Torres Liarte

ÚLTIMAS PUBLICACIONES DEL CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN

Memorias de actividades

- Memoria de Actividades 2007.

Colección Estudios

- Derecho de la competencia y mercados regionales y locales.
- El impacto del Tercer Sector aragonés en las áreas de educación, salud y bienestar social.

Colección Tesis Doctorales

- La descentralización fiscal y el crecimiento económico: el caso español.
- Recursos y estrategias de empresas familiares manufactureras en España.

Colección Proyectos de Investigación

- Nuevos riesgos para el agua potable: Microcistina. Mejora de calidad del agua de consumo por eliminación de toxinas".

Dictámenes emitidos

- Dictamen 1/2007 sobre el avance de los Programas Operativos del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y del Fondo Social Europeo (FSE) de la Comunidad Autónoma de Aragón, 2007-2013.
- Dictamen 2/2007 sobre el Proyecto de Decreto del Gobierno de Aragón, por el que se regula la libre elección de Médico Especialista y de Centro de Atención Especializada en el Sistema Sanitario Público de Aragón.
- Dictamen 3/2007 sobre el Proyecto de Decreto del Gobierno de Aragón, por el que se establece el ejercicio del derecho a la segunda opinión médica en el Sistema Sanitario Público de Aragón.
- Dictamen 4/2007 del CES de Aragón sobre el Proyecto de Decreto del Gobierno de Aragón, por el que se establece la garantía del plazo de asistencia especializada y procedimientos diagnósticos en el Sistema Sanitario Público de Aragón.
- Dictamen 5/2007 del CES de Aragón sobre el Anteproyecto de Ley de Servicios Sociales de Aragón.
- Dictamen 6/2007 sobre el Proyecto de Decreto por el que se regulan las oficinas de turismo y la red de oficinas de turismo de Aragón.
- Dictamen 1/2008 sobre el Anteproyecto de Ley de Servicios Sociales de Aragón.

Agradecimientos

Aunque este trabajo lleve mi nombre y mis apellidos no habría sido posible sin la colaboración, apoyo y dedicación de mucha gente, que de una u otra forma han contribuido a que este viaje llegue a su destino. Y haciendo caso a los sabios consejos del refranero español “es de bien nacidos, ser agradecidos”, me dispongo a dedicarles su merecido homenaje.

A Cristina Nerín, por la confianza depositada para llevar a cabo este proyecto. Muchas gracias por facilitarme el reencuentro con la química y el mundo de la investigación. Ha merecido la pena.

A Ramón por llegar en el momento oportuno. Gracias por los sabios consejos y el tiempo malgastado en intentar convertirme en una persona de provecho para la ciencia. Aunque no lo reconozcas, sé que me vas a echar de menos, ¿o no?

A Cristina Sánchez, mi compañera de aventuras en más de la mitad de este trabajo. Ha sido muy divertido trabajar a tu lado. “Lo que los bichitos han unido, que no lo separe el hombre”. Te espero en Holanda.

A mis compañeros de laboratorio. A los de la vieja escuela, Carlos, Berta, Araceli, McGiver Jesús, Mario, Chelo y Celia, muchas gracias por vuestros consejos. A los de la nueva hornada, María, Laura G, Davidsson, M^a Ángeles, Noelia, Isabel, Elena, Laura Tovar, Sara, Nathalia, y Jorge, y mi querida generación del 80, Ángel, Karim y Joaquín, ha sido un placer trabajar con vosotros. A Chelo, Mario y María, gracias por haberme dejado traspasar esa línea que separa a los compañeros de los amigos. A Laura G., confío en tu dulzura y sutileza para frenar a los del 80. A Joaquín, porque sin tu ayuda no hubiera conseguido acabar a tiempo.

Al grupo de Microbiología de la Facultad de Medicina. Muchas gracias Don Rafael por compartir su sabiduría, su experiencia y su buen humor. A Pili Goñi por presentarnos a unos nuevos “colegas”: los bichitos; no siempre se comportan como deseáramos, pero molan. A las chicas de “Micro”, mis queridas Olga y Esmeralda, Tere, Silvia, Raquel, Laura y Dorita.

A mis padres, por la paciencia, dinero y tiempo invertidos. Me habéis enseñado que hay que luchar por lo que se quiere, espero no haberos defraudado.

A mi tía Carmen, a mis hermanos, José y Miguel, y a mi nueva “hermanita”, Nati, por el apoyo recibido. Os espero en Holanda. Por cierto, sigo queriendo un sobrino.

A mis abuelos, porque sin ellos no existiría. Muchas gracias por esa maravillosa infancia llena de historias, sueños y juegos. Ya lo sé, todavía sigo en ella.

A mi familia política, David, M^a Antonia, Nacho y Dolores, por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A Lorena, Marta e Inés por estos últimos cuatro años de lágrimas, confidencias, risas, jergas y bodas. Os voy a echar mucho de menos. A M^a Luz, M^a Mar, Dorita, Natalia, Ruth, María, Chelo, Paula y Esther, porque a pesar de la distancia, siempre encontráis un hueco para una amiga. A Elisa y Fernando por seguir manteniendo la amistad y el contacto con el paso del tiempo. A Javi, Fran, David, Luis y Alberto porque a pesar de sus barrigas, el tiempo no pasa por ellos.

A Jorge, compañero de viaje. No me asusta el futuro, si permaneces a mi lado.

Índice

Presentación	15
1. Introducción y objetivos	19
1. Interacciones envase-alimento	23
2. Materiales de envase.....	25
3. Legislación	26
4. Nuevas tendencias.....	31
5. Objetivos.....	32
2. Interacciones envase-alimento a alta temperatura	33
1. Introducción	35
1.1. Materiales plásticos en contacto con alimentos para aplicaciones de alta temperatura.....	35
1.2. Efecto de los tratamientos térmicos en la migración.....	37
1.3. Legislación. Evaluación de la migración en aplicaciones de alta temperatura .	40
2. Objetivos.....	42
3. Instrumentación, material y reactivos	44
3.1. Instrumentación analítica.....	44
3.2. Material.....	44
3.3. Disolventes	44
3.4. Sorbentes sólidos	45
3.5. Patrones	45
4. Nuevos simulantes sólidos para la realización de ensayos de migración a alta temperatura	46
4.1. Introducción.....	46
4.2. Experimental.....	47
4.3. Resultados y discusión	51
5. Nuevos materiales poliméricos como sorbentes para muestreos en fase gas con desorción térmica.....	63
5.1. Introducción.....	63
5.2. Experimental.....	65
5.3. Resultados y discusión	68
3. Desarrollo de un envase activo antimicrobiano	77
1. Introducción	79
1.1. Envase activo.....	80
1.2. Envase activo antimicrobiano.....	85
1.3. Legislación.....	89
1.4. Aceites esenciales.....	90

2. Objetivos	92
3. Instrumentación, material y reactivos	93
3.1. Instrumentación analítica.....	93
3.2. Material.....	94
3.3. Disolventes	94
3.4. Cepas de microorganismos	95
3.5. Reactivos y medios de cultivo	95
3.6. Aceites esenciales naturales	95
3.7. Compuestos individuales	96
4. Actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales comerciales por contacto directo y en fase vapor	100
4.1. Introducción.....	100
4.2. Experimental	101
4.3. Resultados y discusión.	105
5. Actividad antimicrobiana en fase vapor de los componentes individuales de las esencias naturales. Enriquecimiento de esencias: ¿sinergia, adición o antagonismo?	117
5.1. Introducción.....	117
5.2. Experimental.....	118
5.3. Resultados y discusión	118
6. Efectividad del cinamaldehído, timol, carvacrol y eugenol en la conservación de queso y productos de bollería	127
6.1. Introducción.....	127
6.2. Experimental.....	128
6.3. Resultados y discusión	132
7. Evaluación de la atmósfera generada por distintas soluciones antimicrobianas en función del tipo del microorganismo y del tiempo de desarrollo mediante HS-SDME.	142
7.1. Introducción.....	142
7.2. Experimental.....	143
7.3. Resultados y discusión	145
8. Desarrollo de un envase activo antimicrobiano	157
8.1. Introducción.....	157
8.2. Experimental.....	158
8.3. Resultados y discusión	160
9. Ensayos de migración con los films antimicrobianos. Validación para su empleo en contacto con alimentos	175
9.1. Introducción.....	175
9.2. Experimental.....	177
9.3. Resultados y discusión	180
Conclusiones	197
Glosario de siglas	203
Bibliografía	207

Presentación

Esta Tesis Doctoral se centra en dos aspectos relacionados con el envase alimentario: las aplicaciones de alta temperatura y los envases activos. La memoria se ha estructurado en Secciones. La primera de ellas contiene una introducción general y plantea los objetivos generales de la Tesis.

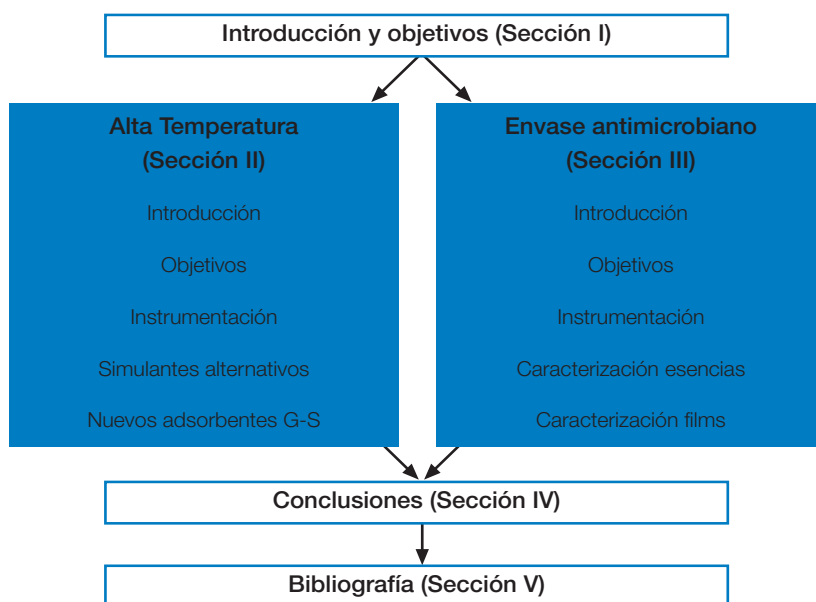
Las investigaciones realizadas sobre los envases destinados a alta temperatura (Sección II) se concentran en la caracterización de simulantes sólidos alternativos para la determinación de compuestos orgánicos volátiles y su comparación con los simulantes legislados. Asimismo, y desde el punto de vista analítico, se estudia la posibilidad de emplear las resinas de última generación (BondElut ENV y LiChrolut EN) en la retención de los compuestos volátiles desprendidos por los envases, y su posterior análisis por desorción térmica.

La Sección III está dedicada al desarrollo de un envase activo antimicrobiano, que incorpora aceites esenciales en su composición, y cuyo modo de acción se basa en la liberación de las sustancias activas al espacio de cabeza del envase. La parte experimental de esta sección está dedicada, por un lado, a la caracterización de los aceites esenciales y sus componentes (actividad antimicrobiana en fase vapor, composición de la atmósfera generada, etc.), y por otro lado, a la caracterización del envase antimicrobiano, (matriz polimérica, actividad antimicrobiana, liberación y retención de sustancias activas, vida útil del film antimicrobiano, etc.).

La memoria se concluye con dos secciones generales, donde se recogen las conclusiones finales (Sección IV) y la bibliografía empleada (Sección V). Todos los capítulos se presentan en forma de secciones autocontenidas, de forma que la introducción, los objetivos y las condiciones experimentales se presentan en cada uno de ellos.

FIGURA 1

Estructura de la memoria de la Tesis Doctoral



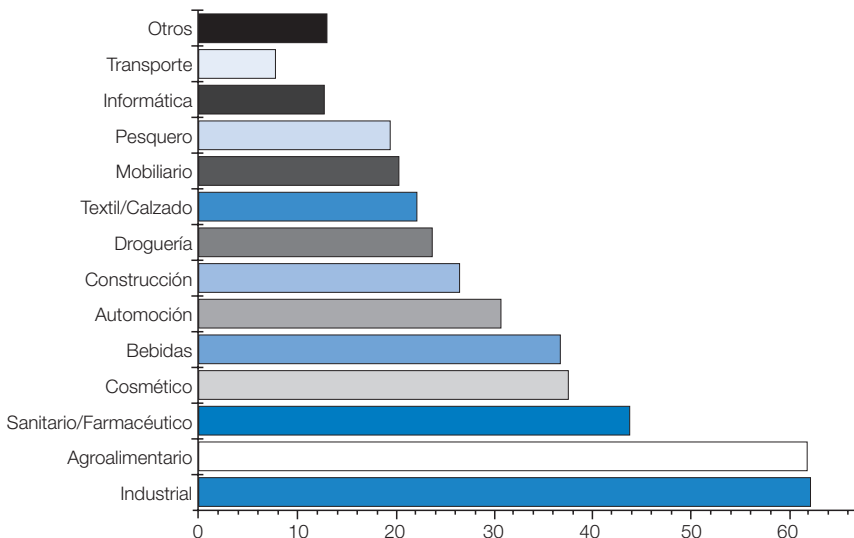
Introducción y objetivos

El envase alimentario, definido por el Codex Alimentarius como “todo recipiente utilizado para envasar completa o parcialmente el alimento destinado a la venta” (*Codex Stant 1071-1981*), surgió hace más de 10.000 años con el único propósito de contener los bienes necesarios para la supervivencia, especialmente agua. A mediados del siglo XX la gran transformación de la vida rural a la vida urbana exigió que los alimentos pudieran ser transportados desde el campo a la ciudad y pudieran mantenerse durante mayores períodos de tiempo en buen estado de conservación, lo que supuso una gran revolución en la tecnología y concepto del envase. Se crearon nuevos conceptos de contenedores, capaces de transportar grandes cantidades de alimentos con el mínimo impacto para la calidad de los mismos; se introdujeron nuevos materiales, como por ejemplo el plástico, más manejable y flexible; y nuevos diseños, como el Tetrabrik, etc. En definitiva, ha sido necesaria una transformación tanto ideológica como tecnológica para adaptar el diseño, tecnología, logística y marketing del envase a los requerimientos y demandas de un consumidor cada vez más exigente y preocupado por su salud y el medio ambiente, e inmerso en una sociedad y en un mercado muy dinámico y globalizado.

Respecto a la totalidad del mercado de envase, el de tipo alimentario ocupa una cuota del 38%, con una producción de 161 billones, el 51% de la cual se fabrica en EE.UU. y un 30% en Europa.

FIGURA I.1

Presencia en España del sector del embalaje en otros sectores



Fuente: Fira Barcelona

En la actualidad, para el IFST (Institute of Food Science and Technology) se distinguen tres niveles de acción:

- a) **Envase primario o envase de venta:** unidad individual en contacto directo con el alimento. Sus principales funciones son contener, proteger y facilitar la distribución y almacenamiento del alimento, además de cumplir con los requerimientos demandados por el consumidor en lo referente a su seguridad y comodidad de uso (Brown, 1992).
- b) **Envase secundario o colectivo:** utilizado a menudo como protección física del producto. Una caja de cartón corrugado en cuyo interior hay cualquier alimento unitariamente envasado en bolsas de plástico flexible es un ejemplo de envase secundario. Además de ser muy útil en cuestiones de marketing y logística, ya que puede llevar diferente información de producción (nº de lote, etc), el envase secundario facilita el manejo del envase primario durante su almacenamiento y distribución, protegiéndolo de daños mecánicos.
- c) **Envase terciario o de expedición:** incorpora el envase secundario al sistema final de transporte, ej: pallets, cajas, etc.

Aunque el aseguramiento de la calidad y salubridad del alimento constituya el requerimiento más importante del envase alimentario, sobre todo desde el punto de vista científico, existen otros aspectos que deben considerarse durante el diseño y desarrollo del mismo (ver tabla I.1):

Como demuestra la tabla I.1, el envase se ha convertido en un instrumento muy importante, y casi esencial, en la ciencia, tecnología, distribución y venta de alimentos, que habrá que tener muy en cuenta en los futuros desarrollos tecnológicos.

■ TABLA I.1.

Requerimientos del envase alimentario

Área	Requerimientos globales	Requerimientos específicos
Calidad del alimento	Conservación características organolépticas. Conservación de los estándares microbiológicos.	Conservación sabor, olor, color y textura. Evitar crecimiento de microorganismos indeseables. Pasteurización y esterilización
Manufacturación	Procesos de fabricación simples y económicos. Compatibilidad con llenado.	Láminas, films, bolsas. Propiedades mecánicas adecuadas. Dimensiones del envase estables Estanqueidad. Envase compatible con maquinaria.
Logística	Facilidad distribución producto.	Adecuado a las exigencias industriales (tamaño, palletización). Trazabilidad (códigos de barras).
Marketing	Cualidades potenciadas en función del punto de venta.	Diseño llamativo. Adecuado a las preferencias culturales del consumidor. Funcional (abre-fácil, usar y tirar, etc).
Medio Ambiente	Salud humana. Uso responsable de recursos. Tratamiento de residuos.	Interacción envase-alimento segura. Evitar daño físico consumidor. Estudio del ciclo de vida del producto. Envase recuperable (aconsejable), reciclable o fácil de compostar o eliminar por incineración.
Legislación	Leyes nacionales e internacionales.	Etiquetado, higiene, ensayos de migración.
Financiera	Costes rentables.	Precio por envase aceptable. Precio de fabricación.

Haugaard *et al.*, 2000.

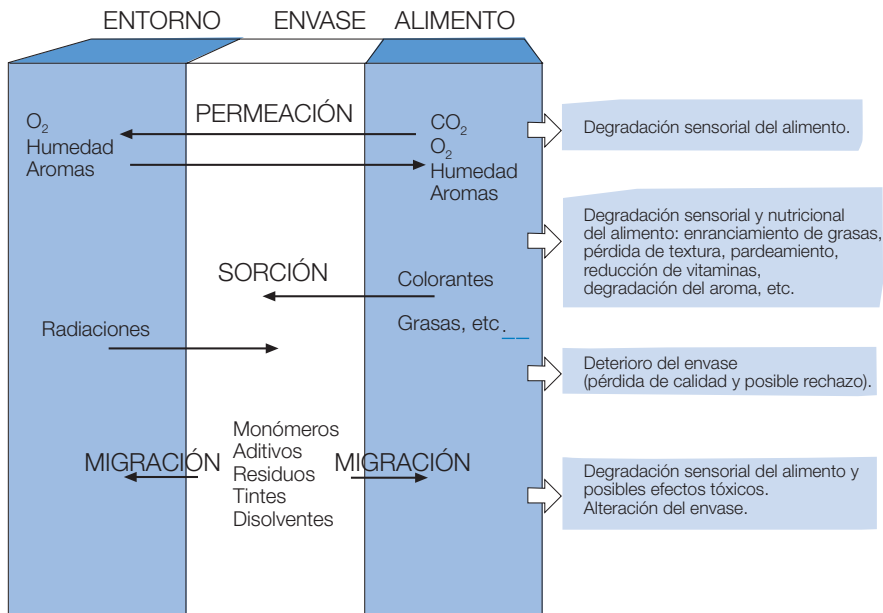
1. Interacciones envase-alimento

El alimento, desde un punto de vista químico, es un producto complejo formado por otros compuestos químicos más sencillos, que pueden reaccionar entre sí, modificando la composición y características del producto. A su vez, el alimento, a través del envase, está expuesto a la acción de factores externos químicos, físicos y microbiológicos (microorganismos, oxígeno, luz, humedad, temperatura, etc.) que contribuyen, de igual forma, a la alteración del mismo. Por lo tanto, el producto envasado debe considerarse como un sistema ternario entorno-envase-alimento, en el que se producen interacciones beneficiosas y perjudiciales.

Las interacciones entorno-envase-alimento corresponden a tres fenómenos: permeación, sorción y migración, resumidas en la figura 1.2.

FIGURA 1.2

Esquema de las interacciones entorno-envase-alimento



Salafranca, 1999.

A) PERMEACIÓN

La permeación es un fenómeno físico-químico por el que tiene lugar una transferencia de materia y energía a través del material que constituye el envase. Este fenómeno, que se produce con gases, humedad y aromas, puede darse en ambas direcciones. Un ejemplo de permeación sería el paso del oxígeno o humedad del entorno al alimento, provocando reacciones de oxidación como enranciamiento de las grasas, pardeamiento enzimáticos o degradación de vitaminas (Riquet *et al.*, 1998; Van Willige *et al.*, 2002).

La transferencia de materia debida a este fenómeno tiene lugar por dos mecanismos (Stanet, 1965): el flujo capilar de las sustancias a través de los poros del material de envase y la difusión, regida por la ley de Fick.

La importancia, tanto absoluta como relativa, de los factores que condicionan la permeabilidad (naturaleza del polímero, estructura cristalina, número de huecos libres de la matriz, humedad, grado de reticulación, naturaleza, forma, tamaño y peso molecular del permeante, solubilidad, presencia de copermeantes, temperatura y concentración) depende de las características del polímero, del permeante y de las condiciones en las que tiene lugar el proceso (Galotto, 1995).

B) SORCIÓN

La sorción consiste en la transferencia de sustancias desde el entorno o el alimento al seno del envase, donde quedan retenidas. Engloba dos fenómenos de diferente naturaleza: adsorción, que tiene lugar en la superficie, y absorción, que ocurre en el seno de la matriz del envase.

La sorción es un fenómeno a tener en cuenta, especialmente, cuando se transfieren grasas, aromas o humedad desde el alimento al envase. Aunque la mayoría de las veces no se altera la composición del alimento, las propiedades del envase pueden modificarse gravemente.

C) MIGRACIÓN

La migración se define como la transferencia de materia desde el envase al alimento durante su almacenamiento o preparación (Briston y Katan, 1994). La incorporación de las sustancias migrantes al producto envasado puede incidir en su calidad y seguridad, al alterarse sus propiedades organolépticas, y en su seguridad en el caso de que los compuestos que migran tienen carácter tóxico. Del mismo modo, la pérdida de componentes del envase puede afectar a su estabilidad.

El estudio de los mecanismos básicos de migración en materiales poliméricos consta de tres etapas diferenciadas, aunque relacionadas entre sí (Briston y Katan, 1994; Gilbert, 1985; Pugh, 1995).

1. Difusión de los migrantes desde el interior del material de envase hasta la interfase. Proceso gobernado por la primera y segunda ley de Fick.
2. Transferencia de materia en la interfase entre el envase y el alimento. Tiene lugar mediante un mecanismo de disolución o solvatación de los migrantes en el alimento. Se producirá una mayor transferencia de materia cuanto mayor sea el coeficiente de reparto de la sustancia que migra en el alimento.
3. Dispersión de los migrantes en el seno del alimento. Proceso gobernado por la primera y segunda ley de Fick. Dado que los coeficientes de difusión en los alimentos son, por lo general, mayores que en los polímeros, esta etapa no interviene a efectos prácticos ni en el equilibrio, ni en la cinética de la migración.

No obstante, como ya se señaló previamente, no las todas interacciones que se producen en el sistema entorno-envase-alimento son perjudiciales. Los fenómenos de migración, sorción y permeación, catalogados hasta ahora como indeseables, pueden utilizarse en sentido contrario, es decir, con la idea de mejorar la calidad y seguridad del alimento. Bajo esta perspectiva, han surgido en los últimos años en el mercado dos nuevos conceptos de envase: **envase activo** y **envase inteligente**. Se define envase activo como la técnica de envasado mediante la cual se favorece una interacción favorable envase-alimento con el objeto de mejorar su calidad, aceptabilidad y aumentar el tiempo de vida. Por otro lado, se considera envase intelligen-

te a la técnica por la que, mediante indicadores internos o externos, basados en su mayoría en reacciones químicas, se monitoriza el estado de conservación del alimento envasado (Ahvenainen y Hurne, 1997; de Kruijff *et al.*, 2002). Ambos conceptos, y especialmente el envase activo, se desarrollarán con más detalle en las secciones posteriores.

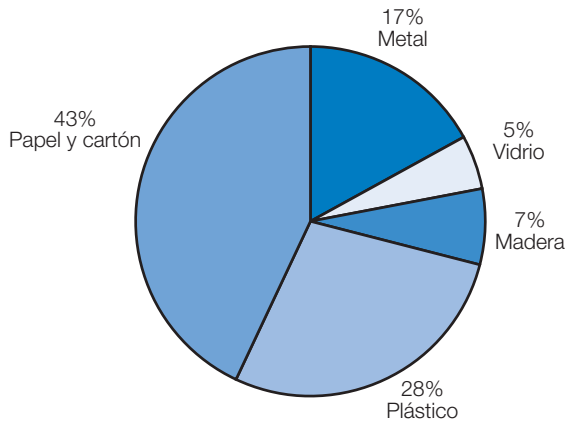
2. Materiales de envase

La naturaleza de los materiales que se pueden utilizar en los diferentes niveles de envase alimentario es muy diversa: naturales, mínimamente procesados, totalmente sintéticos, puros, mezclas, etc. Según la Directiva Europea 89/109/CEE (89/109/CEE), los materiales y objetos destinados a estar en contacto con alimentos pueden ser:

- a) Materiales plásticos, incluidos barnices y revestimientos.
- b) Celulosas regeneradas.
- c) Elastómeros y caucho.
- d) Papel y cartón.
- e) Cerámicas.
- f) Vidrio.
- g) Metales y aleaciones.
- h) Madera, incluido el corcho.
- i) Productos textiles
- j) Ceras: parafinas y microcristalinas.

■ FIGURA 1.3

Materiales usados en envase alimentario



Fuente: Packagiong-gateway

Los polímeros son compuestos químicos cuyas moléculas están formadas por la unión de otras moléculas más pequeñas llamadas monómeros, las cuales se enlazan entre sí como si fueran los eslabones de una cadena. Estas cadenas, que en ocasiones presentan también ramificaciones o entrecruzamientos, pueden llegar a alcanzar un gran tamaño. Habitualmente los polímeros reciben, de forma incorrecta, el nombre de plásticos, que en realidad corresponde tan

sólo a un tipo específico de polímeros, concretamente los que presentan propiedades plásticas (blandos, deformables y maleables con el calor). Dependiendo de su origen, los polímeros pueden clasificarse en naturales y artificiales.

Entre los naturales se encuentran: los hidratos de carbono o polisacáridos (almidón o la celulosa); la lana, la seda y otras proteínas, constituidas por aminoácidos; los ácidos nucleicos (el ADN y el ARN), y otras sustancias tales como el caucho, derivadas de pequeñas moléculas de hidrocarburos.

Con el desarrollo de la tecnología y de la industria química el hombre ha aprendido a imitar la naturaleza, e incluso a mejorarla, sintetizando nuevos polímeros artificiales, normalmente a partir de derivados de petróleo. En la actualidad la síntesis y el procesado de materiales poliméricos es una de las ramas más importantes de la industria química, y los polímeros están presentes de forma habitual en nuestra vida cotidiana.

3. Legislación

La Seguridad Alimentaria es un tema relacionado con la Salud Pública y que preocupa especialmente a los consumidores. Debido al gran número de escándalos alimentarios producidos en la última década, véase el ejemplo de las vacas locas, las dioxinas y más recientemente la gripe aviar, se creó en 2002 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), con personalidad jurídica propia e independiente del resto de instituciones de la Unión Europea, que proporciona asesoramiento científico a la Comisión Europea en todo aquello que influya directa o indirectamente en la seguridad alimentaria. Por lo tanto, y a partir del año 2002, toda legislación relacionada con los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos debe contar con su autorización.

En la tabla I.2 se resume toda la legislación europea existente, vigente y derogada, relativa a los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos.

TABLA I.2.

Legislación europea relativa a materiales y objetos en contacto con alimentos

Regulación	Asunto	D.O.C.E
D 76/893/CEE	Materiales y objetos en contacto con alimentos. Derogada por 89/109/CEE	L340
D 78/142/CEE	Materiales y objetos que contengan cloruro de vinilo monómero, destinados a contacto con alimentos	L44
D 80/590/CEE	Símbolos destinados a materiales y objetos destinados a contacto con alimentos. Derogada por el Reglamento CE 1935/2004.	L151
D 80/766/CEE	Determinación de cloruro de vinilo monómero en envase alimentario	L213
D 81/432/CEE	Determinación de cloruro de vinilo monómero en alimentos	L167
D 82/711/CEE	Normas base para la verificación de la migración desde envases alimentarios plásticos.	L297 L332
D 83/229/CEE	Materiales y objetos de celulosa regenerada en contacto con alimentos. Derogada por 93/10/CEE.	L123 L159
D 85/572/CEE	Lista de simulantes a usar para controlar la migración de los componentes de los envases alimentarios plásticos.	L372
D 86/388/CEE	Modificación de 83/229/CEE.	L228
D 89/109/CEE	Materiales y objetos en contacto con alimentos. Derogada por el Reglamento CE 1935/2004.	L40 L347
D 90/128/CEE	Directiva específica para materiales y objetos plásticos destinados a contacto con alimentos. Derogada por 2002/72/CE.	L75 L349
D 92/15/CEE	Modificación de 83/229/CEE.	L102
D 92/39/CEE	Modificación de 90/128/CEE.	L168
D 93/8/CEE	Modificación de 82/711/CEE.	L90
D 93/9/CEE	Modificación de 90/128/CEE.	L90
D 93/10/CEE	Directiva específica para materiales y objetos de celulosa regenerada en contacto con alimentos.	L93 L176
D 93/11/CEE	Directiva específica relativa a la cesión de N-nitrosaminas y de sustancias N-nitrosables por las tetinas o chupetes de elastómero caucho.	L93 L164
D 93/111/CE	Modificación de 93/10/CEE.	L310
D 95/3/CE	Modificación de 90/128/CEE.	L41
D 96/11/CE	Modificación de 90/128/CEE.	L61
D 97/48/CE	Modificación de 82/711/CEE.	L222
D 1999/91/CE	Modificación de 90/128/CEE.	L310
D 2001/61/CE	Directiva específica para materiales y objetos de derivados epoxídicos destinados a contacto con alimentos. Derogada por 2002/16/CE.	L215
D 2001/62/CE	Modificación de 90/128/CEE.	L222
D 2002/16/CE	Directiva específica para materiales y objetos de derivados epoxídicos destinados a contacto con alimentos.	L51
D 2002/17/CE	Modificación de 90/128/CEE.	L57
D 2002/72/CE	Directiva específica para materiales y objetos plásticos destinados a contacto con alimentos.	L39 L220
D 2004/13/CE	Modificación de 2001/61/CE.	L27
D 2004/14/CE	Modificación de 93/10/CEE.	L27
D 2004/19/CE	Modificación de 2002/72/CE.	L71
R 1935/2004	Materiales y objetos en contacto con alimentos.	L338
D 2005/79/CE	Modificación de 2002/72/CE.	L302
R 1895/2005	Derivados epoxídicos destinados a contacto con alimentos	L302

D. Directiva del Consejo de Europa, R. Reglamento CE, DOCE: Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

A continuación, se van a desarrollar en mayor profundidad las regulaciones con mayor incidencia en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

[Directiva 2002/72/CE y sus modificaciones 2004/19/CE y 2005/79/CE, relativa a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.](#)

Las principales características de esta Directiva son:

- a) Su aplicación contempla los materiales y objetos plásticos y a sus partes que estén:
 - i) constituidos exclusivamente de materias plásticas,
 - ii) compuestos de dos o más capas, cada una constituida exclusivamente de materias plásticas y que estén unidas entre sí por medio de adhesivos o por cualquier otro medio, y que, en el estado de productos acabados, estén destinados a entrar en contacto, y se pongan efectivamente en contacto con productos alimenticios.
- b) Se da una definición de lo que se entiende por “materia plástica”: compuesto macromolecular orgánico obtenido por polimerización, policondensación, poliadición u otro procedimiento similar a partir de moléculas de peso molecular inferior o por modificación química de macromoléculas naturales. No considera “materia plástica” las películas de celulosa regenerada, elastómeros y cauchos, papeles y cartones modificados, revestimientos de superficie obtenidos a partir de ceras de parafina o mezclas con materias plásticas, resinas de intercambio iónico y siliconas.
- c) Establece un límite de migración global de 10 mg por decímetro cuadrado de superficie de material u objeto. Este límite es de 60 mg por kg de producto alimenticio cuando se trate de:
 - i) envases o productos similares que puedan rellenarse, de una capacidad comprendida entre 10 y 500 L.
 - ii) objetos que puedan rellenarse y cuya superficie en contacto con los alimentos es imposible de calcular.
 - iii) Capuchones, obturadores, tapones u otros dispositivos de cierre similares.
- d) Proporciona una lista de monómeros y otras sustancias de partida autorizadas, una lista incompleta de los aditivos que pueden utilizarse en contacto con los alimentos y una lista de polímeros, obtenidos por fermentación bacteriana, autorizados para contacto alimentario.
- e) Impone restricciones específicas por medio de los límites de migración específica (SML), que establecen la cantidad máxima de sustancia que puede migrar del envase al alimento, y las cantidades máximas residuales (QM) de los compuestos en los artículos terminados.

Los largos períodos de tiempo necesarios para la preparación y evaluación de los estudios toxicológicos impiden actualizaciones rápidas y la elaboración de listas definitivas. Por ello, las “listas positivas” se dividen en dos secciones: A y B. La Sección A incluye las sustancias totalmente autorizadas, mientras que la Sección B incluye sustancias que pueden usarse hasta que el Comité Científico de Alimentación las evalúe y decida su introducción en la Sección A o prohibición para este uso.

[Directiva 82/711/CEE que establece las normas necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales en objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, y sus respectivas modificaciones \(enmiendas 93/8/CEE y 97/48/CE\).](#)

Debido a la complejidad de los análisis de migración sobre los alimentos reales en contacto con el envase, esta Directiva introduce por primera vez el término de “simulante de alimentos”. Los simulantes de alimentos, mostrados en la tabla 1.3, deben satisfacer dos requisitos:

1. La extensión y características de la migración deben ser las mismas sobre el simulante que sobre el alimento. Sin embargo, existen simulantes que sistemáticamente sobreestiman la migración, lo que se entiende como un incremento de los márgenes de seguridad.
2. El análisis sobre el simulante debe ser relativamente simple.

■ TABLA I.3.

Simulantes de alimentos con respecto al tipo de alimentos (97/48/CE)

Tipo de alimento	Simulante	Abreviatura
Acuoso (pH>4,5)	Agua destilada o de calidad equivalente.	Simulante A
Ácido (pH≤4,5)	Ácido acético 3% (p/v)	Simulante B
Alcohólico	Etanol al 10% (v/v)	Simulante C
Graso	Aceite de oliva refinado. Aceite de girasol. Mezcla sintética de triglicéridos HB 307. Etanol 95% (v/v). Isooctano	Simulante D
Seco	Tenax	Simulante D

Los simulantes B, C y D se emplean para los envases destinados a entrar en contacto con todo tipo de alimentos. Para los envases destinados a entrar en contacto con un grupo específico de alimentos, el simulante se selecciona según el criterio establecido en la tabla I.4.

■ TABLA I.4.

Simulantes para determinados tipos de alimentos (97/48/CE)

Tipo de alimento en contacto	Simulante
Sólo acuosos	A
Sólo ácidos	B
Sólo alcohólicos	C
Sólo grasos	D
Acuosos y ácidos	B
Alcohólicos y acuosos	C
Alcohólicos y ácidos	B y C
Grasos y acuosos	A y D
Grasos y ácidos	B y D
Grasos, alcohólicos y acuosos	C y D
Grasos, alcohólicos y ácidos	B, C y D

Para las bebidas alcohólicas se utiliza el simulante C, pero la proporción de etanol puede modificarse en función del grado alcohólico de la bebida.

Las condiciones del ensayo de migración (duración (t) y temperatura (T)) con simulantes de alimentos se deberán elegir en función de las condiciones de contacto reales (tabla I.5).

■ TABLA I.5.

Condiciones de tiempo y temperatura de los ensayos de migración (97/48/CE)

Condiciones de contacto (uso real)	Condiciones de ensayo
Duración del contacto	Duración del ensayo
$t \leq 5 \text{ min}$	Peores condiciones previsibles
$5 \text{ min} < t \leq 0,5 \text{ h}$	0,5 h
$0,5 < t \leq 1 \text{ h}$	1 h
$1 \text{ h} < t \leq 2 \text{ h}$	2 h
$2 \text{ h} < t \leq 24 \text{ h}$	24 h
$t \geq 24 \text{ h}$	10 días
Temperatura de contacto	Temperatura del ensayo
$T \leq 5 \text{ °C}$	5 °C
$5 \text{ °C} < T \leq 20 \text{ °C}$	20 °C
$20 \text{ °C} < T \leq 40 \text{ °C}$	40 °C
$40 \text{ °C} < T \leq 70 \text{ °C}$	70 °C
$70 \text{ °C} < T \leq 100 \text{ °C}$	100 °C(*)
$100 \text{ °C} < T \leq 121 \text{ °C}$	121 °C(*)
$121 \text{ °C} < T \leq 130 \text{ °C}$	130 °C(*)
$130 \text{ °C} < T \leq 150 \text{ °C}$	150 °C(*)
$T > 150 \text{ °C}$	175 °C(*)

(*) Los simulantes A, B y C sólo se utilizan hasta temperatura de ensayo de 100 °C o a reflujo.

Reglamento (CE) n°1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.

Este Reglamento, actualmente en vigor, es la unificación de la Directiva Marco 89/109/CEE, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, y la Directiva 80/590/CEE, relativa a la determinación del símbolo que puede acompañar a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.

Bien por novedosos, o por ser su relevancia, conviene destacar los siguientes puntos de este nuevo Reglamento:

- Se incorporan los envases activos e inteligentes a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, ya citados en la Directiva 89/109/CEE, en un intento de adaptar la normativa europea a los nuevos envases emergentes en el mercado. Quedan igualmente excluidos de esta denominación las antigüedades, los recurrimientos y los equipos de suministro de agua.
- Se modifican las definiciones de "trazabilidad" y "comercialización", ya establecidas en el Reglamento (CE) n°178/2002, y se añaden los términos "materiales y objetos activos en contacto con alimentos", "materiales y objetos inteligentes en contacto con alimentos", "empresa" y "operador de empresa".
- Se fijan las funciones de la recién creada Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).
- El Artículo 17, aplicable a partir del 27 de octubre del 2006, garantiza la trazabilidad de los envases alimentarios "mediante el etiquetado o bien la documentación o información pertinente".

4. Nuevas tendencias

Las nuevas tendencias que implican ciertos retos en el envasado alimentario pueden clasificarse como sigue:

Aplicaciones a alta temperatura: El vertiginoso ritmo de la sociedad moderna ha favorecido la aparición en el mercado de gran variedad de alimentos precocinados para ser calentados en el mismo material de envase, así como recipientes plásticos susceptibles de ser utilizados en hornos convencionales y/o microondas. Estos materiales plásticos no son inertes, por lo que es indispensable la caracterización de su comportamiento cuando se someten a altas temperaturas o a la radiación procedente de los hornos microondas.

Biopolímeros. Los biopolímeros son materiales de envase fabricados a partir de recursos renovables. En esta clasificación se incluyen:

- i) Polímeros extraídos directamente a partir de la biomasa, como los polisacáridos almidón y celulosa, y las proteínas caseína y gluteína.
- ii) Polímeros producidos por síntesis química a partir de biomonomeros renovables. Ej: ácido poliláctico.
- iii) Polímeros producidos por microorganismos o bacterias modificadas genéticamente. Ej: polialcanoatos.

Films comestibles: Los recubrimientos comestibles se forman y aplican directamente en la superficie del alimento (pincel, spray, etc.), mediante la adición de una disolución líquida o de compuestos fundidos (Cuq *et al.*, 1995). Estas películas forman parte integral del alimento, y no alteran sus características organolépticas (Guilbert *et al.*, 1997).

Envases activos e inteligentes: Son envases en los que se produce una interacción positiva y deseada entre el envase y el alimento, como se ha descrito anteriormente en esta Sección.

Atmósferas modificadas (MAP): Los alimentos se envasan en materiales de alta barrera y con una composición de gases definida en el interior del envase, que aumenta el tiempo de vida útil del producto, ya que reduce su deterioro por reacciones enzimáticas o proliferación microbiana (Smith *et al.*, 1995).

Nanomateriales: Se están desarrollando nuevos nanomateriales que incrementan las propiedades térmicas y mecánicas de los envases, alargando la vida útil del producto. Más información acerca de estos materiales, fuera de los Objetivos de la presente Memoria, se puede encontrar en la siguiente página Web:

(<http://www.foodproductiondaily.com/news/ng.asp?n=63147-nanotechnology-food-packaging-research-and-development>).

Polímeros en forma de cristales líquidos: Los polímeros que forman fases ordenadas en su estado fundido tienen unas excelentes propiedades barrera, incluso con altos porcentajes de humedades relativas. Sin embargo, la tecnología de estos envases aún debe mejorar, ya que sus propiedades mecánicas en la dirección transversal son muy pobres (Brody, 2000).

Dentro de estas perspectivas de futuro para el envase alimentario, esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los envases plásticos o derivados poliméricos para ser utilizados en aplicaciones de alta temperatura o como envases activos antimicrobianos.

La primera parte de esta Tesis Doctoral se engloba dentro de una de las líneas de investigación del grupo GUIA, que consiste en el estudio de la migración desde los envases cuando éstos son sometidos a un calentamiento tanto en horno convencional como en horno microondas. Las investigaciones realizadas, centradas en la búsqueda de simulantes alternativos para la realización de los ensayos de migración, se basan en los trabajos anteriores del grupo.

En los últimos años, el grupo GUIA ha ampliado su campo de trabajo hacia los envases activos. Concretamente, se ha estado trabajando en el desarrollo de envases antioxidantes que incorporan aceites esenciales en su composición. Otra propiedad muy importante de los aceites esenciales es su capacidad para inhibir y/o controlar el crecimiento microbiano. Por este motivo, se ha iniciado el desarrollo de envases activos con propiedades antimicrobianas. Esta Tesis Doctoral constituye el primer trabajo del grupo GUIA relacionado con los envases antimicrobianos, por lo que se ha hecho especial hincapié en el estudio de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales, así como en los procesos de transferencia que ocurren una vez se incorporan en el material de envase.

5. Objetivos

Los objetivos generales que se pretenden conseguir con la realización de la presente Tesis Doctoral son dos:

1. El estudio y caracterización de nuevos simulantes sólidos, susceptibles de ser utilizados en ensayos de migración envase-alimento para aplicaciones de alta temperatura.
2. El desarrollo de un envase activo antimicrobiano que incorpora esencias naturales en su composición y que actúa en fase vapor mediante la liberación de los agentes activos al espacio de cabeza del envase.

Los estudios necesarios para la consecución de dichos objetivos se han desarrollados en secciones diferentes. La Sección II está dedicada a las investigaciones relacionadas con los envases alimentarios destinados a aplicaciones en alta temperatura, mientras que la Sección III engloba todos los aspectos relacionados con el desarrollo de un envase antimicrobiano. En cada sección se incluye un capítulo donde se desglosan estos dos objetivos generales.

Interacciones envase-alimento a alta temperatura

1. Introducción

El incremento de alimentos envasados listos para cocinar o calentar en el horno microondas y de aquellos cuyo proceso de cocción se realiza directamente en el mismo recipiente, exige un mayor conocimiento de los procesos de interacción envase- alimento a temperaturas elevadas. Uno de los procesos menos estudiados en este campo es la migración de sustancias cuando el conjunto se somete a altas temperaturas. Es, precisamente en este campo, en el que se aborda la primera parte de esta Tesis.

1.1. MATERIALES PLÁSTICOS EN CONTACTO CON ALIMENTOS PARA APLICACIONES DE ALTA TEMPERATURA

De la gran variedad de materiales poliméricos existentes, los más empleados en aplicaciones para alta temperatura son (Acosta, 2001; Fernández, 2003):

Polietilenteraftalato (PET)

Existen tres estados para el PET: un estado altamente cristalino, un estado orientado y parcialmente cristalino y un estado amorfo. Desde el estado amorfo, que no soporta temperaturas superiores a 100 °C, el polímero se transforma, mediante tratamientos térmicos y de orientación y cristalización, en estados más resistentes al calor, cuyas temperaturas de servicio pueden alcanzar los 260 °C. El PET se emplea en envases para esterilización por calor y en bandejas para hornos convencionales y de microondas.

Polipropileno (PP)

Quizá el PP sea el material de envase más empleado en contacto con alimentos, a nivel doméstico. Existen en el mercado diversas calidades de PP, que se consiguen añadiéndole pequeñas cantidades de co-monómeros y cargas minerales, como carbonato cálcico, con temperaturas de servicio entre 120 y 140 °C. Mediante moldeado por inyección se transforma en contenedores para alimentos (“tupperware”).

Polietileno de alta densidad (HDPE)

Se utiliza tanto en envases de microondas como en esterilización térmica. El HDPE, con una temperatura máxima de trabajo de 120 °C, tiene una buena resistencia a las grasas y aceites. La adición de cargas minerales y otros polímeros incrementa su resistencia a la temperatura.

Policloruro de vinilideno (PVDC)

Aunque en la actualidad, como consecuencia de su contenido en cloro, el uso de PVDC ha disminuido, los films monocapa de PVDC se usaron con mucha frecuencia para envolver alimentos grasos en microondas. Este material es resistente hasta temperaturas de 130 °C.

Etil/vinil alcohol (EVOH)

De todos los materiales plásticos de alta barrera, es el que presenta una mayor estabilidad térmica. Resiste los tratamientos de esterilización por calor (121 °C). Suele coextrusionarse con PP para producir contenedores para microondas. Integrado en estructuras laminadas soporta temperaturas de hasta 200 °C.

Poliestireno (PS)

Como PS de alto impacto se emplea en los vasos de un solo uso en máquinas automáticas expendedoras de café y bebidas calientes, así como en envases de diversos productos lácteos

(yogur, mantequilla). Como PS expandido, con grados específicos de PS de alto impacto, se emplea en la fabricación de bandejas para hornos. El PS ordinario no soporta temperaturas superiores a 100 °C, con grados específicos de PS de alto impacto, la resistencia aumenta hasta 190 °C. A pesar de sus aplicaciones, muy habituales en la vida diaria, las autoridades sanitarias no recomiendan su utilización debido a la migración de estireno detectada a altas temperaturas.

La adición del monómero de acrilonitrilo mejora las propiedades térmicas del PS y permite la fabricación de contenedores para hornos y microondas a partir de este material (SAN).

Poliamidas (PA)

Las poliamidas se obtienen por copolimerización de diaminas con ácidos dibásicos y se identifican según el número de carbonos de los monómeros. Los productos comerciales de poliamida más importantes son el Nylon-6,6, con una temperatura máxima de servicio entre 170 y 200 °C, y el Nylon 6, con menor temperatura de trabajo, 140-180 °C en exposiciones cortas. En exposiciones a largo plazo se precisa el uso de estabilizantes de calor. La poliamida con carga de mica constituye una alternativa al PET cristalizado en aplicaciones para hornos.

Policarbonato (PC)

Químicamente son poliésteres de ácido carbónico con compuestos alifáticos o aromáticos con dos radicales hidroxilo. Dada la gran variedad posible de cadenas que pueden ser empleadas, la cantidad de policarbonatos fabricados es inmensa, si bien el más importante es el derivado del Bisfenol A o 2,2-bis-(4-hidroxifenil) propano. La temperatura de trabajo de los polímeros de elevada pureza es de 140 °C. Se usa en esterilización térmica y calentamiento en horno, convencional y microondas.

Poli(4-metil-1-penteno) (PMP)

Polímero de baja densidad con una temperatura máxima de trabajo de 160 a 180 °C. Requiere estabilizantes de calor y antioxidantes para conseguir materiales útiles a temperaturas elevadas. Se utiliza en la fabricación de bandejas y contenedores reutilizables para hornos convencionales y microondas y en esterilización térmica.

Polieterimida (PEI)

Polímero amorfo que, sin reforzar, puede aguantar hasta temperaturas del orden de 200 a 220 °C. Debido a su elevado coste, suele coextruirse con PC para formar contenedores que resistan temperaturas de horno de 260 °C.

Polisulfonas (PSU)

Material que, sin reforzar, resiste temperaturas de hasta 175 °C. La resistencia a la temperatura se eleva a 190 °C cuando se le añaden partículas de vidrio. Se emplea como recipientes de cocina reutilizables resistentes a la temperatura o como bandejas coextruidas con PET para usar en hornos.

Politetrafluoretileno (PTFE)

Material termoplástico altamente cristalino y de elevado peso molecular. Los enlaces C-C y C-F, presentes en su estructura química, le confiere unas extraordinarias propiedades de inercia química, así como una elevada resistencia a la temperatura. Debido a sus características antilubricantes y antirroce, se emplea como recubrimiento de sartenes y utensilios de cocina.

Siliconas

Recientemente han aparecido en el mercado moldes de silicona para horno convencional que soportan temperaturas de 240 °C. Son autolubrificantes y antiadherentes, por lo que no requieren un engrasado previo.

Materiales susceptibles

El término susceptibles abarca un número de estructuras diferentes que se utilizan para dar color y efecto crujiente a los alimentos cocinados en microondas. Los susceptibles son compuestos de plástico, como el PET, con adhesivos, y papel.

En el envasado de alimentos se utilizan dos tipos de susceptibles para microondas (Jickells, 1993). El más común, usado para tostar y rustir pizzas, patatas fritas y productos de pastelería, consiste en una lámina de polietileno tereftalato (PET) metalizada que se pega sobre el papel o el cartón de hornear. En la mayoría de las aplicaciones el PET es la capa en contacto con el alimento, aunque hay en el mercado materiales para uso directo en el hogar que emplean el papel de hornear (Begley *et al.*, 1990). El segundo tipo de susceptible consiste en una estructura trica-pa, con la lámina de PET metalizado entre dos capas de papel. Su uso es menos común y está restringido a los paquetes de palomitas de maíz (Risch *et al.*, 1991).

Los susceptibles se calientan muy rápidamente en un campo de microondas porque la capa interna de aluminio se acopla con la radiación electromagnética y la transforma en calor. Las temperaturas en la superficie de contacto con el alimento pueden superar los 200 °C (Mullin y Bows, 1993) en un minuto, aunque en algunos productos, como las palomitas de maíz, se consiguen temperaturas hasta de 280 °C (Risch, 1993). Las temperaturas dentro del laminado pueden alcanzar incluso los 300 °C. En estas condiciones, el film de PET se pliega y resquebraja, lo que permite, no sólo la penetración de componentes del alimento a través de la capa de papel y cartón, sino también la migración de sustancias desde las capas que rodean al PET hacia el alimento. Además, a las elevadas temperaturas de servicio de un microondas, se desprenden numerosos componentes y productos de degradación, tanto volátiles como no-volátiles (Begley *et al.*, 1991; Sharman *et al.*, 1995).

1.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA MIGRACIÓN

Los ejemplos de envases plásticos en aplicaciones de alta temperatura son numerosos. En el hogar, los envases pueden usarse a altas temperaturas en forma de films flexibles para cubrir alimentos y prevenir que se resequen en el horno, o como contenedores rígidos en los que se calienta o cocina el alimento. Los envases de comida preparada, generalmente precocinada o congelada, suelen ser bandejas o fuentes de plástico que se recalientan en el horno, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En este grupo también se encuentran los susceptibles para microondas.

Sin embargo, los materiales plásticos no son inertes, pudiendo interactuar con los alimentos, vía permeación, sorción y migración (ver Sección I). La migración de las sustancias procedentes del envase al alimento depende de un gran número de variables, entre las que destaca la temperatura.

La temperatura influye en la velocidad de difusión y la solubilidad de las especies migrantes, tanto en el polímero como en el alimento, así como a los coeficientes de partición entre ambos, como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Ec[1]}$$

$$S = S_0 \exp\left(\frac{-DH_s}{RT}\right) \quad \text{Ec[2]}$$

donde E_a es la energía de activación requerida para crear un espacio lo suficientemente grande en la cadena polimérica que permita el paso del migrante, y DH_s es el cambio de entalpía asociado a la sorción. La constante de difusión, D , aumenta siempre con la temperatura, debido a que se incrementa la movilidad de las cadenas poliméricas. La influencia de la temperatura en la solubilidad, en cambio, depende de la naturaleza del migrante. Según Castle (Castle, 1995), la dependencia con la temperatura es mayor en los coeficientes de difusión que en los de partición.

Numerosos estudios de migración, como los de antioxidantes en poliolefinas (Schwope *et al.*, 1987; Goydan *et al.*, 1990; Lickly *et al.*, 1990), de estabilizantes UV tipo benzofenona en LDPE (Al-Malaika *et al.*, 1991), o de benceno y etilbenceno en políéster termoset (Castle, 1995) confirman la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura según la relación de Arrhenius. Sin embargo, esta dependencia no es sencilla, ya que pueden intervenir otros factores no considerados en la ecuación, como la concentración del migrante (Gnanasekharan y Floros, 1997) o la degradación del producto dando lugar a la liberación de monómero libre, como estireno, por las altas temperaturas. La presencia de grandes cantidades de otras sustancias interfiere en el proceso de difusión, pudiendo cambiar la morfología del polímero (plastificación, hinchamiento, ...). En estas situaciones los coeficientes de difusión se calculan según otro tipo de correlaciones (Gavara y Hernández, 1994; Reynier *et al.*, 2002a, 2002b).

Las investigaciones sobre la migración a los alimentos de los materiales plásticos en contacto con ellos en función de la temperatura no son muy numerosas. En general, de estos estudios se concluye que, cuanto mayor es la temperatura y el tiempo de contacto entre el alimento y el envase, mayor cantidad de compuestos de la matriz del plástico se desprenden (Castle *et al.*, 1988; Startin *et al.*, 1987). Sin embargo, para explicar la cantidad de migrantes detectada en el alimento, hay que tener en cuenta además otra serie de factores, como la composición del alimento, y en especial su contenido graso (Nerín, 2002), condiciones de almacenamiento (Simoneau *et al.*, 2002) y tipo de horno utilizado, convencional o de microondas (Castle *et al.*, 1989).

1.2.1. Calentamiento en horno microondas

El trepidante ritmo de la sociedad actual ha convertido al microondas en uno de los electrodomésticos más usados y habituales en la mayoría de los hogares modernos. Mientras que el avance tecnológico que rodea la utilización de ese tipo de horno ha avanzado a pasos agigantados, no le ocurre lo mismo a la investigación científica de los procesos relacionados. Si hasta hace unos años, los estudios acerca de la interacción envase-alimento en aplicaciones de alta temperatura eran escasos, todavía era más reducido el número de estudios centrados en el calentamiento en horno microondas.

Para entender mejor las interacciones envase-alimento que se producen en un horno microondas, es interesante descubrir su mecanismo de calentamiento. Cuando las radiaciones microondas (frecuencia 300 MHz-300GHz, longitud de onda 1m-1mm) son interceptadas por un material dieléctrico, como el alimento, le ceden energía, que absorbe produciendo un incremento de su temperatura. Los mecanismos de calentamiento son dos: polarización iónica y rotación dipolar.

La polarización iónica ocurre cuando los iones en disolución se mueven como respuesta a la componente de campo eléctrico del campo microondas. El campo eléctrico cede energía cinética a los iones, que al colisionar con otros convierte la energía en calor.

La rotación dipolar depende de la existencia de moléculas polares, muy abundantes en la mayoría de alimentos (agua). Las moléculas polares tienden a alinearse en la dirección del campo eléctrico aplicado, que cambia a la frecuencia del microondas, originando una cantidad sustancial de movimiento rotacional. Este fenómeno se manifiesta en un aumento de la temperatura. Los alimentos con un elevado contenido iónico en su superficie, como sales o harinas, pueden experimentar un calentamiento superficial muy elevado, con escasa penetración de energía al interior.

Algunos problemas asociados a la utilización de un horno microondas, como por ejemplo, la aparición de zonas sobrecalentadas o secas, el deterioro del aroma y sabor o la falta de dorado y efecto crocante, se deben a un calentamiento no uniforme del alimento (Lorenson *et al.*, 1990). Las causas por las que se produce son:

- a) Distribuciones de campo indeseables. La energía microondas al entrar por la superficie del alimento, tiende a ser más intensa en la periferia que en el centro.
- b) Penetración de la energía a través de las paredes en envases no totalmente transparentes a la radiación. Se produce un calentamiento mayor en la zona próxima a las paredes, siendo escasa la energía que llega a la zona central.
- c) Diferente absorción de la radiación por parte de alimentos descongelados y congelados. Un alimento congelado es un absorbedor muy pobre de energía. A medida que se va descongelando, absorbe más energía, intensificándose el calentamiento.

Los susceptores, o envases activos para microondas, se introdujeron en el mercado para solucionar los problemas asociados al calentamiento no uniforme: se controla el calentamiento mediante un aumento de las intensidades de campo en el centro del alimento y una reducción de las mismas en los bordes.

1.2.2. Horno convencional frente a horno microondas

El empleo del horno microondas ha generado una serie de preguntas. ¿Tienen las radiaciones algún efecto sobre los envases plásticos destinados a contacto alimentario? ¿Aumenta la velocidad de migración? Y quizá la más importante desde el punto de vista analítico, ¿son comparables los ensayos de migración realizados en horno convencional con los realizados en horno microondas?

Hasta el estudio realizado por Acosta (Acosta, 2001) se creía que la mayoría de los plásticos eran transparentes a la radiación microondas y que, por lo tanto, nunca eran calentados directamente en un horno microondas, aunque sí indirectamente por contacto con el alimento. Sin embargo, en dicho estudio se observó que la temperatura de varios envases de estireno-acrilonitrilo-butadieno y policarbonato para uso en microondas, se elevaba hasta 90 °C, pudiendo alcanzar los 180 °C cuando los envases sin alimento se calentaban directamente durante 5 min.

Existe cierta controversia en bibliografía acerca del efecto que el calentamiento en horno microondas tiene sobre la migración.

Sin embargo, uno de los estudios más extensos, realizado por Jickells (Jickells *et al.*, 1992), en el que muestras de cinco plásticos para uso en microondas se sometieron a calentamiento en microondas y se determinó la migración específica de varios compuestos, no se encon-

tró ningún cambio entre la migración en un horno microondas y en un horno convencional. Las investigaciones concluyeron que la energía de microondas no tiene una influencia significativa en la migración aparte del efecto de calentamiento, por lo que los ensayos de migración de materiales para microondas pueden llevarse a cabo mediante un calentamiento en horno convencional.

1.2.3 Ensayos de migración para compuestos orgánicos volátiles

Como podría esperarse, el desprendimiento de volátiles de los materiales plásticos, se ve favorecido en aplicaciones a altas temperaturas. Se han realizado investigaciones sobre muchos de estos usos, incluyendo plásticos para cocinar en el horno, susceptores de microondas, recubrimientos no adhesivos para uso en horno y parrillas, recipientes de cocina de poliéster termosellado, papel y cartón como materiales de empaquetamiento para uso en horno (Castle, 1995). En todos los casos, la migración de los volátiles al alimento es un proceso ineficiente, en el que sólo del 0,3-3% de los volátiles desprendidos se transfieren al alimento. La baja migración podría deberse, o bien a que el alimento no retuvo las sustancias volátiles, o bien, a que, aunque sí se transfirieron, se perdieron posteriormente por volatilización en el alimento caliente.

Esta situación contrasta con los resultados de los ensayos de migración realizados con simulantes en sistemas cerrados, en los que el simulante recibe la totalidad de las sustancias desprendidas del plástico. Por estas razones, los ensayos de migración llevados a cabo sobre simulantes y en sistemas cerrados sobreestiman, en la mayor parte de los casos, los niveles reales de migración. Este hecho implica dos valoraciones hasta cierto punto contradictorias: por un lado, esta sobreestimación redundaría en una mayor seguridad para el consumidor, pero, por otro lado, puede llevar a rechazar materiales que sí que serían seguros para su empleo, con el subsiguiente perjuicio económico.

1.3. LEGISLACIÓN. EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN EN APLICACIONES DE ALTA TEMPERATURA

Como se señaló en el capítulo anterior, la Directiva 82/711/CEE y sus modificaciones 93/8/CEE y 97/48/CE constituyen, junto con la Directiva 85/572/CEE y las normas del Comité Europeo de Normalización (CEN) sobre migraciones globales y específicas, la base de las exigencias legislativas para los materiales destinados a entrar en contacto con alimentos. En la nueva Superdirectiva sobre materiales destinados a entrar en contacto con alimentos, actualmente en fase de borrador, todos esos aspectos quedan recogidos en único documento.

La Directiva 97/48/CE recoge las condiciones de tiempo y temperatura en que deben realizarse los ensayos de migración (ver tabla I.5) para reproducir las condiciones reales de contacto envase-alimento, entre las que se incluye el transporte, almacenamiento y tratamientos a los que se somete el alimento tanto en su procesado (llenado en caliente, pasteurización, esterilización, irradiación, etc.) como en uso por el consumidor (calentamiento en horno convencional, microondas, baño maría). Por lo tanto, siempre que se deseen realizar ensayos de migración para aplicaciones a alta temperatura se deben estimar las condiciones reales más desfavorables de uso y así escoger las condiciones de ensayo (tiempo, temperatura y simulante) que mejor simulen esa situación, teniendo presente que:

- a) En los materiales para uso en hornos microondas, se empleará un horno convencional para la realización de los ensayos.
- b) Los simulantes A, B y C no pueden utilizarse a temperaturas superiores de 100 °C o a la temperatura de reflujo.

- c) Cuando el tiempo y la temperatura sean desconocidos, o en ausencia de etiqueta o instrucciones de utilización, se usarán los simulantes A, B, C durante 4 h a 100 °C o temperatura de reflujo, o el simulante D durante 2h a 175 °C, en función del tipo de alimento para el que esté destinado el envase.
- d) Cuando un material vaya a ser utilizado en la práctica durante períodos inferiores a 15 min y a temperaturas entre 70 y 100 °C (llenado en caliente) el ensayo de migración se realizará a 70 °C durante 2 h.
- e) Cuando las condiciones reales de contacto no estén cubiertas por la tabla II.1, temperaturas superiores a 175 °C o tiempo de contacto inferior a 5 min., es posible emplear otras condiciones, siempre que supongan el peor caso posible.
- f) En el caso de existir dificultades técnicas relacionadas con el análisis del simulante D, la directiva 97/48/CE permite la utilización de simulantes sustitutivos, que requieren una adaptación de las condiciones de ensayo (ver tabla II.1).

Aunque existen unas condiciones de ensayo, tiempo y temperatura, que intentan reflejar las condiciones reales de uso de los envases, el comportamiento de los simulantes propuestos (A, B, C, D y sustitutivos) –donde los simulantes A, B y C no pueden superar los 100 °C de temperatura de ensayo–, no coincide completamente con el observado para los alimentos, la mayoría de los cuales modifican sus propiedades al calentarse como consecuencia de las diferentes reacciones que ocurren entre sus componentes (gelatinización, desprendimiento de aromas, caramelización, pardeamiento). La legislación europea, por lo tanto, no cubre muchos aspectos de las aplicaciones de envases plásticos en alta temperatura.

■ TABLA II.1

Condiciones de ensayo de los simulantes sustitutivos del simulante D (97/48/CE). MPPO: óxido de polifenileno modificado, (Tenax®)

Condiciones de ensayo			
Simulante D	Isooctano	Etanol 95%	MPPO
10 días / 5 °C	0,5 días / 5 °C	10 días / 5 °C	-
10 días / 20 °C	1 días / 20 °C	10 días / 20 °C	-
10 días / 40 °C	2 días / 20 °C	10 días / 40 °C	-
2 h / 70 °C	0,5 h / 40 °C	2 h / 60 °C	-
0,5 h / 100 °C	0,5 h / 60 °C	2,5 h / 60 °C	0,5 h / 100 °C
1 h / 100 °C	1 h / 60 °C	3 h / 60 °C	1 h / 100 °C
2 h / 100 °C	1,5 h / 60 °C	3 h / 60 °C	2 h / 100 °C
0,5 h / 121 °C	1,5 h / 60 °C	3,5 h / 60 °C	0,5 h / 121 °C
1 h / 121 °C	2 h / 60 °C	4 h / 60 °C	1 h / 121 °C
2 h / 121 °C	2,5 h / 60 °C	4,5 h / 60 °C	2 h / 121 °C
0,5 h / 130 °C	2 h / 60 °C	4 h / 60 °C	0,5 h / 130 °C
1 h / 130 °C	2,5 h / 60 °C	4,5 h / 60 °C	1 h / 130 °C
2 h / 150 °C	3 h / 60 °C	5 h / 60 °C	2 h / 150 °C
2 h / 175 °C	4 h / 60 °C	6 h / 60 °C	2 h / 175 °C

El MPPO o Tenax®, simulante sustitutivo para alimentos grasos constituye hasta la fecha el único simulante sólido legislado apto para aplicaciones en alta temperatura, a pesar del informe del MAFF (Ministry of Agricultural, Fisheries and Food, UK) de 1996, donde se señala la sobreestimación de la migración de las sustancias más volátiles y la subestimación para las

menos volátiles. Las investigaciones centradas en la búsqueda de nuevos simulantes sólidos, con un comportamiento y unas características físico-químicas similares a los alimentos empleados en alta temperatura, deben ayudar a los Organismos Oficiales Europeos en la actualización de una legislación, siempre unos pasos por detrás de los avances tecnológicos y demandas de la sociedad.

Las investigaciones planteadas en este capítulo pretenden contribuir a la búsqueda y caracterización de simulantes sólidos alternativos para aplicaciones en alta temperatura. Además, se estudiará la utilización de dos nuevas resinas poliméricas sintéticas, cuya eficacia en extracciones líquido-sólido ha sido ampliamente demostrada, para el muestreo y retención de compuestos volátiles en estado gas. La utilidad de estas resinas se centra básicamente en la mejora en las propiedades de retención de compuestos de interés, así como en la opción de emplear desorción térmica, proceso vedado anteriormente en el trabajo con estos materiales.

2. Objetivos

El objetivo principal de esta parte de la Tesis Doctoral consiste en el **estudio y caracterización de nuevos simulantes sólidos, susceptibles de ser utilizados en ensayos de migración envase-alimento para aplicaciones de alta temperatura.**

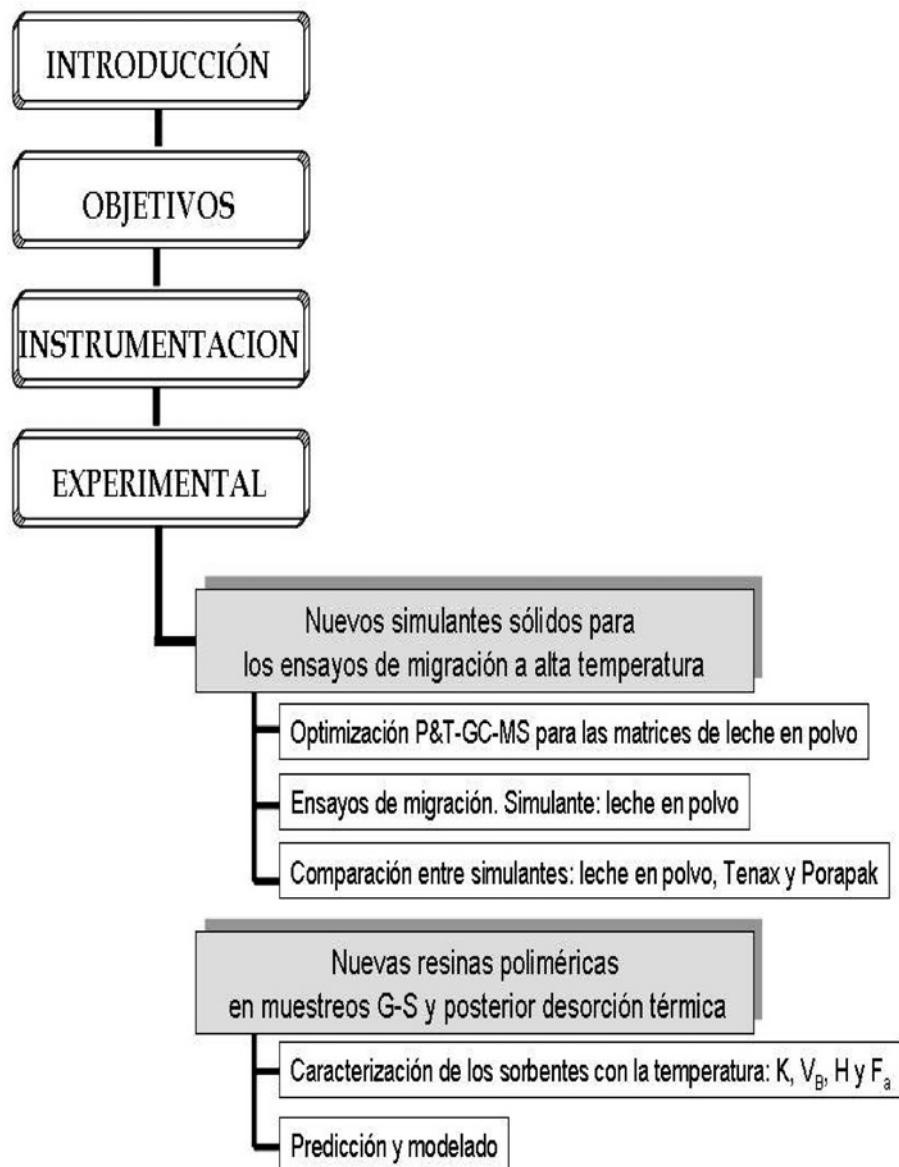
Este objetivo general se estructura en una serie de puntos cuyos objetivos específicos consisten en:

- Optimización del sistema experimental de purga y trampa, acoplado a la separación por cromatografía de gases y espectrometría de masas como detector (P&T-GC-MS) para la extracción y cuantificación de los compuestos volátiles (VOCs) retenidos en dos matrices alimenticias propuestas para su empleo como simulantes alimentarios: leche entera en polvo y leche desnatada en polvo.
- Caracterización del comportamiento de dos nuevas resinas poliméricas, Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN, ampliamente empleadas en extracción sólida (SPE), en el muestreo de compuestos volátiles de muestras gaseosas con posterior desorción térmica.
- Posteriormente, estas técnicas se comparan con el sorbente propuesto en la legislación para este propósito, Tenax® TA. Como un punto fundamental, se lleva a cabo el modelado de nuevas trampas de Bond Elut® y LiChrolut® que logren el mismo grado de retención de compuestos orgánicos volátiles que las trampas estándares de Tenax®TA.
- Caracterización del comportamiento de sorbentes sólidos propuestos como simulantes basados en leche en polvo (entera y desnatada) en los ensayos de migración desde diferentes envases plásticos, muy comunes en aplicaciones de alta temperatura, para distintas condiciones de ensayo (tiempo y temperatura).
- Comparación del comportamiento observado para la migración de volátiles desde los envases plásticos a diferentes matrices simulantes: leche en polvo (entera y desnatada), MPPPO o Tenax®, simulante sólido legislado, y Porapak, sorbente comúnmente utilizado en la retención de volátiles.

Para una mejor comprensión de la línea de argumentación seguida a lo largo de estos capítulos, se muestra en la figura II.1 un esquema de los contenidos.

FIGURA II.1

Esquema de la línea experimental seguida en la sección II



3. Instrumentación, material y reactivos

3.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- Balanza analítica Mettler Toledo AE 163 (Greifensee, Suiza). Intervalo de pesada entre 0-30 g y 30-160 g con una precisión de $\pm 0,00001$ y $0,0001$ g respectivamente.
- Horno de mufla eléctrico "Select Horn" de JP Selecta (Barcelona, España) de 9 litros de capacidad (58x59x65 cm) y temperatura regulable hasta 1150 °C.
- Baños para agua y aceite en batería "Precisat" para 6 plazas y temperatura regulable hasta 120 °C de JPSelecta.
- Baño de ultrasonidos "Ultrasons" de 200 W de potencia y 9 L de capacidad, sin calefacción, de JPSelecta (España).
- Sistema de Purga y Trampa (P&T) Tekmar Dorhmann 3100 (Cincinnati, OH, EE.UU), con un automuestreador ALS 2016 de 16 muestras. Dotado de módulo criogénico y calentadores automáticos e individuales para cada muestra. Trampa sólida Tekmar LSC-1 de Tenax® de 24 cm de longitud y 1/8 de pulgada de diámetro externo.
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard (Palo Alto, CA, EE.UU) 5890 Series II acoplado a un detector de espectrometría de masa HP 5971.
- Columna capilar HP-624 (94% dimetilsiloxano y 6% cianopropilfenilsiloxano) de 25 m x 0,32 mm i.d y 1,5 μm de espesor (temperatura máxima de trabajo 230 °C).
- Pre-columna vacía de 0,32 mm de diámetro interno empleada como línea de transferencia entre el equipo P&T y el GC/MS.
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II acoplado a un detector de ionización de llama (FID).

3.2. MATERIAL

- Placas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro de Sumalsa (Zaragoza, España).
- Tubos de vidrio específicamente diseñados para el muestreador de Purga y Trampa y fabricados por el Servicio de Soplado de Vidrio de la Universidad de Zaragoza.
- Lana de vidrio silanizada de Supelco, Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Pipetas Pasteur suministradas por Sumalsa.
- Cartuchos de extracción Soxhlet de celulosa (22 mm x 60 mm) de Albet (Barcelona, España).
- Viales ámbar de 2 mL y transparentes de 20 mL, con cápsulas de aluminio y septa de butilo/PTFE suministrados por Análisis Vínicos (Ciudad Real, España).
- Encapsuladores de viales de 2 y 20 mL suministrados por LinLab (Zaragoza, España).
- Conducciones de acero inoxidable de 1/16 y 1/8 de pulgada de diámetro interno, reductores Swagelok de 1/8 a 1/16, tuercas macho-hembra de 1/16 y 1/8, férulas 1/8 y 1/16 suministradas por Análisis Vínicos.
- Jeringas de inyección de líquidos en cromatografía de gases Hamilton 701 de 10 μL y Hamilton 1725 de 250 μL de capacidad suministradas por Sumalsa.
- Material de vidrio de laboratorio variado.

3.3. DISOLVENTES

- Agua, resistividad 18,2 MW cm (25 °C), carbono orgánico total (COT) 1-5 ppb, obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q Gradient, Millipore (Billerica, MA, EE.UU).
- Metanol (CAS 67-56-1), grado gradiente HPLC de Scharlab (Barcelona, España).

- *n*-Hexano, (CAS 110-54-3) para análisis de residuos por GC de Scharlab.
- Dietil éter (CAS 60-29-7) extra puro estabilizado con aproximadamente 7 ppm de 2,6-*tert*.-butil-4-metilfenol (BHT) de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.4. SORBENTES SÓLIDOS




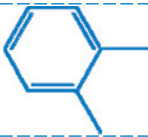

- Leche en polvo entera y desnatada, suministrada por Central Lechera Asturiana (Villaviciosa, España).
- Porapak Q entre 80-100 mesh de diámetro de poro de Supelco, suministrado por Sigma-Aldrich.
- Tenax® TA entre 60-80 mesh de diámetro de poro de Supelco, suministrado por Sigma-Aldrich.
- Bond Elut® ENV, suministrado por Varian Inc. (Palo Alto, CA, EE.UU).
- LiChrolut® EN, suministrado por Merck.

3.5. PATRONES




Los patrones utilizados, su fórmula empírica y estructura química, peso molecular y punto de ebullición se muestran en la tabla II.2.

■ TABLA II.2

Estructura química, fórmula empírica, nº de identificación de Chemical Abstract Service (CAS), peso molecular, temperatura de ebullición y proveedor de los patrones utilizados en la parte experimental

Compuesto	Estructura química
Tolueno (C ₇ H ₈) CAS 108-88-3 PM 92,14 T _e 110 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
1-Octeno (C ₈ H ₁₆) CAS 111-66-0 PM 112,21 T _e 121 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
Etilbenceno (C ₈ H ₁₀) CAS 100-41-4 PM 106,17 T _e 136,2 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
o-Xileno (C ₈ H ₁₀) CAS 95-47-6 PM 106,17 T _e 144 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	
p-Xileno (C ₈ H ₁₀) CAS 106-42-3 PM 106,17 T _e 138,3 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	

■ TABLA II.2 (continuación)

Compuesto	Estructura química
<p><i>m</i>-Xileno (C₈H₁₀)</p> <p>CAS 108-38-3</p> <p>PM 106,17</p> <p>T_e 139,1 °C</p> <p>Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>Estireno (C₈H₈)</p> <p>CAS 100-42-5</p> <p>PM 104,15</p> <p>T_b 145,2 °C</p> <p>Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>1,4-Diclorobenceno (C₆H₄Cl₂)</p> <p>CAS 106-46-7</p> <p>PM 147</p> <p>T_e 173,4 °C</p> <p>Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	

4. Nuevos simulantes sólidos para la realización de ensayos de migración a alta temperatura

4.1. INTRODUCCIÓN

Los envases plásticos son desde hace unas décadas utensilios imprescindibles en cualquier cocina. Aunque al principio se empleaban tan sólo como recipientes para almacenar y guardar los alimentos, la evolución de la sociedad y el progreso de la tecnología han extendido su rango de aplicación a la alta temperatura. Existen en el mercado gran cantidad de envases sobre los que se puede cocinar directamente, calentar los alimentos o los que al someterlos a las ondas generadas por el microondas se calientan localmente (susceptores), como por ejemplo, en las palomitas de maíz para microondas. Sin embargo, las matrices poliméricas no son completamente inertes, de manera que, sustancias procedentes de estos envases pueden migrar, tanto por contacto directo, como en fase vapor, a los alimentos envasados, alterando su inocuidad y sus características organolépticas (Risch *et al.*, 1991; Castle *et al.*, 1988; Skejevrak *et al.*, 2003). Estos procesos de migración dependen fuertemente de la temperatura tanto cuantitativamente, a través del coeficiente de difusión, como cualitativamente, por la posible degradación térmica del material de envase (Booker y Friese, 1989).

Al calentar un envase plástico se desprenden en muy pequeñas cantidades, compuestos orgánicos volátiles (VOCs), por lo que se necesitan técnicas muy sensibles para poder cuantificarlos. Los métodos de análisis habituales consisten en la retención de los VOCs en un adsorbente sólido (o simulante alimenticio), para después desorberlos en el sistema de análisis, generalmente cromatografía de gases (Nerín *et al.*, 1995; Salafranca *et al.*, 2000; Feigenbaum *et al.*, 2002). Algunas de estas técnicas son:

- Espacio de cabeza estático (HS), donde sólo una pequeña fracción de vapor, en equilibrio con la muestra, es introducida en el sistema de análisis (Risch *et al.*, 1991; Nerín y Asensio, 2004). Proporciona poca sensibilidad.
- Desorción térmica, en el que las trampas son directamente calentadas y los analitos liberados conducidos al puerto de inyección del cromatógrafo (Nerín y Acosta, 2002). Este sistema proporciona una máxima sensibilidad, pero también una mayor degradación de analitos.

- c) Espacio de cabeza dinámico o purga y trampa (P&T), donde el total de la masa de los compuestos volátiles se purga con un gas inerte a temperatura moderada, se transfiere a una trampa compuesta por un adsorbente sólido, que, en una segunda etapa se desorbe térmicamente, liberando los analitos en el sistema de análisis. Con este sistema se maximiza la sensibilidad y se conservan las características de la matriz de muestra (Castle *et al.*, 1990; Jickells y Castle, 1993; Nerín *et al.*, 1998).

Cualquier tipo de envase plástico destinado a uso alimentario requiere unos ensayos de migración que aseguren la calidad e inocuidad del alimento envasado (*Directivas Europeas 85/572/CEE, 97/48/CE, 2002/72/CE*). La Directiva 85/572/CEE regula los simulantes que deben utilizarse para controlar la migración desde envases plásticos. Sin embargo, de los cuatro propuestos A (agua MilliQ), B (disolución acuosa al 3% (m/v) de ácido acético), C (disolución acuosa al 10% (v/v) de etanol) y D (aceite de oliva refinado), solamente el simulante D se emplea en ensayos realizados a temperaturas superiores a 100 °C, por razones obvias.

Numerosos estudios han demostrado la tendencia de los contaminantes orgánicos a acumularse en los tejidos y materia grasa (Mackay y Fraser, 2000; Godduhn y Duffi, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003), lo que evidencia la importancia de la composición del alimento, en concreto, su contenido graso, en la sorción de migrantes procedentes del envase. Por lo tanto, los simulantes adecuados para la realización de ensayos de migración de envases plásticos destinados a uso a altas temperaturas, deberían ser sustancias sólidas, con características fisicoquímicas semejantes al alimento que simulan, capaces de retener los compuestos volátiles y semivolátiles desprendidos, en un amplio rango de temperaturas. La Directiva 97/48/CE propone como simulante graso sustitutivo del aceite de oliva o simulante seco al MPPO, polímero poroso basado en óxido de 2,6-difenileno, comercialmente conocido como Tenax, y que soporta temperaturas de trabajo hasta 320 °C. Aunque existen estudios realizados con otro tipo de simulantes sólidos, como mezclas de zeolitas y aceite, Porapak o Amberlitas (Jickells y Castle, 1993; Alnafour y Franz, 1999), solamente el MPPO ha sido aceptado por la Comisión Europea como simulante oficial.

En este capítulo se pretende estudiar y evaluar el comportamiento de dos matrices alimentarias, leche entera en polvo y leche desnatada en polvo, para su utilización como simulantes sólidos en aplicaciones a alta temperatura. En primer lugar, se procederá a la optimización del sistema de análisis, (P&T-GC-MS), para la determinación de los compuestos orgánicos volátiles más relevantes (tolueno, 1-octeno, etilbenceno, (*o*-,*m*-,*p*-) xileno, estireno y 1,4-diclorobenceno) liberados por cuatro envases plásticos comúnmente usados en este tipo de aplicaciones (polipropileno copolímero, polipropileno random, copolímero de estireno-acrilonitrilo y policarbonato). A continuación, se caracterizará la migración a diferentes temperaturas y tiempos de ensayo. Por último, se comparará, en las condiciones más extremas de ensayo, 121 °C y 30 min, la migración observada en leche en polvo con la obtenida para otros dos sorbentes sintéticos, MPPO y Porapak Q.

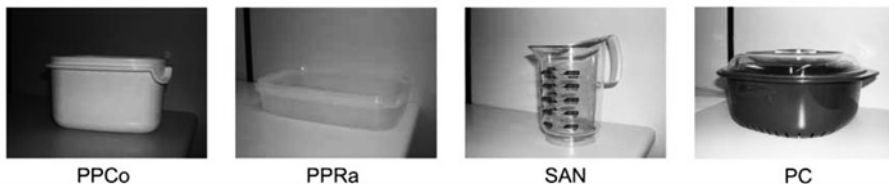
4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Muestras: envases plásticos para aplicaciones de alta temperatura

Los envases plásticos de polipropileno copolímero (PPCo), polipropileno random (PPRa), copolímero de estireno-acrilonitrilo (SAN) y policarbonato (PC), seleccionados por su aplicación a alta temperatura y suministrados por la empresa Curver® (Zaragoza, España) se muestran en la figura II.2.

FIGURA II.2

Envases plásticos para alta temperatura (PPCo: polipropileno copolímero, PPRa: polipropileno random, SAN: copolímero estireno-acrilonitrilo; PC: policarbonato)



4.2.2. Simulantes sólidos

La leche en polvo, entera (23% de materia grasa) y desnatada (0,3% de materia grasa), de la marca comercial Central Lechera Asturiana, se usó sin ningún tratamiento previo. Los adsorbentes químicos, Tenax® TA y Porapak Q, se sometieron, en cambio, a un tratamiento de limpieza consistente en una extracción Soxhlet con metanol durante 8 horas, seguido de otra extracción adicional con *n*-hexano, también de 8 horas, y secado al aire a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo análisis previos de los cuatro simulantes para garantizar la ausencia de contaminación.

4.2.3. Compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

La selección de los compuestos orgánicos volátiles más significativos (tolueno, 1-octeno, etilbenceno, (*o*-,*m*-,*p*-) xileno, estireno y 1,4-diclorobenceno) se basó en trabajos anteriores realizados por miembros del mismo grupo de investigación (Acosta, 2001; Nerín *et al.*, 2002). El 1-octeno y el estireno se emplean como monómeros de partida en algunas reacciones, por lo que pueden encontrarse en la red polimérica del material que forma el envase. La presencia de tolueno, etilbenceno, xilenos, y 1,4-diclorobenceno se debe tanto a restos de trazas de los disolventes empleados en las reacciones de polimerización, como a rupturas de enlaces por degradación y/o transformación de las cadenas de polímero.

En la tabla II.3 se muestran algunas propiedades físico-químicas necesarias para una mejor comprensión del comportamiento observado durante los ensayos de migración, así como el límite de migración específica, SML, para aquellas sustancias susceptibles de entrar en contacto con productos alimenticios (*Directiva 2002/72/CE*).

TABLA II.3

Propiedades físico-químicas de los analitos de interés

	CAS	Tebullición (°C)	Pvapor (mmHg)	Log K _{oct-agua}	SML (µg/kg)
Tolueno	108-88-3	110	22	2,73	
1-Octeno	111-66-0	121	17,4	4,57	15
Etilbenceno	100-41-4	136,2	9,6	3,15	
<i>m</i> -Xileno	108-38-3	139,1	8,3	3,20	
<i>p</i> -Xileno	106-42-3	138,3	8,6	3,15	
<i>o</i> -Xileno	95-47-6	144	6,61	3,12	
Estireno	100-42-5	145,2	6,4	2,95	60
1,4-Diclorobenceno	106-46-7	173,4	1,74	3,44	12

Límites de migración específica (SML) según *Directiva 2002/72/CE*

Se preparó una disolución patrón en *n*-hexano, conteniendo aproximadamente 1000 µg/g de cada analito, la cual se conservó en refrigeración (4 °C). Semanalmente, y a partir de la disolución patrón, se preparaban también en *n*-hexano las disoluciones de trabajo.

4.2.4. Equipo experimental

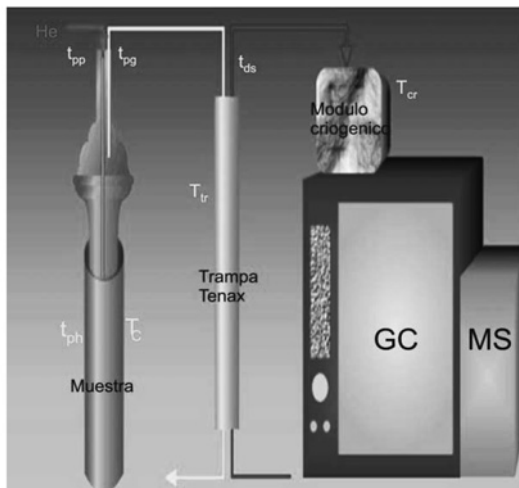
Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de purga y trampa (P&T) Tekmar Dorhmann 3100, conectado en serie con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5860 Series II que utiliza como detector un espectrómetro de masas HP 5971A. El P&T lleva acoplado un auto-muestreador ALS 2016, que cuenta con calefactores individuales para cada muestra, tubos de vidrio de 150 mm de longitud y 19 mm de diámetro interno, recomendados para muestras sólidas, y agujas de acero inoxidable con cuatro orificios en su parte inferior por los que sale el gas de purga. Debido a la extrema sensibilidad del equipo, y para evitar cualquier tipo de contaminación, los tubos de vidrio, limpiados previamente con agua, metanol y *n*-hexano, se almacenaban a 220 °C. Por el mismo motivo, diariamente se realizaban blancos de equipo.

El sistema de P&T trabaja en dos etapas: purga y desorción. El objetivo de la etapa de purga consiste en primer lugar, en la liberación de los compuestos orgánicos volátiles que se desean analizar. Para ello, se hace pasar, a través de la aguja un gas inerte de gran pureza, helio en este caso, por el tubo donde la muestra se ha depositado y calentado previamente. Los analitos purgados son atrapados en el sorbente (Tenax). En la etapa de desorción, la trampa, que hasta entonces se había mantenido a una temperatura sensiblemente más baja que la del gas de purga, se somete a un calentamiento rápido en un corto espacio de tiempo. Los analitos desorbidos son arrastrados hacia el módulo criogénico, donde condensan. Por último, se eleva bruscamente la temperatura del módulo criogénico para que los analitos se introduzcan conjuntamente en el cromatógrafo de gases.

En la figura II.3, se muestra un esquema del sistema experimental detallando las variables del proceso.

■ FIGURA II.3

Esquema del sistema experimental P&T-GC-MS



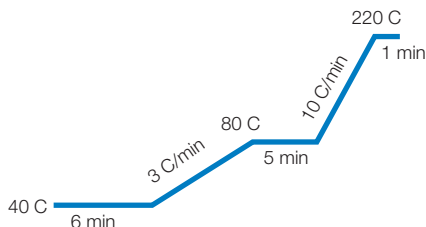
Existen por tanto, un gran número de variables a controlar y optimizar. Las más importantes son:

- Temperatura de las líneas. Para garantizar que todos los volátiles desprendidos de la muestra lleguen a la trampa y no condensen, con la consiguiente contaminación del sistema, es importante que todas las líneas y zonas por las que discurrirá el flujo de los compuestos estén a alta temperatura. El límite superior lo establecen de manera conjunta el propio sistema (capacidad de calentamiento y resistencia térmica de los elementos que lo constituyen) y la posible degradación de los compuestos volátiles de interés a elevada temperatura.
- Tiempo de pre-purga (t_{pp}). En esta primera etapa, previa al calentamiento de muestra, el helio penetra en el tubo de muestreo, lo que sirve para eliminar todo el oxígeno que pudiera quedar dentro del tubo, y por consiguiente, evitar una posible oxidación inducida por el calor.
- Tiempo de precalentamiento (t_{pv}). Tiempo que tarda la muestra en alcanzar la temperatura señalada para el muestreo.
- Temperatura de la muestra (T_c). Temperatura que alcanzarán los calefactores automáticos de las muestras durante la etapa de purga.
- Tiempo de purga (t_{pg}). Establece el tiempo durante el cual circulará el gas de arrastre a través de las muestras. Un exceso podría superar el volumen de ruptura y un defecto podría no arrastrar todos los volátiles desprendidos. El tiempo de purga óptimo depende del tipo de compuestos que se buscan y de la naturaleza química de las trampas empleadas.
- Temperatura de la trampa durante la purga (T_{tr}). Debe ser la adecuada para que los analitos condensen, combinando el efecto de retención química por la trampa, con el efecto de las bajas temperaturas.
- Temperatura de precalentamiento de la desorción. La temperatura de precalentamiento recomendada por el fabricante debe ser, como mínimo, 5 °C menor que la temperatura de desorción.
- Temperatura de desorción (T_{ds}). Temperatura máxima que alcanza la trampa durante la etapa de desorción.
- Tiempo de desorción (t_{ds}). Tiempo durante el que la mezcla del gas de arrastre con los compuestos desorbidos, es conducida hacia el GC mientras la trampa se encuentra a la temperatura de desorción.
- Temperatura del módulo criogénico (T_{cr}). Temperatura a la que se retendrán el gas de arrastre y los volátiles, antes de su entrada en la columna analítica.
- Temperatura y tiempo de inyección.
- Tiempo y temperatura de limpieza. El valor de estos parámetros suele venir optimizado ya por el fabricante, y su función es eliminar los compuestos que hayan podido quedar retenidos en la trampa tras la inyección de la muestra en el GC.
- Flujo de purga. Según el fabricante, el flujo óptimo de gas portador es de 40 mL/min.

Para el análisis cromatográfico se empleó una columna capilar HP-624 (94% dimetilsiloxano y 6% cianopropilfenilsiloxano) de 25 m x 0,32 mm i.d y 1,5 μ m de espesor. El programa utilizado para la temperatura del horno se muestra en la figura II.4.

FIGURA II.4

Rampa de temperatura del horno cromatográfico



La temperatura del inyector fue de 250 °C y la de detector 280 °C.

La cuantificación de los analitos se realizó en modo SIM (Selective Ion Monitoring) y las relaciones masa carga seleccionadas para cada uno de ellos fueron: tolueno, m/z 91 y 65; 1-octeno, m/z 70 y 55; etilbenceno y xilenos, m/z 106 y 91; estireno, m/z 104 y 74 y 1,4-diclorobenceno, m/z 146 y 111.

4.2.5. Procedimiento de dopado de las muestras

Tanto en el proceso de optimización de las condiciones de operación del P&T, como en la obtención de los parámetros analíticos, los simulantes estudiados (leche en polvo –entera y desnatada–, Tenax y Porapak Q) se doparon con 10 ng de una disolución de concentración conocida de cada analito. La masa de simulante dopada se introducía en un tubo de muestreo de P&T, conteniendo lana de vidrio silanizada. El conjunto se dejaba en una habitación limpia a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del disolvente. Pasado este tiempo, se procedía al análisis de la muestra.

4.2.6. Ensayos de migración

Una superficie de 6 cm² de envase plástico se cubre con una masa conocida del correspondiente simulante (0,24 g de Tenax, 0,4 g de leche en polvo y 0,6 g de Porapak) y se coloca en el interior de una placa Petri de vidrio de 10 cm de diámetro. El conjunto se transporta a un horno limpio a la temperatura de ensayo, donde se mantiene durante el tiempo de ensayo. Una vez finalizado el test, la masa del simulante se transfiere inmediatamente a un tubo de muestreo del P&T, previamente acondicionado a temperatura ambiente con lana de vidrio silanizada. A continuación, el tubo de vidrio se dispone en el automuestreador para su análisis.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Optimización de las condiciones de operación del purga y trampa (P&T)

Como ya se mencionó en el apartado 4.2.4, el sistema de P&T depende de un gran número de variables relacionadas, no sólo con el propio diseño del sistema y las características del analito, sino también con la composición de la matriz en el que está embebido (Bianchi *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2002; Rosell *et al.*, 2003; Zuloaga *et al.*, 1999 y 2000). En este trabajo, se optimizó su funcionamiento para las dos nuevas matrices evaluadas: leche en polvo desnatada y leche en polvo entera.

La optimización del sistema se efectuó en dos etapas (Batlle *et al.*, 2003). En una primera etapa, se identificaron los factores estadísticamente más relevantes. A continuación, se halló la superficie de respuesta para dichos factores, la cual permitió la obtención del óptimo de operación. Se siguieron dos criterios de optimización:

- presencia de todos los analitos de estudio
- máxima sensibilidad, calculada como la suma de señal de todos los analitos.

Para realizar estos experimentos, se doparon 0,4 g de cada simulante, según el procedimiento descrito en 4.2.5, hasta una concentración final de 0,5 mg kg⁻¹ de cada analito en cada simulante, inferior al menor límite de migración específica para los analitos seleccionados (12 mg kg⁻¹).

No se optimizaron todos los variables de funcionamiento del equipo de P&T (ver apartado 4.2.4). Las variables seleccionadas, así como su dominio experimental, se muestran en la tabla II.4. El resto de factores se fijaron de acuerdo a las especificaciones de diseño y operación del equipo.

■ TABLA II.4

Rango experimental para el que se optimizaron las variables. Óptimos de operación

Variable	Dominio experimental	Leche entera	Leche desnatada
Tiempo prepurga (t_{pg} , min)	0,5/2	2	0,5
Tiempo precalentamiento (t_{pc} , min)	1/7	1	1
Tiempo de purga (t_{pg} , min)	5/20	14,5	20
Tiempo de desorción (t_{ds} , min)	2/6	2	2
Temperatura de muestreo (T_C , °C)	60/95	95	60
Temperatura de la trampa (T_{tr} , °C)	10/30	30	30
Temperatura de criogenización (T_{cr} , °C)	-20/10	10	10

El “screening” de las variables más significativas se realizó, para cada simulante, mediante un diseño de experimentos de Plackett-Burman (Plackett y Burman, 1946; John, 1996) de las siete variables experimentales a dos niveles.

Los factores significativos, tal y como reflejan las figuras II.5 y II.6, son distintos en función de la matriz, lo que demuestra claramente su influencia en la liberación de los compuestos volátiles.

■ FIGURA II.5

Variables significativas para el análisis de leche en polvo entera

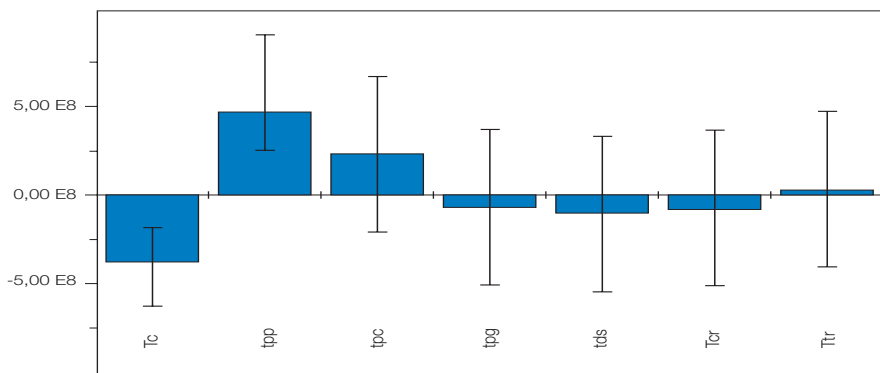
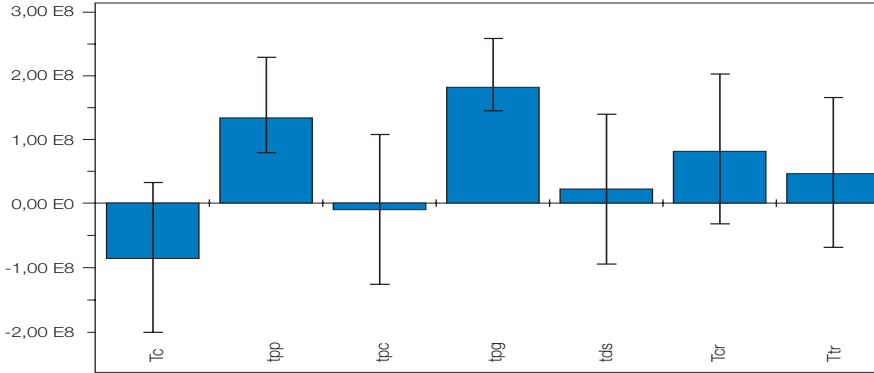


FIGURA II.6

Variables significativas para el análisis de leche en polvo desnatada



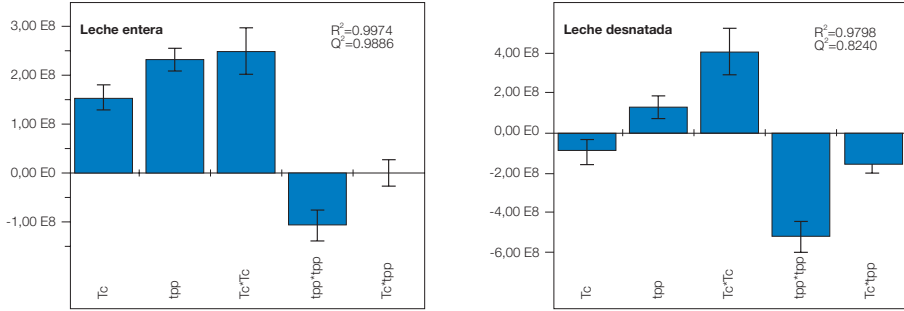
De todos los posibles efectos considerados, sólo aquellos cuyas barras de error no crucen el eje x, son influyentes en la respuesta final. Para la leche en polvo desnatada, de los siete factores considerados, únicamente son significativos el tiempo de prepurga (t_{pp}) y el de purga (t_{pg}), mientras que para el análisis de leche en polvo entera los factores a optimizar son el tiempo de prepurga (t_{pp}) y la temperatura de la muestra (T_c). Tanto el tiempo de purga, como la temperatura de la muestra están positivamente correlacionados con la respuesta. El tiempo de prepurga, en cambio, influye negativamente para el análisis de leche desnatada y positivamente en el caso de la leche entera, lo que demuestra, una vez más, la gran importancia de la matriz de muestra. El modelo de Plackett-Burman no evalúa las posibles interacciones entre variables, por lo que las conclusiones anteriores deben considerarse con la debida precaución.

Una vez discriminadas las variables, se llevó a cabo la optimización de las relevantes mediante un diseño experimental consistente en un modelo de superficie de respuesta (RSM) factorial total, de 2 variables a 3 niveles. El valor de los factores no significativos se ajustó según criterios económicos: minimizar el gasto en tiempo y material.

Los coeficientes obtenidos para cada variable, así como los valores descriptivos de R^2 (fracción de la variación de respuesta explicada por el modelo) y Q^2 (fracción de la variación de respuesta que puede predecir el modelo) se muestran en la figura II.7. Como puede observarse, ambos valores son superiores a 0,8, lo que indica tanto el buen ajuste del modelo como su excelente poder predictivo.

FIGURA II.7

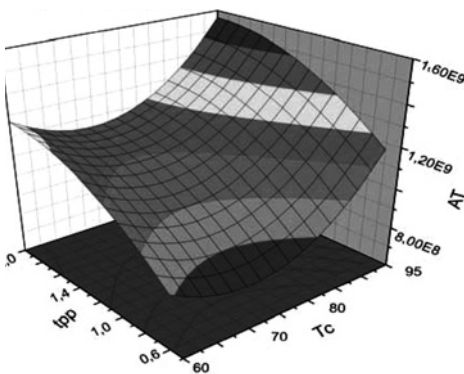
Coefficientes de los factores significativos en el diseño de la superficie de respuesta



Si se considera la leche en polvo entera, se observa que la interacción entre las dos variables optimizadas no es relevante. Los factores individuales, temperatura de la muestra durante el proceso de purga, T_c , y tiempo de prepurga, t_{pp} , se correlacionan positivamente con la respuesta, lo que significa que cuanto mayor sea el valor de estas variables, mayor es la señal de respuesta obtenida. A mayores temperaturas se favorece la volatilización de los analitos de interés, y a mayores tiempos de prepurga, mayor cantidad de oxígeno se elimina del tubo de muestreo, evitando así la oxidación de la matriz grasa. La variable más influyente es el tiempo de prepurga, indicando su cambio de signo en el coeficiente cuadrático $t_{pp} \cdot t_{pp}$ la presencia de curvatura en la superficie de respuesta. Los valores óptimos, tabla II.4 y figura II.8, corresponden al extremo superior del intervalo, es decir, a $T_c=95$ °C y $t_{pp}=2$ min. Los límites de operación de los calefactores de los tubos de muestro, establecidos en 95 °C, impidieron la realización de experimentos a temperaturas superiores.

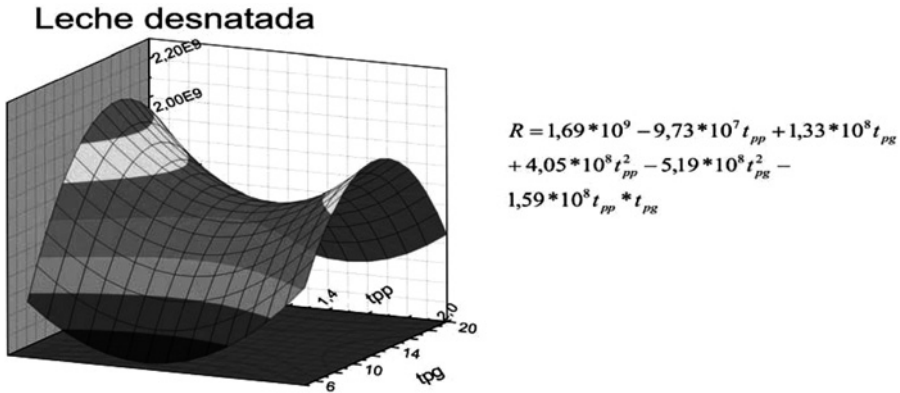
FIGURA II.8

Superficie de respuesta para el análisis de leche en polvo entera y desnatada



$$R = 1,05 \cdot 10^9 + 1,51 \cdot 10^8 T_c + 2,30 \cdot 10^8 t_{pp} + 2,47 \cdot 10^8 T_c^2 - 1,09 \cdot 10^8 t_{pp}^2$$

FIGURA II.8 (continuación)



Para la leche en polvo desnatada, el tiempo de pre-purga, en cambio, se correlaciona negativamente con la respuesta, mientras que el efecto del tiempo de purga es positivo. Sin embargo, el cambio de signo de los coeficientes cuadráticos, t_{pp}^2 y t_{pg}^2 , indica la presencia de una curvatura en la superficie de respuesta. En este caso, hay que tener en cuenta el coeficiente correspondiente a la interacción entre variables, $t_{pp} \cdot t_{pg}$, siendo su valor absoluto incluso mayor que el coeficiente correspondiente al término t_{pg} . El signo negativo señala la presencia de una curvatura a lo largo de la diagonal $t_{pp} - t_{pg}$, tal y como se aprecia en la figura II.8. Como consecuencia directa de esta geometría, el valor óptimo del tiempo de purga (14,5 minutos) se encuentra dentro del dominio experimental (Fig. II.8). El valor óptimo del tiempo de pre-purga corresponde a 0,5 minutos.

4.3.2. Características analíticas

El método de análisis, para ambos simulantes, se evaluó mediante el cálculo de sus límites de detección (LOD), cuantificación (LOQ), linealidad, repetibilidad y reproducibilidad.

Para el cálculo de la repetibilidad, definida como la desviación estándar relativa (RSD) para cuatro réplicas consecutivas, y la reproducibilidad, definida como la RSD de 11 réplicas analizadas en un período de 15 días, se doparon muestras de leche en polvo entera y desnatada en unas concentraciones de $62,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $25 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. El rango de recuperación de los diferentes analitos (tabla II.5) varía entre 84 y 111%, excepto en el caso de tolueno en leche entera, cuya recuperación asciende a 128%. No se observaron diferencias importantes entre matrices en lo que a repetibilidad y reproducibilidad se refiere. En leche en polvo desnatada estos parámetros variaron en un rango comprendido entre 3,1-12,5% y 4,9-14,7% y en leche entera entre 4,7-9,6% y 6,2-13,8% respectivamente.

■ TABLA II.5

Repetibilidad (%RSD), reproducibilidad (%RSD) y recuperación (\pm SD, desviación estándar) para el análisis de leche en polvo entera y desnatada por purga y trampa (P&T)

Analito	Repetibilidad (n=4)		Reproducibilidad (n=11)		Recuperación \pm SD (n=3)	
	Leche desnatada	Leche entera	Leche desnatada	Leche entera	Leche desnatada	Leche entera
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)		
Tolueno	9,4	8,0	9,9	6,1	108 \pm 7	128 \pm 5
1-Octeno	6,2	4,7	5,2	7,4	109 \pm 7	93 \pm 4
Etilbenceno	8,0	9,6	7,3	6,5	74 \pm 5	90 \pm 6
m, p-xileno	6,5	8,7	7,4	13,8	91 \pm 7	87 \pm 7
o-xileno	11,0	4,9	14,7	7,3	86 \pm 7	84 \pm 5
Estireno	12,5	7,8	10,5	6,2	84 \pm 11	111 \pm 3
1,4-Diclorobenceno	3,4	5,7	4,9	8,1	105 \pm 3	84 \pm 5
Media	8,1	7,1	8,6	7,9	94 \pm 7	94 \pm 5

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), expresados como masa absoluta (ng), se calcularon según las recomendaciones de la IUPAC (Currie, 1999) como:

$$LOD = 3 * \frac{\sigma_B}{S_i} \quad \text{Ec[3]}$$

$$LOQ = 10 * \frac{\sigma_B}{S_i} \quad \text{Ec[4]}$$

donde σ_B es la desviación estándar del blanco y S_i es la sensibilidad de cada analito. Como se observa en la tabla II.6, excepto para el estireno y el 1,4-diclorobenceno, los límites de detección de los analitos fueron menores en leche desnatada (entre 0,01 y 1,0 ng) que en leche entera (entre 0,01 y 1,2 ng), debido a la mayor capacidad de acumulación de los contaminantes orgánicos en la materia grasa.

Los LODs del estireno y el 1,4-diclorobenceno son mayores en la leche desnatada. Sin embargo, este resultado no contradice la afirmación anterior, ya que el comportamiento de estos compuestos no sigue la tendencia global, como demuestra el hecho de que sus variables significativas en el análisis por P&T son distintas que para el resto de compuestos, debido probablemente a su mayor temperatura de ebullición. En particular, la temperatura de muestreo, T_C , es relevante para estos dos analitos, y corresponde a un valor más alto que el calculado aplicando los valores promedio. Las prestaciones del método, no obstante, son suficientes para los objetivos del estudio, por lo que no se repitió la optimización.

Una vez calculados los límites de detección, resulta interesante compararlos con los límites específicos de migración, SMLs, de cada compuesto, con el fin de evaluar el verdadero potencial del método analítico. En el peor de los casos, el límite de detección más elevado corresponde al tolueno en leche en polvo entera, con un valor de 1,2 ng, lo que se traduce en una concentración de 3 ng por g de simulante, mil veces inferior al valor límite (12 mg kg⁻¹). Por lo tanto, queda demostrada la validez del método para la determinación de la migración de compuestos orgánicos volátiles de muestras de leche en polvo.

TABLA II.6

Límites de detección (LOD), rango lineal, correlación y verificación matemática ($F_{\text{tab}}(1.n-2)$ de los valores críticos de F para los tests ANOVA de una cola)

Leche en polvo desnatada				
Compuesto	LOD (ng)	Rango (ng)	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$	R^2
Tolueno	1,0	3,3-34	1443/6,61	0,996 (n=7)
1-Octeno	0,01	0,03-23	847/6,61	0,993 (n=7)
Etilbenceno	0,07	0,24-25	2471/7,71	0,998 (n=6)
<i>m, p</i> -Xileno	0,07	0,23-124	2212/7,71	0,992 (n=6)
<i>o</i> -Xileno	0,09	0,31-62	540/5,99	0,990 (n=8)
Estireno	0,05	0,17-35	899/10,1	0,996 (n=5)
1,4-Diclorobenceno	0,81	2,7-50	2232/5,99	0,997 (n=8)
Leche en polvo entera				
Compuesto	LOD (ng)	Rango (ng)	$F_{\text{exp}}/F_{\text{tab}}$	R^2
Tolueno	1,2	4,2-33	3552/10,1	0,999 (n=5)
1-Octeno	0,02	0,06-51	876/7,71	0,994 (n=6)
Etilbenceno	0,21	0,7-6,5	481/10,1	0,992 (n=5)
	0,20	0,68-260	3334/5,59	0,998 (n=9)
<i>m, p</i> -Xileno	0,44	1,2-126	1432/6,61	0,996 (n=7)
<i>o</i> -Xileno	0,52	0,96-65	5877/6,61	0,999 (n=7)
Estireno	0,02	0,06-36	503/10,1	0,992 (n=5)
	0,01	0,03-2516	1323/5,99	0,995 (n=8)
1,4-Diclorobenceno	0,43	1,4-53	945/7,71	0,995 (n=6)

El método es lineal en dos órdenes de magnitud, tal y como se muestra en la tabla II.6. Debido a la alta señal obtenida para etilbenceno y estireno en muestras reales con leche en polvo entera, se necesitaron dos curvas de calibración para esos compuestos. Mediante la aplicación de tests ANOVA de una cola se verificó matemáticamente la linealidad calculada.

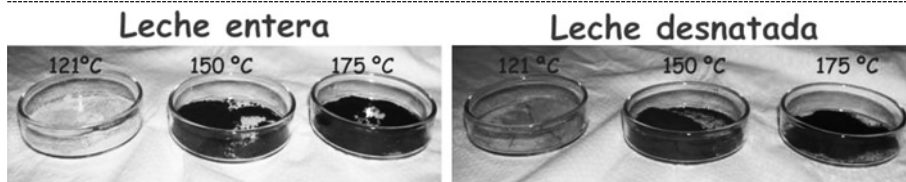
4.3.2. Tests de migración

4.3.2.1. Ensayos de migración para leche en polvo

Los ensayos de migración se llevaron a cabo por triplicado, a tres temperaturas diferentes (75 °C, 100 °C y 121 °C), durante diferentes períodos de tiempo (30, 60, 120 y 240 min) con cuatro tipos de envases plásticos utilizados en aplicaciones de alta temperatura (ver figura II.2) y sobre los dos tipos de leche en polvo como simulante. Las condiciones de tiempo y temperatura se seleccionaron según la Directiva 97/48/CE. Los ensayos de migración pretendían simular las condiciones reales de uso de los envases, durante las cuales el envase permanece abierto al medio, sin llegar a alcanzar en ningún momento el equilibrio.

Debido a las propias características del simulante, leche en polvo, no se pudo elevar la temperatura de los ensayos por encima de 121 °C. A temperaturas superiores, 150 °C y 175 °C, los componentes de la matriz, grasas, proteínas y carbohidratos, sufren reacciones de degradación y como consecuencia, tal y como se aprecia en la figura II.9, se produce un cambio en sus características químicas y organolépticas (caramelización y pardeamiento) y químicas.

■ FIGURA II.9

Alteraciones sufridas por la leche en polvo cuando se calienta durante 30 minutos a diferentes temperaturas (121, 150 y 175 °C)

Los resultados de los ensayos realizados, expresados en mg de compuesto por kg de alimento, se muestran en las tablas II.7 y II.8.

Como puede observarse, en ningún caso los valores de migración específica superan los límites establecidos por la Directiva 2002/72/CE, por lo que la utilización de estos envases en aplicaciones donde se requieran altas temperatura no entraña, en principio riesgo alguno para la salud del consumidor.

Para explicar los resultados de las tablas II.7 y II.8, hay que entender todos los procesos de transferencia de materia que ocurren durante el ensayo. Por un lado, existe una migración de compuestos del envase hacia el simulante, la que implica una migración de los analitos desde el interior del envase a su superficie, sorción en el simulante y migración desde la superficie del simulante hacia el interior. Por otro lado, y dado que el ensayo de migración se realiza en un sistema abierto, se produce una liberación de compuestos, tanto del envase como del simulante, al medio que los rodea.

En general, existe una mayor variación en el grado de migración con la temperatura que con el tiempo. Apenas se detectaron trazas del compuesto menos volátil, 1,4-diclorobenceno (T_e 173,4 °C), posiblemente debido a que las condiciones de los ensayos (T_{max} 121 °C y t_{max} 120 min) no fueran suficientemente extremas como para producir su liberación. La temperatura, en cambio, favoreció el proceso de migración del tolueno (T_e 110 °C) desde el simulante al entorno. Solamente se detectaron trazas de esta sustancia en los ensayos realizados a 75 °C.

■ TABLA II.7

Migración a leche desnatada en polvo expresada en µg/kg de alimento. (n.d.: no detectado)

	T = 121 °C			T = 100 °C			T = 75 °C			
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	240 min
PPCo										
Tolueno	n.d.	n.d.	n.d.	0,203±0,028	n.d.	n.d.	0,383±0,079	0,071±0,041	0,092±0,026	0,151±0,004
1-Octeno	0,048±0,033	0,062±0,012	0,066±0,004	0,040±0,004	0,072±0,036	n.d.	0,071±0,041	0,069±0,023	0,069±0,023	0,056±0,020
Etilbenceno	0,036±0,010	0,045±0,004	0,046±0,004	0,051±0,008	0,034±0,005	0,035±0,003	0,034±0,005	0,035±0,007	0,035±0,007	0,040±0,004
m, p-Xileno	0,259±0,025	0,275±0,017	0,285±0,013	0,289±0,033	0,253±0,018	0,273±0,022	0,252±0,034	0,266±0,043	0,266±0,043	0,291±0,047
o-Xileno	0,091±0,017	0,101±0,008	0,104±0,014	0,091±0,010	0,089±0,009	0,092±0,007	0,086±0,011	0,093±0,017	0,093±0,017	0,105±0,010
Estireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,4-Diclorobenceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,109±0,019
PPRa										
Tolueno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,100±0,024	n.d.	0,106±0,025	n.d.	n.d.	0,256±0,024
1-Octeno	0,056±0,018	0,045±0,012	0,072±0,010	0,047±0,018	0,042±0,006	0,038±0,004	0,058±0,017	0,042±0,004	0,042±0,004	0,043±0,002
Etilbenceno	0,037±0,011	0,037±0,006	0,045±0,001	0,037±0,006	0,040±0,001	0,034±0,003	0,035±0,004	0,037±0,003	0,037±0,003	0,038±0,001
m, p-Xileno	0,267±0,017	0,270±0,018	0,268±0,027	0,261±0,032	0,283±0,041	0,259±0,024	0,266±0,019	0,280±0,027	0,280±0,027	0,283±0,019
o-Xileno	0,096±0,011	0,092±0,008	0,101±0,006	0,090±0,015	0,102±0,004	0,090±0,011	0,092±0,010	0,095±0,008	0,095±0,008	0,099±0,003
Estireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,4-Diclorobenceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SAN										
Tolueno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,537±0,020
1-Octeno	0,074±0,013	0,050±0,004	0,091±0,008	0,080±0,010	0,067±0,021	0,074±0,017	0,082±0,007	0,104±0,045	0,104±0,045	0,096±0,025
Etilbenceno	0,070±0,020	0,076±0,025	0,071±0,003	0,080±0,033	0,049±0,007	0,053±0,008	0,049±0,007	0,090±0,039	0,090±0,039	0,064±0,009
m, p-Xileno	0,433±0,112	0,383±0,052	0,411±0,064	0,461±0,092	0,379±0,054	0,411±0,060	0,365±0,042	0,701±0,304	0,701±0,304	0,495±0,073
o-Xileno	0,147±0,031	0,134±0,027	0,143±0,010	0,171±0,044	0,127±0,018	0,138±0,020	0,133±0,020	0,235±0,102	0,235±0,102	0,166±0,025
Estireno	4,02±0,75	5,31±0,60	0,599±0,169	0,355±0,102	n.d.	n.d.	0,159±0,006	n.d.	n.d.	n.d.
1,4-Diclorobenceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PC										
Tolueno	n.d.	n.d.	n.d.	0,206±0,038	0,148±0,030	n.d.	0,167±0,097	0,088±0,021	0,088±0,021	0,170±0,043
1-Octeno	0,048±0,013	0,126±0,048	0,065±0,008	0,038±0,002	0,040±0,002	0,039±0,002	0,062±0,013	0,047±0,011	0,047±0,011	0,038±0,003
Etilbenceno	0,035±0,001	0,088±0,052	0,043±0,003	0,047±0,005	0,036±0,002	0,035±0,003	0,042±0,012	0,036±0,001	0,036±0,001	0,035±0,005
m, p-Xileno	0,276±0,006	0,367±0,119	0,269±0,009	0,274±0,012	0,269±0,011	0,266±0,015	0,280±0,033	0,269±0,071	0,269±0,071	0,259±0,023
o-Xileno	0,093±0,002	0,178±0,085	0,094±0,009	0,092±0,008	0,092±0,004	0,092±0,010	0,100±0,017	0,092±0,002	0,092±0,002	0,092±0,015
Estireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,4-Diclorobenceno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,167±0,062	n.d.	n.d.	n.d.

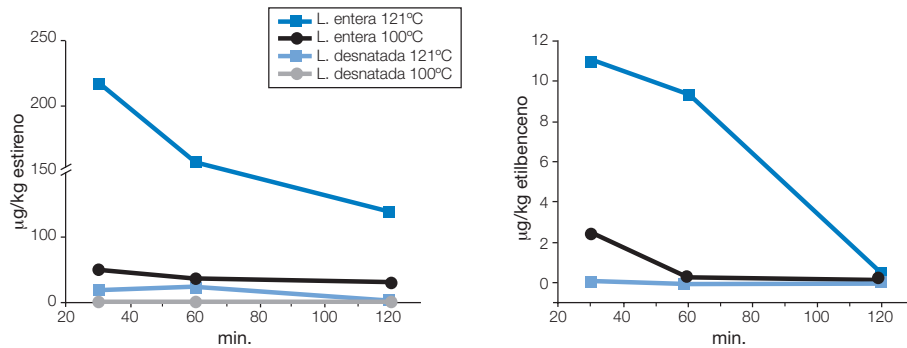
A pesar de ser el compuesto más apolar, no se hallaron trazas de 1-octeno en la leche entera, pero sí en leche desnatada. El 1-octeno es una α -olefina muy reactiva, ampliamente utilizada en reacciones de polimerización (Venkatesh *et al.*, 2004b; Peeters *et al.*, 1999; Asakura *et al.*, 1999). Por lo tanto, y dado el rango de temperaturas de trabajo, es posible que en el seno de la leche entera haya ocurrido alguna reacción de oligomerización entre dicho analito y algún componente de la materia grasa de la leche entera, como anhídrido maleico (Park y Choe, 2005; Venkatesh *et al.*, 2004a) o ésteres orgánicos de cadena corta (de Klerk, 2006).

Las cantidades, para las mismas condiciones de tiempo y temperatura, de etilbenceno, xilenos y estireno, sustancias con similares puntos de ebullición y similar liposolubilidad, son más elevadas en leche entera que en desnatada, especialmente cuando el material de ensayo es SAN. Los analitos se disuelven en la matriz grasa del simulante, en la que quedan retenidos y atrapados, dificultando así su vaporización y liberación al medio exterior.

El estireno monómero forma parte de la composición del copolímero SAN, por lo que cabe esperar una mayor migración para este compuesto, sobre todo en la leche entera, donde queda atrapado por afinidad físico-química, sin llegar a sobrepasar, en ningún caso, los límites legislados. Existe una gran diferencia entre los valores de migración detectados a 121 °C y 100 °C para ambas matrices. Aunque la temperatura límite de utilización del envase de SAN es, según especificaciones del fabricante, de 130 °C, existe ya una degradación considerable de las cadenas del polímero a 121 °C, como consecuencia de la cual se liberan a la atmósfera gran cantidad de productos, entre ellos, estireno monómero. El comportamiento del etilbenceno, cuya presencia está ligada a la composición del copolímero SAN (Tang *et al.*, 2000) sigue unas tendencias similares al estireno (figura II.10).

FIGURA II.10

Migración de estireno y etilbenceno en el copolímero estireno-acrilonitrilo (SAN)



A la vista de los resultados, ha quedado demostrado el importante papel que desempeña la matriz del alimento, concretamente la materia grasa, en el proceso de migración, favoreciendo, según su afinidad físico-química, la retención de sustancias de características similares. Por lo tanto, a la hora de diseñar los experimentos de migración que validen un envase para aplicaciones a temperatura no se debería olvidar nunca el alimento al que va destinado. Alimentos con un contenido importante en grasa favorecerán la acumulación de contaminantes orgánicos procedentes del material de envase.

4.3.2.2. Comparación entre simulantes sólidos para migración a alta temperatura

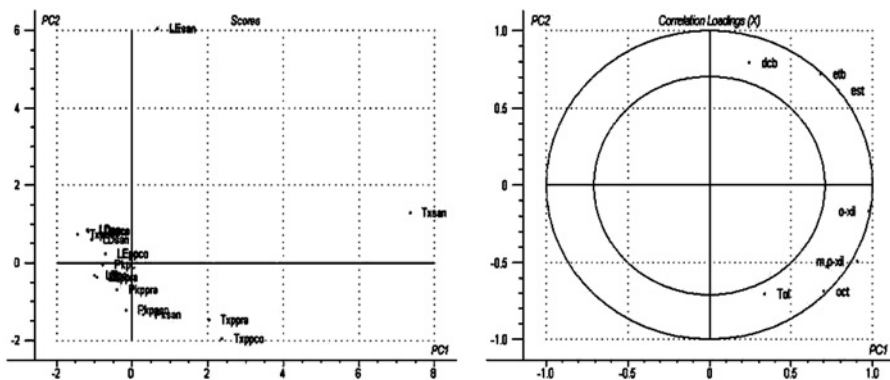
La migración es un proceso de transferencia de materia que depende, entre otros factores, de la afinidad química entre el compuesto que migra y el alimento al que se dirige (sorción) y de la difusión del migrante en el seno del alimento. Cuando se habla de migración a alta temperatura, tal y como se explicó en el apartado 4.3.2.1., se debe considerar también la migración o liberación de los compuestos desde la matriz del alimento a la atmósfera que los rodea. Por lo tanto, la composición de la matriz desempeña un papel fundamental en el proceso de migración, tanto al sorber las sustancias procedentes del envase, como al retenerlas y atraparlas, evitando así su liberación a temperaturas elevadas.

Una vez realizados los ensayos de migración en leche en polvo, y comprobada la gran importancia del contenido graso en la migración, se compararon estos resultados con los obtenidos utilizando como simulantes MPPO y Porapak Q, sorbente muy común en los muestreos de compuestos volátiles (Agelopoulos y Ticket; 1998; Pettersson, 2001; Nerín y Acosta, 2002). Se eligieron las condiciones más desfavorables de migración para la leche en polvo, 121 °C y 30 min. Las condiciones de operación del P&T para el muestreo de MPPO y Porapak Q se ajustaron según estudios anteriores realizados por otros miembros del grupo con el mismo equipo (Nerín *et al.*, 2002).

La comparación de los resultados obtenidos en estos ensayos con sus tests equivalentes sobre leche en polvo se realizó mediante un análisis de componentes principales (PCA), mostrado en la figura II.11.

FIGURA II.11

PCA para la migración a 121 °C y 30 min. de tolueno (tol), 1-octeno (oct), etilbenceno (etb), m,p-xileno (m,p-xil), o-xileno (o-xil), estireno (est) y 1,4-diclorobenceno desde polipropileno copolímero (ppco), polipropileno random (ppra), copolímero de estireno-acrilonitrilo (san) y policarbonato (pc) a MPPO (Tx), Porapak (Pk), leche en polvo entera (LE) y leche en polvo desnatada (LD)



Del PCA, que explica un 83% de la varianza (PC1 50%, PC2 33%), se deduce un comportamiento similar entre la leche entera en polvo, leche desnatada en polvo y Porapak Q en la migración de tolueno, 1-octeno y (*o*-,*m*-,*p*-)xileno. Sin embargo, la leche entera en polvo fue capaz de retener mayor cantidad de etilbenceno y estireno, cuando se puso en contacto con SAN a 121 °C y 30 min. De hecho, se ha demostrado la relación existente entre el contenido en grasa de la matriz y la presencia de estos dos compuestos (Linssen y Reitsma, 1996; Tawfik y Huyghebaert, 1998).

Por otra parte, el MPPO proporcionó mayores valores de migración de tolueno, 1-octeno y (*o*-,*m*-,*p*-)xileno al compararlo con el alimento real, tal y como ocurriera en estudios anteriores (Aurela *et al.*, 1999 y 2001), no existiendo diferencias significativas entre ambas matrices en los niveles detectados de etilbenceno y estireno. Los valores de migración obtenidos en MPPO fueron similares a los detectados por Nerín y Acosta (Nerín y Acosta, 2002) en un trabajo anterior realizado con el mismo tipo de envases.

De este estudio, podemos concluir que el MPPO o Tenax®, simulante sintético recomendado por la legislación europea para la simulación del comportamiento de alimentos sólidos, sobreestima la migración de algunos compuestos volátiles, además de ser menos rentable económicamente. Es necesario, por tanto, buscar simulantes sólidos alternativos cuya composición y comportamiento químico se asemeje al del alimento real. La leche entera en polvo, con un contenido en grasa de 23%, podría, por su naturaleza, precio, manejabilidad y comportamiento, ser la solución para aplicaciones en las que no se requirieran temperaturas superiores a 121 °C.

5. Nuevos materiales poliméricos como sorbentes para muestreos en fase gas con desorción térmica

5.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, entre los métodos utilizados y descritos para la concentración de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), la técnica de Purga y Trampa (P&G), en la que los analitos se desorben de la matriz mediante el uso de temperatura, se desplazan por una corriente de gas inerte hasta un sorbente apropiado donde quedan atrapados y, finalmente, se desorben, mediante el empleo de temperaturas más altas, en la zona de cabeza de una columna cromatográfica, es una de las más utilizadas por sus ya citadas ventajas (Nerín *et al.*, 1998; Kloskowski *et al.*, 2004). Una vez retenidos en el sorbente, los analitos también pueden recuperarse por una desorción con disolventes de diferente naturaleza, escogidos y optimizados según el tipo de interacción solvente-analito-sorbente. En la desorción térmica, los analitos únicamente son desorbidos por la acción de la temperatura, con la consiguiente falta de especificidad y selectividad. Sin embargo, esta técnica presenta otras ventajas (Harper, 2000), tanto desde el punto de vista medioambiental, con menor consumo de disolventes orgánicos, y por tanto, menor producción de residuos, como desde el punto de vista analítico, debido al incremento sensibilidad como consecuencia de la no-dilución de los analitos.

Los sorbentes más utilizados para desorción térmica son (Hori *et al.*, 1989; Harper 2000; Kloskowski *et al.*, 2004; Supelco 2006):

- Tamices de carbón molecular, adecuados para retener moléculas de pequeño tamaño (clorometano, cloruro de vinilo, etc.). Como ejemplo hay que destacar la línea de productos **Carbosieve S-III** o **Carboxen**, comercializados por Supelco®.

- **Carbón-grafito negro**, no poroso. Retiene desde hidrocarburos de cadena pequeña C4-C5 hasta moléculas de mayor tamaño, como los bifenilos policlorados (PCBs). Supelco® lo comercializa con la denominación de **Carbotrap** o **Carbopack**.
- **Polímeros porosos**. Dentro de este amplio grupo se encuentra **Supelpak-2**, obtenida por la purificación de Amberlita-XAD2, y adecuada para la retención de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) en aire; **Tenax**, polímero de óxido de 2,6-difenilo, adecuado para compuestos volátiles y semivolátiles; y **Chromosorb 106**, polímero de estireno-divinilbenceno, con una superficie específica de 750 m²/g, apto para retener pequeñas moléculas.

La extracción en fase sólida (SPE) se introdujo en los laboratorios a principios de la década de los 70 tanto como técnica de extracción como de limpieza, "clean-up", de soluciones líquidas. La determinación de trazas de pesticidas en agua, el aislamiento de moléculas orgánicas en distintas matrices, como vino, fluidos biológicos, orina y sangre, constituyen aplicaciones típicas de SPE (Huck y Bonn, 2000). Los sorbentes típicos de este tipo de aplicaciones, fabricados a partir de sílice fundida en fase reversa C₈-C₁₈, apenas se emplean en desorción térmica debido a la degradación de su superficie específica a altas temperaturas (Thurman y Mills, 1998). Sin embargo, en la década de los 90 se introdujeron en el mercado nuevas resinas poliméricas de elevada superficie específica (ver Tabla II.9 (Hennion, 1999)).

■ TABLA II.9

Características de las resinas copoliméricas comerciales apolares de SPE
(^an.a.: no disponible, ^bEVB: Etilvinilbenceno, ^cNVP: N-vinilpirrolidona)

Sorbente	Fabricante	Estructura	Porosidad (Å)	d _p (µm)	Superficie específica (m ² /g)
Bond Elut ENV	Varian	PS-DVB	450	125	500
Bond Elut PPL	Varian	PS-DVB	300	125	700
Abselut	Varian		100	65-80	500-650
SDB	J.T.Baker	PS-DVB-EVB ^b	300	40-120	1060
Speedisk-DVD	J.T.Baker	PS-DVB	150	n.a. ^a	700
Empore disk	J.T.Baker	PS-DVB	n.a.	6,8	350
LiChrolut EN	Merck	PS-DVB	80	40-120	1200
Isolute ENV+	IST	PS-DVB	100	90	100
Envichrom P	Supelco	PS-DVB	140	80-160	900
Chromabond HR-P	Machery-Nagel	PS-DVB	n.a.	50-100	1200
Porapak RDX	Waters	PS-DVB-NVP ^b	55	120	550
Oasis HLB	Waters	PS-DVB-NVP ^b	55	30 y 60	800
PRP-1	Hamilton	PS-DVB	75	5 y 10	415
PLRPS	Polymer Labs.	PS-DVB	100	15 y 60	550
Hysphere-1	Spark Holland	PS-DVB	n.a.	5-20	>1000

La mayor eficiencia de las nuevas resinas poliméricas, debida, en gran parte, a su elevada superficie específica, permite la extracción de analitos polares (Hennion 1999; Ferreira *et al.*, 2004; Benito-Peña *et al.*, 2006). Por otro lado, su estructura les confiere una mayor estabilidad térmica potencial. Sin embargo, y hasta la fecha, su potencial en aplicaciones con desorción térmica no ha sido documentado.

En este capítulo se pretende estudiar y evaluar el comportamiento de dos de estas nuevas resinas poliméricas para aplicaciones en muestreos en fase gas y posterior recuperación de los analitos por desorción térmica, concretamente Bond Elut ENV, suministrada por Varian Inc., y LiChrolut EN, de Merck, seleccionadas por sus excelentes propiedades de retención en fase líquida (Ferreira *et al.*, 2004). Para ello, se estudiará la capacidad de retención y posterior elución de siete compuestos orgánicos volátiles (VOCs), 1-octeno, etilbenceno, (*o*-,*m*-,*p*-)xileno, estireno y 1,4 diclorobenceno, para compararla con el comportamiento mostrado por Tenax® TA, resina polimérica cuyo uso en este tipo de aplicaciones está muy extendido. Finalmente, se procede al cálculo de las cantidades de estos sorbentes que darían las mismas prestaciones que las trampas comerciales para uso con P&T y relleno de Tenax® TA

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Preparación de los lechos de sorbente y descripción del sistema experimental

Los tres sorbentes utilizados, Tenax® TA, Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN, fueron en primer lugar acondicionados mediante lavado con metanol y secado a vacío. A continuación, el relleno se empaqueta en tubos de acero inoxidable de 1/8 de pulgada de diámetro interno y los extremos del tubo se taponaron con lana de vidrio silanizada para evitar un posible arrastre del sorbente por la corriente de gas.

Los lechos, cuyas propiedades físicas se muestran en la tabla II.10 se unieron al inyector y detector FID de un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 Series II) mediante conexiones de acero inoxidable de 1/16 de pulgada. En la figura II.12 se muestra un esquema del sistema experimental empleado, similar al utilizado por Supelco (Manura, 2004).

■ TABLA II.10

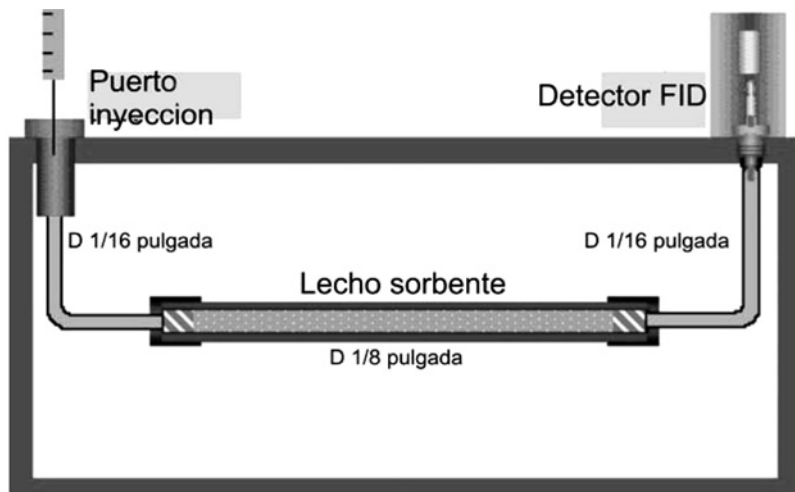
Propiedades de los lechos de sorbentes

	Tenax® TA	BondElut® ENV	LiChrolut® EN
^a Diámetro de partícula (mm)		125	40-120
^a Volumen de poro (mL/g)	2,4	1,3	0,75
^a Superficie específica (m ² /g)	24,1	500	1200
Masa de sorbente (µg)	^b 37,0	108,7	15,1
Longitud del lecho (mm)	^b 18,7	54,9	4,92
Volumen del lecho (µL)	^b 148	435	39,0
Volumen muerto (µL)	^b 127	373	29,8
Relación de fases (Φ , g de sorbente por mL de gas)	0,29		0,51
			0,79

^aFuente: SIS Inc.; Varian Inc.; Merck; ^blos experimentos se realizaron con dos lechos de Tenax distintos.

FIGURA II.12

Esquema del sistema experimental utilizado



Se prepararon disoluciones al 1% (m/m) en dietil éter de cada uno de los estándares (1-octeno, etilbenceno, *o*-,*m*-,*p*-xileno, estireno y 1,4-diclorobenceno). Un microlitro de cada disolución se inyectó a 250 °C. El flujo de gas portador, nitrógeno, se fijó en 20 mL/min. Se monitorizó la elución isoterma de cada analito a través del lecho de sorbente en un rango de temperaturas de 120-180 °C. Previamente se evaluó, por inspección visual, la máxima temperatura que las nuevas resinas poliméricas, Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN, podían resistir sin degradación aparente, siendo ésta de 240 y 260 °C respectivamente.

5.2.2. Determinación de los parámetros cromatográficos del sistema

El **tiempo de retención** (t_R), la **anchura de pico** (w) y el **factor de asimetría** (F_a) se midieron directamente a partir del pico de elución, señal de salida del sistema.

El **factor de capacidad** (k) de cada analito, definido como la relación entre la masa de analito retenida y la masa que permanece en la fase móvil, se calculó mediante la expresión:

$$k_A = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Ec[5]}$$

donde t_0 es el volumen muerto. Los **coeficientes de distribución** se obtienen, por tanto, como:

$$K = k * \phi \quad \text{Ec[6]}$$

siendo ϕ la relación de fases (tabla II.10).

El **número de platos** (N) en función de la temperatura se estimó con ayuda de las curvas de elución como:

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{Ec[7]}$$

Este parámetro y la longitud de lecho de cada sorbente (L), ver tabla II.10, están relacionados por la expresión $H=N/L$, que permite la determinación de la **altura equivalente de plato teórico** (H).

El **volumen de ruptura** (V_B), definido como el volumen de eluyente, a una temperatura dada que puede atravesar un lecho de sorbente antes que la concentración a la salida del analito retenido alcance un valor relativo a la carga inicial, normalmente entre el 1 y el 5%, es el parámetro más importante en SPE (Hennion y Pichon, 1994; Harper, 2000; Liska, 2000; Poole *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Sides *et al.*, 2000). El V_B depende (Liska, 2000) de la carga de analito (independiente a bajas concentraciones) de la temperatura, del flujo de gas portador y del número de platos teóricos, parámetro que es obviado en la mayor parte de los estudios realizados. Experimentalmente se puede determinar V_B tanto por métodos on-line como off-line, requiriendo estos últimos gran cantidad de tiempo, además de ser un tanto subjetivos (Poole *et al.*, 2000). Existen, por otra parte, varios métodos teóricos que estiman V_B . De la teoría de la cromatografía frontal, se puede deducir una expresión que relaciona el volumen de ruptura con varias propiedades (numero de platos, N, volumen muerto, V_M , factor de capacidad) de los lechos de sorbentes y los analitos en ellos retenidos, según:

$$V_B = (1 + k)V_M \left(1 - \frac{2.3}{\sqrt{N}} \right) \tag{Ec[8]}$$

La Ec[8] estima el volumen de ruptura al 1% y se aplica en sistemas con gran número de platos.

Lövkvist y Jönsson (Lövkvist y Jönsson, 1987) propusieron un modelo aplicable a sistemas, como los de SPE, con un número de platos pequeño.

$$V_B = \frac{1}{\sqrt{a_0 + \frac{a_1}{N} + \frac{a_2}{N^2}}} (1 + k) * V_M \tag{Ec[9]}$$

Los parámetros a_0 , a_1 y a_2 son característicos del nivel de ruptura (tabla II.11)

■ TABLA II.11

Parámetros de la ecuación de Lövkvist y Jönsson para el cálculo de V_B

% Ruptura	a_0	a_1	a_2
10%	0,8100	2,878	1,941
5%	0,9025	5,360	4,603
1%	0,9801	13,59	17,60

En este trabajo, el volumen de ruptura experimental se calculó siguiendo el procedimiento descrito por Kroupa y Manura (Kroupa *et al.*, 2004; Manura, 2004) y su valor se comparó con el teórico dado por las ecuaciones [8] y [9].

El **volumen de elución** (V_E), o volumen de gas portador necesario para desorber el analito atrapado en el sorbente, se calculó según la teoría frontal de cromatografía como:

$$V_E = (1 + k)V_M \left(1 + \frac{2.3}{\sqrt{N}} \right) \tag{Ec[10]}$$

5.2.3. Dependencia con la temperatura

La dependencia de las diferentes variables termodinámicas con la temperatura se establece a través de la ecuación de Van't Hoff:

$$\frac{d \ln X}{dT} = - \frac{\Delta H_T}{R * T^2} \quad \text{Ec[11]}$$

donde X es la variable considerada, ΔH_T (J mol^{-1}) es la entalpía del proceso termodinámico, en este caso la adsorción, a la temperatura T (K) y R es la constante universal de los gases.

ΔH_T se obtiene aplicando la ley de Kirchoff:

$$\Delta H_T = \Delta H_{T_0} + \int_{T_0}^T \Delta C_p d\tau \quad \text{Ec[12]}$$

donde ΔH_{T_0} es la entalpía del proceso termodinámico a la temperatura de referencia T_0 y ΔC_p ($\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) es la diferencia de capacidad calorífica molar entre el estado final (sorbido en el sorbente) e inicial (en fase gas) del analito ($\Delta C_p = C_{p_{\text{sorb}}} - C_{p_{\text{g}}}$).

La entalpía de adsorción, no obstante, se considera constante con la temperatura en la mayoría de estudios debido al estrecho rango de temperaturas analizado. Por lo tanto, la integración de la ecuación [12] conduce a la solución:

$$\ln X = \frac{-\Delta H}{RT} + C \quad \text{Ec[13]}$$

donde $-\Delta H/T$ y C son constantes. Esta solución se denomina **modelo de dos parámetros**.

Si se considera la dependencia de ΔH_T con la temperatura, y asumiendo que ΔC_p es constante, se obtiene la solución:

$$\ln X = \frac{-\Delta H_{T_0}}{RT} + \frac{\Delta C_p}{R} \left(\ln \frac{T}{T_0} + \frac{T_0 - T}{T} \right) + C \quad \text{Ec[14]}$$

denominada **modelo de tres parámetros**. Relaciones similares a las obtenidas con el modelo de tres parámetros se han utilizado anteriormente para el estudio de la dependencia con la temperatura de la retención en columna capilar de cromatografía de gases (Héberger y Görgenyi, 2001), en el cálculo de coeficientes de partición aire-agua (Görgenyi *et al.*, 2002) y en el cálculo de volúmenes de ruptura de VOCs en varios sorbentes (Kroupa *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, debido al rango experimental de temperaturas, sólo se ha considerado el modelo de dos parámetros.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Influencia de la temperatura sobre el coeficiente de distribución y el volumen de ruptura

La influencia de la temperatura, tanto sobre el coeficiente de distribución, como sobre el volumen de ruptura, a presión constante viene dada por la aplicación de la ecuación de Van't Hoff (Green y Abraham, 2000), según las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d \ln K}{dT} = - \frac{\Delta H}{R * T^2} \quad \text{Ec[15]}$$

$$\frac{d \ln V_B}{dT} = - \frac{\Delta H}{R * T^2} \tag{Ec16}$$

A partir de estas ecuaciones y, considerando ΔH constante en el rango de temperaturas estudiado, se obtiene un modelo de regresión lineal al representar bien lnK o lnV_B frente a 1/T, siendo (-ΔH/R) la pendiente. En las tablas II.12 y II.13 se muestran los coeficientes de correlación, las pendientes y las ordenadas en el origen para el ajuste de la retención de cada compuesto en los diferentes sorbentes.

■ TABLA II.12

Influencia de la temperatura sobre los coeficientes de distribución K (g/mL)

	R ²			Pendiente = (-ΔH/R)			Ordenada en el origen = ln K ₀		
	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut
	1-octeno	0,9744	0,9991	0,9984	6212±572	7250±98	8212±148	-11,4±0,3	-10,6±0,2
Etilbenceno	0,9838	0,9990	0,9968	5626±479	7038±102	7765±195	-9,7±1,0	-10,0±0,2	-9,6±0,5
o-xileno	0,9769	0,9987	0,9967	5406±479	7198±118	7900±202	-8,8±1,1	-10,1±0,3	-9,6±0,5
m-xileno	0,9807	0,9992	0,9955	5668±460	7137±91	7925±238	-9,6±0,1	-10,1±0,2	-9,3±0,6
p-xileno	0,9804	0,9989	0,9989	5550±453	7038±105	7919±101	-9,4±1,1	-9,9±0,2	-9,8±0,2
Estireno	0,9693	0,9993	0,9989	5126±526	7093±84	8017±110	-8,1±1,2	-10,0±0,2	-9,5±0,3
1,4-diclorobenceno	0,9897	0,9994	0,9841	5636±426	7133±87	7449±474	-9,1±1,0	-9,7±0,2	-7,7±1,3

■ TABLA II.13

Influencia de la temperatura sobre los volúmenes de ruptura V_B (mL/mg)

	R ²			Pendiente = (-ΔH/R)			Ordenada en el origen = ln V _{B0}		
	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut	Tenax	Bond-Elut	LiChrolut
	1-octeno	0,9672	0,9974	0,9924	4910±519	7259±141	8330±326	-13,6±1,2	-16,6±0,3
Etilbenceno	0,9615	0,9978	0,9921	4989±573	7083±148	7886±312	-13,3±1,4	-16,1±0,3	-17,6±0,7
o-xileno	0,9404	0,9912	0,9958	4758±750	7244±304	7832±228	-11,8±1,6	-16,2±0,2	-17,1±0,5
m-xileno	0,9624	0,9990	0,9784	4996±566	7194±99	8003±532	-12,9±1,3	-16,2±0,2	-17,7±1,3
p-xileno	0,9618	0,9987	0,9953	4905±565	7136±115	8167±250	-12,9±1,3	-16,2±0,3	-18,0±0,6
Estireno	0,9416	0,9982	0,9937	4500±647	7280±139	7705±275	-11,6±1,5	-16,5±0,3	-16,9±0,6
1,4-diclorobenceno	0,9883	0,9944	0,9734	5484±421	7817±294	7918±655	-13,3±1,0	-16,9±0,7	-16,5±1,5

Los coeficientes de correlación obtenidos demuestran la validez del modelo propuesto, correspondiendo los peores ajustes a la modelización del comportamiento de los VOCs sobre los lechos de Tenax. Tanto los mayores coeficientes de distribución (K) como los mayores volúmenes de ruptura (V_B) se obtuvieron para la adsorción de los diferentes VOCs sobre LiChrolut® EN, seguida de Bond Elut® ENV, y por último sobre Tenax® TA, en el intervalo de temperatura estudiado, lo que ilustra la clara influencia de la superficie específica sobre la retención. En lo que concierne a los compuestos individuales, los valores de K y V_B en cada sorbente se corresponden con sus puntos de ebullición, siendo el 1-octeno ($T_e=121$ °C) el compuesto menos retenido y el 1,4-diclorobenceno ($T_e=173,4$ °C) el analito más retenido.

El proceso de adsorción de los analitos sobre la matriz de los diferentes lechos es un proceso exotérmico ($\Delta H < 0$), como reflejan los valores positivos de las pendientes calculadas ($-\Delta H/R$), en consonancia con anteriores estudios (Green y Abraham, 2000; Saraullo *et al.*, 1997). Por lo tanto, cuanto mayor es la temperatura, menor es el poder de retención de los sorbentes. Nerín y Acosta ya habían observado el empeoramiento de la propiedades de retención del Tenax® TA por el incremento de la temperatura (Nerín y Acosta, 2002). Sin embargo, no se encontró en bibliografía científica ninguna mención acerca de la variación de dichas propiedades sobre los lechos de LiChrolut® EN o de Bond Elut® ENV.

El valor absoluto de la pendiente es, además, un indicador de la sensibilidad de las propiedades de retención que cada sorbente posee frente a la variación de temperatura. De este modo, las propiedades de retención del LiChrolut® EN y del Bond Elut® ENV, sorbentes cuyos valores de ($-\Delta H/R$) son los más elevados, se ven afectadas en mayor grado por las variaciones de temperatura que las propiedades de retención del Tenax® TA, con menor valor de ($-\Delta H/R$).

Los volúmenes de ruptura también se calcularon (datos no mostrados) según el modelo propuesto por Lökvist y Jönsson (Ec [9]) al 1% para lechos de pocos números de platos, coincidiendo con los obtenidos experimentalmente, tal y como ya ocurriera en estudios anteriores (Fernando *et al.*, 1993; Larrivee y Poole, 1994; Miller y Poole, 1994; Poole y Poole, 1995; Baltussen *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2001). El modelo Gaussiano, basado en cromatografía frontal (Ec. [8]) para el cálculo de los volúmenes de ruptura proporcionó resultados peores, particularmente con LiChrolut® EN, debido a sus pobres propiedades cromatográficas (ver párrafo posterior).

5.3.2. Comportamiento cromatográfico

El comportamiento cromatográfico de cada sorbente se evaluó mediante el cálculo de dos parámetros: la altura equivalente de plato teórico (H) y el factor de asimetría (F_a), así como su variación con la temperatura.

La **altura equivalente de plato teórico** (H) es un parámetro utilizado en teoría de la cromatografía para evaluar la eficiencia de las columnas cromatográficas. Cuanto menor es H, mayor es la eficiencia. En la tabla II.14 se muestran los valores de H calculados para todos los analitos en cada sorbente a las temperaturas del extremo del intervalo estudiado.

TABLA II.14

Altura equivalente de plato teórico ($T=130\text{ }^{\circ}\text{C}$)

H (mm)	Tenax® TA		Bond Elut® ENV		LiChrolut® EN	
	T=120 °C	T=180 °C	T=120 °C	T=180 °C	T=120 °C	T=180 °C
1-Octeno	2,51±0,22	1,89±0,20	0,28±0,03	0,34±0,03	0,61±0,04	0,79±0,03
Etilbenceno	1,97±0,17	2,12±0,11	0,38±0,01	0,39±0,01	0,83±0,09	0,80±0,04
<i>o</i> -Xileno	1,79±0,08	1,93±0,06	0,37±0,01	0,40±0,01	0,69±0,05	0,62±0,04
<i>m</i> -Xileno	1,54±0,02	1,65±0,11	0,33±0,01	0,38±0,01	0,64±0,02	0,74±0,02
<i>p</i> -Xileno	1,79±0,23	1,69±0,06	0,37±0,01	0,40±0,01	0,64±0,05	0,71±0,07
Estireno	1,47±0,13	2,02±0,04	0,34±0,01	0,43±0,07	0,74±0,03	0,82±0,13
1,4-Diclorobenceno	^a 1,39±0,23	1,96±0,17	^a 0,16±0,01	0,28±0,01	^a 0,61±0,07	0,55±0,04

Considerando la tabla II.14, las lechos más eficientes, desde el punto de vista cromatográfico, son los fabricados con Bond Elut® ENV, seguidos de los que contienen LiChrolut® EN. Sorprendentemente, los lechos de Tenax® TA, a pesar de ser los más empleados en este tipo de aplicaciones, son, con diferencia, los menos eficaces y presentan mayor dependencia de la altura equivalente de plato teórico (H) con la temperatura.

Los lechos de Bond Elut® ENV poseen una ventaja adicional: el valor de H es prácticamente independiente de la naturaleza del analito sorbido, lo que permite la predicción del comportamiento de una mayor variedad de analitos. Únicamente el valor de H para el 1,4-diclorobenceno, con mayor polaridad, es menor que para el resto de analitos.

El **factor de asimetría** (F_s) describe la forma del pico cromatográfico, además de proporcionar información sobre el tipo de adsorción entre el analito y el sorbente: cuanto mayor es este valor, más fuerte es la adsorción.

Cuando se estudia la adsorción sobre diferentes materiales, se debe considerar tanto el tamaño como la distribución de poros, ya que la distribución de los analitos sobre los macroporos (diámetro mayor de 50 nm) o microporos (diámetro menor de 2 nm) es diferente. La adsorción sobre los macroporos, descrita por las isothermas de Lagmuir o Freunlich, se debe a la formación de una capa (monocapa) sobre su superficie, seguida de una acumulación en sucesivas capas (multicapa). La adsorción sobre los microporos es más fuerte, ya que se forma una especie de menisco por la proximidad del analito a las superficies del poro (Snow y Slack, 2002).

Los valores de F_s a las temperaturas del extremo del intervalo estudiado se muestran en la siguiente tabla.

TABLA II.15

Factor de asimetría ($T=130\text{ }^{\circ}\text{C}$)

F_s	Tenax® TA		Bond Elut® ENV		LiChrolut® EN	
	T=120 °C	T=180 °C	T=120 °C	T=180 °C	T=120 °C	T=180 °C
1-Octeno	1,36±0,13	1,04±0,06	1,43±0,04	1,17±0,02	1,99±0,17	1,57±0,04
Etilbenceno	1,62±0,09	1,38±0,07	1,57±0,03	1,29±0,06	2,35±0,24	1,66±0,05
<i>o</i> -Xileno	1,52±0,07	1,34±0,04	1,74±0,12	1,34±0,08	1,84±0,07	1,53±0,03
<i>m</i> -Xileno	1,49±0,05	1,34±0,04	1,41±0,06	1,23±0,04	2,13±0,03	1,49±0,08
<i>p</i> -Xileno	1,54±0,17	1,30±0,04	1,69±0,07	1,33±0,02	2,53±0,14	1,49±0,04
Estireno	1,46±0,12	1,41±0,07	1,69±0,07	1,53±0,02	1,87±0,03	1,46±0,23
1,4-Diclorobenceno	^a 1,45±0,06	1,31±0,06	^a 1,23±0,07	1,17±0,07	^a 2,38±0,10	1,39±0,04

A partir de la tabla II.15, se deduce que la interacción analito-sorbente, cualquiera que sea su naturaleza, se debilita al aumentar la temperatura, como indica la disminución de F_a . Los picos de elución más asimétricos se obtuvieron sobre LiChrolut® EN, siendo comparables los valores de F_a para el Tenax® TA y Bond Elut® ENV (menores de 1,50).

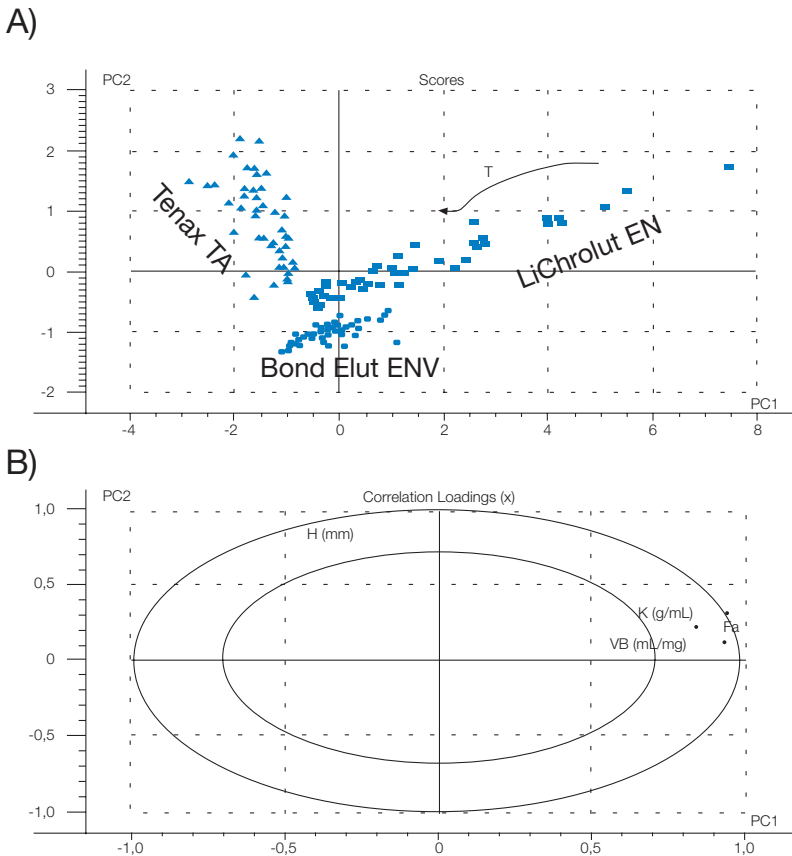
Las diferencias de comportamiento de las resinas de Bond Elut® ENV (estireno divinil benceno) y LiChrolut® EN (etilvinilbenceno-divinilbenceno), a pesar de su similar naturaleza, se atribuyen tanto a la mayor superficie específica como al menor volumen del poro de la última. La retención sobre los poros de LiChrolut® EN es más fuerte, lo que se traduce en una desorción más lenta y la aparición de colas “efecto tailing” en los picos cromatográficos.

5.3.3. Análisis por componentes principales (PCA)

Una vez evaluados por separado los datos generados en este estudio, es conveniente realizar un análisis por componentes principales (PCA), para reducir la dimensionalidad de los datos e identificar (confirmar) las variables más significativas.

■ FIGURA II.13

Análisis por componentes principales. A) Factores B) Variables



En el diseño PCA, los factores considerados fueron el tipo de sorbente, la temperatura y el analito adsorbido; y como variables el coeficiente de distribución (K), la altura equivalente de plato teórico (H), el factor de asimetría (F_a) y el volumen de ruptura (V_B). El modelo obtenido (ver figura II.13) permite explicar en dos componentes principales el 89% de la varianza.

La primera componente principal (65%), correlacionada positivamente con la constante de distribución, volumen de ruptura y factor de asimetría, diferencia el comportamiento del lecho de LiChrolut® EN de los otros sorbentes. La segunda componente principal (26%), correlacionada positivamente con la altura de plato teórico, define el comportamiento del lecho de Bond Elut® ENV (al que correspondieron los menores valores de H) de los otros dos sorbentes.

En los apartados anteriores se destaca la mayor sensibilidad de la resina de LiChrolut® EN con la temperatura. En la figura II.13 se observa en LiChrolut® EN una mayor disminución en los valores de K , F_a y V_B a medida que aumenta la temperatura, lo que origina que su comportamiento se asemeje al de los otros dos sorbentes.

5.3.4. Modelado y predicción

Hasta la fecha, las aplicaciones de las nuevas resinas poliméricas se han centrado en extracciones en fase líquida. Con este trabajo, se pretende validar el uso de estos nuevos materiales para muestreos en fase gas. Hasta el momento se ha estudiado y modelizado el comportamiento de las resinas en un rango de temperaturas comprendido entre 120-180 °C. Sin embargo, y teniendo presente las condiciones de muestreo y análisis de las aplicaciones anteriormente mencionadas, es imprescindible conocer sus propiedades de retención a dos temperaturas significativas, temperatura ambiente (25 °C) a la cual se efectúa el muestreo, y temperatura de elución (220 °C), a la cual los analitos son desorbidos e introducidos en el sistema de análisis correspondiente.

La extrapolación lineal en el modelo de dos parámetros para el cálculo de V_B ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios (Brown y Purnell, 1979; Frank y Frank, 1990; Ventura *et al.*, 1993). Los coeficientes de distribución extrapolados por el modelo de los dos parámetros, a 25 °C y 220 °C se muestran en la tabla II.16:

■ TABLA II.16

Extrapolación de los coeficientes de distribución a 25 °C y 220 °C

	Tenax TA		Bond Elut ENV		LiChrolut EN	
	25 °C	220 °C	25 °C	220 °C	25 °C	220 °C
1-Octeno	8080	2,42	1104105	73,1	27860871	514
Etilbenceno	9490	5,42	963437	79,2	14505402	485
<i>o</i> -Xileno	7560	5,78	1236421	87,7	22894505	639
<i>m</i> -Xileno	12748	6,89	1007551	77,5	21269693	575
<i>p</i> -Xileno	9805	6,20	903437	79,2	20845726	568
Estireno	8863	9,83	1086558	88,6	19308452	462
1,4-Diclorobenceno	16357	9,22	1547248	118	21529103	1094

Los coeficientes de distribución más elevados a temperatura ambiente, y por consiguiente, las retenciones más fuertes, corresponden a LiChrolut® EN, seguido de Bond Elut® ENV. La retención sobre Tenax® TA, en cambio, es mucho más débil, con unos coeficientes de distribución hasta de cuatro y tres órdenes de magnitud menor, respectivamente. Estas diferen-

cias tan abismales en retención se reducen a la temperatura de elución (220 °C), donde los coeficientes de distribución, tanto sobre LiChrolut® EN como sobre BondElut® ENV, son únicamente un orden de magnitud mayor, ya que estas nuevas resinas poliméricas son mucho más sensibles a las variaciones de temperatura, tal como se comprobó en las secciones anteriores.

Es, precisamente, en su mayor sensibilidad a las variaciones de temperatura, donde reside la gran ventaja de Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN frente a los sorbentes convencionales, véase Tenax® TA. Sus excelentes propiedades de retención a temperatura ambiente, junto con una elución comparable a los sorbentes clásicos a temperaturas típicas de elución (220 °C), permiten una mayor flexibilidad y versatilidad en el diseño de nuevas trampas para muestras gas-sólido.

Con base a estos datos, la figura II.14 se refleja la reducción en las dimensiones de las trampas de los sorbentes considerados que se necesitarían para lograr una retención similar a la conseguida por las trampas de Tenax® estandarizadas de Supelco® (24 cm de longitud, 1/8 pulgada de diámetro interno y 475 mg de sorbente).

En la modelización se ha calculado, en primer lugar, el volumen de ruptura de ruptura de los analitos en la trampa de Tenax® a 25 °C. A continuación, y teniendo en cuenta los coeficientes de distribución (tabla II.16) y la altura de plato teórico, se ha ido modificando la longitud de la columna de los lechos de Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN hasta conseguir, para cualquier analito, un volumen de ruptura similar al volumen de ruptura mínimo obtenido para el Tenax® TA.

■ FIGURA II.14

Escalado. Dimensiones de las trampas de Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN con el mismo volumen de ruptura que las trampas estándares de Tenax® TA de Supelco® a 25 °C

Tenax TA

L=240mm D=1/8pul m=475mg N=127platos

Bond Elut ENV

■ L=2,3mm D=1/8pul m=7,1mg N=6,6platos

■ L=4,57mm D=2,0mm m=5,5mg N=13,0platos

LiChrolut EN

I L=0,4mm D=1/8pul m=1,7mg N=0,6platos

I L=0,7mm D=2mm m=1,2mg N=1,1platos

Los volúmenes de ruptura y elución de los analitos se muestran en las tablas II.17 y II.18.

■ TABLA II.17

Volúmenes de ruptura (mL) para las trampas de la figura II.14

	Tenax® TA	Bond Elut® ENV		LiChrolut® EN	
		D = 1/8 pulg	D = 2mm	D = 1/8 pulg	D = 2mm
1-Octeno	3673	4202	3835	6648	6680
Etilbenceno	3860	3667	3439	3461	3478
<i>o</i> -Xileno	3437	4706	4136	5463	5489
<i>m</i> -Xileno	5795	3835	3813	5075	5100
<i>p</i> -Xileno	4457	3439	3419	4974	4998
Estireno	4029	4136	4112	4607	4629
1,4-Diclorobenceno	7435	5889	5856	5137	5162

■ TABLA II.18

Volúmenes de elución (mL) para las trampas de la figura II.18

	Tenax® TA	Bond Elut® ENV		LiChrolut® EN	
		D = 1/8 pulg	D = 2mm	D = 1/8 pulg	D = 2mm
1-Octeno	3,35	1,01	0,54	3,89	2,16
Etilbenceno	5,06	1,09	0,68	3,67	2,03
<i>o</i> -Xileno	5,26	1,20	0,74	4,84	2,68
<i>m</i> -Xileno	5,90	1,07	0,82	4,35	2,41
<i>p</i> -Xileno	5,50	1,09	0,72	4,30	2,38
Estireno	7,57	1,22	0,74	3,50	1,94
1,4-Diclorobenceno	7,22	1,61	0,82	8,27	4,58

Como se muestra en la figura II.14 y en las Tablas II.17 y II.18, sólo serían necesarios unos pocos miligramos de las resinas poliméricas para lograr el mismo grado de retención de los analitos que sobre las trampas de Tenax®, lo que supondría una reducción considerable de sus dimensiones. De igual manera, se reducirían los volúmenes de gas portador necesarios para desorber los analitos. Solamente el analito más pesado, 1,4-diclorobenceno, necesitaría para la trampa equivalente de LiChrolut® EN de 1/8 de pulgada de diámetro, un volumen superior al requerido por la trampa convencional de Tenax® TA.

Se abre, por lo tanto, una nueva línea de trabajo con la utilización de trampas más versátiles y manejables, que pueden ser empleadas “in situ” en el lugar de muestreo y transportadas fácilmente a los laboratorios para un posterior acoplamiento en los equipos de análisis, con unos requerimientos mínimos de presión y operación al reducirse tanto los consumos de gases como los tiempos de análisis.

Por último, cabe señalar que, aunque ambas resinas poliméricas, Bond Elut® ENV y LiChrolut® EN, poseen unas muy buenas propiedades de retención, se recomienda, no obstante, el empleo de Bond Elut® ENV para sistemas de desorción térmica debido a sus excelente comportamiento cromatográfico.

Desarrollo de un envase activo antimicrobiano

1. Introducción

Tradicionalmente, la principal misión del envase alimentario consistía en proteger y contener al alimento. Sin embargo, los cambios introducidos en las prácticas de distribución y comercialización de los productos envasados, como la centralización de la producción, la venta por Internet y la internacionalización de los mercados, han incrementado las exigencias de la industria del envasado de alimentos, que debe responder ante un consumidor que demanda una mayor cantidad de productos frescos o mínimamente procesados (Vermeiren *et al.*, 1999). La nueva concepción del envase alimentario como un instrumento para prolongar la vida útil de los productos ha supuesto una revolución en la industria del envasado. El envase y el alimento ya no se consideran como entidades independientes, sino dos elementos complementarios que pueden interactuar para mejorar la calidad y la aceptabilidad del producto envasado.

El término “envasado activo” fue introducido por primera vez por Labuza (Labuza y Breene, 1989), refiriéndose indistintamente a envases activos e inteligentes. Posteriormente se diferenciaron ambos términos, estableciéndose dos categorías dentro de las técnicas de envasado: el envasado activo y el envasado inteligente (Ahvenainen y Hurne, 1997).

Los sistemas activos modifican alguna condición de conservación de los alimentos envasados para aumentar su vida útil y mejorar la seguridad o las propiedades sensoriales manteniendo su calidad (Hotchkiss, 1997). Existen dos grandes categorías de envases activos: los que absorben compuestos responsables de la disminución de calidad de los productos alimentarios (oxígeno, agua, etileno, ...) y los que liberan sustancias que incrementan la vida útil del producto (antimicrobianos, antioxidantes, aromatizantes, ...).

Los sistemas inteligentes monitorizan algún parámetro que interviene en la conservación y distribución de los productos para proporcionar información a los consumidores sobre la calidad del alimento envasado (de Kruijf, 2002). Comercialmente, los envases inteligentes más difundidos son los indicadores tiempo-temperatura, que se aplican en la superficie exterior del envase e informan sobre la “historia térmica” del mismo. También están disponibles en el mercado indicadores comerciales de oxígeno y dióxido de carbono.

Estos conceptos de envasado activo e inteligente no son nuevos, pero el interés suscitado por ellos, así como el desarrollo de estudios e investigaciones sobre los mismos, se ha incrementado notablemente durante los últimos años. Japón es el país pionero en el desarrollo comercial de este tipo de sistemas, principalmente en el campo de los absorbedores de oxígeno y de varios emisores (Rooney, 1995), y posee un gran número de patentes. En Australia y EE.UU también es posible encontrar en los supermercados ejemplos de aplicaciones con resultados satisfactorios. Sin embargo, en Europa el uso de los envases activos no está muy extendido debido a la falta de legislación específica sobre el tema.

La actual legislación europea sobre materiales en contacto con alimentos establece una lista con todas las sustancias permitidas para entrar en contacto con el alimento (2002/72/CE y 2004/19/CE). Estas listas, de momento, sólo incluyen los compuestos que se usan en la fabricación de los envases, y no contemplan la posibilidad de introducir algunos compuestos que podrían aumentar la vida útil de los alimentos envasados, como sucede en el envase activo. De hecho, el límite de migración global fijado en 60 mg/kg es incompatible con algunos de los sistemas activos basados en la migración de los componentes activos desde el envase al alimento.

1.1. ENVASE ACTIVO

Los envases activos ejercen su función mediante varios mecanismos (Han, 2002):

- atrapando las sustancias indeseables (oxígeno, humedad, etileno, dióxido de carbono) del interior del envase (scavengers),
- liberando sustancias activas,
- empleando nuevos materiales, diseñados específicamente para cada aplicación.

En la tabla III.1 se muestran algunas aplicaciones de los envases activos (Fernández, 2000).

■ TABLA III.1

Ejemplos de aplicaciones de envase activo

Técnica	Dispositivo	Principio/reactivo	Aplicación
Absorbedores de humedad	Láminas	Sales de poliacrilato Amidas modificadas	Productos secos
Reguladores de humedad	Sobres Etiquetas Películas	Gel de sílice Propilenglicol Ceras Chocolate	Carne y pescado fresco Verduras frescas Frutos secos Galletas y aperitivos
Tratamientos antivaho	Películas	Etoxilatos no iónicos Monoglicéridos	Verduras frescas
Absorbedores de O ₂	Sobres Etiquetas Bandejas Películas Tapones	Hierro en polvo Ácido ascórbico Enzimas Luz	Todos
Absorbedores de CO ₂ Emisores de CO ₂	Sobres Sobres	Hidróxido cálcico Bicarbonato sódico	Café tostado Verduras Frutos secos
Absorbedores de etileno	Sobres Películas	KMnO ₄ Adsorbentes	Verduras frescas
Envasado antimicrobiano	Sobres Películas	Etanol Ácidos orgánicos Plata y cobre Enzimas Bacteriocinas Aceites esenciales	Productos de panadería Fruta
Aromas	Películas	Ácidos orgánicos Resinas Enzimas	Pescado Productos grasos Zumos
Envases antioxidantes	Películas	BHT Vitamina E Aceites esenciales	Frutas Cereales

1.1.1. Absorbedores de oxígeno

La presencia de oxígeno en el interior del envase favorece la oxidación de los componentes del alimento y la proliferación de microorganismos sobre la superficie del mismo. Además favorece la aparición de olores extraños –resultado de la oxidación lipídica de las grasas– cambios de color y pérdida de nutrientes, como la vitamina E, pro-vitamina A y vitamina C, muy fácilmente oxidables (de Kruijf *et al.*, 2002). Aunque los alimentos se envasen en atmósfera modificada (MAP) o al vacío, no siempre se consigue una eliminación completa del O₂. Los absorbedores de oxígeno, como su nombre indica, absorben el O₂ residual después del envasado.

En general, las tecnologías de atrapamiento del O₂ residual se basan en la utilización de uno o más de los siguientes mecanismos: oxidación de polvo de hierro, oxidación de ácido ascórbico, fotooxidación de tintes, oxidación enzimática (glucosa oxidasa y alcohol oxidada), sales de hierro, ácidos grasos insaturados o inmovilización de levaduras sobre un soporte sólido (Floros *et al.*, 1997).

Los absorbedores de oxígeno más difundidos se comercializan en pequeños sobres, que se introducen directamente en los envases o se adhieren, a modo de etiqueta sobre la superficie interna del mismo. Recientemente, se han desarrollado tecnologías que incorporan el absorbedor de O₂ directamente en el material de envase, por dispersión, disolución o inmovilización (enzimas).

En la tabla III.2 se muestran ejemplos existentes en el mercado, junto a la naturaleza del componente activo.

■ TABLA III.2

Absorbedores de oxígeno disponibles en el mercado

Nombre comercial	Fabricante	Tipo	País
Ageless®	Mitsubishi Gas Chemical Co.	Hierro	Japón
Atco®	Standa Industrie	Hierro	Francia
Freshlizer®	Toppan Printing Co.	Hierro	Japón
Sanso-cut®	Finetec Co.	Hierro	Japón
Freshpax®	Multisorb Technologies Inc.	Hierro	EE.UU
Seaquil®	Nippon Soda Co.	Hierro	Japón
Kepuron®	Kepuron Co.	Hierro	Japón
Sansoless®	Hayaku Co.	Hierro	Japón
ORC®	Dia Chemifa	Hierro	Japón
Tamotsu®	Toyo Pulp Co.	Hierro	Japón
Vitalon®	Toagosei Chemical Industry Co	Hierro y ácido ascórbico	Japón
Bioka®	Bioka	Glucosa oxidasa	Finlandia
Oxyguard®	Seikan Kaisha	Hierro	Japón
Oxbar™	Carnaud-Metal Box	Oxidación catalizada por cobalto del polímero de nylon	U.K
Amosorb®	Amoco Chemicals	Polímero	EE.UU
Oxysorb®	Pillsbury Co.	Ácido ascórbico	Canadá
Cryovac®	Cryovac Seled Air Co.	Luz	EE.UU
Zero ₂ ™	CSIRO	Luz	Australia

La efectividad de estos sistemas se ha demostrado para el envasado de los productos de bollería, pescado y carne (Nakamura y Hoshino, 1983; Smith *et al.*, 1986; Gill y McGinnis, 1985; Schozen *et al.*, 1997; Berenzon y Saguy, 1998).

1.1.2. Absorbedores de etileno

Los absorbedores de etileno se utilizan para prolongar la vida útil de los productos hortofrutícolas. El etileno (C₂H₄) es considerado como una "hormona" vegetal que producen las plantas y los frutos para iniciar y promover los procesos de maduración.

El control de la concentración de etileno en la atmósfera que rodea los frutos y vegetales es una práctica común en la conservación de los productos hortofrutícolas (atmósferas modificadas en cámaras frigoríficas). Sin embargo, estas prácticas no se transfieren tan fácilmente

a un paquete unitario dirigido al consumidor. La utilización de materiales plásticos modificados con agentes absorbentes y activos frente al etileno o la introducción de sobres conteniendo estas sustancias activas, que al retirar el etileno, bloquean todos los fenómenos relacionados con la maduración: respiración, transpiración, hidrólisis de pectinas y de carbohidratos.

La absorción de etileno se debe a:

- a) Reacción de etileno con permanganato potásico (KMnO_4) inmovilizado sobre diferentes soportes (perlita, alúmina, zeolita, carbón activo, sílica gel). El KMnO_4 (4-6%) actúa oxidando el etileno a etilenglicol y éste, a su vez, a CO_2 y agua.
- b) Por absorción física sobre materiales cerámicos activados introducidos en la matriz polimérica (Zagory, 1995).

En la tabla III.3 se muestran algunas patentes existentes (Pastorelli, 2002).

■ TABLA III.3

Patentes de algunos absorbedores de etileno

Nombre comercial	Fabricante	Contenido/Efecto
FH film (uso industrial) Aisaika (uso doméstico)	Thermo Co.	Película de polietileno (PE) con inclusiones de piedra natural. Absorción y permeación.
BO film	Chlorine Chemical Co.	Película de PE con inclusiones cerámicas.
Takii TS film	Takii & Co.	Película de PE con inclusiones cerámicas. Absorción de etileno y humedad
ABC film	Asahi Glass Co.	Película de PE con inclusiones cerámicas.
Primavera	Inpack Co.	Película de polipropileno (PP) con inclusiones de Oya-stone.
Neupalon™	Sekisui Jushi Co.	Adsorbente de carbón activo.
Neeb	Nippon Kayaku Co.	Absorción e hidrólisis de etileno catalizada por óxidos metálicos.
Fresh case	Tohoku Industry Co.	Cartón ondulado con cubierta tratada con polvo de cristobalita.
Zeomic	Mitsubishi Co.	Zeolita sustituida con iones de Ag. Absorción de etileno. Efecto antibacteriano.
Evert-Fresh	Evert-Fresh Co.	Film impregnado con minerales.
Peakfresh™	Peakfresh Products	Film impregnado con minerales.
Adeka live	Asahi Denka Kogyo KK	Adsorbente de etileno y CO_2 .

1.1.3. Sistemas que permiten controlar la humedad en el interior del envase

Los absorbedores de humedad retienen el agua que se acumula en el interior de los envases como consecuencia de la exudación del producto envasado.

Una acción correctiva que se puede adoptar, a nivel estético, es la incorporación en el plástico de aditivos anticondensación o antivaho (etoxilatos no iónicos o monoglicéridos). Su función consiste en reducir la tensión superficial del agua condensada en el interior del plástico, favoreciendo la unión de las gotas para que formen una película continua que mantiene la transparencia del envase. No obstante, esta función añadida al material de envase no resuelve el problema de la elevada disponibilidad de agua que se crea en el interior.

Los absorbedores de humedad deben retirar el exceso de agua, de forma que no sea visible ni esté disponible. Los dispositivos adoptados consisten en dos estratos de polímero plás-

tico microporoso entre los que se coloca un polímero superadsorbente en forma granular (sales de poliácido, amidas modificadas o copolímero de almidón). Thermarite® (Pty Ltd, Australia) es el nombre comercial de una patente disponible en el mercado. Thermarite® absorbe agua en cantidades iguales a 100 (o incluso 500) veces su peso. Se utiliza en el transporte aéreo de pescado conservado en hielo para retener el agua que se acumula por la fusión del mismo (Fernández, 2000). Otros absorbentes de humedad con esta tecnología disponibles en el mercado son Toppan™ (Japón) y Peaksor® (Peakfresh Products, Australia).

Los reguladores de humedad controlan, más bien reducen, la actividad de agua en la superficie del producto envasado. La reducción de la disponibilidad de agua en fase vapor crea unas condiciones desfavorables para el crecimiento microbiano, prolongando la vida útil del alimento. Los sobres desecadores MiniPax® y las etiquetas Desimax® (Multisorb Technologies, EE.UU), con gel de sílice, se utilizan comercialmente en el envasado de frutos secos y aperitivos. Las técnicas más modernas incorporan un humectante, normalmente propilenglicol, entre dos películas plásticas muy permeables al vapor de agua. Una patente comercial con esta estructura de sándwich es Pichit™ (Showa Denko, Japón), donde se dispone carbohidrato de propilenglicol entre dos láminas de alcohol polivinílico (PVA). Pichit™ se comercializa en Japón, en forma de rollos de plástico, para uso doméstico (de Kruijff, 2002).

1.1.4. Absorbedores/ emisores de CO₂

El dióxido de carbono se forma como consecuencia de las reacciones de respiración y deterioro del alimento. Aunque niveles altos de CO₂ (60-80%) reducen la presencia de microorganismos aerobios, no obstante, alteran el sabor y la apariencia de los productos y favorecen la proliferación de los microorganismos anaerobios.

En el interior de los paquetes de café se introducen sobres absorbedores de O₂ y CO₂, como por ejemplo Ageless® y FreshLock®, para retrasar la variación del aroma por las reacciones oxidativas y evitar la eclosión del envase por acumulación de CO₂ (Smith *et al.*, 1995). El compuesto activo Ca(OH)₂ de los sobres de FreshLock® reacciona con el dióxido de carbono en ambientes húmedos para producir CaCO₃ (Parry, 1993). Multiform Desiccants ha patentado (US # 5322701) un absorbedor de CO₂, en formato sobre, que contiene CaO conjuntamente con un agente desecante, como sílica gel, que absorbe el agua (Cullen y Vaylen, 1994).

En algunos alimentos, como los productos cárnicos, se necesitan sistemas que conjuguen la emisión de CO₂ con la absorción de O₂. Estos sistemas, mostrados en la tabla III.4 (Vermeiren *et al.*, 1999), se basan en carbonato ferroso o mezclas de ácido ascórbico y bicarbonato sódico (Rooney, 1995).

■ TABLA III.4

Generadores/absorbedores de CO₂ con absorbedores de O₂ comerciales

Nombre comercial	Fabricante	Contenido/Efecto
Freshlock o Ageless	Mitsubishi Gas Chem. (Japón)	Absorbedor de CO ₂ (Ca(OH) ₂)/ Absorbedor de O ₂ (hierro)
Ageless C	Mitsubishi Gas Chem. (Japón)	Generador de CO ₂ (ácido ascórbico)/ Absorbedor de O ₂
Freshilizar CV	Toppan Printing Co. (Japón)	Generador de CO ₂ y O ₂ (metal no ferroso)
Freshilizar C y CW	Toppan Printing Co. (Japón)	Generador de CO ₂ y absorbedor de y O ₂
Freshpax M	Multisorb Technologies (EE.UU)	Generador de CO ₂ y absorbedor de y O ₂
Verifrais	S.A.R.L. Codimer (Francia)	Generador de CO ₂
Vitalon C	Toagosei Chem Ind. Co. (Japón)	Generador de CO ₂ y absorbedor de y O ₂

1.1.5. Eliminación/liberación de aromas

Aunque la retención de aromas supone un cambio en las características organolépticas del alimento, el envasado activo puede usarse positivamente para la eliminación de algunos aromas no deseados mediante una absorción selectiva de los mismos.

Por ejemplo, la incorporación de triacetato de celulosa en el envase destinado a los zumos de naranja elimina los compuestos responsables del sabor amargo de los zumos: naringina y limonina (Soares y Hotchkiss, 1998a y 1998b). La enzima naringinasa, inmovilizada en un film de acetato de celulosa, hidroliza la naringina en dos compuestos no amargos: naringenina y prunina.

Entre los compuestos responsables de los olores desagradables se encuentran las aminas y los tioles, que se forman en el pescado por degradación de las proteínas y los aldehídos, y los derivados de la oxidación de los lípidos, que determinan la aparición de aromas rancios. Dupont Polymers (EE.UU) ha desarrollado un sistema, Bynel® IXP, incorporado en polietileno de alta densidad (HDPE), que permite la eliminación de los aldehídos hexanal y heptanal del espacio de cabeza de los envases (Rooney, 1995). Anico Co. (Japón) fabrica unas bolsas, Anico-Bags®, que contienen sales ferrosas y ácidos orgánicos, como el ácido ascórbico o el ácido cítrico, que oxidan las aminas (Rooney, 1995).

Existen en el mercado otros dispositivos en forma de sobres. MINIPAX® y STRIPPAX®, suministrados por Multisorb Technologies (EE.UU), eliminan los mercaptanos y el sulfuro de hidrógeno formados durante la distribución de los alimentos. Profresh®, contiene un componente activo, ADI50, cuya composición es confidencial, que se incorpora en PE y/o PS para absorber el etileno, etanol, acetato de etilo y/o sulfuro de hidrógeno del espacio de cabeza. Entre las aplicaciones futuras se incluyen los envases activos que liberan aromas al alimento, mejorando sus características organolépticas.

Sin embargo, la utilización de estos sistemas (absorbedores o emisores), al enmascarar los aromas representativos del deterioro de los alimentos, puede infundir a errores en los consumidores.

1.1.6. Envases activos antioxidantes

El uso de antioxidantes como aditivos alimentarios para mejorar la estabilidad frente a la oxidación de los alimentos con alto contenido en grasas, es una técnica muy extendida en la industria alimentaria. De igual modo, los antioxidantes se incorporan al plástico para favorecer la estabilidad durante la polimerización, y evitar así la degradación del envase por oxidación. La inclusión de estos aditivos en los envases responde, en buena medida, al interés de los consumidores por reducir su contenido en los alimentos.

Entre los antioxidantes más utilizados se encuentran el butil hidroxitolueno (BHT) y la vitamina E. Sin embargo, el uso de BHT en contacto con alimentos está muy cuestionado, debido a su tendencia a acumularse en el tejido adiposo. La vitamina E es muy soluble en poliolefinas, además de ser bastante estable en las condiciones de fabricación del film. Sin embargo, debido a su mayor tamaño molecular lo que dificulta su difusión a través del film, se libera en menor proporción que el BHT (Wessling *et al.*, 1998).

Las últimas tendencias incorporan productos naturales, como aceites esenciales y sus componentes (Yin *et al.*, 2002; Foti y Ingold, 2003; Nerín *et al.*, 2006; Pezo *et al.*, 2006).

1.1.7. Liberadores de etanol

El uso de etanol como agente desinfectante de superficies está muy extendido. Su efecto depende de su concentración. A elevadas concentraciones (60-70% (v/v)) desnaturaliza las pro-

teínas de los protoplastos de las células vegetativas de los microorganismos. Sin embargo, a bajas concentraciones (4-12%) permite controlar el crecimiento superficial de mohos y bacterias (de Kruijf, 2002).

En Japón se han desarrollado sobres generadores de etanol: Ethicap® y Negamold® (Freund Industrial Co. Ltd.) y Ageless® tipo SE.

Ethicap® consiste en una mezcla de etanol de uso alimentario y agua (55% y 10% en peso), adsorbida sobre sílice (35% peso) y contenida en sobres de papel/etilvinilacetato. El olor del etanol se enmascara con trazas de vainillina u otras moléculas olorosas. La eficacia de Ethicap® depende de la naturaleza del producto envasado (mejor con actividad de agua (a_w) superior a 0,85), de la correcta elección del tipo de sobre, de su capacidad de liberación y de la adecuada permeabilidad al etanol ofrecida por el material de envase del alimento (Daifas *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2002).

Negamold® es otro tipo de generador de etanol que también funciona como absorbedor de O_2 . Aunque se emplea con éxito en productos de bollería y panadería, su uso para el resto de alimentos está limitado por su menor capacidad para generar etanol.

1.1.8. Envases antimicrobianos

Además de mediante la eliminación del oxígeno o la liberación de etanol, el envase activo permite la incorporación en su composición otras sustancias, que evitan la proliferación del crecimiento microbiológico. Estos envases activos, denominados envases antimicrobianos, se desarrollan con mayor detalle en el siguiente apartado.

1.2. ENVASE ACTIVO ANTIMICROBIANO

Uno de las áreas de investigación más importantes en el campo de los envases activos es el desarrollo de envases antimicrobianos. La idea en este tipo de sistemas consiste en incorporar agentes antimicrobianos en el material de envase para prevenir la proliferación de microorganismos en el alimento, aumentando así el tiempo de vida útil del producto (Vermerien *et al.*, 2002).

Existen diversas técnicas para incorporar el agente antimicrobiano al envase (Appendini y Hotchkiss, 2002):

- Adición de pequeños sobres porosos con agentes antimicrobianos volátiles.
- Incorporación directa de los agentes antimicrobianos volátiles y no volátiles.
- Recubrimiento del polímero con las sustancias activas.
- Inmovilización de las sustancias activas en el polímero mediante uniones iónicas o covalentes.
- Empleo de polímeros con propiedades antimicrobianas inherentes.

1.2.1. Adición de sobres con agentes antimicrobianos

La adición de sobres en el interior del envase es la técnica que más éxito comercial ha obtenido. Los sobres comerciales combinan la acción antimicrobiana con algún otro efecto activo: absorción de oxígeno, absorción de humedad o generación de etanol. En las bandejas de carne y pollo se utilizan sobres con ácidos orgánicos y surfactantes que previenen el crecimiento microbiano en el exudado (Hansen *et al.*, 1989).

1.2.2. Incorporación de los agentes antimicrobianos directamente

La incorporación de los agentes bioactivos directamente en el polímero se ha aplicado comercialmente en el sector biomédico, en la limpieza doméstica, en los implantes quirúrgicos y en el reparto de diversas sustancias químicas. Sin embargo, existen en el mercado pocas aplicaciones de este envase activo (tabla III.5).

■ TABLA III.5

Envases antimicrobiano disponibles en el mercado

Compuesto antimicrobiano	Nombre comercial	Fabricante	Tipo de envase	Referencias
Zeolitas con iones plata	Aglon™	Aglon Technologies LLC	Contenedores, cartón, envoltorio de papel y cartón	www.healthshield.com
Cerámicas de fosfato de circonio con iones plata	Novaron®	Toagose, Co. LTD	Diverso	
Triclosan	Microban®	Microban Products	Envoltorios, recipientes para recalentar	Sherman (1998), Rice (1995)
Alilisotiocianato	WasaOuro	Lintec Corp Dry Company	Etiquetas, láminas Sobres	www.lintec.co.jp Annon (1995)
Dióxido de cloro	Microsphere™	Bernard Technologies	Bolsas, etiquetas, recubrimiento, contenedores	Gray (2000)

Appendini y Hotchkiss, 2002.

En Japón, los envases activos que contienen plata son los más extendidos (*Ishitani, 1995*). Actúan desplazando otros iones metálicos, como Ca^{2+} o Zn^{2+} , esenciales para las reacciones metabólicas de los microorganismos.

Microban® es un nuevo envase antimicrobiano en el que se incorpora triclosan ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$) en casi cualquier tipo de matriz polimérica. El triclosan actúa bloqueando la síntesis de ácidos grasos de las bacterias (Heath *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 1999). El Comité Científico en Alimentación ha establecido que la máxima cantidad de triclosan que puede haber en los alimentos es de 5 mg kg^{-1} , pero ha remarcado que la migración desde el envase puede sobrepasar este límite (Scientific Committee, 2000).

En los últimos años se han propuesto una gran cantidad de agentes antimicrobianos, de diferente naturaleza, para ser incorporados directamente en el material de envase. Su actividad antimicrobiana ha sido evaluada frente a una amplia variedad de microorganismos, entre los que se incluye *L.monocytogenes*, *E.coli* y diversos mohos (tabla III.6).

■ TABLA III.6

Agentes antimicrobianos incorporados directamente en el material de envase

Agente antimicrobiano	Material de envase	Microorganismo	Referencias
Ácidos orgánicos Propiónico, benzoico, sórbico, acético, láctico, málico	EVA, LLDPE, films comestibles	Mohos	Weng y Hotchkiss (1993); Doores (1993); Lück y Jager (1997); Weng <i>et al.</i> (1997, 1999); Guilbert (1998); Ouattara <i>et al.</i> (1997,2000a,b) Devlieghere <i>et al.</i> (2004).
Ácidos inorgánicos Fosfórico			Hotchkiss (1997)
Sales de ácidos orgánicos Sorbato potásico, benzoato de sodio			Han y Floros (1997, 1998a,b) Devlieghere <i>et al.</i> , (2000a)

TABLA III.6 (continuación)

Agente antimicrobiano	Material de envase	Microorganismo	Referencias
Ácidos grasos Láurico, palmítico	Chitosan		Quattara <i>et al.</i> (1997, 2000b) Padget <i>et al.</i> (2000)
Antibióticos Natamacina			Luck y Jager (1997)
Gases inorgánicos: Dióxido de azufre, Dióxido de cloro	Polioléfinas	Mohos, bacterias y levaduras	CSIRO (1994); Thomas <i>et al.</i> (1995); Wellinghof (1995); Christie <i>et al.</i> (1997); Opperman <i>et al.</i> (1999)
Metales Plata y cobre	Polioléfinas	Bacterias	Ishitani (1995); An <i>et al.</i> (1998); Chung <i>et al.</i> , (1998).
Fungicidas Benomil, imazalil	LDPE	Mohos	Weng y Hotchkiss (1993)
Bacteriocinas Nisina, pediocinas, lactocinas, bavaricina, brevicina, carnocina, mesenterocina, sakacina, subtilina	Celulosa, LDPE, films comestibles	Bacterias Gram +	Barnby-Smtih (1992); Neetles y Barefoot (1993); Padget <i>et al.</i> (1998); Siragusa <i>et al.</i> (1999); An <i>et al.</i> (2000); Natrajan y Sheldon (2000a,b) Scanell <i>et al.</i> (2000).
Enzimas Lisozima, glucosa oxidasa, lactoperoxidasa, lactoferrina, chitinasa, gluconasa, glucosa oxidasa, mielperoxidasa	PS, Acetato de celulosa, films comestibles	Bacterias Gram +	Conner (1993); Fulgsang <i>et al.</i> (1995); Appendini y Hotchkiss (1997); Padget <i>et al.</i> (1998)
Agentes quelantes EDTA, citrato, cobalmina, polifosfatos	Fims comestibles	Bacterias Gram -	Shelef y Setter (1993); Padget <i>et al.</i> (1998)
Parabenos Metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno	LDPE, cerámicas recubiertas de celulosa	Mohos	Katz (1998); Dobias et al (1998)
Péptidos antimicrobianos Atacina, cecropina, defensina, magainina			Dillon (1994); Abler (1995)
Polisacáridos Chitosan, goma Konjac			Sudarshan <i>et al.</i> (1992); Begin y van Calsteren (1999); Hong <i>et al.</i> (2000) Xiao <i>et al.</i> (2000)
Aminas Hexametilentetraamina	LDPE	Levaduras, bacterias aerobias y anaerobias	Devlieghere <i>et al.</i> (2000b)
Fenoles naturales Catequina, <i>p</i> -cresol, hidroquinonas			Hotchkiss (1997)
Aceites esenciales y sus componentes volátiles Alilisotiocianato, linalol, carvacrol, timol, cineol, eugenol, timol, citral, geraniol, <i>p</i> -cimeno, terpineno	Nylon/PE, celulosa, LDPE	Bacterias, mohos y levaduras	Lück y Jager (1997); Floros <i>et al.</i> (1997); Quattara <i>et al.</i> (1997; 2000b) Lis-Balchin <i>et al.</i> (1998); Scora y Scora (1998); Nielsen y Rios (2000); Brody (2001); Suppakul <i>et al.</i> (2003b); Suhr y Nielsen (2005); Valverde <i>et al.</i> (2005); Matan <i>et al.</i> (2006)

Appendini y Hotchkiss, 2002; Suppakul *et al.*, 2003a

1.2.3. Recubrimiento del polímero con las sustancias activas

A menudo, la incorporación de los agentes antimicrobianos a los materiales poliméricos supone una pérdida en su actividad inhibitoria, que se justifica por la falta de compatibilidad entre los agentes activos con el material del film, y/o por la degradación térmica durante el procesado del polímero (Devlieghere *et al.*, 2000a).

Los agentes antimicrobianos que no resisten las altas temperaturas se aplican en forma de recubrimientos sobre el material polimérico. Como ejemplos de este tipo de envases se incluye la adsorción de nisina sobre PE, EVA, PP, poliamida, PET o PVDC (Daeschel *et al.*, 1995, Wilhoit, 1996), pediocina con leche en polvo adsorbida sobre celulosa (Ming *et al.*, 1997) y la adsorción de una solución de nisina/EDTA/ácido cítrico sobre láminas de PVC, nylon y LDPE (Natrajan y Sheldom, 2000a y 2000b).

La adsorción de los agentes antimicrobianos se puede incrementar manipulando los disolventes y/o la estructura de los polímeros (Appendini y Hotchkiss, 2002). Las propiedades de absorción y difusión de los ácidos sórbicos y benzoicos en films de poli(etileno-ácido metacrílico) aumentan cuando los films son tratados con hidróxido sódico e hinchados con acetona (Weng *et al.*, 1999).

1.2.4. Inmovilización de las sustancias activas mediante uniones iónicas o covalente

En la figura III.7 se muestran ejemplos de agentes antimicrobianos inmovilizados sobre las matrices poliméricas.

■ TABLA III.7

Agentes antimicrobianos inmovilizados covalentemente/iónicamente a los polímeros

Soporte funcional	Agente antimicrobiano	Referencia
Films ionoméricos	Benomil	Halek y Garg (1989)
	Cloruro de benzilo	Weng <i>et al.</i> (1997)
	Bacteriocinas	Dobias <i>et al.</i> (1998)
Poliestireno	Lisozima	Mermelstein (1998)
	Péptidos sintéticos	Haynie <i>et al.</i> (1995)
		Appendini y Hotckiss (2001)
Polivinil alcohol	Lisozima	Appendini y Hotckiss (1997)
Resinas nylon 6,6	Lisozima	Appendini y Hotckiss (1997)

Appendini y Hotchkiss, 2002.

Las técnicas de inmovilización requieren la presencia de grupos funcionales tanto en el agente antimicrobiano como en el polímero. Ejemplos de sustancias antimicrobianas con grupos funcionales son péptidos, enzimas, poliaminas, y ácidos orgánicos. Entre los polímeros con grupos funcionales empleados en envase alimentario se encuentran EVA, EMA, EAA, EMMA, Nylon, Ionómero, PVdC, PS, PVC, PE/EVOH. En la inmovilización se necesitan moléculas, denominadas espaciadores, que unen la superficie del polímero con el agente activo, de forma que confieren a la parte activa del compuesto antimicrobiano la movilidad suficiente como para contactar con el microorganismo presente en la superficie del alimento.

1.2.5. Polímeros con propiedades antimicrobianas inherentes

Existen algunos polímeros que poseen propiedades antimicrobianas por sí mismos. Los polímeros catiónicos, como el quitosano y la poli-L-lisina favorecen la unión del polímero con las células del microorganismo. Las aminas con carga positiva interactúan con las cargas negativas de las membranas celulares ocasionando la pérdida de los constituyentes intracelulares (Goldberg *et al.*, 1990). El quitosano protege las frutas y vegetales frescos del deterioro por la aparición de mohos, y puede combinarse con otros agentes antimicrobianos, como aceites esenciales y ácidos orgánicos (Ouattara *et al.*, 2000a).

1.2.6. Actuación del agente activo

Respecto del modo de actuación del agente activo, podemos distinguir dos situaciones. En primer lugar, aquél en el que el envase está en contacto directo con el alimento (*package/food system*), donde la difusión del agente antimicrobiano se produce desde el envase al alimento a través de la interfase que los separa. En segundo lugar, se encuentran los sistemas donde existe un espacio de cabeza entre el envase y el alimento (*package/headspace/food system*). En estos sistemas el agente antimicrobiano se libera a la atmósfera interna, y desde allí, difunde hacia el alimento. Se establece así un equilibrio de desorción entre el envase y el espacio de cabeza, y un equilibrio de absorción/adsorción entre el espacio de cabeza y el alimento.

Por lo tanto, el diseño del envase antimicrobiano debe tener muy presente la aplicación a la que va destinado. Los compuestos no volátiles únicamente ejercen su acción por contacto directo, mientras que los compuestos volátiles se pueden utilizar en los dos sistemas explicados con anterioridad.

Igualmente, se deberán considerar las características del material de envase y el alimento envasado. La mayor o menor proliferación microbiana se verá afectada tanto por la permeabilidad, espesor, estructura o presencia de aditivos del envase, como por las características físico-químicas del alimento, tales como pH, actividad de agua y temperatura de conservación.

1.3. LEGISLACIÓN

Tanto en Europa como en los Estados Unidos, no existe regulación específica sobre los envases activos. Como ya se ha mencionado profusamente en los epígrafes anteriores, la Legislación Europea establece una lista de sustancias permitidas para contacto con alimentos, así como unos límites de migración para esas sustancias (2002/72/CE, 2004/19/CE). Sin embargo, en aquellos sistemas activos que confieren un valor añadido al alimento, a través de la liberación de compuestos desde envase, es muy probable que dichos límites se sobrepasen.

En el Reglamento 2004/1935 del Consejo Europeo (2004/1935/CE) se mencionan, por primera vez, los términos envase activo y envase inteligente. En este Reglamento se prohíbe, explícitamente, el uso de dispositivos que absorban o liberen sustancias, como aldehídos y/o aminas, y que, por lo tanto, puedan inducir a error en el consumidor. Asimismo establece la posibilidad de modificar o alterar las características organolépticas de los alimentos, siempre y cuando se cumplan las disposiciones exigidas en la Directiva 89/107/CEE (89/107/CEE), sobre aditivos alimentarios.

En este sentido, las investigaciones más recientes se están centrando en la incorporación de agentes naturales, como aceites esenciales y sus componentes, en el envase. Los aceites esenciales se han empleado desde la Antigüedad para conservar y preservar los alimentos. A este factor, hay que añadir que su utilización como agentes aromatizantes está permitida y legislada en Europa (Decisión 2002/113/CE) y que son reconocidos como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA.

1.4. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos y volátiles obtenidos a partir de las plantas. Aunque se pueden obtener mediante métodos de extracción, fermentación o expresión, es la destilación el método más usado en la producción industrial (Van de Braak y Leijten, 1999). De los 3000 aceites esenciales de los que se tiene constancia, únicamente 300 están disponibles en el mercado, siendo la industria de los aromas y las fragancias el principal consumidor de estos productos.

Además de sus propiedades antibacterianas (Deans y Ritchie, 1987; Mourey y Canillac, 2002), a los aceites esenciales también se les reconocen propiedades antivirales (Bishop, 1995), antimicóticas (Azzouz y Bullerman, 1982; Mari *et al.*, 2003), antitoxigénicas (Ultee y Smid, 2001), antiparasitarias (Pandey *et al.*, 2000), e insecticidas (Konstantoupoulou *et al.*, 1992).

Aunque los aceites esenciales se han utilizado desde la Antigüedad para la conservación de los alimentos, su uso en este campo descendió en los siglos XIX y XX en favor de la industria del perfume y del aroma. Sin embargo, en los últimos años, debido a la creciente demanda de productos naturales, se han investigado nuevas aplicaciones. La composición de los aceites esenciales es muy heterogénea, ya que varía en función de la especie, la zona geográfica, la época de recolección, el método de extracción, las condiciones de almacenamiento, etc. (Burt, 2004). En la tabla III.8 se resumen algunos estudios realizados hasta la fecha que demuestran la efectividad de los aceites esenciales como agentes antimicrobianos.

■ TABLA III.8

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes

Agente antimicrobiano	Alimento	Microorganismo	Referencia
Alil isotiocianato (AIT)	Ternera	<i>E.coli</i> O157:H7 <i>S.typhimurium</i> <i>L.monocytogenes</i> <i>S.aureus</i>	Ward <i>et al.</i> (1998)
AIT	Pollo	<i>Lb. alimentarius</i> <i>E.coli</i>	Lemay <i>et al.</i> (2002)
AIT	Pan de centeno	<i>A.flavus</i> <i>P.commune</i> <i>P.roqueforti</i> <i>P.corylophilum</i> <i>P.discolor</i> <i>P.policum</i> <i>E.figuler</i>	Nielsen y Rios (2000)
AIT	Ternera	<i>E.coli</i> O157:H7	Muthukumarasamy <i>et al.</i> (2003)
Albahaca	Salsa de espaguetis	<i>Shigella</i> spp.	Bagamboula <i>et al.</i> (2004)
Albahaca	Zumo de tomate	<i>Lb.curvatus</i> <i>S.cerevisiae</i>	Lachowicz <i>et al.</i> (1998)
Capsicum	Ternera picada	<i>Salmonella</i> spp. <i>Ps.aeruginosa</i>	Careaga <i>et al.</i> (2003)
Carvacrol	Trozos de pescado	<i>S.typhimurium</i>	Kim <i>et al.</i> (1995)
Cilantro	Jamón	<i>L.monocytogenes</i>	Gill <i>et al.</i> (2002)
Cinamaldehído	Ternera seca Crema Carne curada	Bacterias Gram +, Gram - <i>Enterobacteriaceae</i>	Kim <i>et al.</i> (2001) Ouattara <i>et al.</i> (2000b)
Canela	Queso graso Zumo de naranja	<i>L.monocytogenes</i> <i>L.monocytogenes</i>	Smith-Palmer <i>et al.</i> (2001) Yuste y Fung (2002)

TABLA III.8 (continuación)

Agente antimicrobiano	Alimento	Microorganismo	Referencia
Clavo	Ternera	<i>L.monocytogenes</i>	Ting y Deibel (1992)
	Pollo cocinado	<i>L.monocytogenes</i> <i>A.hydrophila</i>	Hao <i>et al.</i> (1998a)
	Cerdo cocinado	<i>A.hydrophila</i>	Stecchini <i>et al.</i> (1993)
	Queso bajo en grasa	<i>L.monocytogenes</i>	Smith-Palmer <i>et al.</i> (2001)
	Pan	<i>E.aerogenes</i>	Wendakoon y Sakaguchi (1993)
Sulfuro de dialilo	Ternera	<i>C.jejuni</i>	Yin y Chen (2003)
Disulfuro de dialilo	Ternera	<i>C.jejuni</i>	Yin y Chen (2003)
Eugenol	Ternera cocinada	<i>A.hydrophila</i> <i>L.monocytogenes</i>	Hao <i>et al.</i> (1998b)
Ajo	Salchichas	Microflora natural	El-Khateib y El-Rahman (1987)
Rábano	Ternera	<i>L.monocytogenes</i>	Ward <i>et al.</i> (1998)
		<i>S.aureus</i>	
		<i>E.coli</i> O157:H7	
		<i>S.grimsii</i>	
Metil chavicol	Extracto de lechuga	<i>A.hydrophila</i>	Wan <i>et al.</i> (1998)
Menta	Tzatziki	<i>S.enteritidis</i>	Tassou <i>et al.</i> (1995)
		<i>L.monocytogenes</i>	
Orégano	Pieza de pescado	Microflora natural	Harpaz <i>et al.</i> (2003)
	Ternera	<i>L.monocytogenes</i>	Ting y Deibel (1992)
	Mayonesa	<i>E.coli</i> O157:H7	Skandamis <i>et al.</i> (2001)
	Filete de ternera	<i>S.typhimurium</i>	Skandamis <i>et al.</i> (2002)
Pimiento	Ternera cocinada	<i>A.hydrophila</i>	Hao <i>et al.</i> (1998b)
		<i>L.monocytogenes</i>	
Romero	Salchichas	<i>L.monocytogenes</i>	Pandit y Shelef (1994)
Salvia	Comida para bebés, arroz hervido	<i>S.typhimurium</i>	Shelef (1983)
		<i>S.aureus</i>	
		<i>B.cereus</i>	
Tomillo	Pieza de pescado	Microflora natural	Harpaz <i>et al.</i> (2003)
	Salsa de espaguetis	<i>Shigella</i> spp.	Bagamboula <i>et al.</i> (2003)
	Ternera cocinada	<i>A.hydrophila</i>	Hao <i>et al.</i> (1998b)
		<i>L.monocytogenes</i>	
Vainilla	Puré de fresas	Microflora natural, levaduras	Cerrutti y Almazora (1996)
Wasabi	Atún en lata	<i>V.parahaemolyticus</i>	Hasegawa <i>et al.</i> (1999)

Holley y Patel, 2005.

Las investigaciones realizadas en esta sección pretenden contribuir al desarrollo de un envase antimicrobiano que incorpore aceites esenciales en su composición y que pueda actuar en fase vapor. En primer lugar, se seleccionarán los agentes naturales más efectivos en la inhibición de los microorganismos, mediante el estudio de su actividad antimicrobiana y de la composición de las atmósferas que generan al evaporarse. En segundo lugar, se evaluará la actividad antimicrobiana del nuevo envase propuesto, consistente en láminas de PP y/o PE/EVOH en las que se incorporan las esencias naturales más efectivas, y donde cobran especial interés las interacciones de los agentes antimicrobianos con la matriz polimérica.

2. Objetivos

El objetivo principal de esta parte de la Tesis Doctoral consiste en el **desarrollo de un envase activo antimicrobiano que incorpora extractos de aceites esenciales naturales en su composición y que actúa en fase vapor mediante la liberación de los agentes activos al espacio de cabeza del envase**. De esta forma, se consigue aumentar el tiempo de vida útil del alimento envasado, al evitar su deterioro por la aparición de microorganismos indeseables.

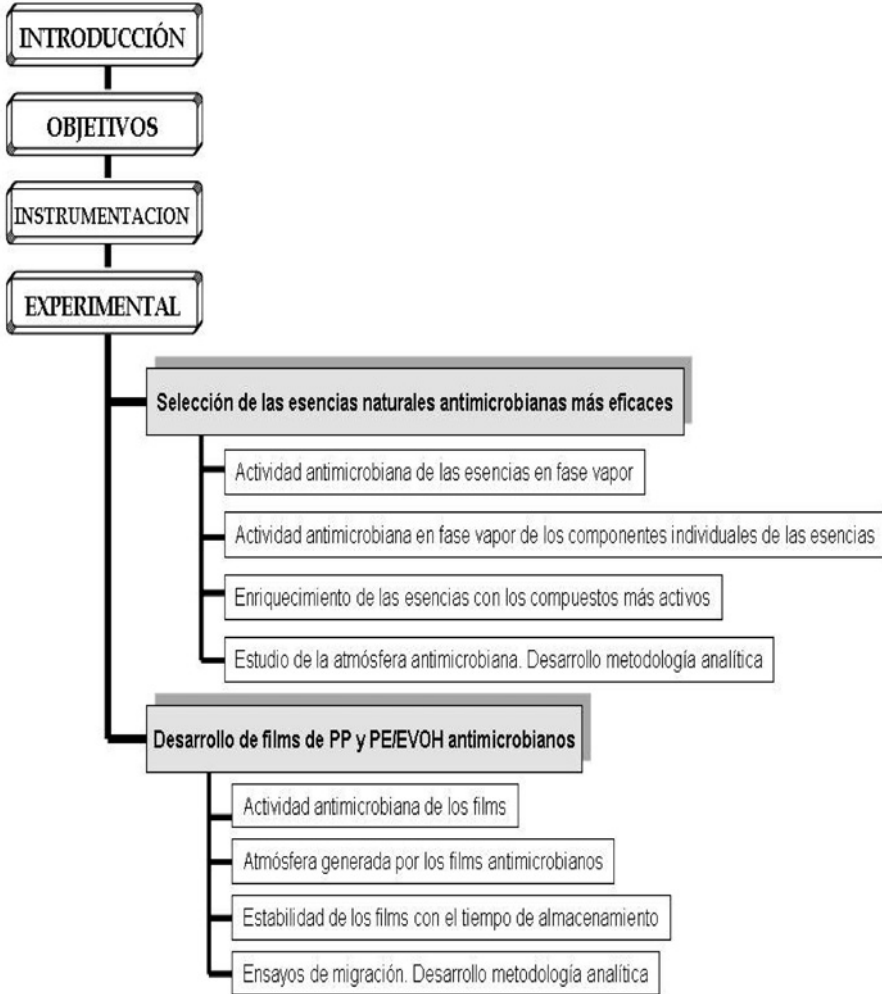
Este objetivo general se estructura en una serie de puntos cuyos objetivos específicos consisten en:

- a) Selección de los agentes activos antimicrobianos que se incorporan a la matriz polimérica. La elección de los agentes antimicrobianos naturales que se incorporen a la matriz polimérica implica la caracterización de los aceites esenciales. Para ello, se realizarán los siguientes estudios:
 - Evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes aceites esenciales en fase vapor.
 - Evaluación de la actividad antimicrobiana de los componentes volátiles individuales de los aceites esenciales en fase vapor.
 - Variación de las propiedades antifúngicas de los componentes más activos de los aceites esenciales en función de la actividad de agua y pH del alimento. Modelado de la inhibición de varios mohos, contaminantes habituales del queso y de los productos de panadería y bollería.
 - Enriquecimiento de las esencias naturales en alguno de sus componentes más efectivos.
 - Estudio de la composición de la atmósfera generada por los aceites esenciales y de su evolución con el tiempo. Desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de las diferentes atmósferas antimicrobianas.
- b) Desarrollo de films antimicrobianos de polipropileno (PP) y de copolímero de polietileno-alcohol vinílico (PE/EVOH). La consecución de este objetivo implica la realización de los siguientes estudios:
 - Evaluación de la actividad antimicrobiana de los films de PP y PE/EVOH en función de la cantidad de aceite esencial que incorporan en su composición.
 - Estudio de la atmósfera generada por los diferentes films antimicrobianos. Grado de retención de los agentes antimicrobianos en la matriz polimérica en función de su afinidad físico-química.
 - Tiempo de vida medio de los films antimicrobianos (tiempo de almacenado útil).
 - Ensayos de migración que validen la utilización de esos films en contacto con alimentos. Desarrollo de una metodología analítica para la extracción de las sustancias activas de los simulantes acuosos.

En la figura III.1 se muestra un esquema de los contenidos de esta sección.

FIGURA III.1

Esquema de la línea experimental seguida en la sección III



3. Instrumentación, material y reactivos

3.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- Balanza analítica Mettler AE 163. Intervalo de pesada entre 0-30 g y 30-160 g con una precisión de $\pm 0,00001$ y $0,0001$ g respectivamente.
- Balanza analítica OR-202, GR-202-EC, A&D Instruments LTD (Tokio, Japón), máximo 210 g, mínimo 1 mg, resolución $0,1/0,01$ mg.
- Cromatógrafo de gases Varian CP 3800 acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Saturn 2000.

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard (EEUU) 6890 acoplado a un detector de espectrometría de masa cuadrupolo HP 5973.
- Estufa bacteriológica "Incubat" de JP Selecta (España) de 80 L de capacidad.
- Incubador refrigerado tipo FOC 225-E de Velp® Scientifica (Milán, Italia) de 220 L de capacidad. Temperatura regulable 0-50 °C.
- Incubador refrigerado Binder Series KB de Binder GMBH (Tuttlingen, Alemania) de 115 L de capacidad. Temperatura regulable -10 a 100 °C.
- Autoclave eléctrico para esterilización de control analógico "Presoclave" de JP Selecta, de 75 L de capacidad.
- Espectrofotómetro Ultrospec 1000 E UV/Visible, Pharmacia Biotech (España).
- Agitador magnético con calefacción MicroMagMix, Ovan (Barcelona, España). Velocidad de agitación: 56-1250 rpm (± 10 rpm). Rango de calefacción: 0-400 °C (± 1 °C).

3.2. MATERIAL

- VF-5ms (95% dimetilsiloxano y 5% fenilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm i.d y 0,25 μ m de espesor. Temperatura máxima de trabajo 325 °C.
- Columna capilar HP-5 MS (95% dimetilsiloxano y 5% fenilsiloxano) de 60 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μ m de espesor. Temperatura máxima de trabajo 325 °C.
- Fibras de SPME de polidimetilsiloxano de 100 μ m de espesor y de poliacrilato de 85 μ m de espesor de Supelco®, suministradas por Sigma-Aldrich.
- Soporte para muestro manual con fibras de SPME de Supelco, suministradas por Sigma-Aldrich.
- Jeringa de 5 μ L 85RN de Hamilton Bonaduz (Suiza) con aguja 26S/51 mm tipo 2, suministradas por Sumalsa.
- Jeringas de inyección de líquidos en cromatografía de gases Hamilton 701 de 10 μ L y Hamilton 1725 de 250 μ L de capacidad de Hamilton, suministradas por Sumalsa.
- Placas Petri, fabricadas por Deltalab (Rubí, España) en poliestireno transparente, de 90 mm de diámetro, suministradas por Scharlab.
- Micropipetas Finnigan Focus de Thermo Electron Corporation (Barcelona, España) para el rango de 1-10 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L, suministradas por Sumalsa.
- Papel de filtro Albet®.
- Puntas para micropipeta suministradas por Análisis Vínicos.
- Pipetas Pasteur suministradas por Sumalsa.
- Viales ámbar de 2 mL y transparentes de 4 mL y 20 mL, con cápsulas de aluminio y septa de butilo/PTFE suministrados por Análisis Vínicos.
- Encapsuladores de viales de 2 y 20 mL suministrados por LinLab.
- Frascos de vidrio de 220 y 250 mL de capacidad por Sumalsa.
- Agitadores magnéticos, suministrados por Análisis Vínicos.
- Material de vidrio de laboratorio.

3.3. DISOLVENTES

- Agua, resistividad 18,2 M Ω cm (25 °C), carbono orgánico total (COT) 1-5 ppb, obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q Gradient (Millipore).
- Etanol (CAS 64-17-55) absoluto para HPLC en gradiente de Scharlab.
- Ácido acético (CAS 64-19-7) glacial para HPLC Scharlab.
- *p*-Xileno (CAS 106-42-3) de Fluka-Sigma-Aldrich.

- Metanol (CAS 67-56-1), grado gradiente HPLC de Scharlab.
- Acetona (CAS 67-64-1) para HPLC de Scharlab.
- Dietil éter (CAS 60-29-7) extra puro estabilizado con aproximadamente 7 ppm de 2,6-*tert.*-butil-4-metilfenol (BHT) de Merck.
- Acetato de etilo (CAS 141-78-6), suministrado por Gilca (Zaragoza, España).

3.4. CEPAS DE MICROORGANISMOS

- *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection, ATCC 29213).
- *Bacillus cereus* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 495).
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644).
- *Escherichia coli* (ATCC 29252).
- *Yersinia enterocolitica* (CECT 4315).
- *Salmonella choleraesuis* (CECT 4000).
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).
- *Candida albicans* (ATCC 64550).
- *Debaryomyces hansenii* (CECT 10353).
- *Zygasacharomyces rouxii* (CECT 11928).
- *Penicillium islandicum* (CECT 2762NT).
- *Aspergillus flavus* (CECT 2687, IBT 21323).
- *Penicillium nalgiovense* (IBT Culture Collection of Fungi, 12105).
- *Penicillium commune* (IBT 21314).
- *Penicillium roqueforti* (IBT 21319).
- *Eurotium repens* (IBT 1800).

3.5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Sabouraud Chloramphenicol Agar de Scharlau (España).
- Agar Mueller-Hinton de Biorad (EE.UU), suministrado por Sumalsa (España).
- Agar de extracto de malta No1, de Scharlau (España).
- Extracto de levadura BioKar, suministrado por Food Diagnostics ApS (Grenaa, Dinamarca).
- Caldo Czpaek dox de Difco™ (Disco Laboratorios, MI, EE.UU).
- Agar (CAS 9012-18-0), suministrado por Bie&Berntsen (Dinamarca).
- Agar diclorán glicerol (DG18) base 1, de Oxoid (Hampshire, Reino Unido).
- Sulfato de cobre pentahidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7758-99-8), de Merck.
- Sulfato de cinc heptahidratado, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7746-20-0), de Merck.
- Tween 80 (CAS 9005-65-6), de Merck.
- Glicerol anhidro (CAS 56-81-5) de JTBaker, (Mallinckrodt Baker, Deventer, Holanda).
- Cloruro sódico (CAS 7647-14-5) de Merck.
- Disolución de cloranfenicol, DTU (Danish Technical University, Dinamarca).
- Disolución de clorotetraciclina, DTU.

3.6. ACEITES ESENCIALES NATURALES

- Aceite esencial de albahaca (CAS 8015-73-4), suministrado por Artibal (Sabiñánigo, España).
- Aceite esencial de canela (CAS 8015-91-6), suministrado por Artibal.

- Aceite esencial de clavo (CAS 8000-34-6), suministrado por Artibal.
- Aceite esencial de eneldo (CAS 8000-75-5), suministrado por Artibal.
- Aceite esencial de jengibre (CAS 8007-08-7), suministrado por Artibal.
- Aceite esencial de orégano (CAS 8007-11-2), suministrado por Artibal.
- Aceite esencial de romero (CAS 8000-25-7), suministrado por Artibal.
- Aceite esencial de tomillo (CAS 8015-73-4), suministrado por Artibal.

3.7. COMPUESTOS INDIVIDUALES

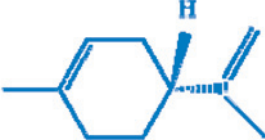

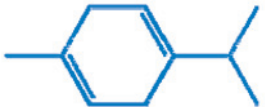
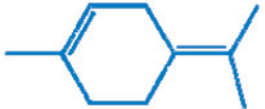
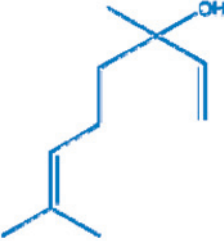
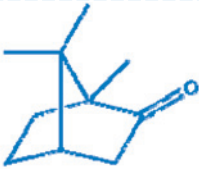

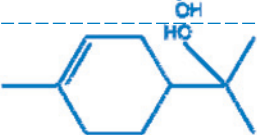
Los compuestos individuales utilizados, su fórmula empírica, estructura química, peso molecular y punto de ebullición se muestran en la tabla III.9.

■ TABLA III.9

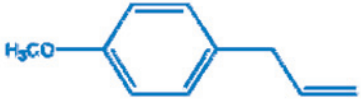
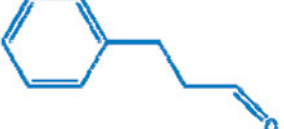
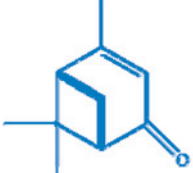
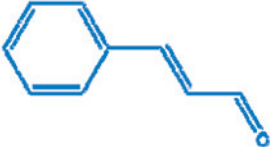
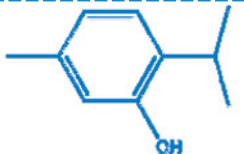

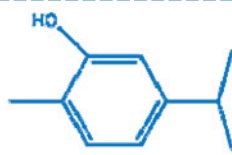
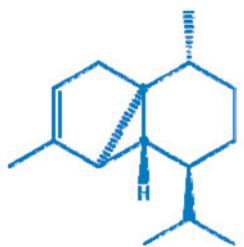
Estructura química, fórmula empírica, n° de identificación de Chemical Abstract Service (CAS), peso molecular, temperatura de ebullición y proveedor de los patrones utilizados en la parte experimental

Compuesto	Estructura química
<p>α-Pinenol 98% (C₁₀H₁₆) CAS 80-56-8 PM 136,23 T_e 155-156 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>Canfeno ≥ 95% (C₁₀H₁₆) CAS 79-92-5 PM 136,23 T_e 159-160 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>β-Pinenol 99% (C₁₀H₁₆) CAS 18172-67-3 PM 136,23 T_e 165-167 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>α-Felandrenol ≥ 95% (C₁₀H₁₆) CAS 4221-98-1 PM 136,23 T_e 171-174 °C Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>α-Terpinolol ≥ 95% (C₁₀H₁₆) CAS 99-86-5 PM 136,23 T_e 173-175 °C Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>p-Cimolol 99% (C₁₀H₁₆) CAS 99-87-6 PM 134,22 T_e 176-178 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	

■ TABLA III.9 (continuación)

Compuesto	Estructura química
<p>(R)-(+)-Limoneno 97% (C₁₀H₁₆) CAS 5989-27-5 PM 136,26 T_e 176-177 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>1,8-Cineol 99% (C₁₀H₁₈O) CAS 470-82-6 PM 154,25 T_e 176-177 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>γ-Terpineno 97% (C₁₀H₁₆) CAS 99-85-4 PM 136,23 T_e 182 °C Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>α-Terpinoleno 97% (C₁₀H₁₆) CAS 586-62-9 PM 136,23 T_e 184-186 °C Fluka (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>Linalol ≥ 97% (C₁₀H₁₈O) CAS 78-70-6 PM 154,25 T_e 194-197 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>Canfor 96% (C₁₀H₁₆O) CAS 76-22-2 PM 152,23 T_e 204 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>Borneol 98% (C₁₀H₁₈O) CAS 464-43-7 PM 154,25 T_e 206-209 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).</p>	
<p>α-Terpineol 98% (C₁₀H₁₈O) CAS 10482-56-1 PM 154,25 T_e 217-218 °C ChemService (West Chester,PA, EE.UU).</p>	

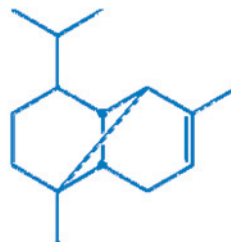
■ TABLA III.9 (continuación)

Compuesto	Estructura química
Estragol 98% (C ₁₀ H ₁₈ O) CAS 140-67-0 PM 148,20 T _e 215-220°C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
Hydrocinamadehído ≥ 90% (C ₉ H ₁₀ O) CAS 104-53-09 PM 136,23 T _e 229 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	
(-)-Verbenona ≥ 97% (C ₁₀ H ₁₄ O) CAS 1196-01-6 PM 150,22 T _e 227-228 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	
Trans-Cinamadehído 99% (C ₉ H ₈ O) CAS 14371-10-9 PM 132,16 T _e 250-252 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
Timol ≥ 99,5% (C ₁₀ H ₁₄ O) CAS 89-83-8 PM 150,22 T _e 232 °C Sigma (Sigma-Aldrich).	
Bornil acetato 95% (C ₁₂ H ₂₀ O) CAS 76-49-3 PM 196,29 T _e 223-224 °C Aldrich (Sigma-Aldrich).	
Carvacrol ≥ 97% (C ₁₀ H ₁₄ O) CAS 499-75-2 PM 150,22 T _e 236-237 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	
(-)-α-Cubebeno ≥ 97% (C ₁₅ H ₂₄) CAS 17699-14-8 PM 204,35 T _e 245-246 °C Fluka (Sigma-Aldrich).	

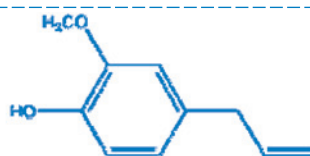
■ TABLA III.9 (continuación)

Compuesto**Estructura química**

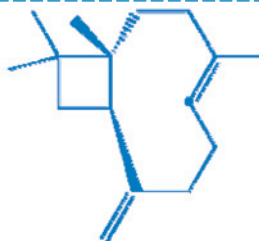
(-)- α -Copaeno $\geq 90\%$ (C₁₅H₂₄)
 CAS 3856-25-5
 PM 204,35
 T_e 124 °C (15 mm Hg)
 Fluka (Sigma-Aldrich).



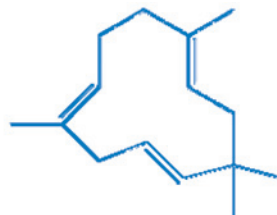
Eugenol 99% (C₁₀H₁₂O)
 CAS 97-53-0
 PM 164,20
 T_e 254 °C
 Aldrich (Sigma-Aldrich).



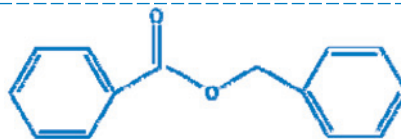
β -Cariofileno 99% (C₁₅H₂₄)
 CAS 87-44-5
 PM 204,35
 T_e 262-264 °C
 Sigma (Sigma-Aldrich).



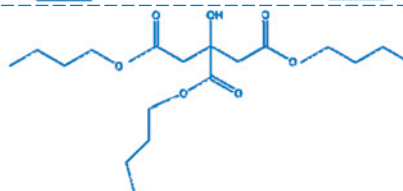
α -Humuleno 99,5% (C₁₅H₂₄)
 CAS 6753-98-6
 PM 204,35
 T_e 166-168 °C
 Fluka (Sigma-Aldrich).



Benzil benzoato 99% (C₁₄H₁₂O₂)
 CAS 120-51-4
 PM 212,24
 T_e 323-324 °C
 Sigma (Sigma-Aldrich).



Tributil citrato $\geq 97\%$ (C₁₈H₃₂O₇)
 CAS 77-94-1
 PM 360,44
 Fluka (Sigma-Aldrich).



4. Actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales comerciales por contacto directo y en fase vapor

4.1. INTRODUCCIÓN

A pesar del gran progreso experimentado en materias de higiene y producción de alimentos, los temas de seguridad alimentaria, y concretamente aquéllos referidos a la conservación de los alimentos, al ser asuntos de salud pública, siguen constituyendo un campo en constante desarrollo e investigación.

La mayor parte de los productos que se consumen son perecederos por lo que requieren medidas de protección contra la alteración microbiológica que aseguren su calidad e inocuidad durante el tiempo de vida del alimento (preparación, almacenamiento, distribución y consumo). Debido a la presión de los consumidores, que exigen alimentos sabrosos, fáciles de manejar y con sus propiedades nutricionales intactas, la industria alimentaria ha ido sustituyendo las técnicas tradicionales de conservación, entre las que se incluyen los tratamientos intensos de calor, salazón, acidificación, desecado y adición de conservantes químicos, como por ejemplo benzoatos, sorbatos o propionatos, por otro tipo de tecnologías de inactivación. Las técnicas alternativas más investigadas son el uso de altas presiones hidrostáticas (HHP), la irradiación con energías de baja longitud de onda (UV, rayos gamma, etc.), la generación de campos de pulso eléctrico (PEF) o magnético, el empleo de nuevos sistemas de envasado como las atmósferas modificadas (MAP), el envasado activo, la utilización de agentes antimicrobianos naturales y la bioconservación (Devlieghere *et al.*, 2004). Últimamente, y como consecuencia del gran incremento en el hábito de consumo hacia productos naturales, el uso de aceites esenciales como aditivos antimicrobianos naturales, con la esencia activa adicionada directamente al alimento o incorporada en el envase, se ha convertido en una alternativa bastante prometedora.

Los hongos xerotolerantes y xerófilos y las bacterias halofílicas constituyen los principales agentes alterantes de los alimentos con actividad de agua comprendida entre 0,65 y 0,90 (Matan *et al.*, 2006). Entre los microorganismos detectados en este tipo de alimentos se incluyen *Aspergillus flavus* y *Penicillium roqueforti* en pan (Nielsen y Rios, 2000), *Staphylococcus aureus* en miel (Mundo *et al.*, 2004), *Debaromyces hansenii* y *Zygasaccharomyces rouxii* en frutas y mermeladas (Andrews *et al.*, 1997) o *Candida albicans* en carne seca (Pitt y Hocking, 1977). La contaminación por *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio parahaemolyticus* o *Clostridium perfringens* se produce en alimentos, como carne y derivados, pescado y derivados y frutas y hortalizas, cuya actividad de agua es mayor a 0,90 (Bharathi *et al.*, 2001; Ellis y Goodacre, 2001; Mbandi y Shelef, 2001; Cook *et al.*, 2002; Hew *et al.*, 2005). La actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales, obtenidos a partir de plantas naturales, contra un gran número de microorganismos alterantes y patógenos, ha sido extensamente estudiada y demostrada tanto en ensayos *in-vitro* como con alimentos reales (Hammer *et al.*, 1999; Burt, 2004; Holley y Patel, 2005).

En la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha, el aceite esencial entra en contacto directo con el medio de cultivo (ensayos *in-vitro*) o con el alimento. Sin embargo, si dicho aceite esencial formara parte del material de envasado, su acción sería deseable, no solo en contacto directo envase-alimento, sino también por efecto de los componentes volátiles de la esencia, liberados en el espacio de cabeza. Este modo de acción es especialmente relevante, ya que minimiza la posibilidad de desarrollo de alteraciones de tipo objetivo (transferencia de componentes indeseables) o subjetivo (colores o sabores extraños) en el alimento envasado.

En general, la información acerca de la efectividad de los aceites esenciales en fase vapor es más bien escasa, aunque algunos autores ya han demostrado la acción antimicrobiana de los componentes más volátiles de las esencias (Caccioni *et al.*, 1997 y 1998; Sardini *et al.*, 1998; Lanciotti *et al.*, 2003). En este último tipo de aplicaciones, resulta especialmente interesante la correlación entre la composición de la atmósfera generada y el comportamiento antimicrobiano de la esencia.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica sin empleo de disolvente, en la que los analitos de interés quedan retenidos en una pequeña fibra de sílica fundida. Se han desarrollado métodos de SPME para una gran variedad de aplicaciones en fase vapor. Si el muestreo se realiza con la fibra retraída (muestreo pasivo), la cantidad de muestra extraída sólo depende de la difusión de los analitos, con lo que no son necesarios los equipos de muestreo, bombas o aspiradores cruciales en los métodos dinámicos o activos (Batlle *et al.*, 2001; Chen y Pawliszyn, 2003). Además, la cuantificación por muestreo pasivo presenta mayores ventajas.

En este capítulo se pretende evaluar la actividad antimicrobiana de varios aceites esenciales comerciales, tanto por contacto directo como en fase vapor, frente a 11 microorganismos patógenos, seleccionados por su prevalencia en episodios de alteración y deterioro de los alimentos. El muestreo por SPME de las atmósferas generadas por dichas esencias, permitirá relacionar composición e inhibición, etapa necesaria para averiguar el mecanismo de acción en fase vapor.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Microorganismos

Los microorganismos patógenos que se han seleccionado, como se ha comentado en el epígrafe anterior, por ser de gran interés en los episodios de contaminación alimentaria, se muestran en la tabla III.9 conjuntamente con sus condiciones de cultivo (medio, tiempo y temperatura de incubación). Previo a su uso, las cepas se almacenaban en refrigeración a -18 °C en leche desnatada esterilizada.

■ TABLA III.9

Microorganismos patógenos empleados: cepa de referencia

	Cepa (nº referencia)	Medio cultivo	T (°C)	t (día)	
Bacterias Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	30	2	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29122			
	<i>Bacillus cereus</i>	CECT 495			
Bacterias Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29252	30	1	
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT 4000			
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 4315			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853			
Levadura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 64550	Sabouraud Cloroanfenicol agar	30	2
Mohos	<i>Aspergillus flavus</i>	CECT 2687	36,5	7	
	<i>Penicillium islandicum</i>	CECT 2762NT			

(ATCC: American Type Culture Cutive, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo), medio de cultivo (M.H.:Mueller-Hinton), temperatura (T) y tiempo (t) de incubación.

4.2.2. Aceites esenciales

En este trabajo, se han estudiado varios aceites esenciales comerciales suministrados por la empresa Artibal S.A, que se muestran en la tabla III.10.

■ TABLA III.10

Propiedades físicas de los aceites esenciales utilizados

	Aceite esencial	n°CAS	Teb (°C)	ρ (g/mL) 25°C
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	[8015-73-4]	215	0,957
Canela	<i>Cinnamon zeylanicum</i>	[8015-91-6]	194-234	1,041
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	[8000-34-6]	251	1,05
Eneldo	<i>Anethum graveolens</i>	[8006-75-5]	189	
Jengibre	<i>Zingiber officinalis</i>	[8007-08-7]	254	0,871
Orégano	<i>Oregano vulgaris</i>	[8007-11-2]	239	0,939
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	[8000-25-7]	145-176	0,908
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	[8015-73-4]	190-195	0,916

4.2.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

4.2.3.1. Contacto directo: difusión en disco

(Farang *et al.*, 1989; Aureli *et al.*, 1992; Fioruzi *et al.*, 1998; Burt y Reinders, 2003).

Sobre aproximadamente 15 mL del medio de cultivo correspondiente, previamente vertido y solidificado sobre placas Petri de 90 mm de diámetro, se inocularon en superficie 100 μ L de una disolución fisiológica salina cuya concentración de microorganismo puro bajo estudio se fijó en 10⁶⁻⁷ unidades formadoras de colonias (CFU). La concentración exacta de los inóculos se controló mediante la escala de McFarland y por turbidimetría.

Se añadieron tres microlitos de aceite esencial puro, sin diluir, a un filtro de papel estéril de 5 mm de diámetro, que se colocó sobre el medio de cultivo ya inoculado. Para cada tanda de experimentos se dispuso de blancos con inóculo, pero sin disco. Tras el período de incubación, se midió el diámetro de la zona alrededor del disco sobre la cual no había crecimiento del microorganismo (inhibición total) y de la zona donde las colonias no presentaban las mismas características de forma, tamaño o color que las colonias consideradas como blanco (zona de retardo). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

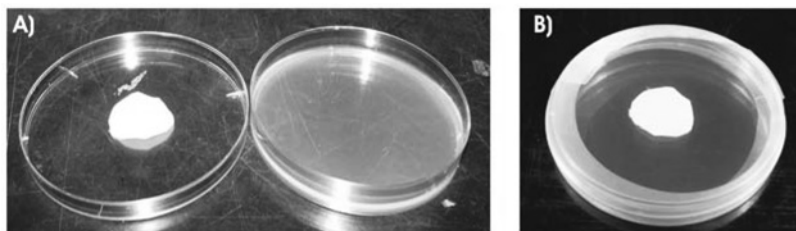
4.2.3.2. Fase vapor: método de las diluciones

Al igual que en los ensayos por contacto directo, se inoculaban por superficie 15 mL de medio de cultivo solidificado, con 100 mL de una disolución fisiológica de 10⁶⁻⁷ CFU/mL de microorganismo puro. Cada aceite esencial se diluyó en dietil éter, para obtener una serie de diluciones decrecientes hasta un 1% (v/v). A continuación, se añadían 10 μ L de cada una de las diluciones a un papel blanco de filtro estéril de 10 mm de diámetro, el cual se colocaba en la tapa de la placa Petri libre de medio, de forma que no existiera contacto directo entre el filtro y el medio de cultivo. Las placas Petri fueron selladas con parafilm (figura III.2). Evidentemente, el sello no es hermético, pero esta es una característica deseada en el experimento, ya que representa las condiciones más desfavorables para conseguir la inhibición, debido a que los componentes activos de las esencias en fase vapor pueden fugarse por los bordes de la placa Petri, disminuyen-

do así su concentración efectiva. Los ensayos blanco consistieron en placas sembradas con el microorganismo de estudio y enfrentadas a 10 μ L de dietil éter puro, previamente añadido a un papel de filtro estéril. Se comprobó que el diétil éter no producía ningún efecto sobre el crecimiento de los microorganismos. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

■ FIGURA III.2

Sistema experimental: determinación de la actividad antimicrobiana en fase vapor



Después del período de incubación, se miden las zonas bajo los papeles de filtro donde no se produjo crecimiento de colonias, y se calcula la concentración mínima inhibitoria (MIC) para la cual existe inhibición. Las placas correspondientes a la esencia pura (no diluida) se incuban en las mismas condiciones de temperatura, sin renovar la atmósfera generada por el aceite esencial con el propósito de evaluar durante cuánto tiempo se prolongaba el efecto antimicrobiano; o con la atmósfera renovada, es decir, sustituyendo la parte superior (aquella en la que se coloca el filtro con el aceite esencial) de la placa Petri por otra limpia y estéril, con la intención de averiguar si el efecto antimicrobiano del aceite esencial era –cida (muerte) o –estático (impedía el crecimiento, pero no mataba). Cada 7 días se examinaban las placas y se comprobaban las variaciones en la inhibición. Todos los ensayos fueron realizados también por triplicado.

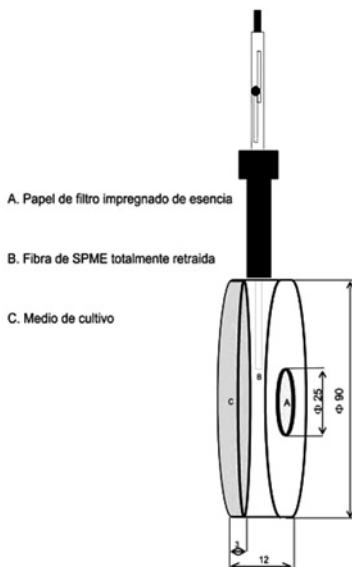
4.2.4. Muestreo de las atmósferas generadas por los aceites esenciales: Microextracción en fase sólida (SPME)

Las atmósferas generadas por los aceites esenciales se muestrearon con fibras de SPME totalmente retraídas. De acuerdo con investigaciones anteriores (Huerga, 2004; López *et al.*, 2006), se empleó la fibra de 100 μ m de espesor de polidimetilsiloxano (PDMS) para el muestreo de la atmósferas generadas por los aceite esenciales de orégano, canela, tomillo, romero y albahaca. La fibra de poliacrilato (PA) de 85 mm de espesor se utilizó en el muestreo de la atmósfera de clavo.

La fibra retraída (con el fin de asegurar el muestreo basado en difusión pura, muestreo pasivo) se dispuso en la placa Petri, tal y como muestra la figura III.3 durante un período de 24 horas. El volumen del espacio de cabeza de la placa Petri es de 57,3 cm^3 .

FIGURA III.3

Sistema experimental para el muestreo de la atmósfera generada por las esencias

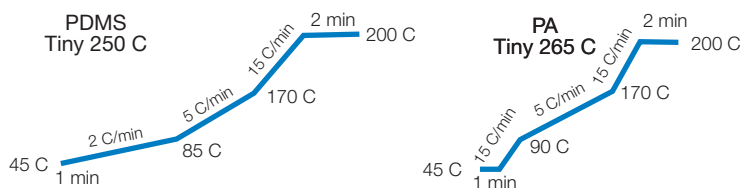


4.2.5. Composición de la atmósfera: análisis cromatográfico (GC-ITMS)

Las fibras de SPME, una vez transcurrido el período de muestreo (24 h) se transportaban al portal de inyección de un cromatógrafo de gases, Varian CP-3800, que emplea como detector un espectrómetro de masas de trampa iónica, Saturn 2000 ITMS. Las dimensiones de la columna cromatográfica utilizada, VF-5MS (polimetilsiloxano con 5% de fenilsiloxano) eran 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor. Como gas portador se empleó helio a un flujo constante de 1,0 mL/min. Las temperaturas del horno y del inyector variaron en función de la fibra desorbida (fig. III.4):

FIGURA III.4

Temperaturas de inyección y del horno para el análisis de los compuestos volátiles procedentes de los aceites esenciales y retenidos en las fibras de SPME



La detección en el MS se realizó en modo impacto electrónico y en *scan*. Se registró el intervalo de masas comprendido entre 40 y 350 uma. Los compuestos se identificaron por comparación de su espectro de masas con el suministrado por la librería comercial NIST, con un criterio de semejanza mayor de 85%. Cuando fue posible se inyectaron estándares para comprobar y verificar tanto los tiempos de retención como los espectros de fragmentación. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por contacto directo

En una primera aproximación, se estudió la actividad antimicrobiana de todos los aceites esenciales por contacto directo, mediante la realización de los tests de difusión sólida en agar. Los halos de inhibición y los halos de retardo (en mm), de la media de tres ensayos, así como sus desviaciones estándar, se muestran en la tabla III.11.

■ TABLA III.11

Actividad antimicrobiana (mm de inhibición total y mm de retardo de crecimiento (paréntesis y cursiva) junto a las desviaciones estándares) de los diferentes aceites esenciales comerciales por contacto directo. Diámetro placa Petri 90 mm (resultado de 90 se corresponde con inhibición total)

		Orégano	Canela	Clavo	Tomillo	Romero	Albahaca	Jengibre	Eneldo
Gram +	<i>S.aureus</i>	38±3	20±5 (25±7)	19±2 (23±4)	13±4 (15±4)	10±4 (13±4)	12±4 (15±4)	10±3 (12±5)	15±2 (17±2)
	<i>L.monoc.</i>	25±5 (37±5)	23±9 (25±8)	18±6 (20±8)	12±1 (15±1)	13±5 (15±3)	16±6 (17±4)	0±0	0±0
	<i>E.faecalis</i>	25±5 (30±10)	15±0 (17±2)	15±2 (17±1)	9±1 (11±1)	7±4 (9±3)	12±2 (14±3)	0±0	0±0
	<i>B.cereus</i>	31±5 (32±6)	22±4 (25±6)	23±4 (25±5)	12±3	7±0 (9±3)	0±0	6±1 (7±1)	0±0
	Gram -	<i>E.coli</i>	24±2 (27±3)	15±2 (17±3)	15±2 (18±2)	12±0 (15±0)	7±1 (10±3)	9±1 (10±3)	0±0
	<i>S.choler.</i>	25±6 (31±6)	20±4 (25±6)	18±3 (20±2)	15±5 (16±6)	11±3 (15±3)	12±2 (15±3)	0±0	8±1 (10±3)
	<i>Y.enteroc.</i>	35±5 (40±5)	16±4 (19±7)	16±4 (19±7)	16±4 (17±3)	7±3 (9±4)	10±2 (12±1)	0±0	0±0
	<i>Ps.aerug.</i>	12±1 (15±1)	11±2 (13±3)	11±1 (13±2)	7±1	7±2	8±2	0±0	0±0
Hongos	<i>C.albicans</i>	48±6 (50±5)	40±1 (45±3)	39±10 (45±10)	15±3 (17±4)	14±7 (16±9)	10±2 (15±3)	12±1 (15±3)	12±0 (15±2)
	<i>A.flavus</i>	90±0	90±0	90±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
	<i>P.island.</i>	90±0	90±0	90±0	10±5 (90±0)	0±0	0±0	0±0	0±0

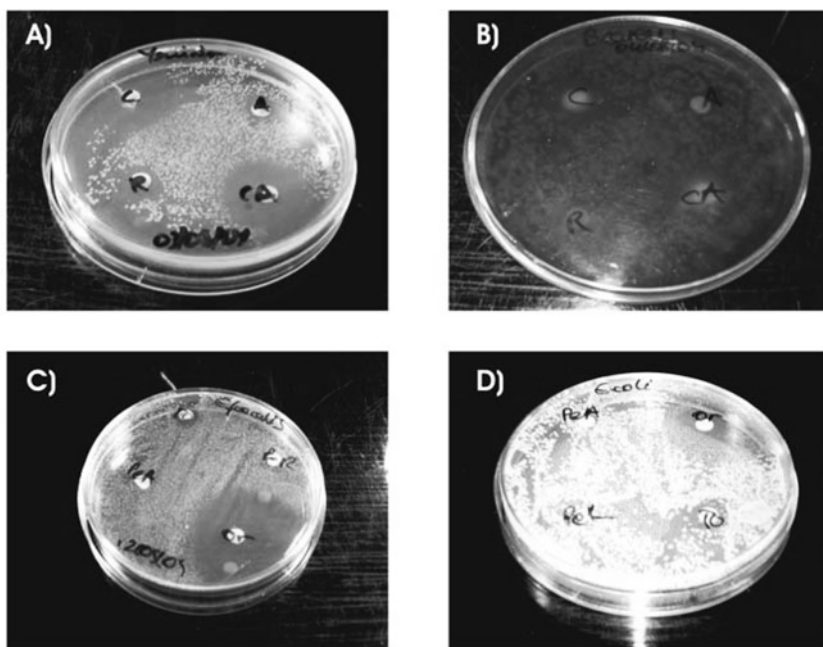
Las mayores actividades antimicrobianas por contacto directo corresponden a los aceites esenciales de orégano, canela y clavo, seguidos de tomillo, romero y albahaca. Los aceites esenciales de jengibre y eneldo, en cambio, no inhibieron el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, únicamente mostraron cierta actividad contra la levadura y la bacteria Gram positiva, *S.aureus*.

Los hongos, especialmente los dos mohos, mostraron mayor susceptibilidad a la presencia de aceites esenciales, cuyo crecimiento fue inhibido completamente por las esencias de orégano, canela y clavo. Las bacterias, por el contrario, son más resistentes, especialmente las bacterias Gram negativas en presencia de clavo y canela, aunque las diferencias percibidas no son estadísticamente significativas en su conjunto.

En la figura III.5, se muestran algunos ejemplos de inhibición por contacto directo.

■ FIGURA III.5

Inhibición por contacto directo. A) *Y.enterocolitica*, B) *B.cereus*, C) *E.faecalis* y D) *E.coli*



C:Clavo, Ca:Canela, A:Albahaca, R:Romero, Or:Orégano, To:Tomillo, PeR:Jengibre, PeA:Eneldo.

Aunque existen numerosas investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por contacto directo, la comparación y extrapolación entre resultados no es trivial.

Por un lado, los métodos empleados para medir la actividad antimicrobiana difieren de unos estudios a otros. Opalchenova (Opalchenova y Obreshkova, 2003) propuso la albahaca como agente antimicrobiano frente al crecimiento de *Ps.aeruginosa* y *S.aureus*. Aunque aparentemente esta conclusión está en contradicción con los resultados mostrados en la tabla III.11, la metodología que empleó implica la dilución en caldos de cultivo (Tween, soluciones salinas, etc.) y la adición de compuestos activos a dicho caldo. Esta difusión es mucho más rápida que en el caso de la difusión en la superficie sólida del agar, con lo que el contacto es mucho más efectivo y los resultados no son directamente extrapolables. Así, por ejemplo, en el trabajo de Bonzin (Bonzin *et al.*, 2006), donde se comparaba por difusión en disco la actividad antimicrobia-

na de la albahaca del orégano y del tomillo, se obtuvieron resultados similares a los presentados en este trabajo.

Incluso aplicando el mismo método, en este caso difusión sólida en agar, si el medio de cultivo sobre el que se siembra el microorganismo varía de un ensayo a otro, la comparación directa entre resultados no es del todo posible. De acuerdo a la bibliografía, el aceite esencial de tomillo, por ejemplo, es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *L.monocytogenes* y de *A.flavus* sobre PDA (patata dextrosa agar) que el aceite esencial de clavo (Singh *et al.*, 2003), y que el aceite esencial de canela (Soliman y Badaea, 2002), respectivamente. Además de estos factores hay que tener en cuenta las diferencias en la composición de los aceites esenciales, en las características de las cepas de microorganismos, etc.

4.3.2. Actividad antimicrobiana de los aceites en fase vapor

A continuación, se examinó la actividad antimicrobiana en fase vapor de los aceites esenciales más efectivos por contacto directo, es decir, orégano, canela, clavo, tomillo, romero y albahaca, conforme a la metodología anteriormente descrita. Ni el aceite esencial de romero, ni el de albahaca, consiguieron inhibir el crecimiento de ninguno de los microorganismos elegidos para el estudio, por lo que sólo se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en fase gas para los restantes aceites esenciales (orégano, canela, clavo y tomillo). Esta concentración (MIC), se define como la mínima concentración de esencia a la que se observa inhibición en el crecimiento del microorganismo (Hammer *et al.*, 1999; Delaquis *et al.*, 2002) y expresada en microlitros de esencia por litro de atmósfera, se muestra en la tabla III.12 para cada pareja esencia-microorganismo.

■ TABLA III.12

Actividad antimicrobiana de la atmósfera generada por los aceites esenciales de orégano, canela, clavo y tomillo expresada como μL esencia/L atmósfera

		Orégano MIC ($\mu\text{L/L}$)	Canela MIC ($\mu\text{L/L}$)	Clavo MIC($\mu\text{L/L}$)	Tomillo MIC ($\mu\text{L/L}$)
Bacteria Gram +	<i>S.aureus</i>	13,1	34,9	26,2	87,3
	<i>L.monocytogenes</i>	26,2	34,9	17,5	175
	<i>E.faecalis</i>	34,9	52,4	87,3	87,3
	<i>B.cereus</i>	17,5	17,5	17,5	131
Bacteria Gram -	<i>E.coli</i>	13,1	17,5	26,2	52,4
	<i>S.choleraesuis</i>	17,5	131	52,4	131
	<i>Y.enterocolitica</i>	4,4	17,5	8,73	34,9
	<i>Ps.aeruginosa</i>	175	No inhibe	No inhibe	No inhibe
Levadura	<i>C.albicans</i>	17,5	13,1	13,1	26,2
Mohos	<i>A.flavus</i>	17,5	13,1	17,5	175
	<i>P.islandicum</i>	17,5	8,73	8,73	34,9

La actividad antimicrobiana en fase gas es más débil que por contacto directo (Matan *et al.*, 2006), como consecuencia de los diferentes procesos de transferencia de materia que intervinen en cada ensayo así como, posiblemente, por la identidad de los distintos analitos que estén implicados en ambos procesos. Respecto a la transferencia de materia, en los ensayos por contacto directo los componentes activos de las esencias difunden desde el seno del aceite esencial a la interfase aceite-medio de cultivo, en la que se solubilizan, y posteriormente difun-

den por el medio de cultivo hasta alcanzar su objetivo: las células del microorganismo. En los ensayos en fase gas, los componentes activos deben, en primer lugar, transferirse al espacio de cabeza de la placa Petri. Una vez en fase gas pueden, o bien atacar directamente las células de microorganismo, o bien incorporarse al medio de cultivo (difusión desde el gas hasta la interfase gas-medio de cultivo, y posterior disolución). Por lo tanto, la efectividad de los aceites esenciales para actuar en fase gas dependerá de la volatilidad de sus compuestos activos y su afinidad por las células del microorganismo. Excepto para el orégano en las bacterias Gram +, las tendencias observadas en los ensayos en fase gas coinciden con las observadas por contacto directo (tabla III.11).

En general, y para las bacterias, las menores MICs, lo que significa mayor actividad antimicrobiana, corresponden a la atmósfera generada por el aceite esencial de orégano, seguidas del clavo y la canela. Sin embargo, esta tendencia varía en los mohos, para los que las atmósferas de clavo y canela son, aparentemente, las más eficaces. El tomillo, en cambio, es el menos efectivo debido a sus mayores MICs, independientemente del microorganismo estudiado. Solamente el orégano, a concentración elevada, fue capaz de inhibir el crecimiento de *Ps.aeruginosa*. La gran resistencia de este patógeno oportunista a los agentes antimicrobianos está ligada con la naturaleza única de su membrana externa, compuesta principalmente por lipopolisacáridos (Mann *et al.*, 1999; Longbottom *et al.*, 2004).

Conjuntamente con el cálculo de las MICs, se construyeron las curvas de inhibición para cada microorganismo (figuras III.6, III.7 y III.8).

■ FIGURA III.6

Curvas de inhibición para las bacterias Gram + (%inhibición=H/90*100; H: mm de halo de inhibición; 90: mm de total inhibición. Barras de error: desviación estándar)

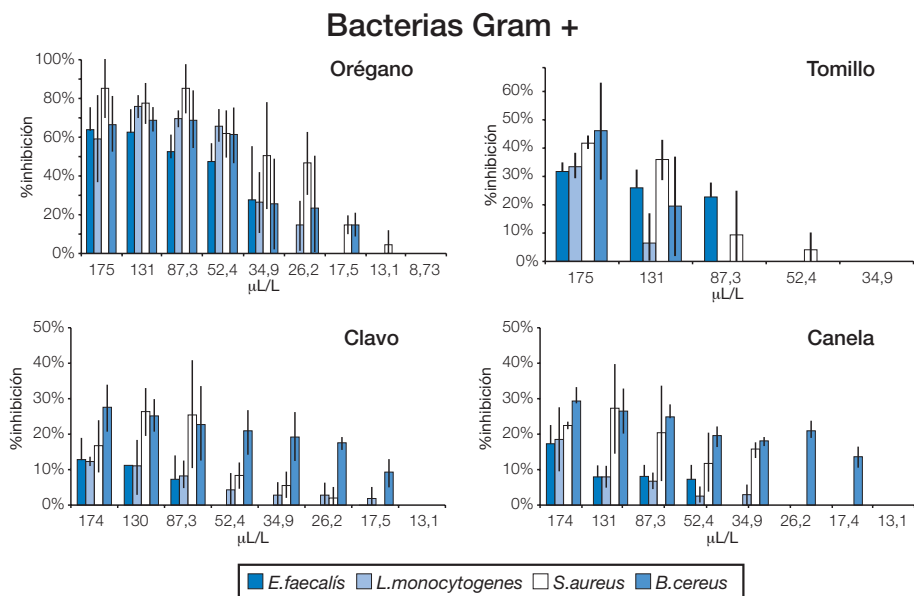


FIGURA III.7

Curvas de inhibición para las bacterias Gram - (%inhibición=H/90*100; H: mm de halo de inhibición; 90: mm de total inhibición. Barras de error: desviación estándar)

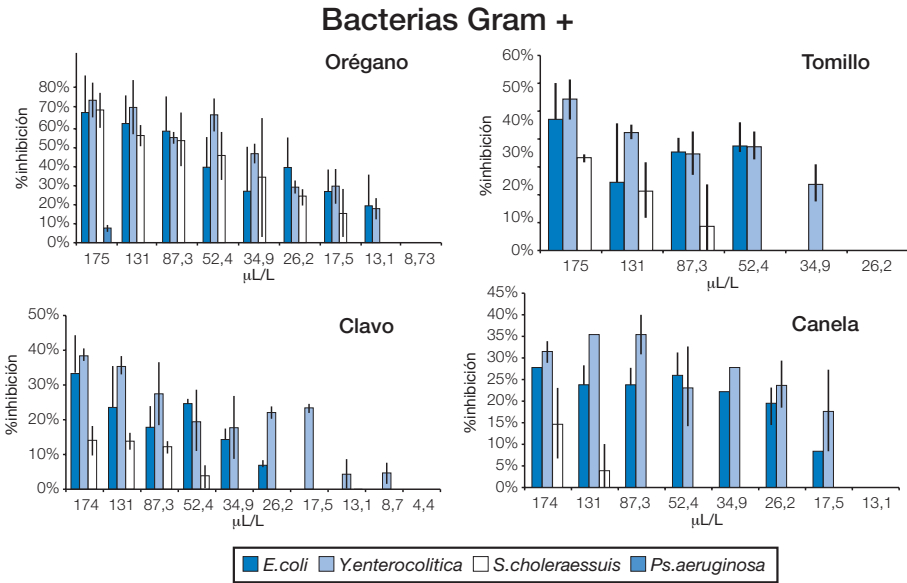
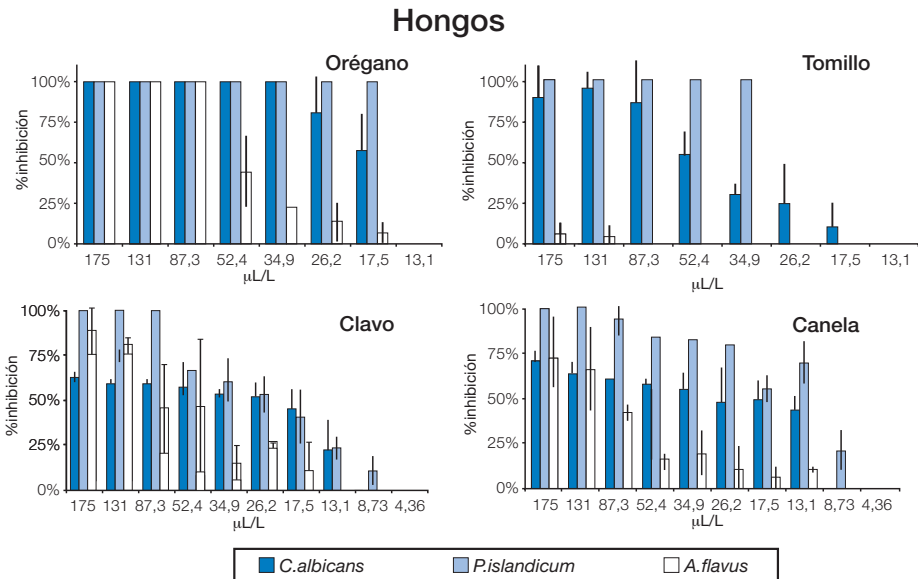


FIGURA III.8

Curvas de inhibición para los hongos (%inhibición=H/90*100; H: mm de halo de inhibición; 90: mm de total inhibición. Barras de error: desviación estándar)



Las curvas de inhibición establecen, una vez más, la mayor eficacia del aceite esencial de orégano como agente antimicrobiano. A pesar de los valores de MIC de orégano obtenido para los hongos, mayores que los observados para el clavo y la canela (ver tabla III.12), las mayores inhibiciones corresponden para una misma concentración de esencia, a la atmósfera generada por el orégano, produciendo, incluso, inhibición total para varias diluciones. Las curvas de inhibición de la canela y clavo son similares.

Los hongos fueron los microorganismos que mayor sensibilidad manifestaron a la presencia de aceites esenciales. Por otro lado, mientras que las bacterias Gram negativas (*S.choleraesuis*) fueron las más resistentes a la acción de la canela y del clavo; en el caso de tomillo y orégano, la mayor resistencia correspondió a las bacterias Gram positivas (*E.faecalis*). En un principio, y teniendo en cuenta la estructura de su membrana celular, con una pared de lipopolisacáridos que dificulta la difusión de compuestos hidrofóbicos (Vaara, 1992), se puede suponer que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a la acción de los agentes antibacterianos. Sin embargo, no todos los estudios realizados alcanzan esta conclusión, ya que en muchos de ellos se demostró la mayor resistencia de las bacterias Gram positivas (Burt, 2004).

En la figuras III.9 y III.10, se muestran algunos ejemplos de los resultados de inhibición conseguidos en fase vapor.

■ FIGURA III.9

Inhibición en fase vapor. A) *B.cereus* frente a tomillo (To) a concentración 100% y 50% (v/v). B) *E.coli* frente a canela (Ca). C) *A.flavus* frente a clavo (C) al 100%. D) *C.albicans* frente a 6,25% de clavo (C) y 6,25% de canela (Ca).

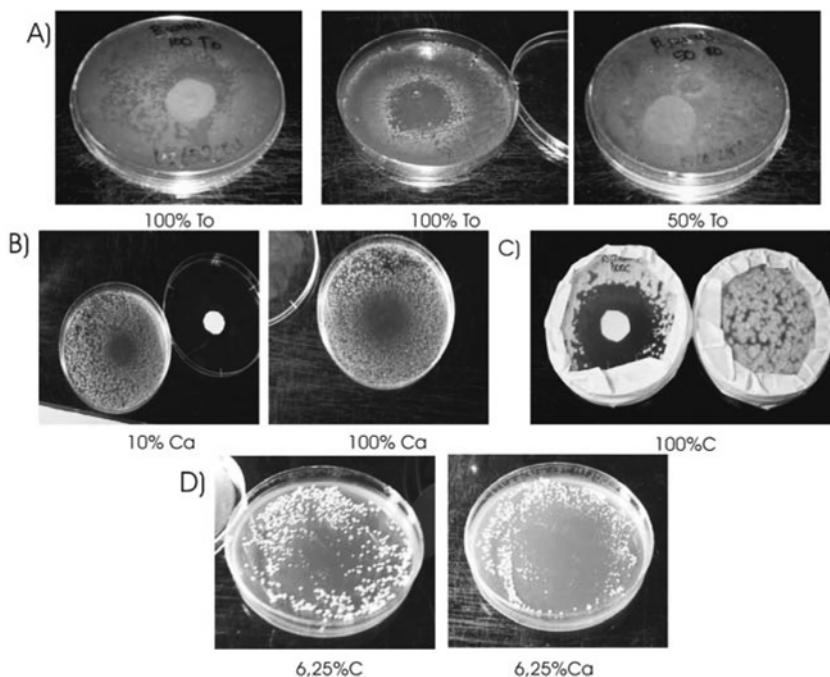
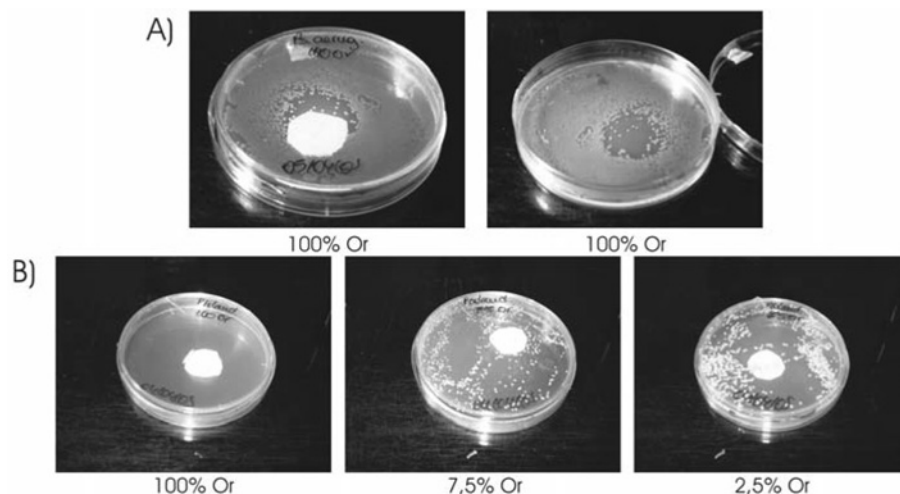


FIGURA III.10

Inhibición en fase vapor de la esencia de orégano (Or). A) Inhibición de *Ps.aeruginosa*. B) Inhibición de *P.islandicum* frente orégano 100% 7,5% y 2,5% (v/v).



Inhibición ¿efecto –cida o –estático?

Para averiguar si el efecto de los aceites esenciales de orégano, canela, clavo y tomillo en fase vapor era –cida (inhibición constante y definitiva con el tiempo en atmósfera limpia) o –estático (disminución de la inhibición con el tiempo una vez renovada la atmósfera y eliminados los agentes antimicrobianos), se sigue la evolución del halo de inhibición durante un mes. Dicha evolución se muestra en la figura III.11.

Los aceites esenciales de orégano, de clavo y canela poseen un efecto –cida para todos los microorganismos ensayados; sólo se observó un efecto fugiestático en el crecimiento de *A.flavus* bajo la atmósfera generada por la canela y el clavo.

El aceite esencial de tomillo, en cambio, presenta un efecto –estático para la mayoría de los microorganismos. El halo de inhibición va disminuyendo durante los primeros 15 días, momento en el que, o bien el microorganismo ha crecido por toda la placa (*L.monocytogenes*), o bien la inhibición alcanza un valor constante (*B.cereus*). El tomillo en fase gas sólo posee efecto –cida frente a *P.islandicum* y *E.faecalis*.

Para averiguar cuánto se prolongaba en el tiempo la inhibición de los aceites esenciales de orégano, canela, clavo y tomillo las placas correspondientes al 100% de esencia se mantuvieron selladas y en condiciones de incubación durante un período de 35 días. La evolución del halo de inhibición, figura III.12, se comprobaba cada siete días.

La inhibición conseguida por las esencias de orégano, clavo y canela se mantiene prácticamente constante durante el tiempo que dura el ensayo, debido a su efecto –cida. En el apartado anterior se comprobó que 10 μ L de esencia pura de clavo y canela tenían un efecto fugiestático sobre el crecimiento de *A.flavus*, lo que se confirma con el descenso de la inhibición pasados los primeros 15 días.

FIGURA III.11

Efecto -cida o -estático de la inhibición de los aceites esenciales

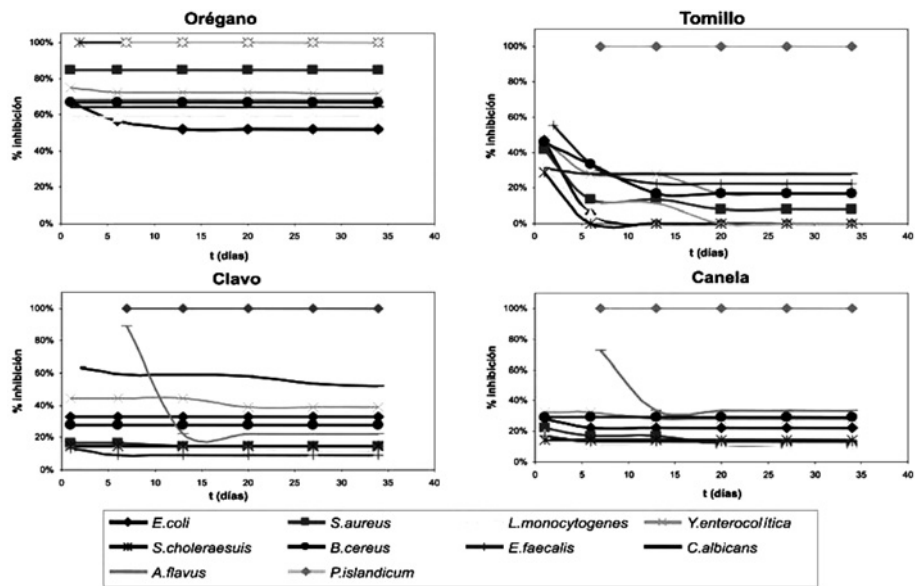
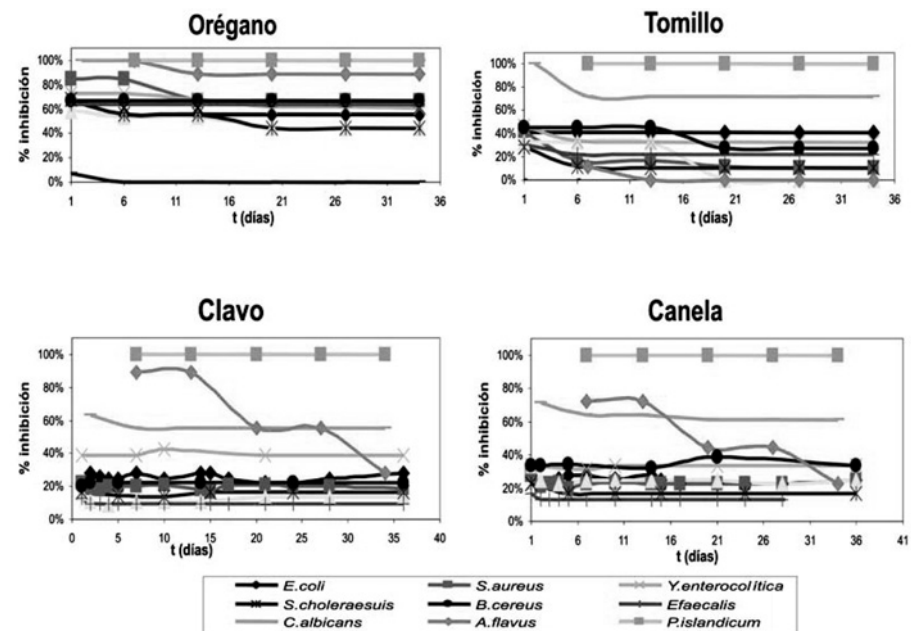


FIGURA III.12

Evolución de la inhibición durante 35 días



Tal y como cabría esperar teniendo en cuenta su comportamiento –estático, la inhibición producida por la esencia de tomillo disminuye con el tiempo para todos los microorganismos, excepto *P.islandicum*. El tiempo a partir del cual comienza a observarse la aparición de nuevas colonias varía en función del microorganismo.

4.3.3. Composición de las atmósferas generadas por las esencias

Las atmósferas generadas en el interior de la placa, cuando el papel de filtro se impregnaba respectivamente con 10 μ L de aceite esencial de canela, clavo, orégano, tomillo, albahaca y romero, se muestrearon durante 24 h con fibras retraídas de SPME, microextracción en fase sólida, (figura III.3). Posteriormente, las fibras se desorbían en el portal de inyección de un equipo GC-ITMS en las condiciones expuestas en el apartado 4.2.5.

La composición de las diferentes atmósferas y los cromatogramas obtenidos se muestra en la tabla III.13 y en las figuras III.13 y III.14. Diferentes combinaciones de terpenos (mono-, sesqui-), fenoles y derivados terpénicos (alcoholes, cetonas y ésteres), cuyo potencial antimicrobiano ya es conocido (Burt, 2004; Holley y Patel, 2005), constituyen la atmósfera activa.

De acuerdo a la tabla III.13, la gran efectividad del orégano se explica por su mayor contenido en carvacrol. Las investigaciones realizadas por Chrorianopoulos y Aligiannis con diferentes especies de orégano han demostrado la relación existente entre el poder inhibitorio y el contenido en carvacrol (Aligianinnis *et al.*, 2001; Chorianopoulos *et al.*, 2004).

La actividad antimicrobiana de los aceites de clavo y de canela parece deberse a la presencia de eugenol (Outtara *et al.*, 1997). Aunque estos aceites dan lugar a inhibiciones similares, en la atmósfera generada por la canela se detectaron un mayor número de compuestos interesantes, entre los que cabe destacar el (E)-cinamaldehído y el timol. Es bien conocido que la presencia de componentes minoritarios influye en la inhibición global (Mourey y Canillac, 2000; Gill *et al.*, 2002). Es posible, por tanto, que el cinamaldehído y el timol, compuestos calificados junto al carvacrol, como los más activos entre los detectados (Delgado *et al.*, 2004; Valero y Giner, 2006), sean los responsables de las diferencias observadas entre las esencias de canela y clavo. No obstante, son necesarios otro tipo de experimentos para explicar la posible sinergia entre el eugenol y estos compuestos.

La extraordinaria efectividad del aceite esencial de tomillo en la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos ha sido destacada en investigaciones recientes (Dafarera *et al.*, 2000; Rasoli y Mirmostafa, 2003), siendo las especies más activas las que contenían una mayor proporción de timol. La atmósfera generada por la esencia de trabajo de tomillo, en cambio, sólo contenía un 0,5% de timol, lo que explicaría los resultados obtenidos.

Aunque existen claras diferencias de actividad entre el aceite esencial de romero y el de tomillo, las atmósferas generadas por ambos incluyen muchos compuestos en común. Aparte de la presencia de timol y carvacrol, la proporción de α -pineno, β -pineno, borneol y canfor, para los que se ha demostrado cierta actividad, sobre todo en el caso del borneol (Scortichini y Rossi, 1991; Santoyo *et al.*, 2005), es más elevada en la atmósfera de tomillo. El 1,8-cineol, mayoritario en la atmósfera de romero, en cambio, no inhibe el crecimiento de *S.aureus* (Belai-che *et al.*, 1995).

El estragol es el componente principal de la atmósfera generada por el aceite esencial de albahaca, totalmente inefectiva en fase vapor. Bagamboula (Bagamboula *et al.*, 2004) ya ha demostrado la menor actividad de este compuesto frente al timol y carvacrol en la inhibición por contacto directo de *Shigella ssp.*

■ TABLA III.13

Compuestos detectados en las atmósferas generadas por las diferentes esencias

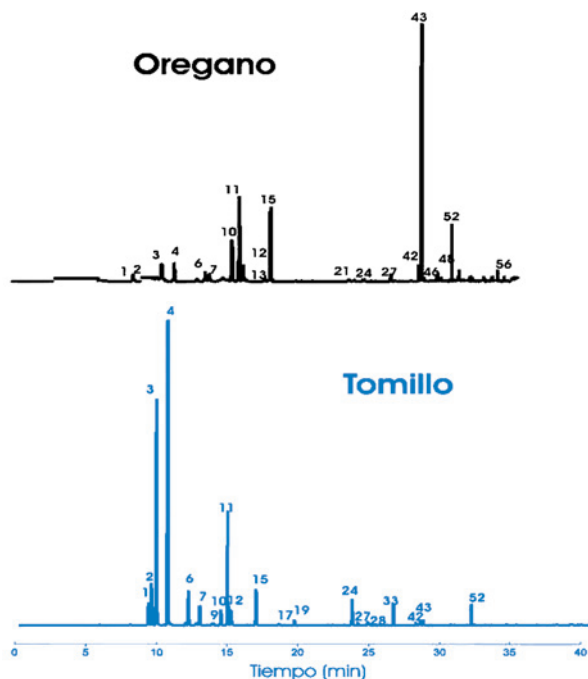
Compuestos	Canela	Albahaca	Romero	Clavo	Orégano	Tomillo
1 Triciclono	-	-	-	-	0,5±0,1	2,7±0,3
2 α-Tujeno	-	-	-	-	0,6±0,1	4,9±0,6
3 α-Pineno	1,1±0,4	0,1±0,0	3,8±0,7	-	5,1±1,6	28±6
4 Canfeno	0,4±0,2	-	1,8±0,4	-	5,0±0,6	41±9
5 Sabineno	-	-	-	-	-	0,3±0,1
6 β-Pineno	0,8±0,2	0,3±0,0	4,8±0,9	-	0,7±0,1	4,0±0,8
7 β-Mirceno	-	0,2±0,0	0,6±0,1	-	1,8±0,2	2,3±0,4
8 α-Felandreno	1,2±0,6	-	-	-	0,6±0,1	0,3±0,0
9 3-δ-Careno	-	-	-	-	-	0,3±0,1
10 α-Terpineno	-	-	-	-	10 ±1	1,9±0,3
11 p-Cimeno	1,2±0,1	-	1,3±0,6	-	20±1	15±3
12 Limoneno	0,9±0,5	0,2±0,0	1,0±0,4	-	4,3±0,3	2,3±0,6
13 1,8-Cineol	1,2±0,1	6,5±0,7	48±9	-	0,9±0,7	-
14 Cis-OCimeno	-	0,9±0,2	-	-	-	-
15 γ-Terpineno	-	-	0,3±0,0	-	18±1	4,6±1,2
16 β-Terpineol	-	-	0,1±0,1	-	-	-
17 α-Terpinoleno	-	-	0,2±0,0	-	0,2±0,0	0,3±0,1
18 L-Fenchona	-	0,3±0,1	-	-	-	-
19 Linalool	3,0±0,4	1,6±0,4	1,6±0,6	-	0,1±0,0	0,8±0,3
20 Fenchol	-	0,2±0,1	-	-	-	-
21 Canfor	0,4±0,3	1,1±0,4	17±4	-	0,2±0,1	0,1±0,0
22 Mentona	-	0,2±0,0	-	-	-	-
23 Citronelal	0,2±0,1	-	-	-	-	-
24 Borneol	0,2±0,0	0,2±0,0	2,9±1,5	-	0,2±0,1	3,7±1,6
25 Isopinocanfona	-	-	0,3±0,1	-	-	-
26 Mentol	-	1,6±0,0	-	-	-	-
27 1-Terpinen-4-ol	0,3±0,2	-	1,0±0,5	-	0,1±0,0	0,3±0,2
28 α-Terpineol	0,5±0,1	-	2,1±1,3	-	-	0,5±0,2
29 Estragol	1,7±0,5	82±1	1,5±0,4	0,2±0,1	-	-
30 Verbenona	-	-	0,1±0,0	-	-	-
31 Carvona	-	-	-	-	-	0,1±0,0
32 Isoborneol formato	-	-	-	-	-	0,1±0,0
33 Metiletertilil	-	-	-	-	-	2,6±1,5
34 Fenchil acetato	-	0,2±0,0	-	-	-	-
35 Pulegona	-	0,1±0,0	-	-	-	-
36 (Z)-Anetol	-	0,1±0,0	-	-	-	-
37 Borneol formato	-	-	-	-	-	0,4±0,2
38 (E)-Cinamaldehido	0,4±0,0	-	-	-	-	-
39 Bornil acetato	-	0,2±0,0	1,7±0,2	-	-	-
40 (E)-Anetol	-	0,4±0,3	-	-	-	-
41 Safrol	2,8±0,9	0,1±0,0	-	-	-	-
42 Timol	0,1±0,0	-	-	0,1±0,0	1,2±0,4	0,5±0,2
43 Carvacrol	-	-	-	-	21±5	0,5±0,1
44 (E)-Cinamil alcohol	0,1±0,0	-	-	-	-	-
45 α-Cubebeno	0,1±0,0	-	0,1±0,0	-	-	-
46 Eugenol	67±12	0,5±0,0	0,1±0,0	82±2	0,1±0,0	-
47 Bencenopropilacetato	0,1±0,0	-	-	-	-	-
48 α-Copaeno	2,1±0,7	-	0,4±0,2	-	0,2±0,1	0,1±0,1
49 β-Gurjuneno	-	-	-	-	-	0,0±0,0
50 α-Bourboneno	-	-	-	-	-	0,0±0,0

TABLA III.13 (continuación)

Compuestos	Canela	Albahaca	Romero	Clavo	Orégano	Tomillo
51 Metiletereugenol	-	0,2±0,1	-	-	-	-
52 β-Cariofileno	8,6±1,7	0,1±0,0	6,8±3,7	10±2	8,1±6,9	1,9±0,8
53 α-Bergamoteno	-	2,0±0,1	-	-	-	-
54 α-Aromadendreno	0,1±0,0	-	0,1±0,0	-	-	-
55 (E)-Cinamil acetato	0,7±0,1	-	-	-	-	-
56 α-Humulene	1,7±0,6	0,1±0,0	0,8±0,1	2,9±0,5	-	-
57 Germacreno D	-	-	-	-	-	0,1±0,0
58 α-Alloaromadendreno	-	-	0,2±0,0	-	0,3±0,3	-
59 β-Cubebene	-	0,1±0,1	-	-	-	-
60 γ-Muroleno	0,2±0,0	-	-	-	-	-
61 Ledeno	0,2±0,0	-	-	-	-	-
62 α-Muroleno	0,1±0,1	-	-	-	0,1±0,0	0,0±0,0
63 γ-Cadineno	-	0,2±0,0	0,2±0,0	-	-	-
64 Eugenol acetato	0,6±0,5	-	0,2±0,0	0,5±0,3	-	-
65 δ-Cadineno	0,3±0,1	-	0,3±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1	0,1±0,1
66 (Z)-Calameneno	0,1±0,0	-	-	0,3±0,0	0,0±0,0	-
67 Benzil benzoato	1,1±0,4	-	-	-	-	-
No identificados	0,5±0,2	1,1±0,1	0,6±0,8	0,5±0,2	0,1±0,1	0,1±0,0
TOTAL	100±1	101±1	99±1	100±3	100±9	119±11

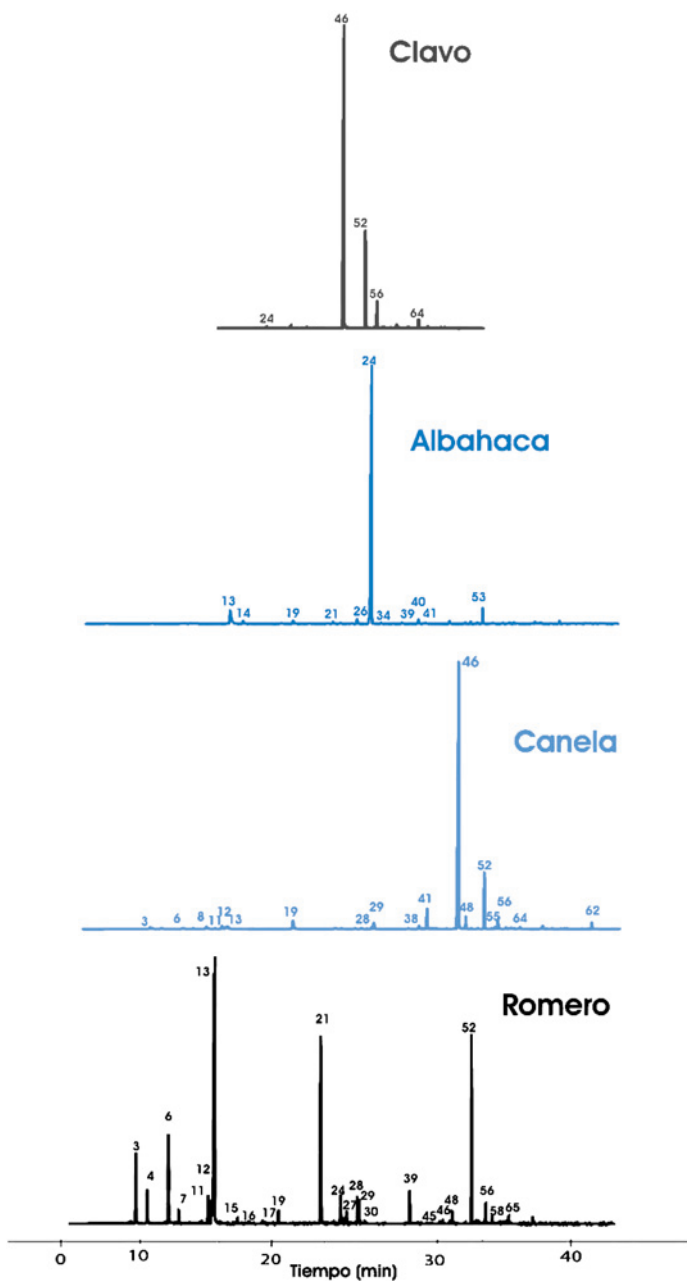
FIGURA III.13

Cromatogramas obtenidos al muestrear con SPME la atmósfera generada por las esencias de tomillo y orégano en el interior de una placa Petri. (Identificación, tabla III.13)



■ FIGURA III.14

Cromatogramas obtenidos al muestrear con SPME la atmósfera generada por los aceites esenciales de clavo, canela, romero y albahaca en el interior de una placa Petri. (Identificación, tabla III.13)



La relación existente entre la actividad antimicrobiana en fase gas y la composición de la atmósfera generada ha quedado patente en este capítulo. Los aceites esenciales de orégano, de clavo y de canela exhibieron una mayor capacidad de inhibición, que en un primer momento se atribuye a la presencia de carvacrol y eugenol en su composición. Salvo en el caso de *A. flavus*, donde únicamente se retardaba su crecimiento (efecto estático), para el resto de microorganismos se observó un efecto –cida que se prolonga hasta los 35 días.

La aplicación de los aceites esenciales a los envases activos constituye una opción prometedora, en la que se persigue una mejor y más prolongada conservación de los alimentos, con la sustitución de los agentes químicos por agentes naturales. Sin embargo, es necesario un estudio en mayor profundidad de los componentes individuales de las esencias, así como de las alteraciones organolépticas que pueden producir en los alimentos.

5. Actividad antimicrobiana en fase vapor de los componentes de las esencias naturales. Enriquecimiento de esencias: ¿sinergia, adición o antagonismo?

5.1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son una fuente natural de agentes antimicrobianos, entre los que se incluyen los derivados terpénicos, biosintetizados a partir de la condensación de la molécula de isopreno (1-metil,1,3-butadieno), y una mezcla de hidrocarburos, alcoholes, ácidos, aldehídos, cetonas y ésteres de bajo peso molecular. La actividad antimicrobiana por contacto directo de varios de estos compuestos, como benzaldehído, carvacrol, carvona, 1,8-cineol, cinamaldehído, citral, cuminaldehído, p-cimeno, estragol, eugenol, geranil acetato, geraniol, isoeugenol, limoneno, mentol, perilaldehído, α -pinene, salicilaldehído, terpineol, timol o vanillina, se ha evaluado frente al crecimiento de distintos microorganismo patógenos causantes de la alteración y deterioro de los alimentos en numerosos trabajos científicos (Moleyar y Narasimhanm, 1992; Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001; López-Malo *et al.*, 2002; Valero y Giners, 2006). Una de las conclusiones más relevantes es que la estructura química y la conformación geométrica de los agentes antimicrobianos son críticas a la hora de interactuar con los constituyentes de las células del microorganismo (Dorman y Deans, 2000; Fitzegard *et al.*, 2005; Veldhuizen *et al.*, 2006).

La posible incorporación de estos compuestos al alimento, adicionándolos directamente como conservantes, o indirectamente a través del envase, está limitada en la mayoría de los casos por las altas concentraciones necesarias para lograr una inhibición adecuada, que exceden, en la mayor parte de los casos, el umbral de percepción aceptado por el consumidor (Nazer *et al.*, 2005; Valero y Giners, 2006). En este contexto, las combinaciones entre compuestos, enriquecimiento de aceites esenciales en componentes activos y tecnologías de conservación adquieren una gran relevancia. En los últimos años se ha investigado el uso de tratamientos físico-químicos de conservación combinados con agentes naturales, obteniéndose resultados bastante prometedores (Karatzas *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2005; Mahmoud *et al.*, 2006a y 2006b).

Las combinaciones en todas su facetas posibles (agentes químicos, esencias naturales, tratamientos físico-químicos) pueden producir un efecto aditivo, sinérgico o antagónico. Se observa un efecto aditivo cuando la inhibición combinada es igual a la suma de las inhibiciones de los individuales. Se produce sinergia cuando la inhibición global es mayor que la suma de los efectos individuales y antagonismo en caso contrario, es decir, cuando el efecto combinado es

menor que el efecto de los individuales por separado. Las técnicas empleadas para detectar este tipo de interacciones entre agentes individuales son muy diversas y bastante laboriosas: curvas de muerte, factores FIC (concentración inhibitoria fraccional), E-test (White *et al.*, 1996).

En este capítulo se evalúa la actividad antimicrobiana en **fase gas** de varios constituyentes de las esencias naturales, estudiándose con más detalle aquéllos cuya atmósfera presenta una mayor efectividad. Asimismo, se contempla la posibilidad de adicionar estos componentes naturales, altamente activos, a los aceites esenciales de canela y tomillo, en un intento de potenciar su carácter antimicrobiano con la búsqueda de efectos sinérgicos entre sus componentes, minimizando la concentración necesaria de los mismos y de este modo la posibilidad de alterar las características organolépticas del alimento.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1. Microorganismos

Los microorganismos con los que se ha trabajado, así como sus condiciones de incubación (tiempo, temperatura y medio de cultivo) se muestran en la tabla III.9 del capítulo 4 de esta sección.

5.2.2. Aceites esenciales fortalecidos

Los aceites esenciales de tomillo y canela fortalecidos respectivamente con un 15-20% de timol y un 80-85% de cinnamaldehído en peso han sido suministrados por la empresa Artibal S.A. Teniendo en cuenta que el objetivo final de este capítulo de la Tesis Doctoral, es el desarrollo de un envase activo antimicrobiano se ha preferido trabajar con aceites esenciales de calidad comercial, donde la homogeneidad de sus propiedades físico-químicas está garantizada por la existencia de controles de calidad, al igual que su trazabilidad y accesibilidad. Además es requisito imprescindible en la actualidad que todos los componentes empleados estén autorizados, bien para formar parte del envase alimentario o como aditivos alimentarios. Los aceites esenciales utilizados en este trabajo poseen el certificado de "aditivo alimentario".

5.2.3. Estudios preliminares de la actividad antimicrobiana en fase vapor

Diez microlitros de una disolución al 50%(v/v) en dietil éter del compuesto a estudiar se impregnan en un disco de papel de filtro esterilizado de 10 mm de diámetro, que se dispuso en la tapa de una placa Petri libre de medio y enfrentado a 15 mL de medio solidificado. El agar había sido previamente inoculado con 100 mL de una disolución de suero fisiológico que contenía 10^6 CFU/mL de microorganismo puro. La placa se selló con parafilm. Pasado el tiempo de incubación, se evaluó la inhibición observada por medida directa del halo de inhibición, definido como la zona donde no hay crecimiento apreciable de microorganismos, y el halo de retardo, donde el aspecto externo de las colonias (forma, tamaño, color) es diferente. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada pareja compuesto-microorganismo.

La actividad antimicrobiana en fase vapor, tanto de los compuestos individuales como de las esencias fortalecidas, así como su carácter -cida o estático se determinaron según el procedimiento descrito en el epígrafe 4.2.3 del capítulo 4 de la presente sección.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Estudios preliminares de la actividad antimicrobiana en fase vapor

La actividad antimicrobiana en fase vapor de varios de los componentes individuales de las esencias descritas en el capítulo 4 (sección III), para los que existe constancia de su efectividad

por contacto directo (Scortichini y Rossi, 1991; Santoyo *et al.*, 2005), se evaluó según el procedimiento descrito en el apartado 5.2.3, frente a la inhibición de *L.monocytogenes* (bacteria Gram +), *S.choleraesuis* (bacteria Gram -), *C.albicans* (levadura) y *A.flavus* (moho).

■ TABLA III.14

Halo de inhibición (mm) y halo de retardo entre paréntesis (mm).^aInhibición total

Compuesto	<i>S. choleraesuis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>A. flavus</i>	<i>C. albicans</i>
Eugenol	18 (25)	0 (7)	47 (50)	51 (62)
Cinamaldehído	35 (38)	31 (33)	^a 90	82 (85)
Hidrocinamaldehído	35 (50)	0 (5)	10 (12)	82 (87)
Timol	50 (60)	72 (76)	60 (65)	^a 90
Carvacrol	41 (45)	52 (55)	80 (90)	^a 90
Canfor	0	0	0	0 (17)
Estragol	0	0	0	0
1,8-Cineol	0	0	0	0
<i>p</i> -Cimeno	0	0	0	0
β -Cariofileno	0	0	0	0
Limoneno	0	0	0	0
Linalool	9 (12)	0 (25)	0	5 (60)

Los resultados obtenidos para el timol, carvacrol, linalool, eugenol, cinamaldehído, hidrocinamaldehído, canfor, estragol, 1,8-cineol, *p*-cimeno, β -cariofileno, expresados en milímetros de inhibición y milímetros de retardo se muestran en la tabla III.14.

Únicamente los compuestos fenólicos (timol, carvacrol y eugenol) y los aldehídos (cinamaldehído e hidrocinamaldehído) presentaron algún tipo de inhibición frente al crecimiento de los microorganismos ensayados.

El eugenol, cuya efectividad en contacto directo frente a aerobios mesófilos, mohos y levaduras ya se había puesta de manifiesto (Valverde *et al.*, 2005), no inhibió el crecimiento de la bacteria Gram +, *L.monocytogenes*, siendo únicamente efectivo contra *C.albicans*, *S.choleraesuis* y *A.flavus*, aunque en menor grado que el timol y carvacrol. Dichos compuestos, timol y carvacrol, compuestos isómeros, proporcionaron resultados similares para la inhibición de *C.albicans*, *A.flavus* y *L.monocytogenes*, mientras que el timol fue significativamente ($p < 0,05$) más eficaz contra *S.choleraesuis*.

La importancia del grupo hidroxilo en la estructura fenólica se ha comprobado al comparar la actividad del timol, carvacrol y eugenol con sus respectivos derivados metil éter (Dorman y Deans, 1999) y metil (Veldhuizen *et al.*, 2006). La diferencia de efectividad entre timol y carvacrol para la inhibición de *S.choleraesuis* indica una cierta influencia de la posición del grupo hidroxilo. Además, el hecho de que el hidrocarburo cíclico monoterpeneo, *p*-cimeno, precursor biológico del carvacrol y del timol, no haya mostrado ningún tipo de actividad confirma la trascendencia del grupo fenólico. Sin embargo, el mecanismo de acción de este grupo de compuestos, a pesar del gran número de teorías publicadas (Prindle y Wright, 1977; Conner y Beuchat, 1984a y 1984b), no ha sido completamente elucidado. Davidson (Davidson, 2001) propone un conjunto de acciones entre las que se encuentran la inactivación de las enzimas esenciales, reacciones con la membrana celular y modificaciones del material genético.

El cinamaldehído y el hidrocinalaldehído, obtenido por hidrogenación del doble enlace, manifestaron el mismo grado de actividad frente al crecimiento de *C.albicans*. Sin embargo, la inhibición de *S.choleraesuis*, y sobre todo de *A.flavus* y *L.monocytogenes*, fue mucho mayor para el cinamaldehído. El grupo aldehído confiere a estos compuestos una gran electronegatividad, por lo que pueden tomar parte activa en procesos biológicos que impliquen una transferencia de electrones, reaccionando así con el nitrógeno presente en las proteínas y los ácidos nucleicos de los microorganismos. Cuanto mayor es la electronegatividad, mayor es la actividad antimicrobiana (Kurita *et al.*, 1979). Por consiguiente, las diferencias entre el cinamaldehído, con un doble enlace conjugado al grupo aldehído, y el hidrocinalaldehído, se originan por estas diferencias en electronegatividad.

En resumen, el timol, carvacrol y cinamaldehído, de manera coherente con los resultados presentados por Valero y Giners (Valero y Giners, 2006), fueron los compuestos más eficaces en la inhibición del crecimiento de microorganismos.

5.3.2. Estudio de la inhibición en fase vapor del cinamaldehído, timol y carvacrol

Conforme al esquema presentado al comienzo del capítulo, la actividad antimicrobiana de los compuestos cinamaldehído, timol y carvacrol en fase gas se estudió en mayor profundidad. Para ello, se calcularon sus respectivas MICs (concentración mínima inhibitoria) y sus curvas de inhibición.

La concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada compuesto en fase vapor, expresada en μL de esencia por litro de espacio de cabeza de la placa Petri, se muestra en la tabla III.15.

■ TABLA III.15

Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{L}/\text{L}$) en fase gas

	<i>S.choleraesuis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.flavus</i>
Cinamaldehído	4,4	21,8	4,4	21,8
Carvacrol	10,9	21,8	10,9	21,8
Timol	10,9	21,8	10,9	43,6

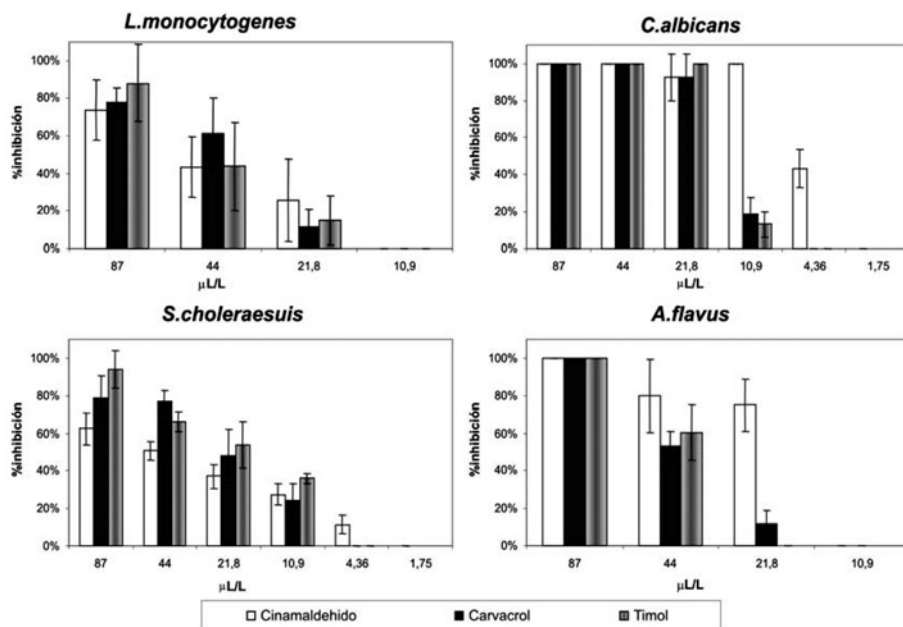
El valor MIC es el mismo para los tres compuestos frente al crecimiento de *L.monocytogenes*. Para *S.choleraesuis* y *C.albicans*, aunque se observó una inhibición similar en presencia de timol y carvacrol, y más débil que en presencia de cinamaldehído, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Carvacrol y cinamaldehído proporcionaron valores de MIC menores que el timol, es decir, mayor actividad, en la inhibición de *A.flavus*.

No se observaron diferencias en las curvas de inhibición de las bacterias *S.choleraesuis* y *L.monocytogenes* para los tres compuestos estudiados (figura III.15). Sin embargo, y en el caso de los dos hongos, *A.flavus* y *C.albicans*, los mayores porcentajes de inhibición se obtienen en atmósfera de cinamaldehído, a pesar de que su MIC es similar a la del carvacrol.

Por lo tanto, la dependencia de la concentración con la inhibición es diferente para bacterias y hongos. En las bacterias la actividad antimicrobiana disminuye paulatinamente con la concentración, mientras que en el caso de los hongos se advierte un descenso brusco para un valor de concentración próximo al valor de la MIC. A concentraciones superiores a este valor, el porcentaje de inhibición se mantiene constante y próximo al 100%.

FIGURA III.16

Curvas de inhibición en fase vapor del cinamaldehído, timol y carvacrol



5.3.3. Nuevos aceites esenciales enriquecidos en componentes activos

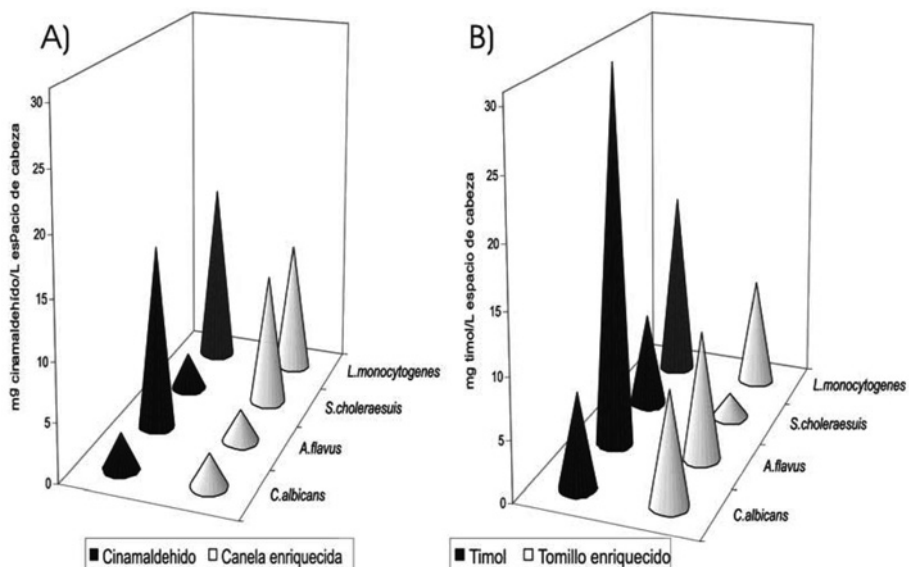
A la vista de los resultados anteriores, se plantea la siguiente cuestión, ¿sería posible aumentar la efectividad antimicrobiana de un aceite esencial, ya de por sí efectivo, enriqueciéndolo en uno o varios de sus componentes más activos? La idea de confeccionar una mezcla activa, combinando las propiedades antimicrobianas de los agentes naturales individuales con las características aromáticas de los aceites esenciales, amplía las aplicaciones y relaciones de mercado entre proveedores, fabricantes y consumidores, sin poner en peligro, en ningún caso, la salud de los consumidores. La legislación europea permite el uso de timol, carvacrol y cinamaldehído como agentes aromatizantes en alimentos (2002/113/CE), además de estar reconocidos por la FDA (Federal Drug Administración, EE.UU) como GRAS, (<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>) o sustancias generalmente reconocidas como seguras.

En este trabajo se contemplaron dos opciones: aceite esencial de canela enriquecido en cinamaldehído y aceite esencial de tomillo enriquecido en timol. La actividad antimicrobiana en fase vapor para ambas opciones se evaluó, como viene siendo habitual, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y de las curvas de inhibición.

Los resultados obtenidos para las MICs, expresadas en miligramos (mg) de sustancia activa (cinamaldehído o timol) por litro de espacio de cabeza se muestran en la figura III.16.

FIGURA III.16

Comparación de la concentración mínima inhibitoria obtenida para el componente individual y su respectiva esencia enriquecida



Al comparar las MICs para cada pareja, el agente individual y su respectivo aceite esencial fortalecido, se observa que las mayores actividades antimicrobianas se obtuvieron en el caso de la esencia enriquecida, exceptuando la inhibición de *S.choleraesuis* por cinamaldehído y canela enriquecida, lo que conduce a pensar en la existencia de un efecto sinérgico o aditivo entre el timol y el cinamaldehído con algún otro constituyente de los aceites esenciales de tomillo y canela respectivamente. La determinación de las sinergias o antagonismos (tabla III.16) se comprobó mediante el cálculo de los índices FIC (concentración inhibitoria fraccionada) para cada microorganismo (White *et al.*, 1996) como la relación MIC para A en combinación frente a MIC A puro, siendo A el agente antimicrobiano. La sinergia se caracteriza por $FIC \leq 0,5$; valores de $0,5 < FIC \leq 4$ indican un simple efecto aditivo o de indiferencia. El antagonismo se define por $FIC \geq 4$.

TABLA III.16

Evaluación de la presencia de efecto sinérgicos entre cinnaldehído-esencia de canela enriquecida y timol-esencia de tomillo enriquecida

	FIC Cinnaldehído	FIC Timol
<i>L.monocytogenes</i>	0,7	0,5
<i>S.choleraesuis</i>	3,6	0,3
<i>A.flavus</i>	0,1	0,4
<i>C.albicans</i>	0,9	1,2

Según los resultados de la tabla III.16, solamente el cinamaldehído presenta un efecto sinérgico con algún otro componente del aceite esencial de canela en la inhibición de *A.flavus*. Para el resto de microorganismos, existe un efecto aditivo que en el caso de *Salmonella choleraesuis* se caracteriza por un valor cercano a 4, cerca de la definición de antagonismo. El sinergismo entre cinamaldehído y eugenol, componentes de la atmósfera generada por la esencia de canela enriquecida, contra el crecimiento de *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* s.p. y *Enterobacter* s.p. ya se había descrito en la literatura científica (Moleyar y Narasimham, 1992).

Del mismo modo, se confirma la sinergia del timol con algún compuesto presente en la esencia de tomillo para casi todos los microorganismos estudiados, con excepción de *C.albicans*. Anteriormente, Lambert había demostrado la aparición de un efecto aditivo entre el timol y el carvacrol, ambos presentes en la atmósfera generada por el aceite esencial de tomillo fortalecido, frente a la inhibición de *S.aureus* y *Ps.aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001).

Las curvas de inhibición obtenidas para ambas esencias fortalecidas, frente a una gran variedad de distintos tipos de microorganismos, se muestran en la figura III.17.

Los aceites esenciales enriquecidos consiguen un mayor porcentaje de inhibición que sus respectivas esencias originales (figura III.6, capítulo 4), siendo substancialmente significativo el incremento de actividad logrado con la esencia de canela fortalecida frente a las bacterias Gram negativas y los hongos: consigue inhibir completamente el crecimiento de *P.islandicum*, *A.flavus*, y *C.albicans*, a concentraciones de 4,36, 34,9 y 26,2 μ L/L respectivamente. Asimismo, muestra mayor actividad contra *Ps.aeruginosa*, microorganismos distinguidos por su gran resistencia a las modificaciones del medio, que el aceite esencial de orégano (ver capítulo 4).

En conclusión, y con excepción de *Y.enterocolitica* (Gram-), *B.cereus* (Gram +) y *P.islandicum* (hongo), los microorganismos más susceptibles a la atmósfera generada por la esencia de tomillo enriquecida en timol fueron Gram - > Gram +> hongos, mientras que el orden de sensibilidad detectado en presencia de la atmósfera de canela fortalecida se modificó por hongos > Gram - \geq Gram +.

En las figuras III.18 y III.19, se muestran varios ejemplos de las inhibiciones conseguidas en fase vapor para los aceites esenciales enriquecidos. En el caso de *A.flavus* (figura III.18.C) hay que destacar que, aunque en las diluciones de 10, 15 y 20% (v/v) el hongo se ha desarrollado por toda la placa, se aprecia una diferencia tanto en color como en forma y tamaño de las colonias con respecto a la placa considerada como blanco.

FIGURA III.17

Curvas de inhibición para las esencias de canela y tomillo enriquecidas

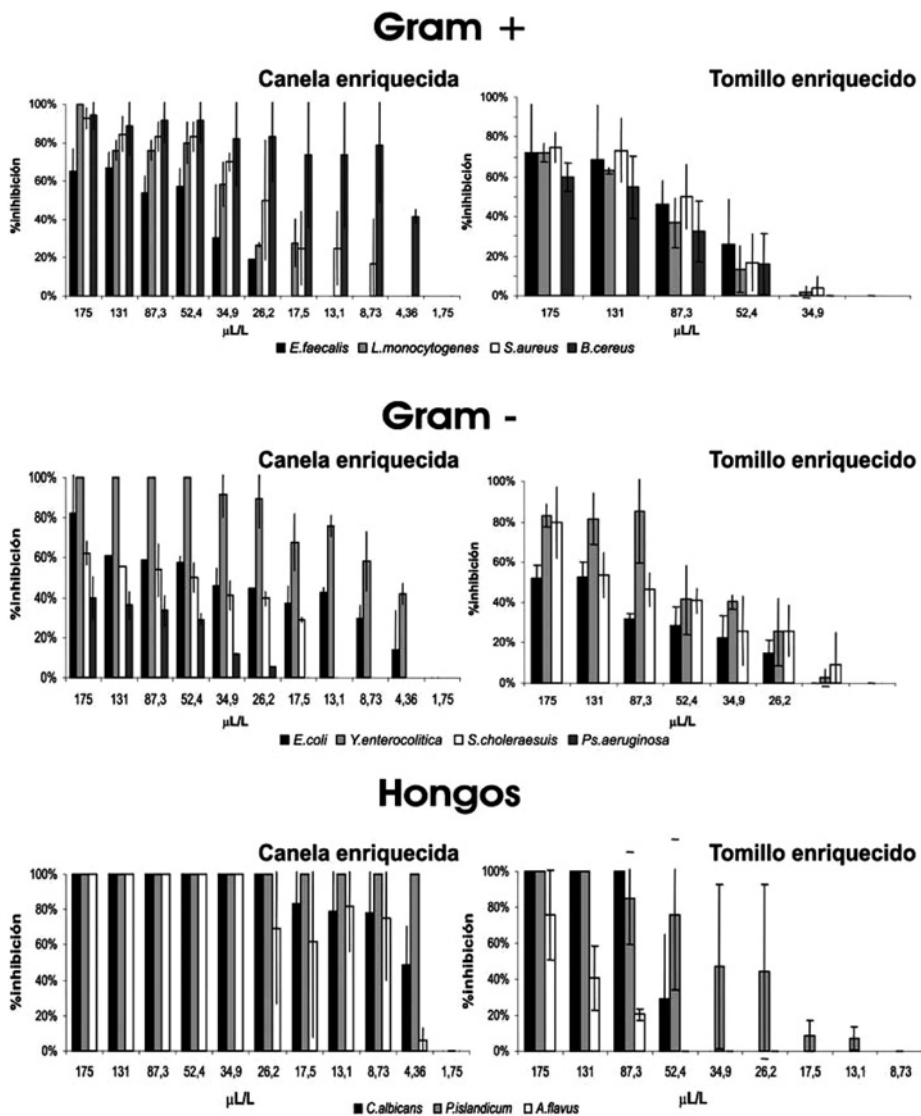
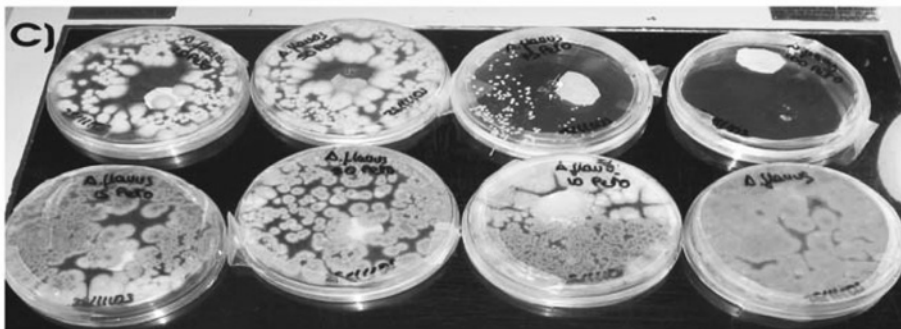
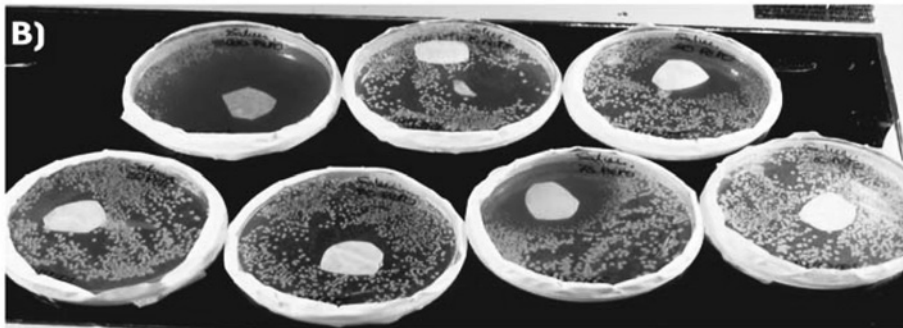
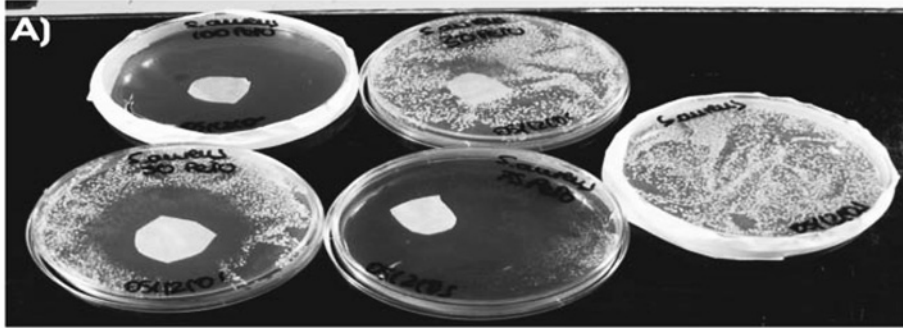


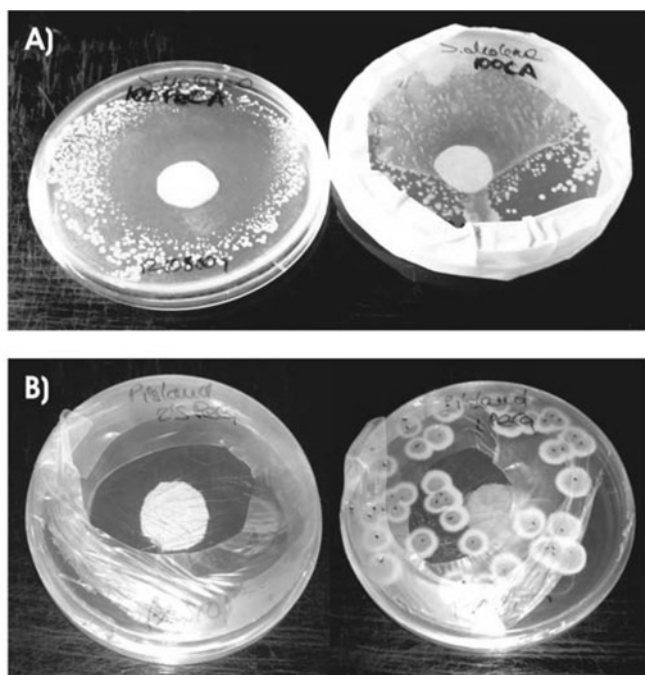
FIGURA III.18

Inhibición producida por la atmósfera del aceite de tomillo enriquecido. A) *S.aureus*: blanco (dcha) y diluciones de izqda a dcha y de arriba abajo al 100, 30, 50 y 75% (v/v). B) *S.choleraesuis*: diluciones de izqda a dcha y de arriba abajo al 100, 15, 50, 30, 20 y 75%(v/v) y blanco. C) *A.flavus*: diluciones (izda-dcha y arriba abajo) al 20, 50, 75, 100, 15, 30, 10% (v/v) y blanco



■ FIGURA III.19

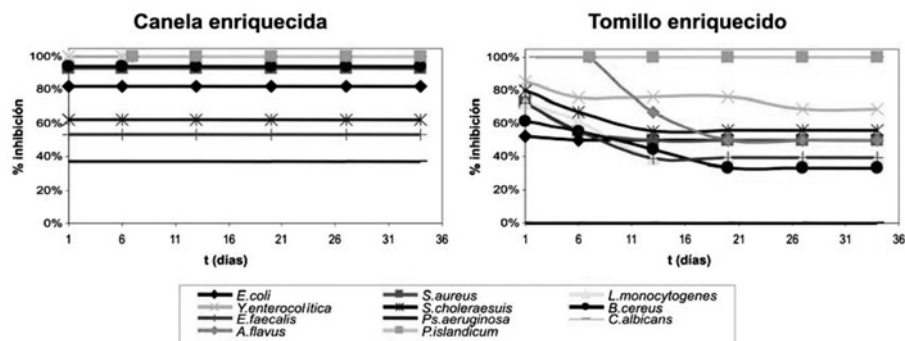
Inhibición producida por la atmósfera de canela enriquecida en cinamaldehído.
A) *S.choleraesuis*: comparación 100%(v/v) entre canela -dcha- y canela enriquecida -izqda-.
B) *P.islandicum*: dilución al 1% -izqda- y 2,5% -dcha- (v/v)



El aceite de canela enriquecido en cinamaldehído presenta una ventaja adicional a las ya mencionadas: el carácter -cida para todos los microorganismos ensayados, incluido el *A.flavus* (figura III.20). La esencia de tomillo fortalecida, por el contrario, posee un efecto -estático sobre *A.flavus*, *L.monocytogenes*, *E.faecalis* y *S.choleraesuis*. Estos microorganismos, una vez eliminado el foco que les ocasionaba el estrés, se desarrollan hasta alcanzar un nivel de crecimiento que se mantiene constante, en el caso de las bacterias, a los 14 días, y en el caso del moho, a los 21. Para una descripción más detallada del protocolo de ensayo, véase, epígrafe 4.2.3, capítulo 4.

FIGURA III.20

Efecto –cida o –estático para las esencias enriquecidas



La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de sus componentes individuales, así como de las posibles interacciones, beneficiosas (sinergismos), neutras (adiciones) o perjudiciales (antagonismos) que se establecen entre ellos. La estructura química de los compuestos individuales es clave en el mecanismo de inhibición, siendo los derivados fenólicos y aldehídos los agentes más activos, concretamente, timol, carvacrol y cinamaldehído. Dichas sustancias, en solitario o formando parte de esencias enriquecidas, pueden incorporarse a los envases alimentarios, y prevenir, mediante su liberación al espacio de cabeza, la proliferación microbiana. Por su actividad, eficacia y duración, destaca la esencia de canela enriquecida.

6. Efectividad de cinamaldehído, timol, carvacrol y eugenol en la conservación de queso y productos de bollería

6.1. INTRODUCCIÓN

Los mohos son los agentes alterantes más comunes en los productos de panadería, así como en el queso y derivados (Mortensen *et al.*, 2004; Nielsen, 2004).

La mayor parte de la contaminación fúngica observada en el pan blanco o de harina de trigo se debe a diversas especies de *Penicillium* (90-100%) y, en menor grado, a las especies *Aspergillus* y *Cladosporium*, especialmente en climas cálidos (Legan y Voysey, 1991). Las especies más abundantes son *Penicillium commune*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus sydowii* (Northolt *et al.*, 1995) y *Eurotium repens* en pan de centeno (Lund *et al.*, 1996).

Aunque se han aislado muchos mohos en el queso, realmente sólo unos pocos se consideran alterantes, siendo el más importante es el *P. commune*. Los mohos más prevalentes son, evidentemente, función del tipo de queso. Así, si se trata de un producto con alto contenido en sal, los mohos más relevantes son *P. nalgiovense* y *P. verrucosum*, mientras, que, si se trata de productos refrigerados la mayor parte de episodios descritos están relacionados con *P. solium* y de nuevo *P. nalgiovense*.

El uso de conservantes sintéticos, como ácido propiónico, sorbatos y benzoatos, añadidos directamente sobre el alimento, ha constituido durante varias décadas la principal técnica de conservación del pan y del queso. Sin embargo, las continuas exigencias y presiones del con-

sumidor hacia productos más naturales y con menor contenido en conservantes químicos sintéticos, han tenido como consecuencia la aplicación y el desarrollo de nuevas tecnologías de envasado. El envasado en atmósferas modificadas (MAP) consigue prolongar la vida útil de estos productos. Sin embargo, hay investigaciones que demuestran que en la mayor parte de las ocasiones la protección lograda es insuficiente para retardar el crecimiento de los mohos durante el tiempo requerido por el fabricante y el consumidor (Haasum y Nielsen, 1998). El envase activo, en el que los agentes naturales antifúngicos forman parte del mismo, se convierte, por lo tanto, en una técnica alternativa al uso de MAP y de conservantes químicos.

En los capítulos anteriores se ha comprobado la actividad antimicrobiana en fase vapor, tanto de varios aceites esenciales, como de sus componentes individuales. En este capítulo se evaluará la actividad antifúngica de los vapores generados por los componentes individuales, cinamaldehído, carvacrol, timol y eugenol frente al crecimiento de diversos mohos causantes de la alteración del queso y de los productos de panadería, en función de la actividad de agua (a_w) y del pH del alimento. El intervalo de actividad de agua y pH elegido describe el mayor rango de variedades de queso y productos de panadería existentes en el mercado, desde el queso y/o pan fermentado hasta bollería seca y relativamente alcalina, así como quesos maduros y salados. En las condiciones más propicias de a_w y pH para el crecimiento de mohos, se modela la inhibición conseguida por diferentes mezclas de los cuatro agentes individuales, con el fin de definir efectos sinérgicos en función de la composición de la atmósfera.

6.2. EXPERIMENTAL

6.2.1. Hongos

Los mohos utilizados en estos experimentos: *Penicillium nalgiovense* (IBT 12105), *Penicillium commune* (IBT 21314), *Penicillium roqueforti* (IBT 21319), *Aspergillus flavus* (IBT 21323) y *Eurotium repens* (IBT 1800), se obtuvieron de la colección de cultivos de Biocentrum-DTU (Danish Technical University, Lyngby, Dinamarca).

Las cepas se inocularon sobre agar extracto autolisado Czapek para levaduras (CYA), excepto *Eu.repens* que se inoculó sobre Agar Dichloran con 18% glicerol (DG-18). La composición de los medios de cultivo se muestra en la tabla III.17 (Samson *et al.*, 2000). Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C en oscuridad. A continuación las colonias se transfirieron a medio fresco y se volvieron a incubar otros 7 días en las mismas condiciones. La suspensión de esporas, conteniendo 10^6 - 10^8 esporas mL^{-1} se preparó en agua destilada con un 0,05% (m/v) de agar y 0,05% (m/v) de Tween-80.

■ TABLA III.17

Composición de los medios de cultivo

CYA (1000 mL)		DG-18 (1000 mL)	
Extracto de levadura	5,0 g	Glicerol Dicloran	25,8 g
Caldo Czapek	35,0 g	Glicerol anhidro	180,3 g
Agar	15,0 g	T Disolución de metales	0,82 mL
Disolución de metales	1 mL	Disolución de cloranfenicol	0,82 mL
Agua destilada (completar hasta 1 L)		Agua destilada	820 mL
		Clorotetraciclina ^b	8,2 mL

^aDisolución de metales: 1% (m/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5% (m/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada. ^bSe añade después de la esterilización.

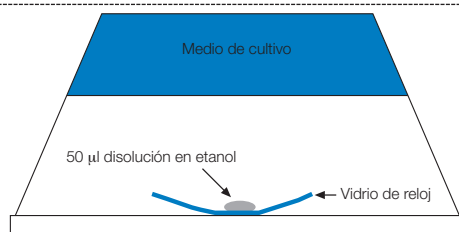
6.2.2. Preparación del medio de cultivo

En función de los experimentos a realizar se ajustaron los valores de actividad de agua y pH del medio de cultivo. La variación de la actividad de agua entre 0,82 y 0,97 se consiguió añadiendo distintas cantidades de cloruro sódico al medio. Para conseguir el pH adecuado se utilizaron disoluciones de HCl o NaOH de 0,1N y 0,01N. Una vez esterilizados los distintos medios, se comprobó el valor final del pH y de la actividad de agua.

Los diferentes medios de cultivo, una vez esterilizados, se vertían en el interior de unos botes de vidrio estériles de 440 mL de capacidad y se dejaban solidificar. Los medios de cultivo se inoculaban con la disolución de esporas correspondiente con una aguja en un punto discreto. A continuación, y sobre un vidrio de reloj estéril, se depositaban 50 μ L del agente microbiano correspondiente disuelto en etanol al 96%. El vidrio de reloj se colocaba sobre la tapa del recipiente. El bote invertido se cerraba herméticamente y se incubaba a 25 °C en oscuridad durante el tiempo requerido (ver figura III.21). Se realizaron blancos con etanol para comprobar el efecto que producía en el crecimiento de los mohos.

FIGURA III.21

Esquema del sistema empleado para medir la actividad antifúngica



6.2.3. Curvas de crecimiento

Se midió el diámetro de las colonias (en milímetros) después de la incubación a diferentes períodos de tiempo. En la primera serie de experimentos, donde se llevó a cabo el “screening” de las variables más influyentes y se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento, los diámetros de las colonias se midieron a los 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25 y 30 días. En los experimentos correspondientes a la determinación de la superficie de respuesta las mediciones se efectuaron a los 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 y 18 días. Las curvas de crecimiento para cada experimento se construyeron representado el diámetro de colonia frente al tiempo.

6.2.4. Diseño de experimentos

6.2.4.1 Variables más relevantes para los componentes individuales

Con el software MODDE 4.0 se realizó un diseño de experimentos D-Optimal con la actividad de agua (a_w) y el pH como variables cuantitativas y los componentes individuales de los aceites esenciales cinamaldehído, timol, carvacrol y eugenol al 50% (v/v) en etanol como variables de formulación (composición). El diseño obtenido consistía en 20 experimentos, con seis composiciones de medio diferentes, y con un experimento en el punto central por triplicado (ver tabla III.20).

6.2.4.2 Superficie de respuesta en función de la composición de la atmósfera

A la hora de determinar la superficie de respuesta, es necesario evitar la inhibición total del crecimiento del microorganismo a lo largo del tiempo de ensayo. Con este fin, y a partir de los resultados del screening, se fijaron para cada microorganismo unos valores de actividad de agua, pH y concentración para cada componente individual aislado (ver tabla III.18).

■ TABLA III.18

Condiciones de partida para el cálculo de la superficie de respuesta del modelo de mezcla proporcionado por la combinación de los agentes antimicrobianos individuales

	a_w	pH	% Ci	% Eu	% Ti	% Ca
<i>P.nalgiovense</i>	0,97	5	50	25	10	10
<i>Proqueforti</i>	0,97	5	10	50	20	20
<i>P.commune</i>	0,97	5	50	50	20	20
<i>A.flavus</i>	0,97	5	75	75	30	30
<i>Eu.repens</i>	0,92	6,5	75	20	20	20

La superficie de respuesta de la actividad antimicrobiana de las mezclas de agentes individuales, preparadas a partir de la composición descrita en la tabla anterior para cada compuesto individual, se calculó según el modelo cuadrático de mezcla con diseño simplex modificado centroide centrado en una cara. El software MODDE 4.0, de acuerdo con el modelo propuesto, diseñó una serie de experimentos donde se evaluaba la eficacia de 19 atmósferas de diferente composición (ver tabla III.19). El experimento correspondiente al punto central (atm 19) se realizó por triplicado.

■ TABLA III.19

Matriz de experimentos según el modelo de mezcla

	Cinamaldehído	Eugenol	Carvacrol	Timol
Atm 1	1	0	0	0
Atm 2	0	1	0	0
Atm 3	0	0	1	0
Atm 4	0	0	0	1
Atm 5	1/2	1/2	0	0
Atm 6	1/2	0	1/2	0
Atm 7	1/2	0	0	1/2
Atm 8	0	1/2	1/2	0
Atm 9	0	1/2	0	1/2
Atm 10	0	0	1/2	1/2
Atm 11	1/3	1/3	1/3	0
Atm 12	1/3	1/3	0	1/3
Atm 13	1/3	0	1/3	1/3
Atm 14	0	1/3	1/3	1/3
Atm 15	5/8	1/8	1/8	1/8
Atm 16	1/8	5/8	1/8	1/8
Atm 17	1/8	1/8	5/8	1/8
Atm 18	1/8	1/8	1/8	5/8
Atm 19	1/4	1/4	1/4	1/4

Las concentraciones de cinamaldehído, timol, eugenol y carvacrol fueron introducidas en el modelo como variables de formulación, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = a * Ci(w\%) + b * Eu(x\%) + c * Ti(y\%) + d * Ca(z\%) \quad \text{Eq[1]}$$

con a, b, c y d las proporciones de cada disolución individual; w%, x%, y% e z% la composición en volumen de partida del compuesto individual (tabla III.19) y Ci, Eu, Ti, Ca, los compuestos individuales, cinamaldehído, eugenol, timol y carvacrol, respectivamente.

Se cuantificó el porcentaje de inhibición a los 4, 10 y 18 días mediante la ecuación:

$$\%Inhibición = 100 - \left(\frac{T}{C} * 100 \right) \quad \text{Eq[2]}$$

donde T es el diámetro de la colonia del moho en el experimento con atmósfera antifúngica y C es el diámetro de la colonia del moho en el experimento considerado como blanco.

6.2.5. Análisis estadístico: Curvas de supervivencia

El análisis de supervivencia permite estudiar y construir modelos para analizar el tiempo que un suceso tarda en ocurrir, en función de distintas variables conocidas como variables pronósticas. Una característica inherente al análisis de supervivencia es la censura, que se puede definir como la ausencia de datos definitivos. Así, existen varios tipos de censura: censura por la izquierda, cuando el tiempo de supervivencia real es menor que el intervalo de tiempo observado; censura por la derecha, la más habitual, cuando el tiempo de supervivencia real es mayor que el intervalo observado.

Entre los diferentes tipos de modelos que se pueden emplear, uno de los más extendidos en medicina es el modelo de riesgos proporcionales, también conocido como modelo de Cox (Cox y Oakes, 1984), donde la función de riesgo (*hazard*) viene dada por:

$$h_i(t) = h_0(t) * \exp(\beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip}) \quad \text{Eq [3]}$$

Este modelo se denomina semiparamétrico, ya que la función de riesgo base o de referencia $h_0(t)$ no queda especificada y puede tomar cualquier forma. Al término $\beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip}$ se le denomina puntuación de riesgo, ya que un valor negativo grande corresponde a un perfil de riesgo menor que la media, mientras que un valor positivo grande de esa puntuación corresponde a un perfil de riesgo mayor que la media. La bondad del ajuste por el modelo de regresión de Cox se comprueba por el test estadístico de *Chi-cuadrado*.

6.2.6. Efecto sinérgico, aditivo o antagonico

La presencia de sinergismos, antagonismos o efectos aditivos se evaluó según el método propuesto por Dufour (Dufour *et al.*, 2003), donde además de la inhibición conseguida, se tienen en cuenta otra serie de parámetros relacionados con el crecimiento de los mohos. Las condiciones experimentales (actividad de agua, pH y concentración de los agentes individuales) se muestran en la tabla III.19.

Los agentes individuales, carvacrol, timol, eugenol y cinamaldehído, y sus combinaciones, se puntuaron en base a tres criterios:

- a) Incremento de la fase lag del moho.
- b) Reducción de la velocidad de crecimiento.

c) Porcentaje de inhibición transcurrido el tiempo de duración máximo del experimento. En este caso, 18 días.

Tanto la fase lag, como la velocidad de crecimiento se calcularon a partir de las curvas de crecimiento, obtenidas al representar frente al tiempo los diámetros de colonia medidos.

La fase lag se define como el tiempo requerido para que la colonia de moho alcance un diámetro de 0,2 mm. El incremento de la fase lag se calculó como la diferencia entre la fase lag del blanco (ausencia de agentes contaminantes) y la fase lag del compuesto o combinación de compuestos y se normalizó dividiéndolo por el tiempo de duración del experimento (18 días).

El segundo criterio tiene en cuenta la velocidad de crecimiento (mm colonia/día). La reducción en la fase de crecimiento se calcula como la diferencia en la velocidad de crecimiento entre el blanco y la muestra de estudio y se normaliza dividiéndola por la velocidad de crecimiento del blanco.

El tercer criterio corresponde al porcentaje de inhibición a los 18 días.

Cada criterio se evalúa sobre un total de 100 puntos.

Para la determinación del carácter de la combinación de los agentes individuales se siguió el siguiente criterio. Si la puntuación total del sistema es menor o igual que la puntuación más elevada obtenida por los agentes individuales, los compuestos actúan de manera antagonista. Si la puntuación final del sistema es mayor que la suma de las puntuaciones finales correspondientes a los compuestos individuales, existe una sinergia entre los componentes. Por último, si la puntuación total del sistema se sitúa entre estos dos valores límites, suma de la puntuación de los agentes individuales y puntuación más elevada del compuesto correspondiente, existe un efecto aditivo.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Variables más influyentes en el crecimiento de mohos. Análisis de supervivencia

El modelo de "screening" de los parámetros más relevantes y las respuestas obtenidas para los diferentes hongos se muestra en la tabla III.20.

La actividad de los componentes individuales de los aceites esenciales es mayor cuanto menor es la actividad de agua del medio. Salvo en el caso de *Eu.repens*, no se observó crecimiento de colonias a valores de actividad de agua distintas de 0,97, lo que confirma la teoría por la cual el crecimiento óptimo de los mohos del género *Penicillium* se obtiene para valores de a_w próximos a la unidad (Corry, 1987). El crecimiento de los mohos del género *Eurotium*, por el contrario, se ve favorecido por niveles bajos de actividad de agua (Suhr y Nielsen, 2004).

Asimismo, la disminución del pH afecta negativamente a la efectividad de los agentes microbianos, siendo el cinamaldehído el más susceptible. La eficacia de este compuesto reside en su electronegatividad, originada por la presencia de un grupo aldehído conjugado con un doble enlace. En medio ácido, estas estructuras se desestabilizan fácilmente al ser atacadas por los iones H^+ , con la consiguiente pérdida de actividad.

Se ha demostrado que las formas no disociadas de los compuestos fenólicos son más activas que las formas disociadas (Kabara 1991; Ultee *et al.*, 2002, López-Malo *et al.*, 2005). Dado los pK de los compuestos fenólicos: timol (10,6), carvacrol (10,6) y eugenol (10,2), se puede asumir que estas moléculas se encuentren prácticamente sin disociar a los pH de trabajo. Las diferencias detectadas a diferentes pH, dependen, por lo tanto, más de la naturaleza de los mohos, que de los agentes antimicrobianos. Así, se ha observado que carvacrol y eugenol inhiben en menor grado el crecimiento de los mohos de la familia *Penicillium* a pH 5 que a pH 6,5. Una disminución del pH mejora, en cambio, la efectividad antifúngica de estos compuestos frente a *Eu.repens* y *A.flavus*.





TABLA III.20

Diseño del experimento de screening y las respuestas obtenidas

Exper	a_w	pH	%Ci	%Eu	%Ti	%Ca	Crecimiento ^a				
							<i>P.com</i>	<i>P.roq</i>	<i>P.nalg</i>	<i>A.flav</i>	^b <i>Eu.rep</i>
N1	0,92	5	1	0	0	0					
N2	0,92	5	0	1	0	0					
N3	0,92	5	0	0	1	0					
N4	0,92	5	0	0	0	1					
N5	0,97	5	1	0	0	0					
N6	0,97	5	0	1	0	0					
N7	0,97	5	0	0	1	0					
N8	0,97	5	0	0	0	1					
N9	0,92	6,5	1	0	0	0					
N10	0,92	6,5	0	1	0	0					
N11	0,92	6,5	0	0	1	0					
N12	0,92	6,5	0	0	0	1					
N13	0,97	6,5	1	0	0	0					
N14	0,97	6,5	0	1	0	0					
N15	0,97	6,5	0	0	1	0					
N16	0,97	6,5	0	0	0	1					
N17	0,945	6,5	0,33	0	0,33	0,33					
N18	0,945	5,75	0,25	0,25	0,25	0,25					
N19	0,945	5,75	0,25	0,25	0,25	0,25					
N20	0,945	5,75	0,25	0,25	0,25	0,25					

Abreviaturas: Ci: cinamaldehído, Eu: eugenol, Ti: timol, Ca: carvacrol. *P.com*: *P.commune*, *P.roq*: *Proqueforti*, *P.nalg*: *P.nalgiovense*, *A.flav*: *Aspergillus flavus*, *Eu.repens*: *Eurotium repens*.

^aLos valores de censura/crecimientos se corresponden con la leyenda:

	Valor censurado (no se observa crecimiento en 30 días).
	Primer día con crecimiento observado entre el día 16 y el 30.
	Primer día con crecimiento observado entre el día 7 y el 15.
	Primer día con crecimiento observado entre el día 0 y el 6.

^bPara *Eu.repens* los valores de actividad de agua fueron 0,88 0,90 y 0,92 respectivamente.

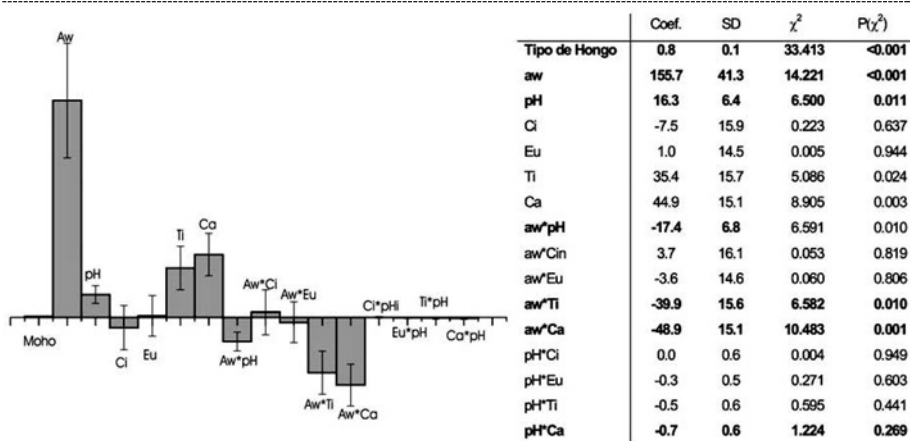
Proqueforti y *P.commune* mostraron la misma sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos, mientras que el *P.nalgiovense* fue más susceptible a la presencia de grupos fenólicos en la atmósfera, y especialmente al timol y carvacrol. El *Eu.repens*, en cambio, fue el moho más resistente.

Dadas las características del experimento, donde se evaluaba la aparición de crecimiento fúngico, suceso que sólo puede ocurrir una vez, se modelaron los resultados obtenidos mediante el cálculo de la curva de supervivencia. Como respuesta se empleó el día exacto en el que se detectó crecimiento, y no las respuestas etiquetadas de la tabla III.20. En la figura III.22 se muestran los coeficientes de los parámetros del modelo de supervivencia de Cox.

Las variables más significativas según el modelo de supervivencia de Cox fueron la actividad de agua, seguidas de la proporción de carvacrol, proporción de timol y de la interacción $a_w \cdot Ca$ y $a_w \cdot Ti$. El pH influye en el crecimiento de los mohos, aunque en menor medida que el resto de parámetros.

FIGURA III.22

Coefficientes del modelo de supervivencia de Cox. Ci: cinamaldehído, Eu: eugenol, Ti: timol, Ca: carvacrol



En negrita factores relevantes.

A partir de los resultados de este experimento, se fijaron unas condiciones óptimas para el crecimiento de cada moho, actividad de agua, pH y porcentaje de cada componente individual (tabla III.19), a partir de los cuales se efectuó el cálculo de la superficie de respuesta, como se ha explicado con anterioridad.

6.3.2. Superficie de respuesta en función de la composición de la atmósfera

Las superficies de respuesta obtenidas para los microorganismos *P.commune*, *P.nalgiovense*, *Eu.repens* y *Proqueforti*, que se muestran desde la figura III.23 a III.26, representan la inhibición obtenida a los 4, 10 y 18 días en función de la composición de la atmósfera. La mayoría de atmósferas consiguieron una inhibición total del hongo *A.flavus* durante el tiempo que transcurrió el experimento, por lo que no fue posible la determinación de la superficie de respuesta.

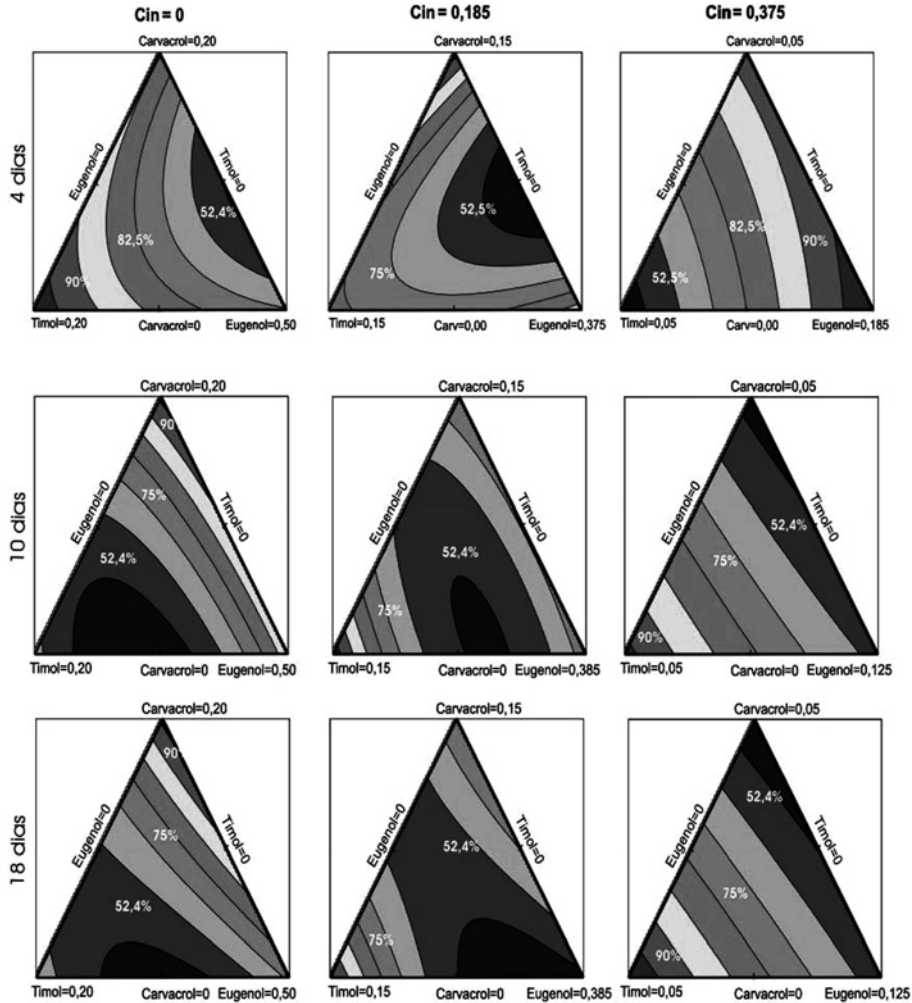
El cinamaldehído se correlaciona negativamente con la inhibición para *Proqueforti* y *P.commune*, lo que significa, tal y como se observa en las figuras III.23 y III.24, que cuanto mayor es la proporción de esta sustancia, menor es la actividad que se consigue. No obstante, este efecto puede verse compensado o reforzado según la proporción del resto de constituyentes de la atmósfera. Asimismo, en el caso del *Proqueforti*, la disminución en la inhibición se puede corregir disminuyendo el producto Ti*Eu (correlacionado también negativamente), es decir aumentando la proporción de carvacrol en la mezcla. El incremento de carvacrol en la composición de la atmósfera retarda también el crecimiento de *P.commune*.

La influencia que el timol y el eugenol ejercen sobre el crecimiento de *Eu.repens* (figura III.25) es opuesta, mientras que el aumento en la proporción de timol (correlacionado positivamente) favorece la inhibición, el incremento de la proporción de eugenol estimula el crecimiento del moho.

La evolución de la inhibición con el tiempo, depende del efecto que la composición de la atmósfera ejerce sobre la velocidad de crecimiento del microorganismo. Si la composición no interviene en la velocidad de crecimiento, independientemente de la proporción de los agentes

FIGURA III.23

Evolución de la inhibición con el tiempo para el crecimiento de *P.commune* en atmósferas con diferente composición de cinamaldehído (Cin), carvacrol, eugenol y timol



antimicrobianos en la mezcla, apenas se observarán variaciones en las superficies de respuesta, véase *Eu.repens*. En cambio, sí existirán diferencias significativas cuando la velocidad de crecimiento varíe en función de la composición de la atmósfera (véase *Penicillium*).

Como corolario, el análisis de regresión por PLS (partial least squared), que se presenta en la fig. III.27, ha demostrado que la concentración de cinamaldehído en la atmósfera es el factor más influyente en el crecimiento de los mohos del género *Penicillium*. El *Eu.repens*, en cambio, es más sensible a la presencia de eugenol o timol.

FIGURA III.24

Evolución de la inhibición con el tiempo para el crecimiento de *P.roqueforti* en atmósferas con diferente composición de cinamaldehído (Cin), carvacrol, eugenol y timol

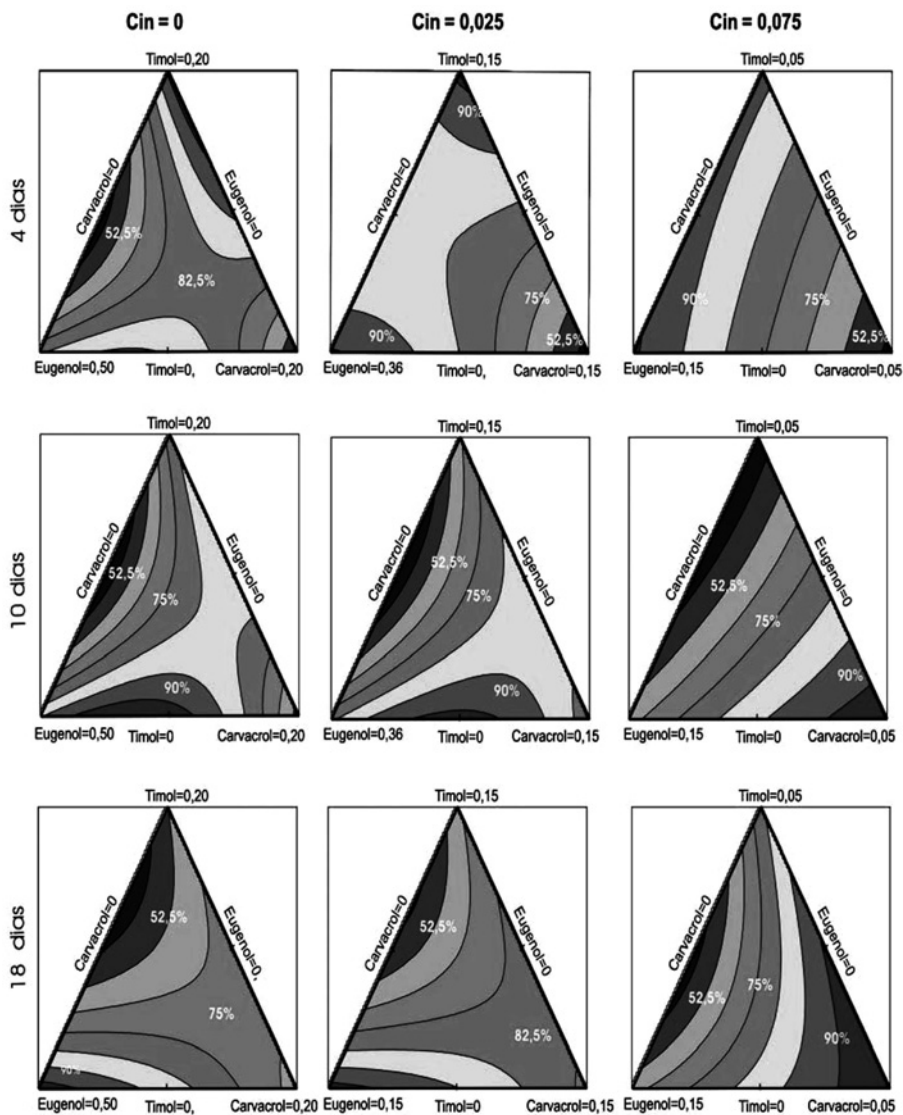


FIGURA III.25

Evolución de la inhibición con el tiempo para el crecimiento de *Eu.repens* en atmósferas con diferente composición de cinamaldehído (Cin), carvacrol, eugenol y timol

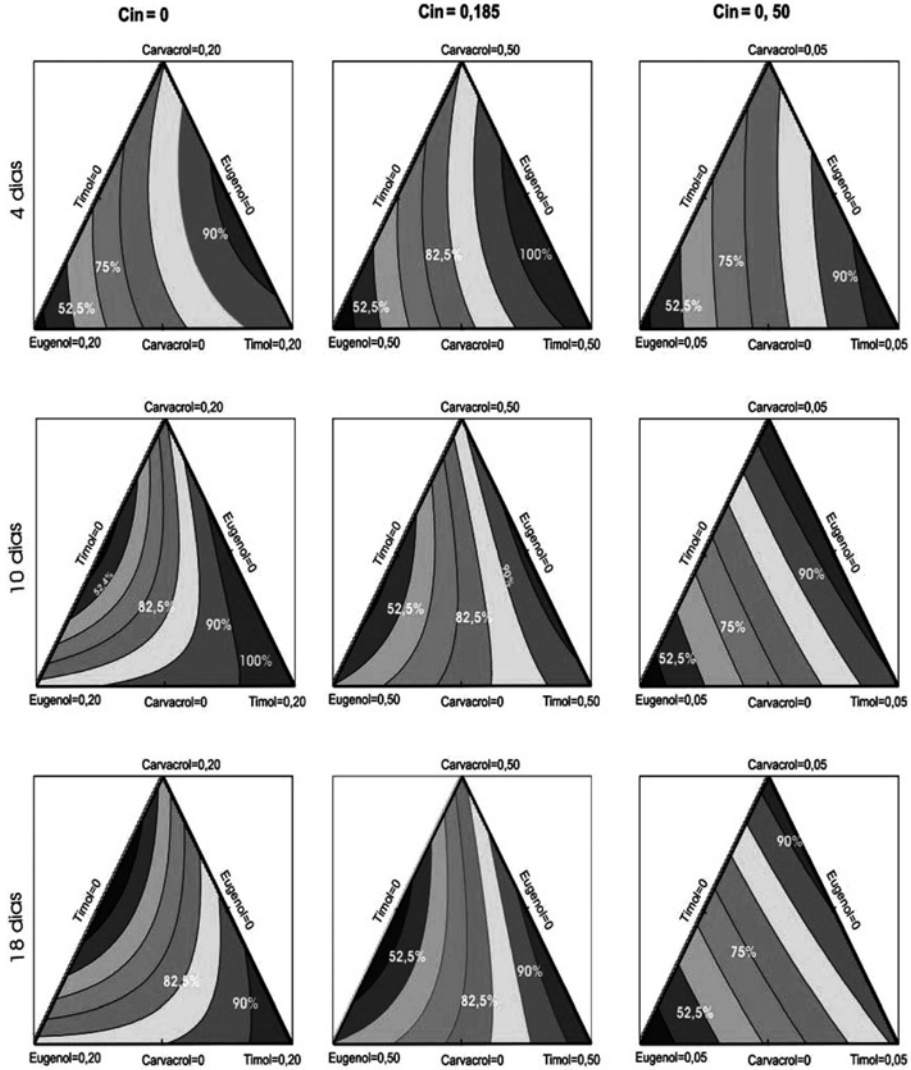


FIGURA III.26

Evolución de la inhibición con el tiempo para el crecimiento de *P.nalgiovense* en atmósferas con diferente composición de cinamaldehído (Cin), carvacrol, eugenol y timol

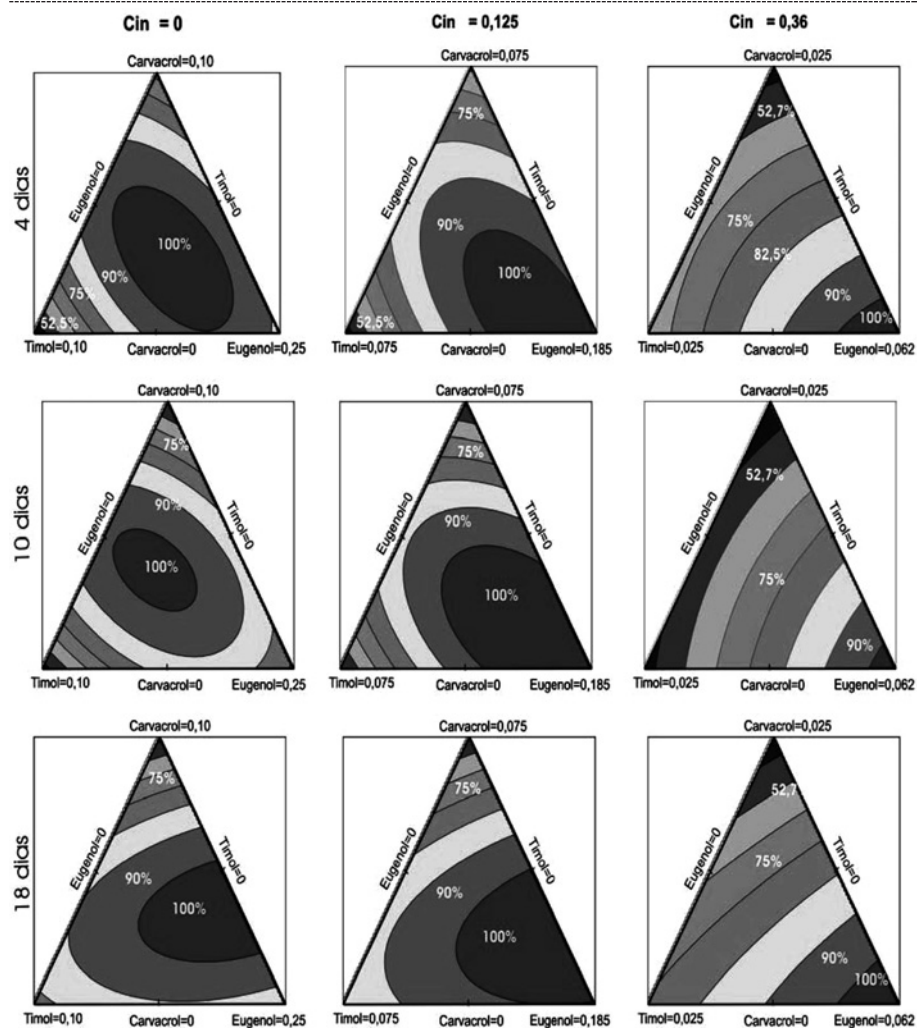
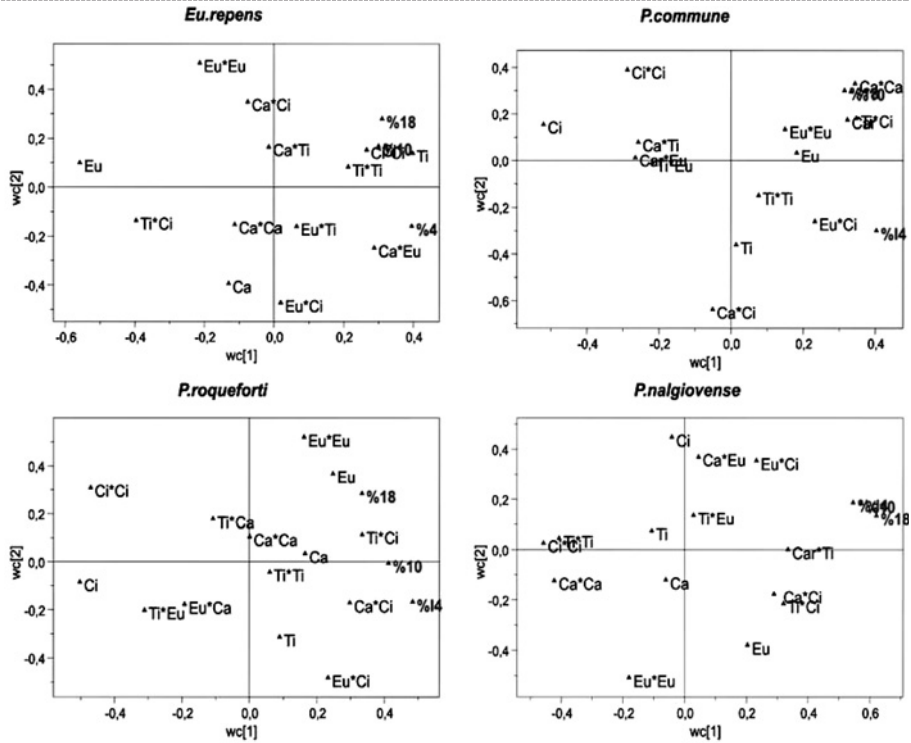


FIGURA III.27

Regresión PLS para el crecimiento de los microorganismos en función de la composición de cinamaldehído (Ci), carvacrol (Ca), Eugenol (Eu) y Timol (Ti)



%14 inhibición a los 4 días, %10: inhibición a los 10 días; %18 inhibición a los 18 días.

En la tabla III.21 se muestran los coeficientes R^2 (coeficiente de ajuste del modelo), Q^2 (coeficiente de predicción del modelo) y las variables más significativas (en negrita) para las superficies de respuesta obtenida.

■ TABLA III.21

Coefficientes R² y Q² y factores más relevantes (en negrita) para la inhibición de los mohos a los 4, 10 y 18 días

		R ²	Q ²	Factores relevantes
<i>P.com.</i>	%4	0,751	0,441	Ci*Ci; Ca*Ci
	%10	0,749	0,296	Ci; Ca*Ca; Eu*Eu; Ci*Ci; Ca*Eu; Ca*Ci; Ti*Eu; Ti*Ci; Eu*Ci
	%18	0,822	0,339	Ci; Ca*Ca; Ci*Ci; Ca*Ti; Ca*Eu; Ca*Ci ; Ti*Eu; Ti*Ci; Eu*Ci
<i>P.nalg.</i>	%4	0,582	0,101	Ci; Ca; Ti; Eu; Ca*Ci ; Ti*Eu ; Ti*Ci
	%10	0,762	0,152	Ci; Ca; Ti; Eu; Ca*Ci; Ca*Ti; Ca*Eu; Ti*Eu; Ti*Ci; Eu*Ci
	%18	0,876	0,175	Ca; Eu; Ca*Ci; Ca*Ti; Ca*Eu; Ti*Eu; Ti*Ci ; Eu*Ci
<i>P.roq.</i>	%4	0,969	0,491	Ci*Ci ; Ti*Eu ; Ti*Ci ; Eu*Ci
	%10	0,755	0,480	Ci; Ca; Ca*Ca; Ti*Eu;
	%18	0,739	0,391	Ci; Ca; Eu*Eu; Ti*Eu
<i>Eu.rep.</i>	%4	0,703	0,402	Ti
	%10	0,809	0,397	Ti ; Eu ; Ti*Ti ; Ca*Eu; Ca*Ci; Eu*Ci
	%18	0,694	0,366	Ti ; Eu ; Eu*Eu; Ca*Eu; Ca*Ci; Eu*Ci

Ci: cinamaldehído; Ti: timol; Eu: eugenol; Ca: carvacrol.

6.3.3. Efecto sinérgico, antagonico o aditivo entre los componentes

Entre los factores relevantes de los modelos calculados se encuentran varias combinaciones de componentes individuales. El carácter de las interacciones entre agentes individuales por contacto directo ha sido estudiado frente a la inhibición de las bacterias (Moleyar y Narasimham, 1992; Lambert *et al.*, 2001; Nazer *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia en literatura acerca del efecto combinado de los compuestos individuales en fase vapor frente al crecimiento de mohos

Las combinaciones entre cinamaldehído, timol, carvacrol y eugenol, como se mencionó en el capítulo anterior, pueden proporcionar un efecto sinérgico, antagonico o simplemente aditivo. Sin embargo, aunque a partir de la superficie de respuesta es posible intuir ciertas tendencias, es necesario un análisis en mayor profundidad para determinar el carácter de estas interacciones.

En la tabla III.22 se muestra, a modo de ejemplo, la puntuación obtenida para cada cepa de moho cuando se analiza el efecto del cinamaldehído y carvacrol, según la metodología descrita en el apartado 6.2.6.

■ TABLA III.22

Inhibición del crecimiento fúngico por combinación de cinamaldehído (Ci) y timol (Ti)

Criterio analizado	Puntuación por criterio			Puntuación más alta del conjunto	Suma de puntuaciones individuales	Puntuación global	Efecto
	Ci	Ti	Ci+Ti				
<i>P.commune</i>							
Lag phase	9	30	15	^a 90	^b 147	^c 93	Aditivo
Veloc. crec.	17	27	39				
%I18	31	33	39				
<i>P.nalgiovense</i>							
Lag phase	3	15	20	50	91	126	Sinergia
Veloc. crec.	30	26	40				
%I18	17	0	66				
<i>Proqueforti</i>							
Lag phase	0	38	48	159	172	238	Sinergia
Veloc. crec.	5	88	95				
%I18	8	33	95				
<i>Eu.repens</i>							
Lag phase	93	93	93	293	586	293	Aditivo
Veloc. crec.	100	100	100				
%I18	100	100	100				

^aPuntuación obtenida al sumar la puntuación individual más alta, i.e., 30+33+37=90. ^bPuntuación obtenida al sumar la puntuación de ambos individuales, 9+17+31+30+27+33=147. ^cPuntuación obtenida al sumar la puntuación de la combinación, i.e., 15+39+39=93.

De las combinaciones posibles, únicamente presentaron sinergia (tabla III.23), las mezclas de cinamaldehído y timol para *P.commune* y *P.nalgiovense* y la mezcla cinamaldehído-eugenol para *P.nalgiovense*. Esta mezcla, en cambio, tuvo carácter antagonístico para el resto de mohos, al igual que ocurrió con las combinaciones cinamaldehído-carvacrol y eugenol-timol. El incremento de la inhibición en fase gas para el resto de combinaciones se debe a un efecto aditivo.

■ TABLA III.23

Puntuación final obtenida para las combinaciones de cinamaldehído (Ci), carvacrol (Ca), timol (Ti) y eugenol (Eu)

Moho	Puntuación final para la combinación de los agentes antimicrobianos					
	Ci+Ca	Ci+Ti	Ci+Eu	Ca+Ti	Ca+Eu	Eu+Ti
<i>P.commune</i>	73 ^T	93 ^A	47 ^T	105 ^A	187 ^A	79 ^T
<i>P.nalgiovense</i>	104 ^A	126 ^S	298 ^S	118 ^A	113 ^T	128 ^A
<i>Proqueforti</i>	123	238 ^S	150 ^T	175 ^A	241 ^A	142 ^T
<i>Eu.repens</i>	191 ^T	293 ^A	79 ^T	293 ^A	31 ^T	193 ^T

S: sinergia; A: efecto aditivo; T: antagonismo. En negrita, los factores relevantes para el cálculo de la superficie de respuesta.

A la vista de los resultados expuestos en este capítulo, se puede concluir que la incorporación de agentes antifúngicos naturales en envases activos está limitada por las características físicas (actividad de agua y pH) del alimento a envasar. El efecto antimicrobiano se ve favorecido por la baja actividad de agua, por lo que no se necesitarán elevadas concentraciones de timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído para inhibir el crecimiento fúngico en este tipo de alimentos (quesos con alto contenido en sal y bollería seca, gama de alimentos objetivo del estudio). Del mismo modo se ha demostrado la menor eficacia del cinamaldehído a pH bajos por lo que es conveniente sustituirlo por timol o carvacrol cuando se envasen alimentos con marcado carácter ácido, como por ejemplo panes fermentados. Los isómeros carvacrol y timol, por lo general, proporcionan un efecto aditivo.

7. Evaluación de la atmósfera generada por distintas soluciones antimicrobianas en función del tipo del microorganismo y del tiempo de desarrollo mediante hs-sdme

7.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha demostrado en los capítulos anteriores, los compuestos volátiles, constituyentes de los aceites esenciales, son los responsables de la actividad antimicrobiana en fase vapor. La efectividad en la inhibición del crecimiento microbiano se debe tanto a la concentración e identidad del agente microbiano en el espacio de cabeza, como a la presencia de otros compuestos con efecto aditivo o sinérgico. Es imprescindible, por tanto, no solamente identificar los compuestos presentes en la atmósfera, sino también cuantificarlos para poder comprender mejor su mecanismo y modo de acción.

Existen numerosas técnicas de muestreo apropiadas para fase vapor. Una de las alternativas más empleadas es microextracción en fase sólida (SPME). SPME es una técnica barata, de fácil manejo y respetuosa con el medio ambiente ya que no implica el uso de disolventes orgánicos, con la que se han obtenido resultados de gran calidad en el análisis de los componentes volátiles de los aceites esenciales (Adam *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005 y 2006). Sin embargo, a causa del limitado, aunque creciente número de fases estacionarias disponibles, y de la necesidad de un calibrado externo para la cuantificación, se han buscado métodos alternativos de muestreo, siendo la microextracción por gota (SDME) probablemente la alternativa más prometedora (Jeannot y Cantwell, 1996; He y Lee, 1997; Word *et al.*, 2004).

En la técnica aplicada al muestreo en fase vapor, HS-SDME, una gota, de entre 1 y 3 μL de un disolvente orgánico (medio extractante) suspendida sobre la punta de una jeringa, se expone a la fase vapor a muestrear durante el tiempo y la temperatura requeridos. Tras el muestreo, la gota se retrae en el cuerpo de la jeringa y se inyecta directamente en el equipo de análisis correspondiente.

En el caso de la extracción de compuestos orgánicos del espacio de cabeza generado por una muestra líquida, la cantidad de analito (n) extraída por la microgota en el equilibrio puede describirse de acuerdo a la ecuación [4] (Przyjazny y Kokosa, 2002; Shariati-Feizabadi *et al.*, 2003). Esa ecuación es análoga a la ecuación que describe la cantidad de analito extraída por una fibra de SPME en un sistema de tres fases (Górecki y Pawliszyn, 1997; Pawliszyn, 1997):

$$n = \frac{K_{oh} K_{hm} V_o C_0 V_m}{K_{oh} K_{hm} V_o + K_{hm} V_h + V_m} \quad \text{Ec[4]}$$

donde K_{oh} y K_{hm} son las constantes de reparto del analito entre el espacio de cabeza/disolvente orgánico de la microgota y la muestra/espacio de cabeza, respectivamente. V_o , V_h y V_m son los volúmenes de la gota, el espacio de cabeza y la muestra y C_o es la concentración inicial del analito en la muestra líquida.

Previo al análisis, es necesario optimizar una serie de parámetros (Przyjazny y Kokosa, 2002; Shen y Lee, 2003) tales como la naturaleza del disolvente de extracción, el volumen de la gota, la temperatura de extracción, el volumen de muestra (tanto del espacio de cabeza, como de la muestra líquida, en su caso), la agitación o el tiempo de extracción. Comparada con SPME, las principales ventajas de HS-SDME residen en el gran abanico de disolventes de extracción que se pueden elegir, con la posibilidad de seleccionar mezclas binarias o ternarias de disolventes orgánicos, así como en la facilidad para añadir en la gota un estándar interno de inyección, mejorando la cuantificación o, en caso de ser necesario, un agente derivatizante.

Los microorganismos desarrollan mecanismos de resistencia frente a las variaciones del entorno. Las bacterias reaccionan de forma diferente frente a los bactericidas, bien por su metabolismo interno, capaz de asimilar y transformar los agentes antimicrobianos, bien por el desarrollo de mecanismos de resistencia o por modificaciones genéticas (Cloete, 2003). Así por ejemplo, el cinamaldehído, uno de los agentes antimicrobianos más activos según se demostró en los capítulos anteriores, se biotransforma en alcohol cinnámico (Smith *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000). Las bacterias del género *Pseudomonas* metabolizan el eugenol para producir derivados metoxifenólicos aromáticos, como la vainillina (Rabenhorst, 1996). Igualmente, se han propuesto varios mecanismos para la transformación de terpenos bajo determinadas condiciones (Demyttenaere y De Kimpe, 2001; Demyttenaere *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2003; Lindmark-Herinksson, 2004).

En este capítulo se va a estudiar la composición de la atmósfera generada por los aceites esenciales más activos, de acuerdo a los estudios anteriores, es decir, orégano, tomillo, canela y los aceites enriquecidos de canela y tomillo, en el interior de una placa Petri, en función del tiempo de aplicación y del tipo de microorganismo inoculado. Como técnica de muestreo de la atmósfera se empleará la HS-SDME, previamente optimizada.

7.2. EXPERIMENTAL

7.2.1. Optimización del volumen de gota y tiempo de muestreo

Distintos volúmenes de *p*-xileno con una concentración de 6 µg/g de verbenona en *p*-xileno se suspende de la punta de una jeringa de 5 µL Hamilton 85RN con una aguja tipo 26S/51 mm. Como estándar interno se escogió un terpeno, verbenona, ausente en la composición de los aceites esenciales a muestrear (ver tabla III.13).

La gota, de volumen conocido, se suspende durante el tiempo requerido en el interior de un vial de 20 mL. Para la optimización, la atmósfera de terpenos (≈ 100 ng/mL) ha sido generada 24 horas antes, mediante la adición en diferentes viales de 5 µL de una disolución de terpenos, con una concentración aproximada de 1 µg/g en dietil éter. Estos viales se habían almacenados durante 24 horas a la temperatura de muestreo, 30 °C, con el fin de que se produjera la generación de una atmósfera estable y totalmente desarrollada. Transcurrido el tiempo de muestreo, la microgota se retrae en la jeringa y se inyecta directamente en el portal de inyección de un GC/MS.

7.2.2. Microextracción en gota para el muestreo de atmósferas (HS-SDME)

Una gota de 2,5 μL de 6 $\mu\text{g/g}$ de verbenona en *p*-xileno se suspende durante 5 minutos en el interior de una placa Petri, dispuesta según se describe en el siguiente párrafo. Pasado ese tiempo, la gota se retrae y se inyecta en un GC/MS.

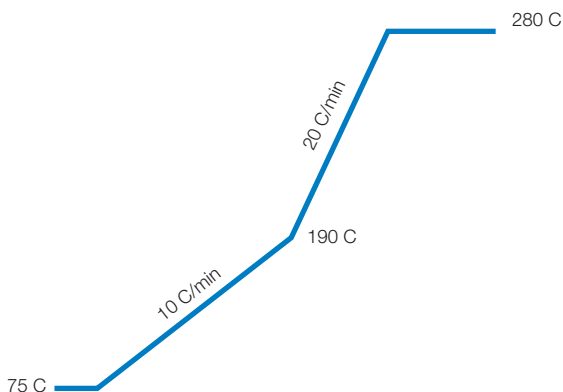
Las placas Petri, con agar solidificado, han sido previamente inoculadas con 100 mL de una disolución de suero salino fisiológico que contenía 10^6 - 10^8 CFU/mL de microorganismo puro. Los microorganismos inoculados fueron una bacteria Gram +, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644); una bacteria Gram -, *Salmonella choleraesuis* (CECT 4000); una levadura, *Candida albicans* (ATCC 64550) y un moho, *Aspergillus flavus* (CECT 2687). Sobre la tapa libre de medio se colocaba un disco de papel de filtro estéril que se impregnaba con 10 mL de aceite esencial puro: orégano, canela, tomillo, canela enriquecida en cinamaldehído y tomillo enriquecido en timol (ver capítulo 4). El conjunto se sellaba con cinta adhesiva y se incubaba a 30 °C. Los muestreos se realizaron en el instante inicial y a las 6, 24, 72 y 168 horas de incubación. Como blancos se consideraron placas Petri con agar, pero sin inóculo. Todos los ensayos (5 microorganismos x 5 esencias x 5 tiempos) se llevaron a cabo por triplicado.

7.2.3. Análisis: cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis de las muestras se efectuó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas 5973 como detector. La columna capilar escogida para separar los analitos fue una HP-5 MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μm de espesor). La temperatura de inyección fue 270 °C, en modo splitless durante 18 s. El programa de temperaturas del horno cromatográfico se muestra en la figura III.28.

FIGURA III.28

Programa de temperatura del horno cromatográfico

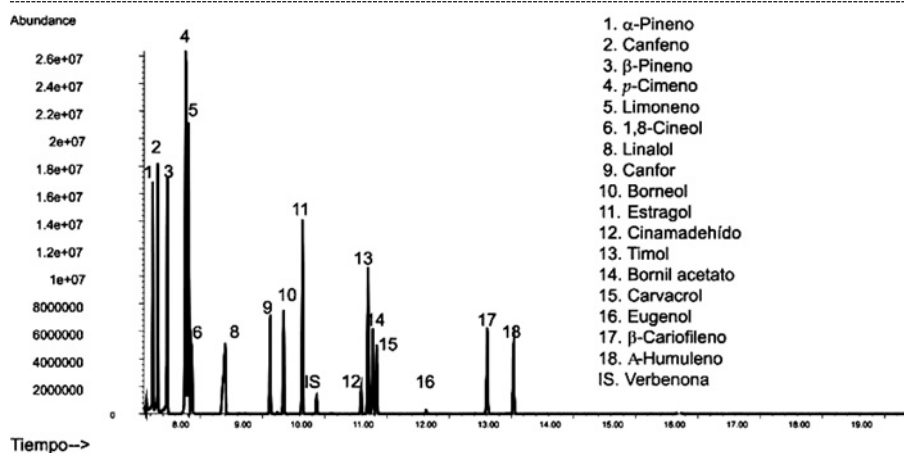


La temperatura de la interfase fue de 280 °C y el flujo de gas portador, helio de 99,999 pureza, constante a 1 mL/min. La optimización de la cromatografía se realizó en modo scan, en un rango de 45 a 250 m/z y a una velocidad de barrido de 6,61 u.m.a/s. La cuantificación de los compuestos seleccionados se realizó en modo SIM (Selective Ion Monitoring), con las siguientes relaciones masa/carga siguiente: α -pineno, canfeno, β -pineno, α -terpinoleno y linalol, m/z

93 y 121; *p*-cimeno, limoneno y 1,8-cineol, *m/z* 119, 68 y 134; canfor, borneol y estragol, *m/z* 95 y 148; verbenona, *m/z* 107 y 135; cinamaldehído, timol, bornil acetato y carvacrol, *m/z* 131, 135 y 95; eugenol, *m/z* 164; β -cariofileno, *m/z* 133 y 105 y α -humuleno, *m/z* 93. En la figura III.29 se muestra un ejemplo de cromatograma.

FIGURA III.29

Cromatograma del espacio de cabeza generado por una solución de terpenos



7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1 Optimización de los parámetros de muestreo

Debido a las características del muestreo, vapor generado por los aceites esenciales en el interior de una placa Petri durante el período de incubación a 30 °C, el número de variables a optimizar queda reducido a tres: disolvente de extracción, volumen de gota y tiempo de muestreo. La temperatura de muestreo, 30 °C se fija por las condiciones de incubación de los microorganismos, mientras que el volumen de muestra se mantuvo en 10 μ L de esencia pura, de acuerdo al trabajo desarrollado en los capítulos 4 y 5 de esta sección.

La elección del disolvente determina en gran parte la sensibilidad, precisión y selectividad de la extracción. En general, un buen disolvente de extracción debe cumplir una serie de requisitos (Shen y Lee, 2003):

- No debe ser excesivamente volátil (temperatura de ebullición elevada y baja presión de vapor) para evitar pérdidas por evaporación durante el período de extracción.
- Debe extraer los analitos cuantitativamente. La extracción se favorece si la polaridad del disolvente se asemeja a la de los analitos.
- Debe proporcionar una cromatografía adecuada. El pico de disolvente debe estar perfectamente separado del resto de los analitos, así como no propiciar la aparición de colas ("tailing") por arrastre.
- No debe contener impurezas.

En un trabajo anterior, Romero (Romero *et al.*, 2006) empleó *n*-hexadecano (T_{eb} 287 °C) como disolvente de extracción, con resultados satisfactorios para la extracción de los terpenos más volátiles (α -pineno, canfeno, canfor). Sin embargo, para estos experimentos, fue necesario escoger un nuevo disolvente, debido a la similitud entre el punto de ebullición del mismo con alguno de los compuestos de mayor interés (trans-cinamaldehído, timol, carvacrol o eugenol), así como la aparición de colas (efecto “tailing”) en la cromatografía. Entre los diferentes disolventes ensayados, se eligió *p*-xileno (T_{eb} 138,3 °C), ya que su volumen de gota se mantenía estable durante tiempos de muestreo en torno a 5 minutos, proporciona una extracción cuantitativa para todos los analitos de interés y su cromatografía permitía la detección del compuesto de interés más volátil, α -pineno (T_{eb} 155 °C).

En general, la cantidad de analito extraído en la microgota aumenta cuanto mayor es el tiempo de exposición en el espacio de cabeza. Sin embargo, la técnica HS-SDME no es un método exhaustivo de extracción ya que la masa de analito total se divide entre el espacio de cabeza y el solvente de la microgota en función de la constante de reparto del sistema. Evidentemente, la cantidad de analitos transferida será máxima cuando se alcance el equilibrio y hasta ese momento se incrementa con el tiempo de extracción. Sin embargo, para un análisis cuantitativo no es práctico ni necesario que se alcance dicho equilibrio; es suficiente con que las condiciones de extracción sean reproducibles y proporcionen la sensibilidad adecuada (Tankeviciute *et al.*, 2001; Yamini *et al.*, 2004).

El máximo volumen de gota (μL) viene determinado, en primer lugar, por la máxima cantidad que se puede suspender de la jeringa con un número asumible de pérdidas. En segundo lugar, hay que tener presente el volumen que alcanza la gota líquida al expandirse en el inyector como consecuencia de la temperatura. Se requiere un volumen menor que el volumen del inserto empleado (ref: 19251-60540 de Supelco), cuyas dimensiones son: 78,8 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno. El volumen expandido de la gota se calculó en función de la compresibilidad del disolvente (*p*-xileno), la temperatura de inyección (270 °C) y la naturaleza del gas portador (helio) con ayuda del software Hewlett-Packard FlowCalc® 2.0.

El volumen de gota y el tiempo de muestreo se optimizaron mediante el cálculo de la superficie de respuesta. Se utilizó un diseño de experimentos CCF, cúbico centrado en las caras, correspondiendo el valor óptimo al máximo tiempo de muestro y máximo volumen de gota (tabla III.24).

■ TABLA III.24

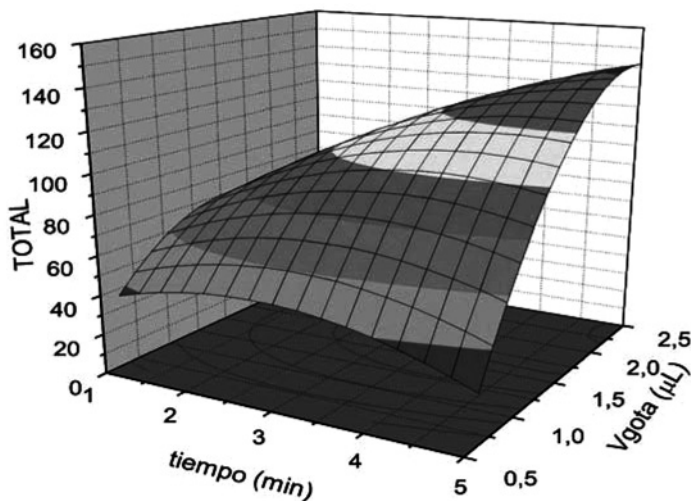
Dominio experimental y valor óptimo de los factores considerados para el muestreo por HS-SDME de la atmósfera generada en el interior de la placa Petri

Factor	Rango experimental	Valor óptimo
Volumen gota (μL)	0,5-2,5	2,5
Tiempo de muestreo (min)	1-5	5

La superficie de respuesta para el total de los analitos (figura III.30) confirma que la extracción aumenta con el volumen de gota, debido al incremento en el área de intercambio de la interfase gas-líquido. Para volúmenes de gota comprendidos entre 0,5 y 1,5 μL , la extracción aumenta con el tiempo hasta un máximo de 3 min. A partir de 3 min, la evaporación del disolvente de la gota y la posible transferencia de analitos en sentido contrario, es decir, de la gota al espacio de cabeza, producen una disminución en la respuesta. Para volúmenes de gota mayores de 1,5 μL , el tiempo de extracción favorece la transferencia de masa, por la mayor superficie de intercambio.

FIGURA III.30

Superficie de respuesta para la extracción por HS-SDME



En las condiciones óptimas se evaluó la precisión del método mediante el cálculo de la repetitividad o variación de la respuesta en intervalos pequeños de tiempo ($n=10$). Los resultados para los 18 analitos de interés, expresados como el porcentaje de la variación estándar relativa (%RSD) se muestran en la tabla III.25.

TABLA III.25

Repetitividad (%RSD) de los analitos de interés por HS-SDME ($n=10$)

Compuesto	%RSD	Compuesto	%RSD	Compuesto	%RSD
α -Pinoeno	5	Canfeno	9	β -Pinoeno	7
<i>p</i> -Cimeno	10	Limoneno	8	1,8-Cineol	5
α -Terpinoleno	10	Linalol	11	Canfor	9
Borneol	14	Estragol	9	Cinamaldehído	8
Timol	12	Bornil acetato	15	Carvacrol	4
Eugenol	10	β -Cariofileno	8	α -Humuleno	12

La precisión del método es ligeramente inferior a la obtenida por Romero (Romero *et al.*, 2006) para la extracción de los terpenos más volátiles, pero similar a la obtenida en otros trabajos centrados en los componentes más pesados (Besharati-Seidani *et al.*, 2005; Fakhari *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006).

7.3.2. Cuantificación de las atmósferas generadas por los aceites esenciales

Los compuestos volátiles presentes en la atmósfera se transfieren al disolvente de extracción en función de su constante de reparto, según la ecuación (5).

$$K = \frac{C_h}{C_o} \quad \text{Eq [5]}$$

donde K es la constante de reparto a una temperatura T fija, C_h es la concentración del analito en el espacio de cabeza y C_o es la concentración de analito en el disolvente orgánico, en este caso en la gota.

Es evidente que el tiempo de muestreo no es suficiente para alcanzar el equilibrio, de manera que las constantes calculadas no pueden ser calificadas de constantes de reparto. Por lo tanto, se ha adoptado la nomenclatura de pseudo-constante de reparto (K_s), para hacer referencia a este hecho.

Para el cálculo de K_s , se siguió el siguiente procedimiento:

- Calibración de la señal (área) en el GC-MS en función de la concentración de los analitos diluidos en *p*-xileno (ver tabla III.26).

■ TABLA III.26

Calibrado. Señal obtenida en el cromatografo ($Y=A_{\text{analito}}/A_{\text{SI}}$) en función de la concentración ($X=C_{\text{analito}}/C_{\text{SI}}$). SI: estándar interno (verbena)

Compuesto	Calibrado	Rango X	Compuesto	Calibrado	Rango X
α -Pinoeno	$Y=5,14 \cdot X+1,38$ $Y=5,40 \cdot X-0,03$	2,12-126 0-2,12	Canfeno	$Y=5,29 \cdot X+1,63$ $Y=5,74 \cdot X-0,01$	2,57-153 0-2,57
β -Pinoeno	$Y=5,14 \cdot X+2,91$ $Y=5,85 \cdot X-0,01$	2,08-124 0-2,08	<i>p</i> -Cimeno	$Y=9,78 \cdot X+1,04$ $Y=12,3 \cdot X+0,07$	2,31-138 0-2,31
Limoneno	$Y=3,87 \cdot X+3,19$ $Y=4,54 \cdot X+0,06$	2,15-129 0-2,15	1,8-Cineol	$Y=1,65 \cdot X+1,42$ $Y=1,94 \cdot X-0,01$	2,35-141 0-2,35
α -Terpinoleno	$Y=2,68 \cdot X-0,11$ $Y=2,62$	0,15-25,5 0-0,15	Linalol	$Y=9,50 \cdot X+11,5$ $Y=5,14 \cdot X+0,46$	0,14-27,1 0-0,14
Canfor	$Y=2,92 \cdot X+0,11$ $Y=2,92 \cdot X$	2,08-125 0-2,08	Borneol	$Y=6,34 \cdot X+0,30$ $Y=5,24 \cdot X-0,03$	2,07-124 0-2,07
Estragol	$Y=3,69 \cdot X-0,52$ $Y=3,67 \cdot X-0,07$	2,37-142 0-2,37	Cinamaldehído	$Y=2,77 \cdot X+3,09$ $Y=1,92 \cdot X-0,14$	3,19-191 0-3,19
Timol	$Y=7,86 \cdot X-1,23$ $Y=6,88 \cdot X-0,11$	2,06-123 0-2,06	Bornil acetato	$Y=3,51 \cdot X+0,29$ $Y=3,56 \cdot X-0,02$	2,30-127 0-2,30
Carvacrol	$Y=7,71 \cdot X-2,57$ $Y=6,25 \cdot X-0,18$	2,12-127 0-2,12	Eugenol	$Y=2,95 \cdot X-3,09$ $Y=1,75 \cdot X-0,13$	3,28-196 0-3,28
β -Cariofileno	$Y=3,79 \cdot X+1,67$ $Y=4,00 \cdot X-0,02$	2,16-129 0-2,16	α -Humuleno	$Y=4,19 \cdot X+2,80$ $Y=4,66 \cdot X-0,03$	2,29-137 0-2,29

- Muestreo de atmósferas de concentración conocida. En viales de 20 mL sellados herméticamente, se introdujeron 5 μ L de una disolución de terpenos de concentración conocida en dietil éter. El vial se calentó a 80 °C durante 4 min para evaporar el disolvente y generar la atmósfera, y a continuación se muestreo su atmósfera a 30 °C en las condiciones optimizadas ($t=5$ min, $V_{\text{gota}}=2,5$ μ L).
- Cálculo de la pseudo-constante de reparto, K_s , como la pendiente de la recta que se obtiene al representar gráficamente la concentración en la atmósfera (suponiendo que la totalidad de los 5 μ L se han evaporado) frente a la concentración en el disolvente de extracción (calculada a partir de la recta de calibrado, tabla III.26). Las pseudos-constantes de reparto adimensionales a los 5 minutos, K_s , obtenidas para los 18 analitos se muestran en la tabla III.27.

TABLA III.27

Pseudos-constantes de reparto a los 5 min (K_5) entre el aire y el *p*-xileno a 30 °C

Analito	$K_5 \cdot 10^3$	Analito	$K_5 \cdot 10^3$
α -Pinoeno	4,01±0,55	Canfeno	3,90±0,44
β -Pinoeno	3,58±0,32	<i>p</i> -Cimeno	3,16±0,47
Limoneno	3,12±0,36	1,8-Cineol	3,97±0,44
α -Terpinoleno	10,9±0,15	Linalol	6,66±0,20
Canfor	3,36±0,29	Borneol	5,32±0,57
Estragol	3,15±0,20	Cinamaldehído	4,31±0,11
Timol	10,6±0,07	Bornil acetato	4,59±0,23
Carvacrol	13,1±0,16	Eugenol	58,7±9,20
β -Cariofileno	4,26±0,21	α -Humuleno	4,81±0,17

Previamente, se comprobó que la constante de reparto era independiente de la presencia de otros compuestos. Se calculó la K_5 para una atmósfera de un único componente (*p*-cimeno, timol y α -humuleno). Los valores determinados de K_5 en las atmósferas unicomponente para los tres compuestos eran similares ($p < 0,05$) a los valores de K_5 en la atmósfera multicomponente.

7.3.3. Evolución de la atmósfera generada por diferentes aceites esenciales en el tiempo en función de la presencia y tipo de microorganismo

Empleando la técnica HS-SDME y las pseudos-constantes de reparto a los 5 minutos (tabla III.27), se determinó la composición de las atmósferas generadas por los aceites esenciales de canela, tomillo y orégano, así como las esencias enriquecidas de tomillo y canela (ver capítulo 5 de esta sección), a distintos tiempos, y en función de la presencia de diferentes tipos de microorganismos (*Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*).

Las diferencias en la composición de las atmósferas se estudiaron mediante un análisis por componentes principales (PCA), siendo necesarias 4 componentes principales para explicar el 75% de la varianza (figura III.31).

La primera componente principal (PC1), que explica el 39% de la varianza, distingue la evolución de la atmósfera de tomillo con el tiempo y el tipo de microorganismo. Se correlaciona positivamente con α -pinoeno, canfeno, β -pinoeno, *p*-cimeno, α -terpinoleno, linalol y β -cariofileno.

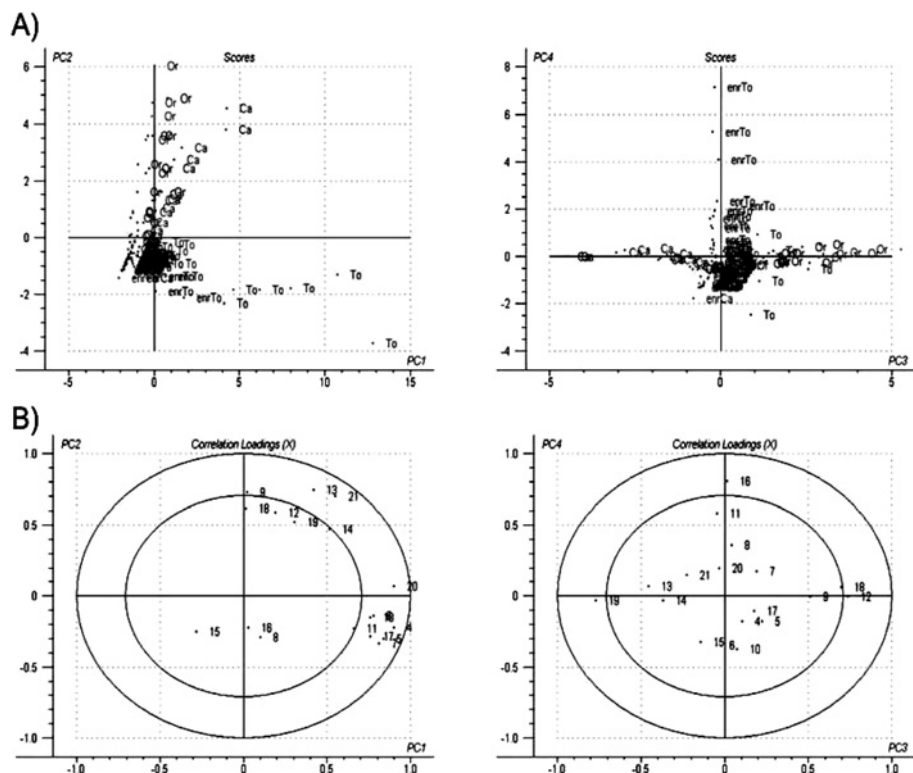
La segunda componente principal (PC2) explica el 19% de la varianza. Diferencia las atmósferas generadas por los aceites de canela y orégano, que se caracterizan por la presencia de 1,8-cineol, borneol, estragol, carvacrol, eugenol y α -humuleno.

La tercera componente principal (PC3) separa estas dos esencias, ya que se correlaciona positivamente con la concentración de carvacrol y canfor (presentes en la atmósfera generada por el orégano) y negativamente con la concentración de eugenol (compuesto característico de la atmósfera de canela). Por último, la cuarta componente principal (PC4), que explica el 9% de la varianza, define el comportamiento de la esencia de tomillo enriquecida en timol, siendo precisamente la cantidad de este compuesto la que establece las diferencias con el tiempo y la presencia de microorganismo.

La mayor variación temporal en cuanto a la composición se detectó en las primeras 6 horas. En el instante inicial las atmósferas de las esencias son ricas en sus componentes más volátiles (figura III.32). Así, la concentración de α -pinoeno representa, respectivamente, un 20% y un 13% de la composición inicial de la esencia de canela y orégano; el canfeno un 43% de la com-

FIGURA III.31

Análisis por componentes principales para el muestreo de la atmósfera generada por el aceite esencial de canela (Ca), tomillo (To), orégano (Or), tomillo enriquecido en timol (enrTo), canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa).



A) Muestras B) Variables. PC1 39%, PC2 19%, PC3 13% y PC4 9%. Compuestos: 4. α -pineno, 5. canfeno, 6. β -pineno, 7. *p*-cimeno, 8. limoneno, 9. 1,8-cineol, 10. α -terpinoleno, 11. linalol, 12. canfor, 13. borneol, 14. estragol, 15. cinamaldehído, 16. timol, 17. bornil acetato, 18. carvacrol, 19. eugenol, 20. β -cariofileno, 21. α -humuleno.

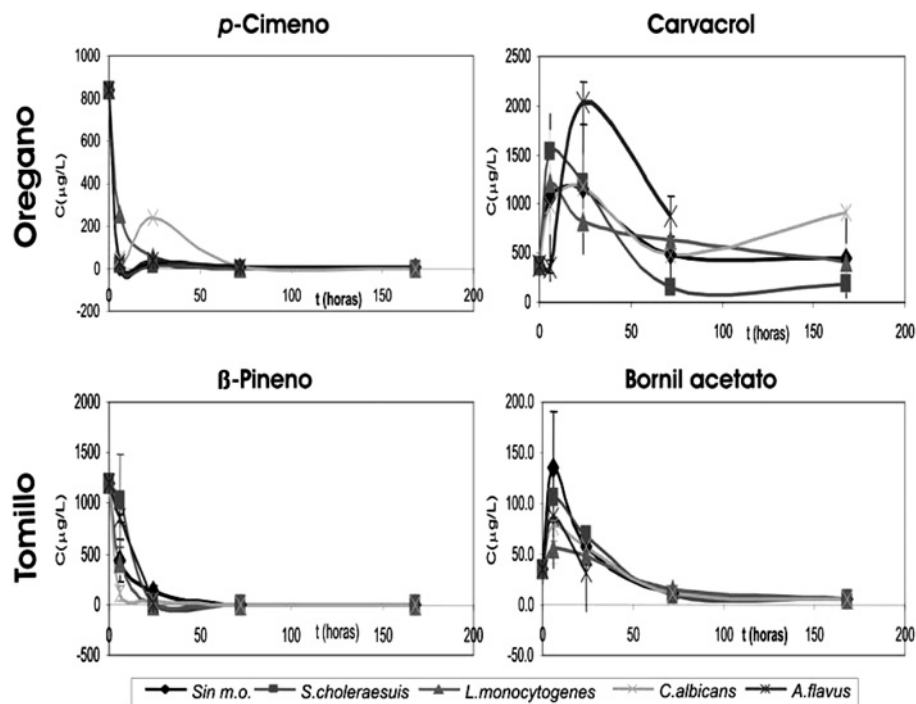
posición inicial del tomillo y el *p*-cimeno y limoneno alrededor de un 40% en las esencias enriquecidas de canela y tomillo.

Conforme aumenta el tiempo, las atmósferas se van enriqueciendo en sus componentes menos volátiles responsables de la actividad antimicrobiana (figura III.32), según se comprobó en el capítulo 5. El eugenol representa más de un 80% en la atmósfera generada por la esencia de canela. El eugenol y el cinamaldehído definen la esencia de canela enriquecida. El carvacrol es el compuesto mayoritario en la esencia de orégano; canfeno, linalol, timol, bornil acetato, carvacrol y β -cariofileno en la esencia de tomillo y el timol en el tomillo enriquecido.

Aunque las máximas concentraciones se alcanzan entre las 6-72 h, el porcentaje que cada compuesto representa sobre la totalidad de los analitos detectados y cuantificados se mantiene constante a partir de las 6 horas de incubación.

FIGURA III.32

Evolución de p-cimeno, carvacrol en la esencia de orégano y de β -pineno y bornil acetato en la esencia de tomillo, en función del tiempo y la presencia de microorganismo



Por último, hay que resaltar que las diferencias entre la composición de las atmósferas, en función de la naturaleza del aceite esencial y la presencia de microorganismo, son significativas ($p < 0,05$) durante las primeras 24 horas y disminuyen conforme aumenta el tiempo de incubación. La atmósfera generada por la esencia de canela enriquecida en cinamaldehído es la que menor variación de composición presenta con el tiempo, siendo además prácticamente independiente de la presencia de microorganismo. Se han encontrado tres posibles razones para explicar tal comportamiento.

En primer lugar, las diferencias entre atmósferas para un mismo aceite esencial son debidas al metabolismo de los microorganismos, que transforman los compuestos presentes en la atmósfera en función de sus enzimas y rutas metabólicas (Carvalho y Fonseca, 2006). La máxima actividad metabólica de los microorganismos se produce en la etapa de crecimiento logarítmico, que, con excepción del *A. flavus*, corresponde con las primeras 3 a 24 h de incubación. En segundo lugar, las placas Petri, aunque selladas con cinta adhesiva, no constituyen un sistema cerrado herméticamente. La liberación de los compuestos volátiles del interior de la placa Petri al exterior se incrementa con el tiempo de incubación. Por último, hay que considerar la posible absorción de volátiles por el medio de cultivo. Pasados 7 días (168 h), la cantidad de los compuestos característicos de una determinada esencia ha descendido a un nivel en el que no se aprecian diferencias significativas entre muestras ($p < 0,05$) por las razones anteriormente enumeradas.

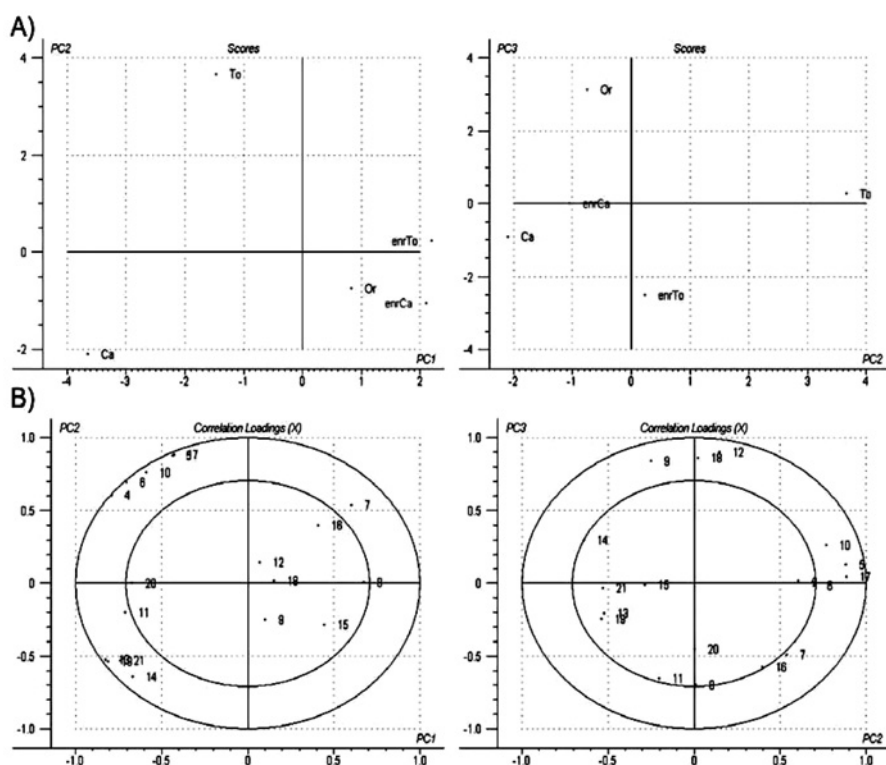
La composición de la atmósfera en el interior de la placa Petri durante las primeras 24 h tiene, por consiguiente, una especial relevancia a la hora de explicar, tanto la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, como la resistencia de determinados microorganismos. Por este motivo, se han evaluado por separado las atmósferas en el instante inicial, a las 6 horas y a las 24 horas de incubación, mediante un análisis por componentes principales.

Instante inicial (t=0h).

Las diferencias en la composición de las atmósferas en el instante inicial se explican mediante tres componentes principales, que definen el 86% de la varianza (figura III.33). La primera componente principal (PC1) explica el 35% de la varianza y diferencia entre las esencias enriquecidas de canela y tomillo, cuyas atmósferas en el instante inicial contienen una gran cantidad de *p*-cimeno y limoneno, del aceite esencial de canela.

FIGURA III.33

Análisis por componentes principales para el muestreo de la atmósfera generada por el aceite esencial de canela (Ca), tomillo (To), orégano (Or), tomillo enriquecido en timol (enrTo), canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa) en el instante inicial (t=0h)



A) Muestras B) Variables. PC1 35%, PC2 27% y PC3 24%. Compuestos: 4. α -pineno, 5. canfeno, 6. β -pineno, 7. *p*-cimeno, 8. limoneno, 9. 1,8-cineol, 10. α -terpinoleno, 11. linalol, 12. canfor, 13. borneol, 14. estragol, 15. cinamaldehído, 16. timol, 17. bornil acetato, 18. carvacrol, 19. eugenol, 20. β -cariofileno, 21. α -humuleno.

La segunda componente principal (PC2) define el aceite esencial de tomillo, correlacionado positivamente con la componente principal, y el aceite esencial de canela, correlacionado negativamente. El aceite esencial de tomillo se caracteriza por su elevada concentración de α -pineno, canfeno, β -pineno, α -terpinoleno y bornil acetato. La esencia de canela, en cambio, genera una atmósfera inicial con un mayor contenido en linalol, eugenol, borneol, estragol y α -humuleno.

Por último, la tercera componente principal (PC3), que explica el 24% de la varianza, describe el orégano, correlacionado positivamente, y el tomillo enriquecido con timol, correlacionado negativamente. La máxima concentración de carvacrol se encuentra en la atmósfera generada por la esencia de orégano, además de ser la única donde se detecta la presencia de canfor y 1,8-cineol. El aceite esencial de tomillo enriquecido en timol produce, por otra parte, una atmósfera inicial rica en *p*-cimeno, limoneno y timol, compuestos correlacionados negativamente con la tercera componente principal.

t=6h

El 78% de la varianza en la composición de la atmósfera a las 6 horas de incubación se explica con tres componentes principales (figura III.34).

La primera componente principal (PC1) describe la atmósfera generada por el aceite esencial de tomillo en función de la presencia de microorganismo. Se correlaciona negativamente con la concentración de α -pineno, canfeno, β -pineno, *p*-cimeno, α -terpinoleno, bornil acetato y β -cariofileno. Las máximas cantidades de α -pineno, canfeno, β -pineno y *p*-cimeno se detectaron en presencia de *A. flavus* y *S. choleraesuis*, cuyas atmósferas, como se aprecia en la figura III.35, difieren significativamente del blanco.

La segunda componente principal (PC2) agrupa, por un lado, a la esencia de canela y a la de orégano, correlacionados negativamente, y, por otro lado, a las esencias enriquecidas de tomillo y canela, correlacionadas positivamente.

La tercera componente principal (PC3) permite distinguir entre la esencia de canela, caracterizada por su contenido en borneol, estragol y eugenol, y la esencia de orégano, definida por la concentración de carvacrol y canfor.

Tras el aceite esencial de tomillo, las mayores discrepancias en función del tipo de microorganismo inoculado se producen en el aceite esencial de orégano y en el aceite esencial de canela. En lo que respecta al orégano, la presencia de *L. monocytogenes* o *C. albicans* origina diferencias significativas en la cantidad de linalol, canfor, borneol, timol y carvacrol. El eugenol, por otro lado, es el responsable de las desigualdades observadas para la atmósfera originada por la esencia de canela entre *C. albicans* y *S. choleraesuis* y entre el blanco y *A. flavus* (figura III.35).

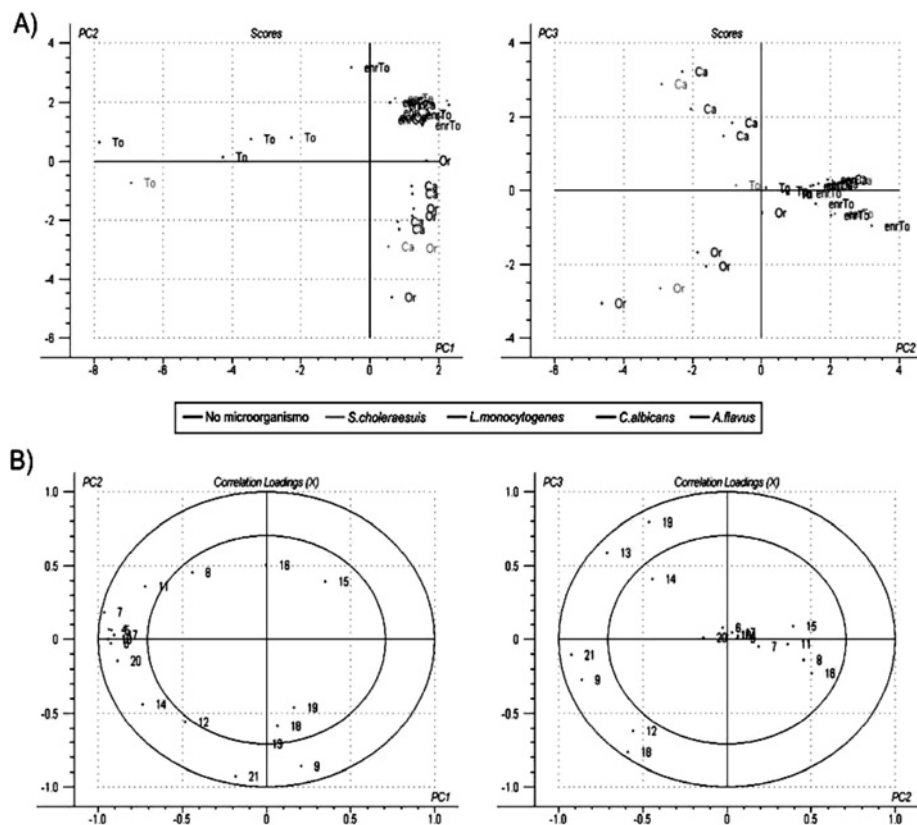
t=24h

El análisis por componentes principales para la composición de las atmósferas a las 24 h de incubación se muestra en la figura III.36. Son necesarias tres componentes principales para explicar el 77% de la varianza.

La primera componente principal (PC1), correlacionada positivamente con la concentración de α -pineno, canfeno, β -pineno, *p*-cimeno, limoneno, α -terpinoleno, linalol, bornil acetato y β -cariofileno, caracteriza la atmósfera de la esencia de tomillo. El análisis por PCA revela la gran influencia que la presencia de microorganismo ejerce sobre la composición de la atmósfera en el interior de la placa Petri: la concentración de α -pineno, canfeno, β -pineno, *p*-cimeno y limoneno es significativamente más elevada en la placa blanco, sin inóculo.

FIGURA III.34

Análisis por componentes principales para el muestreo de la atmósfera generada por el aceite esencial de canela (Ca), tomillo (To), orégano (Or), tomillo enriquecido en timol (enrTo), canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa) a las 6 horas de incubación (t=6h).

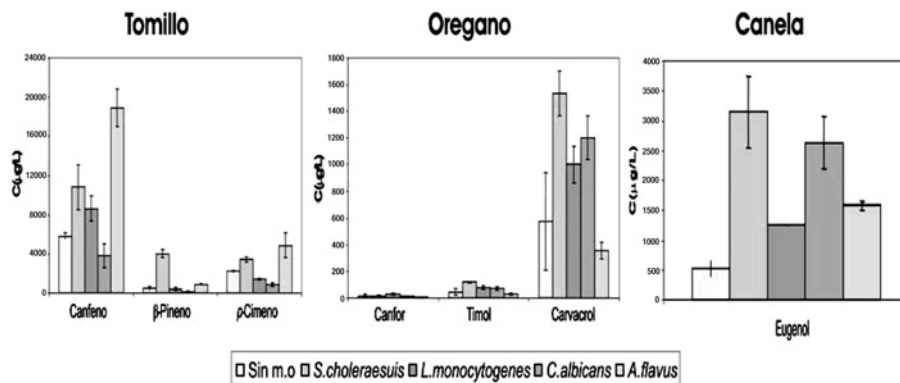


A) Muestras B) Variables. PC1 43%, PC2 22% y PC3 13%. Compuestos: 4. α -pineno, 5. canfeno, 6. β -pineno, 7. *p*-cimeno, 8. limoneno, 9. 1,8-cineol, 10. α -terpinoleno, 11. linalol, 12. canfor, 13. borneol, 14. estragol, 15. cinamaldehído, 16. timol, 17. bornil acetato, 18. carvacrol, 19. eugenol, 20. β -cariofileno, 21. α -humuleno.

La segunda componente principal (PC2) distingue tres grupos, orégano, canela y el conjunto formado por los aceites esenciales enriquecidos, y se correlaciona positivamente con la concentración de 1,8-cineol, canfor, borneol, carvacrol y α -humuleno. La PC2 también explica las diferencias detectadas para la esencia de orégano por la presencia de hongos (moho y levadura), originadas por una mayor cantidad de 1,8-cineol, *p*-cimeno y carvacrol y un menor contenido en linalol que el resto de muestras (blanco y bacterias).

FIGURA III.35

Efecto de la presencia de microorganismo en la concentración ($\mu\text{g/L}$) a las 6 h de varios analitos en la atmósfera generada por la esencia de tomillo, orégano y canela



La tercera componente principal (PC3) agrupa la esencia de canela, correlacionada positivamente debido al mayor contenido en eugenol y estragol, y las esencias enriquecidas. Las diferencias por la presencia de microorganismo a la largo de esta componente principal se deben a la variación en el contenido de eugenol. Aparte de por su menor contenido en eugenol, la atmósfera de canela en presencia de *C. albicans* posee un menor contenido en *p*-cimeno, linalol, borneol y β -cariofileno y mayor en α -terpinoleno. Por estas razones, las muestras donde se ha inoculado *C. albicans* se distinguen del resto en la PC2.

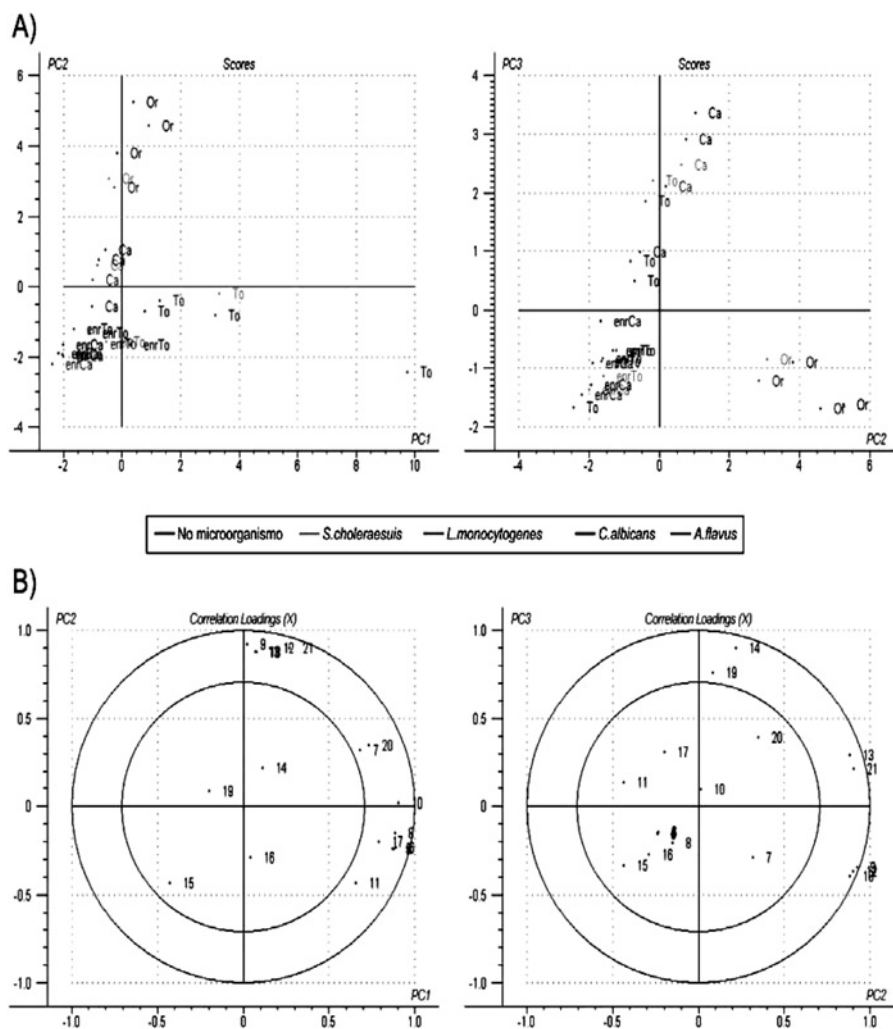
En este capítulo se ha desarrollado el empleo de la técnica HS-SDME para el muestreo y cuantificación de los agentes antimicrobianos en la fase vapor generada por los distintos aceites esenciales y soluciones antimicrobianas derivadas. Su simplicidad, economía y versatilidad para el acoplamiento con el resto de técnicas convencionales de análisis, la convierten en una técnica de gran futuro para el muestreo de volátiles y semivolátiles de diversa naturaleza.

Los compuestos más volátiles (α -pineno, β -pineno, canfeno, *p*-cimeno y limoneno) se liberan rápidamente al espacio de cabeza, mientras que la liberación de los agentes antimicrobianos menos volátiles como timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído, es más progresiva, alcanzando su pico de concentración entre las 24 y las 72 horas. De este modo, se confirma la acción de los agentes antimicrobianos durante la fase lag del microorganismo.

Además, se ha demostrado la influencia que ejerce el microorganismo sobre la composición de la atmósfera, al metabolizar los componentes liberados por los diferentes aceites esenciales. Los mecanismos de metabolización y biotransformación de los terpenos difieren en función de la composición enzimática de cada una de las cepas estudiadas. El aceite esencial de canela enriquecida consigue una inhibición total de todos los microorganismos (ver capítulo 5 de esta sección), excepto *Salmonella choleraesuis*, bacteria para la que se detectaron diferencias en la concentración atmosférica de *p*-cimeno, limoneno, linalol y cinamaldehído. De igual modo, se puede destacar que las mayores diferencias entre la atmósfera generada en ausencia/presencia de microorganismo se produce para el agente antimicrobiano menos efectivo, el aceite esencial de tomillo.

FIGURA III.36

Análisis por componentes principales para el muestreo de la atmósfera generada por el aceite esencial de canela (Ca), tomillo (To), orégano (Or), tomillo enriquecido en timol (enrTo), canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa) a las 24 horas de incubación (t=6h)



A) Muestras B) Variables. PC1 35%, PC2 28% y PC3 14%. Compuestos: 4. α -pineno, 5. canfeno, 6. β -pineno, 7. *p*-cimeno, 8. limoneno, 9. 1,8-cineol, 10. α -terpinoleno, 11. linalol, 12. canfor, 13. borneol, 14. estragol, 15. cinamaldehído, 16. timol, 17. bornil acetato, 18. carvacrol, 19. eugenol, 20. β -cariofileno, 21. α -humuleno.

8. Desarrollo de un envase activo antimicrobiano

8.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que sufren la mayor parte de las empresas productoras de alimentos, de envasado y distribución y los propios consumidores, es la contaminación de los alimentos por proliferación de microorganismos indeseables. En este sentido, el envase pasivo tradicional únicamente protege de forma limitada los alimentos durante la distribución y el almacenamiento. La adición de agentes antimicrobianos directamente al alimento previene y disminuye la población microbiana, pero es susceptible de provocar el desarrollo de aromas, colores y/o cambios de textura indeseables y, además en ningún caso el producto envasado puede calificarse como alimento natural y/o fresco.

El envase activo, que combina los avances en seguridad y tecnología alimentaria y en ciencia y tecnología de los materiales, es una alternativa interesante e innovadora para sustituir al envase tradicional (Scanell *et al.*, 2000). La aplicación de agentes antimicrobianos en el material de envase podría constituir una forma efectiva de prevenir la contaminación microbiológica, incrementando así el tiempo de vida útil del producto y mejorando su calidad (Vermeiren *et al.*, 2002).

Existen diversas técnicas para incorporar el agente antimicrobiano al envase (Appendini y Hotchkiss, 2002):

- Adición en el envase de pequeños recipientes porosos con agentes antimicrobianos volátiles.
- Incorporación directa de los agentes antimicrobianos volátiles y no volátiles en el envase. A menudo, la incorporación de los agentes antimicrobianos a los materiales poliméricos supone una pérdida en su actividad inhibitoria, que se justifica por la falta de compatibilidad entre los agentes activos con el material del film, y/o por la degradación térmica durante la extrusión (Devlieghere *et al.*, 2000).
- Recubrimiento del polímero con las sustancias activas.
- Inmovilización de las sustancias activas en el polímero por uniones iónicas o covalentes.
- Empleo de polímeros con propiedades antimicrobianas.

La acción antimicrobiana del envase activo se consigue por varios mecanismos. Por un lado, existe un mecanismo de transferencia de masa. Los componentes activos migran del envase al alimento, bien por contacto directo entre ambos, o bien a través del espacio de cabeza del envase donde se han liberado los agentes volátiles (Lück y Jagger, 1997). Por otra parte, ciertos agentes antimicrobianos ejercen su acción sin necesidad de que ocurra un proceso de transferencia de masa entre el envase y el alimento: el efecto inhibitorio se produce cuando el microorganismo entra en contacto con la superficie antimicrobiana (Kourai *et al.*, 1994).

Los aceites esenciales y sus componentes figuran entre los agentes antimicrobianos que pueden añadirse en el envasado activo (Floros *et al.*, 1997; Nielsen y Rios 2000; Suhr y Nielsen, 2005; Valverde *et al.*, 2005; López *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2005; Matan *et al.*, 2006; Pezo *et al.*, 2006). Su origen natural, unido al hecho de que su utilización como agentes aromatizantes en contacto con alimentos está autorizada por la legislación europea (*Decisión 2002/113/CE*), convierten a este tipo de sustancias en una opción muy atractiva de cara al consumidor.

En este capítulo se propone un nuevo envase activo antimicrobiano, consistente en una película de polímero de polipropileno o copolímero etileno-alcohol vinílico, al que se le han incorporado, mediante una tecnología específica y que por razones de confidencialidad no puede describirse aquí, aceites esenciales, cuya efectividad antimicrobiana en fase vapor ha sido estudiada en los capítulos precedentes. La principal ventaja de este nuevo e innovador envase con-

siste en su mecanismo de actuación. La acción antimicrobiana se ejerce mediante una liberación controlada de los componentes activos al espacio de cabeza. No es necesario, por tanto, un contacto directo entre el envase y el alimento con lo que se asegura una menor transferencia de masa de los agentes antimicrobianos al alimento y, en consecuencia, una menor probabilidad de desarrollo de alteraciones objetivas (definidas como aquellas que realmente tienen un efecto pernicioso sobre la salud del consumidor o deletéreo de las propiedades del alimento) o subjetivas (como aquellos que dan lugar a cambios que, si bien no son graves, provocan una rechazo del consumidor).

8.2. EXPERIMENTAL

8.2.1. Envase activo antimicrobiano

Los films antimicrobianos se elaboraron con una concentración en peso conocida de aceite esencial, que se incorpora a polipropileno (PP) o bien copolímero de polietileno-alcohol vinílico (PE/EVOH). El uso del PP y PE/EVOH en contacto con alimentos está autorizado, según especificaciones del fabricante.

El film coextrudido biorientado de PP, de 20 µm de espesor, está fabricado por Poligal S.A (Polipropileno de Galicia, A Coruña, España). Su estructura consta de tres capas: dos capas externas (5%) de polipropileno y copolímero de etileno, y una capa interna (95%) de homopolímero de polipropileno isotáctico. El film de PE/EVOH, de 50 µm de espesor (5 µm EVOH), es un material de alta barrera (Bariflex®), fabricado por Industria Termoplastica Pavese SpA (Milán, Italia).

Las láminas antimicrobianas se fabricaban 24 horas antes de la realización de los ensayos correspondientes.

8.2.2. Microorganismos

Los microorganismos patógenos y alterantes seleccionados, así como sus condiciones de cultivo (medio, tiempo y temperatura de incubación), se muestran en la tabla III.28. Previo a su uso, las cepas se almacenaban en refrigeración a -18°C en leche desnatada esterilizada.

■ TABLA III.28

Microorganismos patógenos empleados: cepa

	Cepa (nº referencia)		Medio cultivo	T (°C)	t (día)
Bacteria Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Mueller Hinton agar	30	2
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644			
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29122			
	<i>Bacillus cereus</i>	CECT 495	Agar sangre M.H		
Bacteria Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29252	Mueller Hinton agar	30	1
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT 4000			
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 4315			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853			
Hongo	<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT10353	Malta Dextrosa agar	30	3
	<i>Zigasacharomyces rouxii</i>	CECT 11928			
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 64550	Sabouraud Cloroanfenicol agar	30	2
	<i>Aspergillus flavus</i>	CECT 2687			
	<i>Penicillium islandicum</i>	CECT 2762NT			
	<i>Penicillium nalgiovense</i>	IBT 12105	30	7	
	<i>Penicillium roqueforti</i>	IBT 12319			
<i>Eurotium repens</i>	IBT 1800				

ATCC: American Type Culture Cutive, CECT: Colección Española de Cultivos Tipo) de medio de cultivo (M.H.:Mueller-Hinton), temperatura (T) y tiempo (t) de incubación.

8.2.3. Actividad antimicrobiana de los films

100 μL de una disolución de suero fisiológico, conteniendo entre 10^{5-6} CFU/mL, se inoculan por superficie sobre 15 mL de medio de cultivo solidificado. A continuación, se coloca el film sobre la placa Petri, con la cara más concentrada en los agentes activos enfrentada al medio de cultivo y sin que se produzca contacto directo (figura III.37). El conjunto se cierra con una brida y se incuba en una estufa en las condiciones señaladas por la tabla III.29. Evidentemente, este sistema de cierre no asegura la hermeticidad del conjunto. Sin embargo, conviene recalcar que la evaluación del sistema debe llevarse a cabo en las condiciones más desfavorables, por lo que tanto la posible pérdida de los componentes activos volátiles liberados como la posible contaminación conjunta por microorganismos ambientales son fenómenos deseados. Pasado el tiempo de incubación se cuentan las colonias de microorganismo que se han desarrollado.

FIGURA III.37

Placa Petri con *Pislandicum* enfrentada a una lámina de PP sin sustancia activa



Los ensayos se realizaron por triplicado. Para cada microorganismo se inoculaba e incubaba una placa control, sin lámina, y una placa blanco con el film sin sustancia activa.

8.2.4. Cuantificación de la atmósfera generada por los films antimicrobianos.

La atmósfera generada en el interior de la placa Petri por los diferentes films antimicrobianos se cuantificó mediante el procedimiento HS-SDME-GC-MS, descrito en el capítulo anterior. Una gota de 2,5 μL de 6 $\mu\text{g/g}$ de verbenona en *p*-xileno se suspende durante 5 minutos, desde la punta de una jeringa de 5 μL Hamilton 85RN, en el interior del sistema mostrado por la figura III.37. Pasado ese tiempo, la gota se retrae y se inyecta en un GC/MS en las condiciones que se detallan en el apartado 7.2.3 de dicho capítulo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

8.2.5. Estabilidad antifúngica de las láminas de PE/EVOH y PP con un 4% en peso de esencia de canela enriquecida o de esencia de orégano.

Para la realización de los ensayos de estabilidad, Artibal S.A. preparó lotes de láminas antimicrobinas de PP y PE/EVOH con un 4% de esencia de canela enriquecida o de orégano. Los films antimicrobianos se almacenaron a temperatura ambiente (≈ 15 $^{\circ}\text{C}$).

Semanalmente se comprobaba la actividad antimicrobiana de las láminas frente a una levadura (*C.albicans*) y a un hongo (*A.flavus* o *P.nalgiovense*), según el procedimiento descrito en el apartado 8.2.3. Quincenalmente se cuantificaban las atmósferas generadas por dichas láminas durante los primeros 5 minutos del test de inhibición, según el procedimiento descrito en el apartado 8.2.4. Los ensayos se realizaron por triplicado y la duración total del ensayo fue de 76 días.

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Actividad antimicrobiana de las láminas de PP y PE/EVOH

De acuerdo con estudios anteriores realizados con láminas de PP antioxidantes, en las que se añadía como agente activo aceite esencial de romero (Tovar, 2003; Tovar *et al.*, 2005; Bentayeb 2004; Bentayeb *et al.* 2006), la concentración máxima de aceite esencial en la capa activa que se incorpora al PP o PE/EVOH, se fijó, inicialmente, en un máximo del 4% en peso.

La actividad antimicrobiana de las diferentes láminas de PP y PE/EVOH frente al crecimiento de bacterias y hongos se muestra en las figuras III.38 y III.40 respectivamente.

Únicamente las láminas elaboradas al 4% con aceite esencial de canela enriquecida en cinamaldehído mostraron cierta actividad antimicrobiana frente al crecimiento de las bacterias. Los films de PP mostraron mayor efectividad que los de PE/EVOH, con excepción de la bacteria Gram +, *B.cereus*, cuyo crecimiento fue inhibido completamente en experimentos con ambas matrices plásticas (figura III.39). Como se muestra en la figura III.38, las bacterias Gram positivas son, en general, más sensibles que las bacterias Gram negativas.

■ FIGURA III.38

Actividad antibacteriana de los films de PP y PE/EVOH que llevan incorporado esencia de canela (Ca), clavo (C), orégano (Or) o canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa) en concentraciones de 1% ó 4% (m/m)

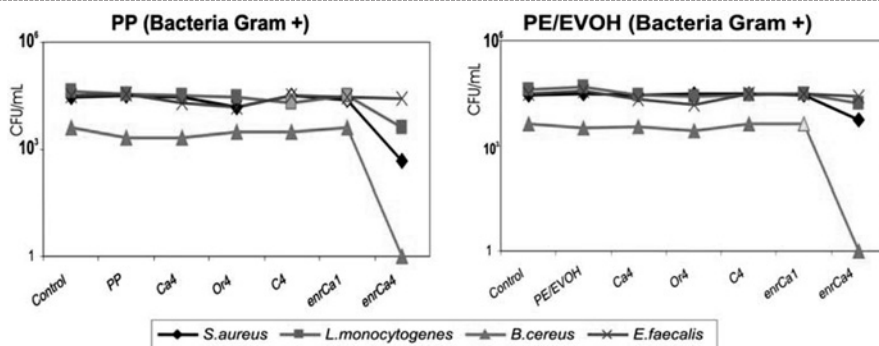


FIGURA III.38 (continuación)

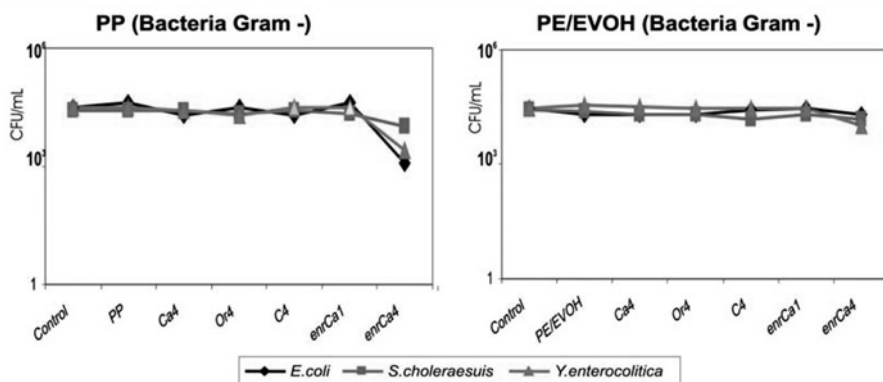
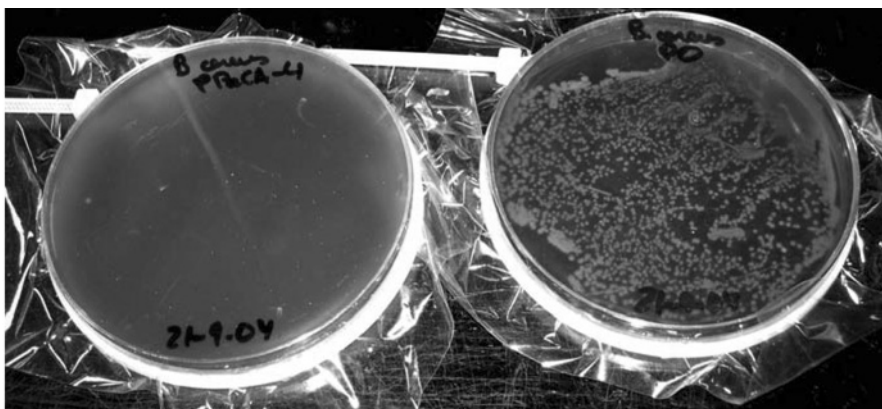


FIGURA III.39

Inhibición producida por la lámina de PP que lleva incorporada al 4% esencia de canela enriquecida en cinnamaldehído frente a *Bacillus cereus*. Inóculo inicial 104 CFU/mL



Izquierda, lámina activa; derecha, lámina blanco

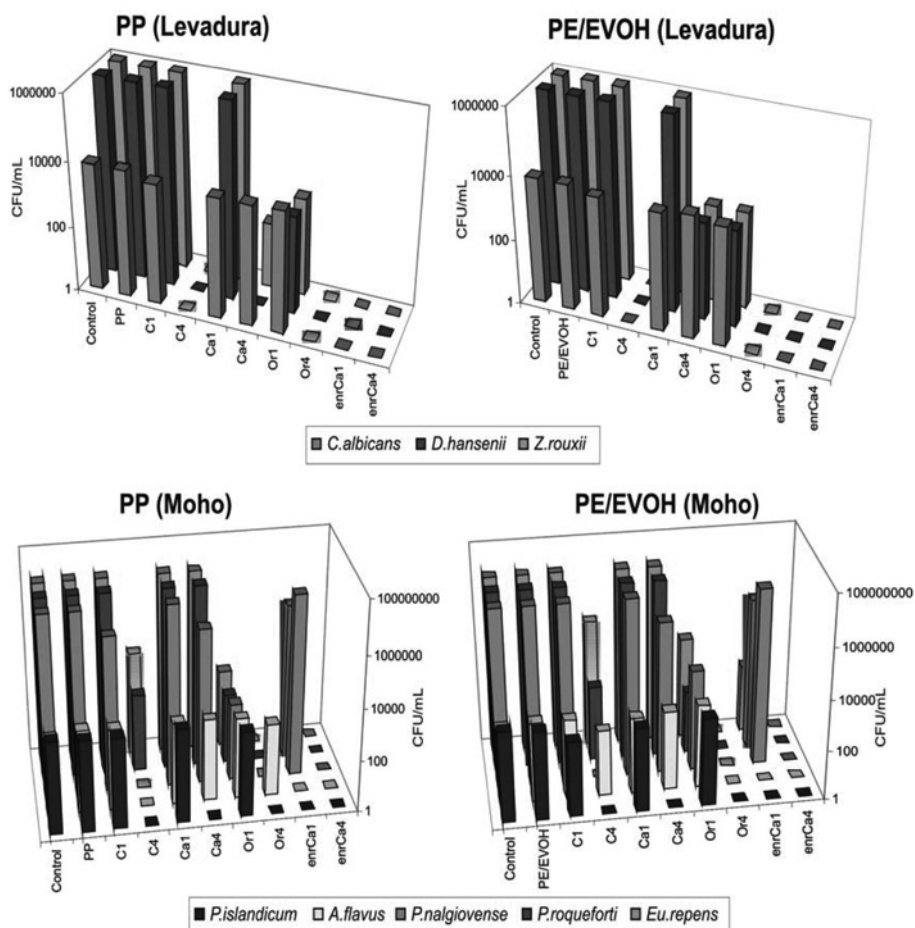
El PP con esencia de canela enriquecida al 4%, consigue una inhibición de dos órdenes de magnitud en el crecimiento de *S. aureus*, mientras que las láminas de PP con clavo y orégano al 4% alteran la morfología de las colonias *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica*.

La figura III.40 ilustra la capacidad antifúngica de las láminas de PP y PE/EVOH que incorporan aceites esenciales. Ambos polímeros con orégano, clavo al 4% y canela enriquecida al 1 y al 4% consiguen inhibir completamente el crecimiento de todas las levaduras y prácticamente todos los mohos. La mayor sensibilidad de los hongos frente a la acción de los aceites esenciales ya fue demostrada en los capítulos 4 y 5 de la presente sección.

Los films de PP y PE/EVOH fabricados con esencia de orégano al 1% y de canela al 4% redujeron el número de colonias *D.hansenii* y *Z.rouxii*. Asimismo, la levadura *D. hansenii* es el único microorganismo inhibido por los envases activos de PP que incorporan aceite esencial de canela al 4%.

■ FIGURA III.40

Actividad antifúngica de los films de PP y PE/EVOH que incorporan esencia de canela (Ca), clavo (C), orégano (Or) o canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa) en concentraciones de 1% ó 4% (m/m)

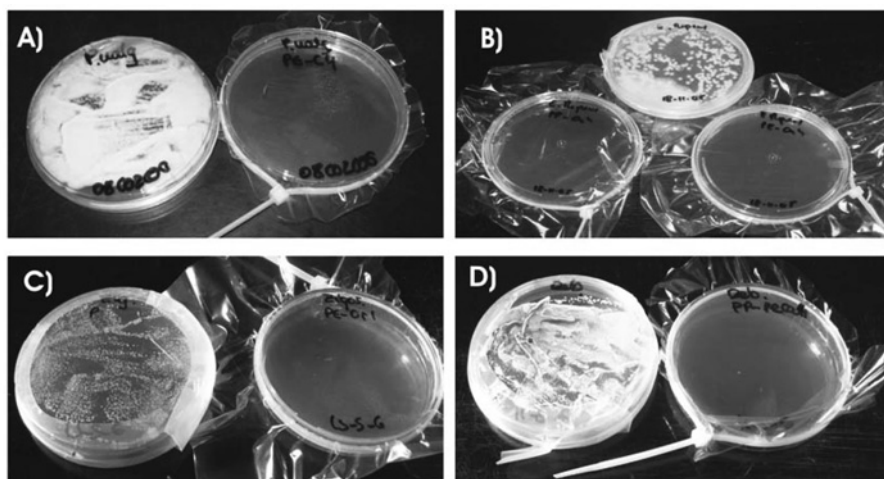


Al igual que ocurría con las bacterias, los films de PP revelaron una mayor actividad anti-fúngica que los de PE/EVOH. El recuento de colonias señaló un mayor crecimiento de hongos para placas incubadas bajo PE/EVOH con orégano al 1%, clavo al 1% o con canela al 1 o al 4% que para las placas incubadas bajo PP.

Las láminas con clavo al 4%, orégano al 4% y canela enriquecida al 1% no inhibieron completamente el crecimiento de todos los mohos estudiados. Como se aprecia en la figura III.40, *Proqueforti* y *Eu.repens* se desarrollaron bajo los films de PP y PE/EVOH con clavo al 4%, aunque en menor grado que en el control.

FIGURA III.41

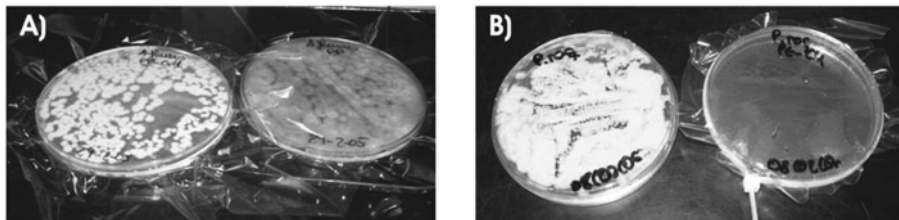
A) *P.nalgiovense*: control frente PE/EVOH-C4. B) *Eu.repens*: control frente a PP-Or4 y PE/EVOH-Or4. C) *Z.rouxii*: control frente a PE-Or1. D) *D.hansenii*: control frente a PP-enrCa1



Los constituyentes de los aceites esenciales embebidos en la matriz plástica, y posteriormente liberados al espacio de cabeza, retardan el crecimiento de los mohos y reducen el número de colonias formadas, llegando incluso a alterar su morfología externa. En la figura III.42.A se observa cómo las colonias *A.flavus* desarrolladas en presencia de PP con orégano al 4% son menos numerosas si se comparan con la placa blanco de PP. Estas colonias se encuentran en distinta fase de desarrollo, tal y como indica su color blanquecino, en comparación con la tonalidad marrón de las colonias control, así como la incompleta formación de esporas en su reverso. *Proqueforti* en presencia de PE/EVOH con clavo al 4% comienza a crecer como una masa traslúcida que cubre la superficie del medio de cultivo, de manera totalmente diferente al ensayo control, como se demuestra en la figura III.42.B.

FIGURA III.42

A) *A.flavus*: PP frente a PP-Or4. B) *Proqueforti*: control frente a PE/EVOH-C4

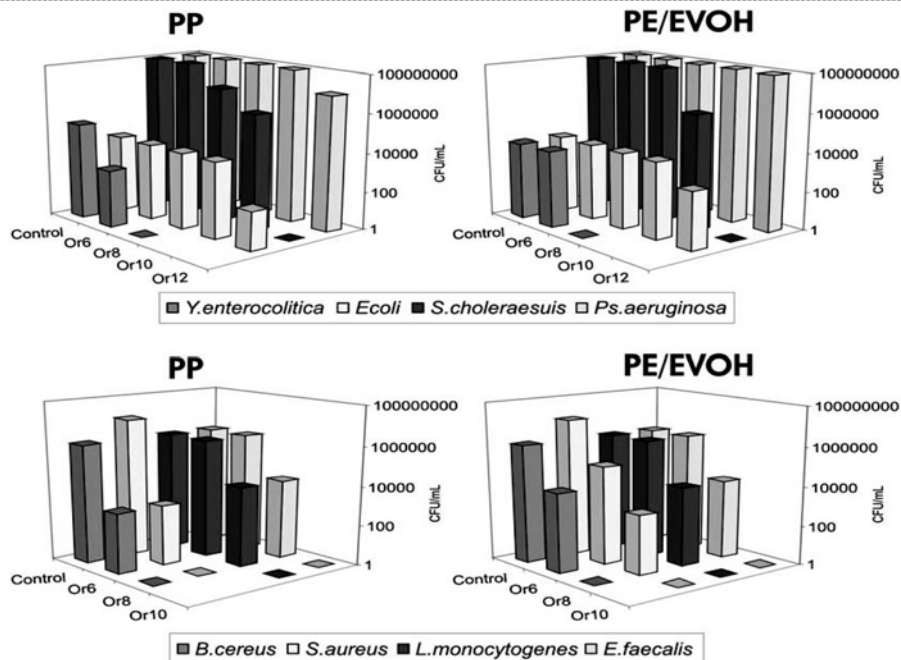


Estos ensayos han confirmado las extraordinarias propiedades antifúngicas de los films de PP y PE/EVOH que llevan incorporada la esencia de orégano o de canela enriquecida al 4%. Sin embargo, esta concentración, aunque afecta al crecimiento de las bacterias, no logra su inhibición total. Por estos motivos, se evaluó la actividad antibacteriana de nuevos films que incorporan hasta un 12 % en peso de aceite esencial de orégano y de canela enriquecida.

En la figura III.43, se observa el aumento de la efectividad antimicrobiana de las films de PP y PE/EVOH cuando aumenta el contenido en orégano.

FIGURA III.43

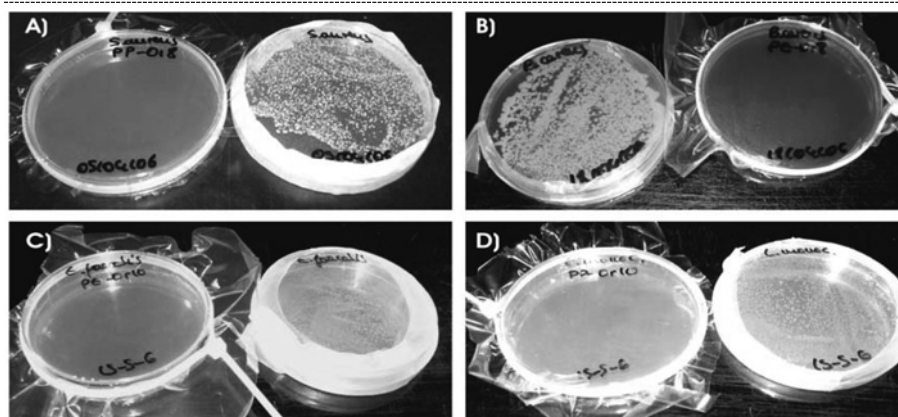
Actividad antimicrobiana de los films de PP y PE/EVOH en función del porcentaje en peso de la esencia de orégano (Or) en la capa activa



Como en los casos anteriores, las bacterias Gram + son más sensibles que las bacterias Gram -, con la excepción de *Y. enterocolitica*. Todas las bacterias Gram + son inhibidas completamente con los films de PE/EVOH y PP con un 10% de aceite esencial de orégano. Una reducción de la cantidad de orégano (8%) se traduce en un descenso de la inhibición obtenida, es decir, en un incremento en el número de colonias desarrolladas. Los films de PP con orégano al 8% inhiben el crecimiento de *S. aureus*., como se ilustra en la figura siguiente.

FIGURA III.44

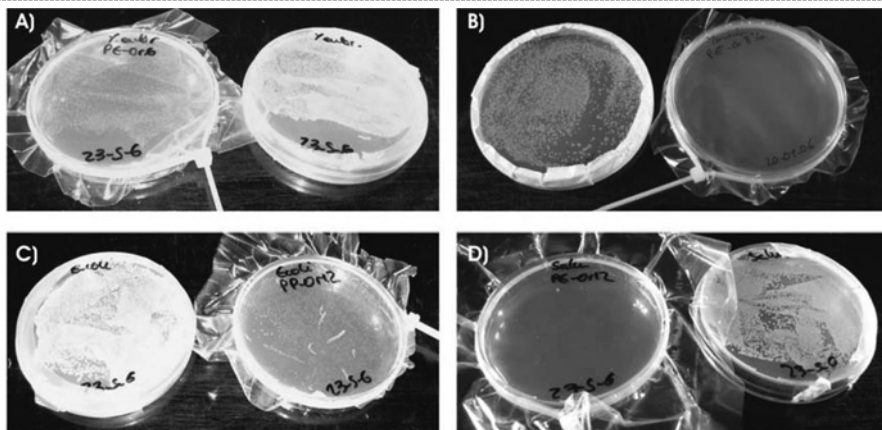
A) *S. aureus*: control frente a PP-Or8. B) *B. cereus*: control frente PE/EVOH-Or8. C) *E. faecalis*: control frente a PP-Or10. D) *L. monocytogenes*: control frente a PP-Or10



La inhibición total de *S. choleraesuis* únicamente ocurrió en presencia de los films con orégano al 12%, siendo esta cantidad insuficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli* y de *Ps. aeruginosa*. Sin embargo, se detectó una reducción del número de células viables de ambos microorganismos (figura III.43).

FIGURA III.45

A) *Y.enterocolitica*: control frente PE/EVOH-Or6. B) *Y.enterocolitica*: control frente PE/EVOH-Or8. C) *E.coli*: control frente PP-Or12. D) *S.choleraesuis*: control frente PE/EVOH-Or12



En cambio, los films que llevan incorporada la esencia de canela enriquecida son más efectivos. Salvo *Ps.aeruginosa*, cuya resistencia a las condiciones adversas del medio es ya conocida, el resto de microorganismos fue inhibido completamente por los films de PP y PE/EVOH con un contenido del 10% en peso de canela enriquecida (figura III.46). De nuevo, se observó una mayor resistencia en las bacterias Gram – que en las Gram +.

Las láminas de PP con agente activo consiguen una mayor reducción del número de colonias que las de PE/EVOH para aquellos casos en los que no se ha logrado la inhibición completa, como se ilustra en las figuras III.46 y 47.

Asimismo, los films de PP y PE/EVOH con canela enriquecida al 12% ejercen efecto sobre el metabolismo de pigmentación de *Ps.aeruginosa*, como demuestra la diferencia en la tonalidad verde obtenida en presencia de estos films si se compara con el microorganismo control (figura III.48).

A lo largo de este apartado, se ha podido comprobar la menor efectividad de los films de PE/EVOH como envase antimicrobiano. El EVOH confiere al film mayor polaridad y mayor capacidad de fijación de los compuestos más polares, como el cinnamaldehído y el carvacrol, responsables en gran parte de la inhibición, como se ha demostrado en los Capítulos precedentes.

El grado de fijación de estos compuestos en la matriz polimérica se evaluará en el siguiente apartado, donde se estudia la atmósfera generada por las diferentes láminas activas de órgano y esencia de canela enriquecida. La velocidad de liberación de los compuestos y su grado de encapsulamiento en el film son las claves para comprender el mecanismo de actuación de estos films antimicrobianos.

FIGURA III.46

Actividad antimicrobiana de los films de PP y PE/EVOH en función del porcentaje en peso de la esencia de canela enriquecida (enrCa)

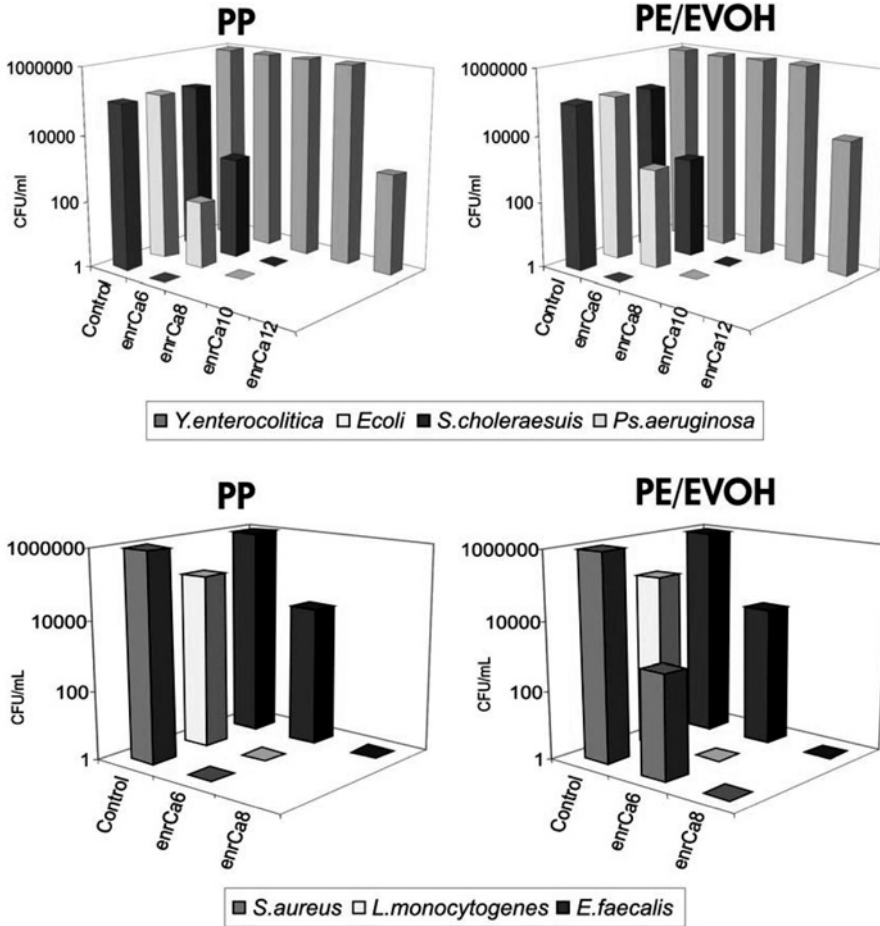


FIGURA III.47

A) *S.aureus*: control frente PP-enrCa6. B) *S.aureus*: control frente PE/EVOH-enrCa6.
C) *Y.enterocolitica*: control frente PE/EVOH-enrCa6. D) *E.faecalis*: control frente PP-enrCa12

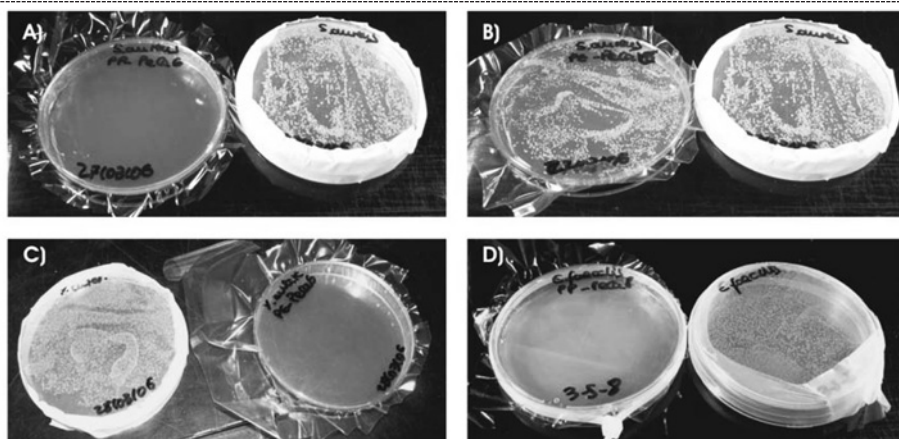
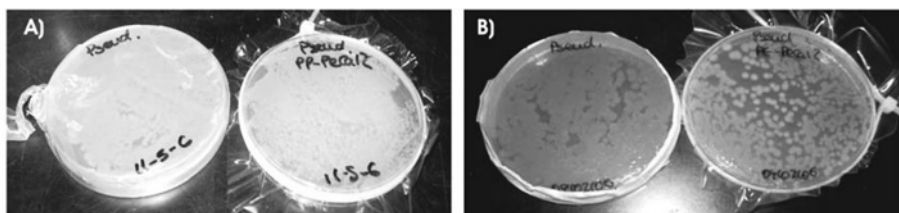


FIGURA III.48

Efecto de las láminas de PP (A) y PE/EVOH (B) -enrCa12 sobre el crecimiento y el metabolismo de pigmentación de *Ps.aeruginosa*



8.3.2. Atmósfera generada por las láminas de PP y PE/EVOH

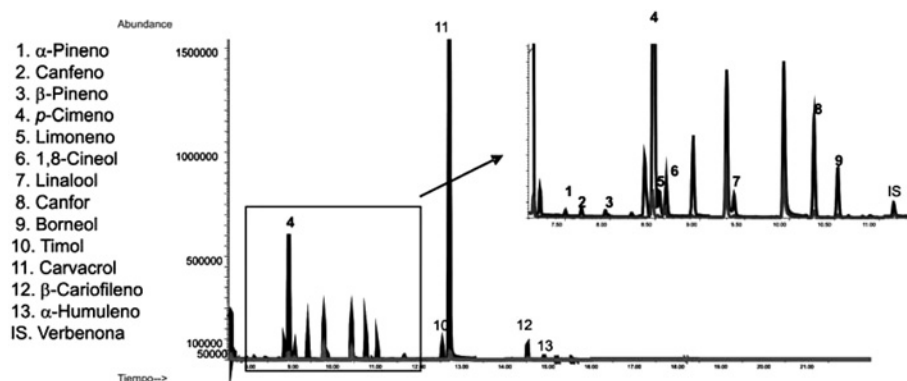
Se cuantificó la composición de la atmósfera generada por los films de PE/EVOH y PP que incorporan esencia de orégano al 1, 4, 6, 8, 10 y 12% y por los films que incorporan esencia de canela enriquecida al 1, 4, 6 y 8% en el instante inicial y a las 3, 6, 12, 24 y 48 h de incubación a 30 °C.

Orégano (Or)

Las láminas que contienen esencia de orégano liberan al espacio de cabeza *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, canfor, borneol, estragol, timol, carvacrol, β -cariofileno y α -humuleno, en una concentración que es función de la concentración inicial en la capa activa y de las propiedades de retención del plástico al que se incorporan (PP o PE/EVOH). En los films con mayor contenido en aceite esencial de orégano (10 y 12%) se detectan también α -pineno, canfeno, β -pineno y estragol durante las tres primeras horas de incubación (figura III.49).

FIGURA III.49

Cromatograma de PE/EVOH con orégano al 12% a las 3 horas de incubación (azul) y de PP con orégano al 4% a las 6 horas (verde)



El compuesto mayoritario, entre un 80-90% del total de analitos cuantificados, es el carvacrol, seguido del timol, borneol y canfor, cuya concentración en todas las atmósferas analizadas es muy similar.

En la figura III.50, se muestra la evolución con el tiempo de la concentración de carvacrol y timol para los diferentes films antimicrobianos. Salvo en el caso de PP con orégano al 12% (PP-Or12), las tendencias observadas para los dos isómeros son similares.

Durante las doce primeras horas, cuanto mayor es la cantidad de orégano que se añade a la capa activa, mayor es la concentración de carvacrol y timol que se libera en el interior de la placa Petri.

FIGURA III.50

Evolución de la concentración de carvacrol y timol ($\mu\text{g/L}$) en el espacio de cabeza de la placa Petri en función del tiempo, la concentración de orégano en la capa activa y el tipo de polímero al que se añade

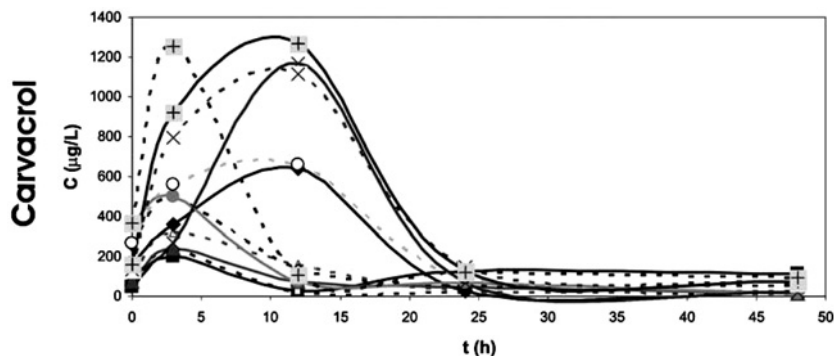
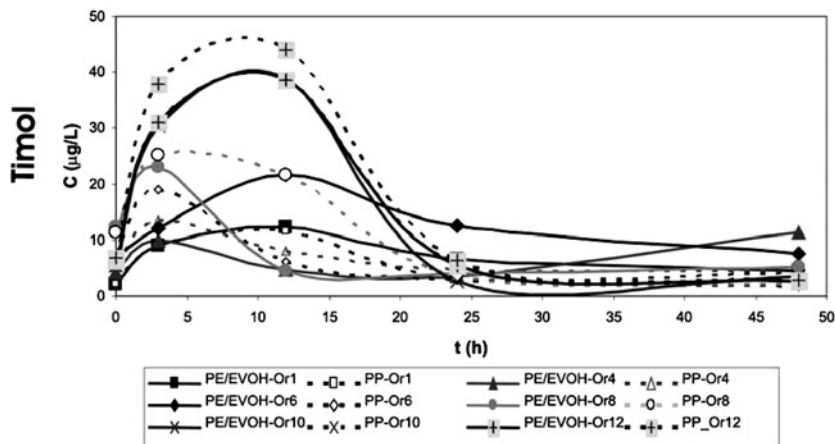


FIGURA III.50 (continuación)



La concentración de timol y carvacrol aumenta hasta alcanzar un máximo, entre las 3 y las 12 h, en función del film. Pasado ese intervalo, la cantidad de estos isómeros en el espacio de cabeza disminuye hasta un nivel que se mantiene prácticamente constante durante el resto del tiempo que dura el muestreo.

El sistema experimental compuesto por medio, placa Petri, film y brida, al no ser hermético, no constituye un sistema en equilibrio. Por otra parte, los films empleados no son barrera total frente a los aromas, por lo que los analitos difunden a lo largo del espesor de la lámina antimicrobiana para desprenderse en la atmósfera interna de la estufa incubadora.

El timol y el carvacrol son los responsables de la actividad antimicrobiana de la esencia de orégano (capítulo 5). Aunque se desconoce con exactitud el mecanismo de actuación de estos compuestos, numerosos autores apuntan a una actuación durante la fase lag, que en el caso de las bacterias es de varias horas. Como puede observarse en la figura III.50, durante las primeras horas y para una misma cantidad de orégano en el film, el PP desprende mayor cantidad de carvacrol y timol que el PE/EVOH, lo que explica la mayor efectividad de los films fabricados con PP.

Existe, por lo tanto, un mayor grado de retención de timol y carvacrol por parte del PE/EVOH, debido, principalmente, a la mayor afinidad de estos compuestos fenólicos con la parte polar de la matriz polimérica (EVOH). Este hecho se manifiesta en una liberación más controlada al espacio de cabeza de la placa Petri, tal y como se aprecia en la figura III.50. El máximo de timol y carvacrol para la mayor parte de los films de PE/EVOH se alcanza a las 12 horas de incubación, mientras que en el caso del PP ese máximo de concentración se produce a las 3 h.

Canela enriquecida en cinamaldehído (enrCa)

Los compuestos detectados en la atmósfera generada por los films con canela enriquecida han sido cinamaldehído, entre un 85-95% del total de analitos cuantificados, *p*-cimeno, limoneno, linalol y trazas de estragol y eugenol (figura III.51).

La evolución de la concentración de cinamaldehído en la atmósfera en función del tiempo y de la matriz polimérica de procedencia se representa en la figura III.52.

FIGURA III.51

Cromatograma de PE/EVOH con canela enriquecida al 6% en verde (3 h). Cromatograma de PP con canela enriquecida al 6% en azul (3h)

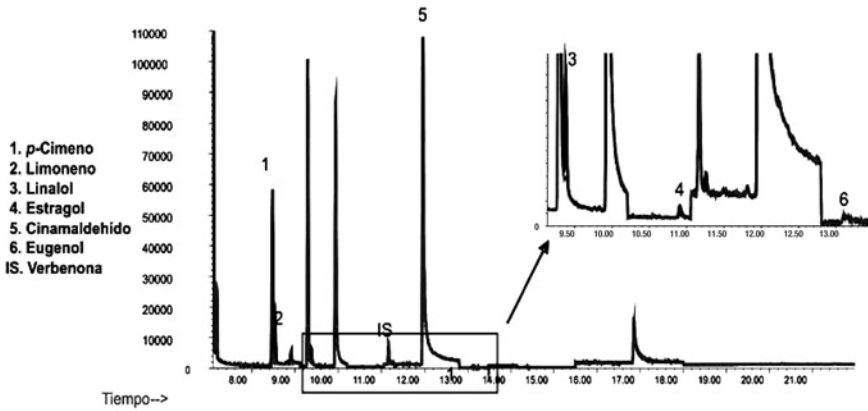
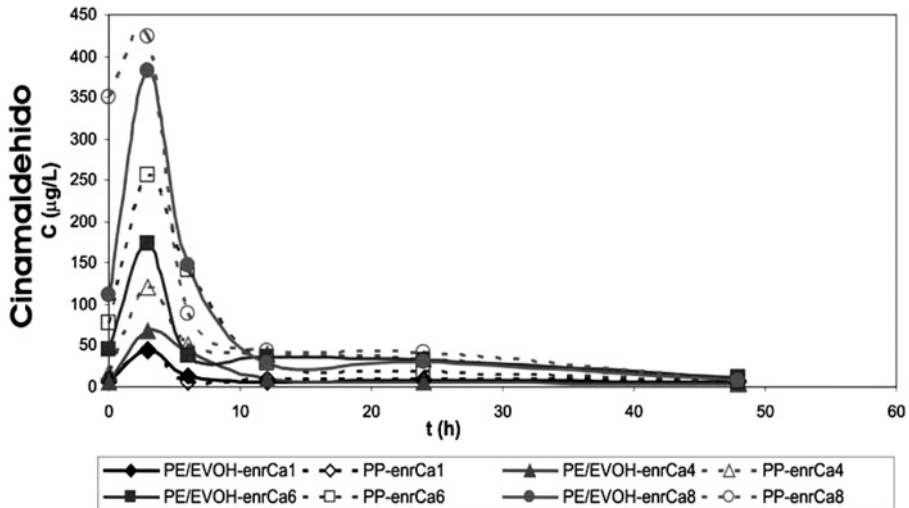


FIGURA III.52

Evolución de la concentración de cinamaldehído (µg/L) en el espacio de cabeza de la placa Petri en función del tiempo, la concentración de esencia de canela enriquecida en la capa activa y el tipo de polímero al que se añade



Al igual que ocurría con el carvacrol y el timol en PP, la máxima concentración de cinamaldehído se alcanza a las 3 horas de incubación y aumenta con la proporción de esencia de canela enriquecida en el film.

El cinamaldehído es el responsable de la actividad antimicrobiana de la esencia de canela enriquecida (capítulo 5). La liberación de cinamaldehído al espacio de cabeza durante las tres primeras horas de incubación es más elevada desde el PP que desde el PE/EVOH, ya que la capa de EVOH le confiere al film mayor capacidad de retención de las moléculas más polares. La mayor efectividad de los films de PP se debe, por lo tanto, a la mayor concentración de cinamaldehído liberado a la atmósfera durante la fase lag de crecimiento.

Si se comparan las figuras III.50 y III.52, se observa una gran disminución de la concentración de cinamaldehído a las 6 horas de incubación, en comparación con la variación de concentración de timol y carvacrol entre las 3-12 h. Este hecho sugiere un mecanismo de interacción de timol y carvacrol con las matrices poliméricas de PE/EVOH diferente que el de cinamaldehído.

Los hongos (mohos y levaduras) fueron inhibidos completamente por los films de PP y PE/EVOH con un 4% de canela enriquecida u orégano, mientras que eran necesarias mayores concentraciones de ambas esencias en la capa activa para impedir el crecimiento de las bacterias. La incorporación de mayores cantidades de sustancia activa a los films de PP y PE/EVOH supone un cambio en la tonalidad inicial del film, además de un aumento en su aromaticidad, lo que podría ocasionar el rechazo del producto por parte del consumidor. Por estos motivos, y a falta de estudios organolépticos, se han seleccionado los films que incorporan las esencias al 4% para las pruebas de vida media.

8.3.3. Estabilidad antifúngica de las láminas de PE/EVOH y PP con un 4% en peso de esencia de canela enriquecida o de esencia de orégano

De cara a una posible aplicación industrial, es deseable que las láminas activas conserven sus propiedades antifúngicas con el tiempo. El interés de este concepto, responde, por ejemplo, al caso común de que el envasado no se lleva a cabo por el productor del film, de manera que es necesario que las láminas conserven las propiedades con el tiempo.

Un lote de láminas de cada tipo (PP-enrCa4, PP-Or4, PE/EVOH-enrCa4 y PE/EVOH-Or4), se almacenó durante 2 meses a temperatura ambiente ($\approx 15\text{ }^{\circ}\text{C}$). La actividad antimicrobiana de los films fue evaluada semanalmente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.53.

Las láminas de canela enriquecida consiguen prolongar su efecto antifúngico durante un período de tiempo superior a 76 días para los microorganismos objeto de estudio. La concentración de cinamaldehído liberada al espacio de cabeza durante los 5 primeros minutos de incubación (figura III.53) no disminuye en función del envejecimiento del plástico. Además, los films con esencia de canela enriquecida producen un efecto fungicida sobre *A. flavus* y *C. albicans*. Una vez pasado el período de incubación se eliminó el foco causante de la inhibición (film), se cubrió la placa con la tapa superior y se prolongó la incubación, sin que se produjese la aparición de colonias de hongos sobre la superficie del medio de cultivo.

Aunque las láminas con orégano también inhiben el crecimiento de *C. albicans* durante más de 76 días, únicamente las láminas de PP poseen un efecto fungicida. Por otro lado, los films con orégano no logran inhibir completamente el desarrollo del moho *P.nalgiovense*. A partir del día 29 y 36 se observa la aparición de colonias, menos desarrolladas que el blanco, en las placas incubadas bajo PP y PE/EVOH, respectivamente. En ambos casos, el efecto del orégano es fungiestático, se produjo un crecimiento de las colonias una vez retirado el film.

FIGURA III.53

Estabilidad en el tiempo de la inhibición fúngica de los films de PP y PE/EVOH que incorporan esencia de orégano (Or) y de canela enriquecida (enrCa) al 4%

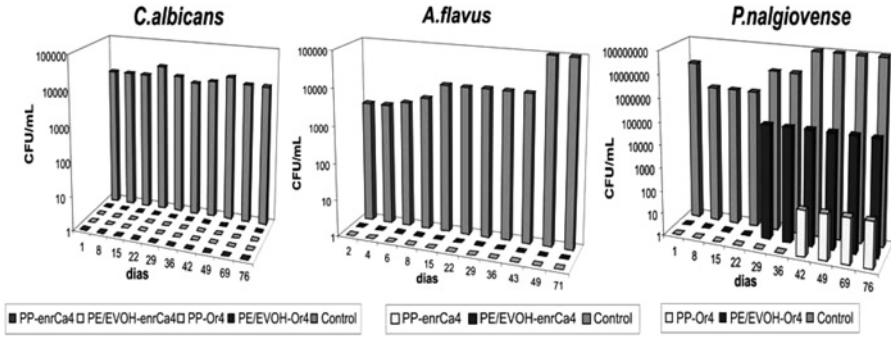


FIGURA III.54

A) Inhibición de *C. albicans* frente a PE/EVOH-enrCa4 en el día 48. B) Inhibición de *A. flavus* frente a PP-enrCa4 en el día 71.

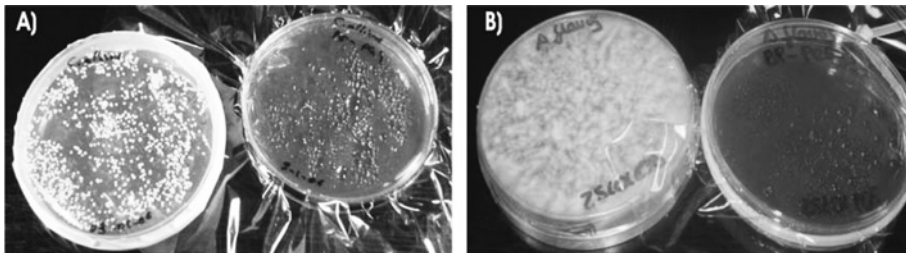
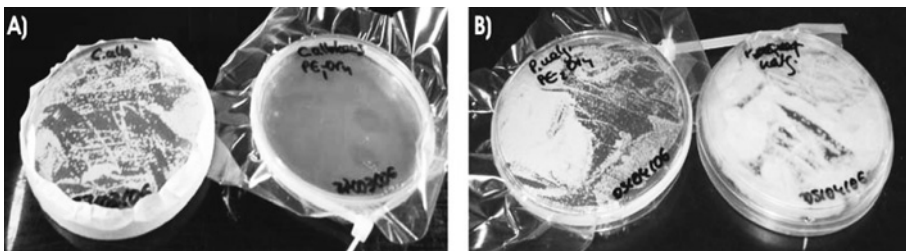


FIGURA III.55

A) Inhibición de *C. albicans* frente a PE/EVOH-Or4 en el día 71. B) Inhibición de *P. nalgioyense* frente a PE/EVOH-Or4 en el día 71

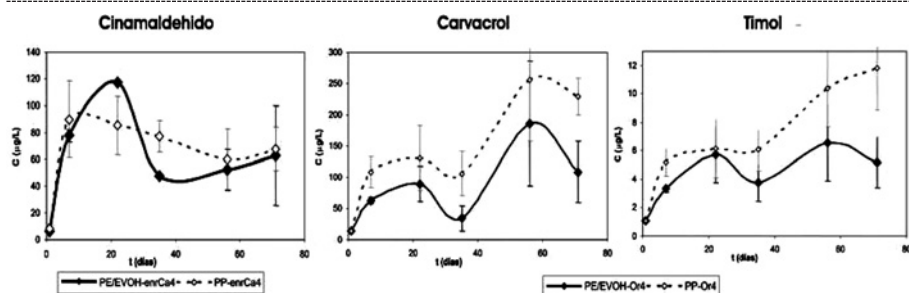


La cantidad de carvacrol liberada es siempre mayor para PP que para PE/EVOH, razón por la que PP tiene una vida útil más larga que PE/EVOH en la inhibición de mohos. Aunque aparentemente la concentración de carvacrol aumenta a partir del día 35 de almacenamiento (figura III.56), también se observa una mayor variabilidad de los datos, que se justifica teniendo presente las condiciones de almacenamiento de los films. Las láminas activas se han almacenado juntas, con contacto directo entre ellas, al igual que ocurriría en las bobinas producidas industrialmente. El contacto directo facilita la difusión de los compuestos activos de unas láminas a otras. Cuanto mayor es el período de almacenamiento, mayor es la difusión y mayor es la diferencia de composición entre las láminas.

No obstante, este aumento de concentración de carvacrol no supone un incremento en su capacidad antifúngica, más bien al contrario. La duración de la fase lag de *P.nalgiovense* es de varios días. En cambio, la medición de la atmósfera se ha efectuado en los 5 primeros minutos. Sería necesario estudiar la evolución de la concentración de los agentes antifúngicos (carvacrol y timol) durante los primeros días de incubación de los mohos para explicar de manera concluyente este resultado.

■ FIGURA III.56

Cantidad de cinamaldehído, carvacrol y timol liberada por las láminas antimicrobianas envejecidas durante los 5 primeros minutos de incubación



En este capítulo se ha comprobado la efectividad antifúngica de los nuevos envases activos que incorporan un 4% en peso de esencia de canela enriquecida o esencia de orégano. Aumentando la cantidad de aceites esenciales (8% canela enriquecida y 12% el de orégano) se consigue la inhibición total de la mayoría de las bacterias.

El nuevo envase antimicrobiano propuesto como consecuencia de este trabajo, que incorpora en films de PP y PE/EVOH un 4% de aceites esenciales, es válido, en principio, para todos los alimentos que se deterioran por la presencia de mohos y levaduras, retardando, igualmente, el crecimiento de bacterias indeseables. Los films antimicrobianos mantienen su capacidad inhibitoria durante más de dos meses.

9. Ensayos de migración con los films antimicrobianos. Validación para su empleo en contacto con alimentos

9.1. INTRODUCCIÓN

La legislación europea en su Directiva 2002/72/CE (2002/72/CE) y su modificación posterior 2004/19/CE (2004/19/CE) establece una lista de sustancias positivas que pueden incorporarse a los materiales plásticos destinados a utilizarse en contacto con alimentos, así como unos límites de migración específica (SML) para algunas de ellas. El cumplimiento de estos SMLs se comprueba mediante la realización de ensayos de migración, definidos en la Directiva 82/711/CEE (82/711/CEE) y sus ulteriores modificaciones (93/8/CE y 97/48/CE). Brevemente, un ensayo de migración consiste en poner en contacto durante un tiempo y a una temperatura determinada (en función de las condiciones previstas de uso) el material a ensayar con los distintos simulantes establecidos (A, acuoso; B, ácido; C, alcohólico y/o D, graso) seleccionados en función del alimento o tipo de alimentos que se prevé que vayan a entrar en contacto con el material. Finalmente, una vez concluido el ensayo, se realizan sobre el simulante la determinación analítica. En el mismo sentido, se han establecido los denominados ensayos de migración global, en los que el simulante tras el ensayo se evapora y se determina por pesada el residuo seco, dando una idea no cualitativa de la cantidad de compuestos que se transfieren al alimento durante una aplicación real. Sin embargo, dentro del concepto de envase activo e inteligente se hallan los envases no inertes donde, de forma intencionada, se persigue precisamente la liberación de sustancias desde el envase al alimento o al espacio de cabeza del envase con algún efecto beneficioso. Es, por tanto, necesaria una revisión de la legislación donde estos nuevos conceptos de envase queden incluidos.

En el Reglamento (CE) 1935/2004 del Consejo Europeo (2004/1935/CE) se introducen por primera vez los términos envase activo e inteligente. Se prohíbe específicamente el uso de sustancias como colorantes y aromatizantes en estos envases porque pueden inducir a error al consumidor acerca del estado de salubridad del alimento. No obstante, y según este Reglamento, *“hasta que no se adopten normas adicionales mediante una medida específica sobre los materiales y objetos activos e inteligentes, las sustancias deliberadamente incorporadas en los materiales y objetos activos que vayan a liberarse en los alimentos o en su entorno deberán autorizarse y utilizarse con arreglo a las disposiciones comunitarias correspondientes aplicables a los alimentos”*, lo que significa que toda sustancia incorporada desde el envase al alimento debe cumplir la Directiva 89/107/CEE (89/107/CEE) sobre aditivos alimentarios.

La Directiva 89/107/CEE clasifica los aditivos alimentarios como conservantes, colorantes, aromatizantes, estabilizantes de calor, etc., en función del efecto buscado al adicionarlos al alimento. Existe una legislación específica para cada grupo de aditivos. Concretamente, los aceites esenciales y la mayoría de sus constituyentes se encuentran admitidos como aromatizantes por la Decisión 2002/113/CE (2002/113/CE) de la Comisión Europea.

Por otra parte, la Comisión Europea, a través de su Laboratorio de Referencia (<http://crfcm.jrc.it/>), establece una serie de métodos oficiales para la determinación de la migración específica de varias sustancias. Sin embargo, de los constituyentes de los aceites esenciales, únicamente existe metodología para la determinación del eugenol, propuesta por Jan J. de Bont en 1992, y basada en la extracción con metanol durante 24 h e inyección directa en HPLC.

No hay que perder de vista que los terpenos son compuestos volátiles y semivolátiles, por lo que es preferible el empleo de métodos de análisis basados en cromatografía de gases. Así,

la extracción con diclorometano y mezclas de dietil éter-pentano (1:1), seguido de un análisis por GC/MS, se ha estudiado para la extracción de linalol, nerol, α -terpineol, citronelol y geraniol de muestras hidroalcohólicas con resultados interesantes (López y Gómez, 2000). Otros métodos de extracción habituales se basan en extracción en fase sólida, SPE, empleando carbón activo (Edris et al, 2003), y en microextracción en fase sólida, SPME, (Deng *et al.*, 2004; Tovar *et al.*; 2005; López *et al.*, 2005 y 2006). Recientemente se ha publicado la extracción con mezclas de acetato de etilo/tetrahidrofurano (4:1 v/v), de lactonas de terpenos desde muestras acuosas. Tras la evaporación de la fase orgánica, el producto obtenido por redisolución con metanol se inyectaba en HPLC para su análisis (Lanq *et al.*, 2004).

Una alternativa interesante es la microextracción por gota en fase líquida (L-SDME). En ella, una microgota de disolvente orgánico, inmisible con el agua, se suspende en la punta de una jeringa y se sumerge en una disolución acuosa con agitación durante un cierto tiempo (Liu y Dasgupta, 1996; Jeannot y Cantwell, 1996 y 1997; Psillakis y Kalogerakis, 2002) es una técnica rápida y barata, que presenta múltiples ventajas frente a la extracción líquida convencional, la SPE y la SPME. Al igual que la SPME, con la L-SDME, prácticamente se elimina el uso de disolventes orgánicos, se consiguen factores de enriquecimiento más elevados y se integra la extracción e inyección en un solo equipo. Además, tal y como se vio en el capítulo 7, existe una mayor disponibilidad de disolventes orgánicos inmiscibles en agua, frente al limitado número de fibras de SPME disponible.

Teóricamente, la concentración de de los analitos en la gota, suponiendo que el volumen de esta se mantiene constante durante la extracción, viene determinada por la expresión (Psillakis y Kalogerakis, 2002):

$$C_A^o(t) = C_A^{o,eq} [1 - e^{-\lambda t}] \quad \text{Eq [6]}$$

donde $C_A^o(t)$ es la concentración del compuesto A en la fase orgánica (gota) a tiempo t; y $C_A^{o,eq}$ es la concentración de equilibrio del analito en la microgota y λ es una constante de velocidad de transferencia:

$$C_A^{o,eq} = \frac{K_A C_{A,0}^{aq} V^{aq}}{V^{aq} + K_A V^o} \quad \text{Eq [7]}$$

$$\lambda = \frac{k_{tot}^o A}{V^o} \left(1 + \frac{K_A V}{V^{aq}} \right) \quad \text{Eq [8]}$$

donde $C_{A,0}^{aq}$ es la concentración inicial de analito en la fase acuosa, V^o y V^{aq} son, respectivamente, los volúmenes de la fase orgánica (microgota) y la fase acuosa, A es el área de la interfase, K_A es el coeficiente de distribución del analito y k_{tot}^o es el coeficiente global de transferencia de materia. En la teoría de las dos capas, el coeficiente global de transferencia de materia se calcula como:

$$\frac{1}{k_{tot}^o} = \frac{1}{k^o} + \frac{K_A}{k^{aq}} \quad \text{Eq [9]}$$

donde k^o y k^{aq} son los coeficientes de transferencia del analito en la fase orgánica y en la fase acuosa. Esta última se calcula según la ecuación de Nernst o teoría de la capa límite, que define la transferencia de materia en la fase acuosa para la extracción con microgota (Jeannot y

Cantwell, 1997). El coeficiente de transferencia es función de la difusividad molecular (D_A) del analito en fase acuosa y del espesor de la interfase que se forma alrededor de la microgota (d).

$$k^{aq} = \frac{D_A^{aq}}{\delta} \quad \text{Eq [10]}$$

La aplicación de esta técnica para la extracción de los ftalatos presentes en simulantes acuosos (A, B, y C) ya ha sido evaluada (Battle y Nerín, 2004). Queda pendiente su aplicación para la extracción de migrantes de distinta naturaleza.

Debido a las características fisico-químicas del disolvente empleado en la L-SDME, no es posible el análisis de los simulantes grasos (aceite de oliva o simulantes alternativos) por exposición directa de la gota. Con el fin, entre otros, de solucionar este problema, se han desarrollado técnicas, como las membranas y las fibras huecas (Shen y Lee, 2002; Zhao y Lee, 2002; Basheer y Lee, 2004) que protegen al disolvente orgánico de la extracción.

9.2. EXPERIMENTAL

9.2.1. Ensayos de migración global

Los ensayos de migración global se realizaron por las dos caras. En el interior de un vial de 20 mL se colocó una lámina de 1 dm² del film correspondiente. Se añadió la cantidad de simulante necesaria para cubrir la lámina por completo (\approx 15 g). El vial se cerró herméticamente y se llevó a una estufa a 40 °C durante 10 días. Las condiciones experimentales de los ensayos de migración se rigen por la legislación europea (97/48/CE) en función del tiempo y temperatura de contacto real. Puesto que los envases activos objeto de estudio se pretenden aplicar a alimentos de estantería, es decir, cuya permanencia en el envase es superior a 24 horas a temperatura ambiente, se seleccionaron las condiciones de ensayo estándar, es decir 10 días de contacto a 40 °C. Pasado este tiempo, se extrajo la lámina y el contenido del vial se llevó hasta sequedad por evaporación controlada, evitando la ebullición, y se pesó.

Los ensayos de migración global se realizaron, por quintuplicado, para los siguientes films:

- PP y PE/EVOH (blancos).
- PP y PE/EVOH con aceite esencial de canela al 4%, Ca4.
- PP y PE/EVOH con aceite esencial de clavo al 4%, C4.
- PP y PE/EVOH con aceite esencial de orégano al 4%, Or4.
- PP y PE/EVOH con canela enriquecida en cinamaldehído al 4%, enCa4.

9.2.2. Ensayos de migración específica

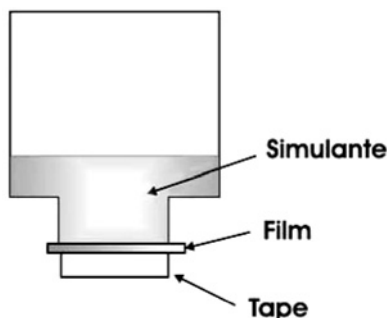
Los ensayos de migración específica se realizaron con una cara del film en contacto directo con el simulante. Únicamente se muestrearon las láminas activas de PP y PE/EVOH con mayor actividad antimicrobiana, es decir, aquellas que llevan incorporado aceite esencial de orégano y aceite esencial de canela enriquecido en cinamaldehído al 4%. Ambas caras del film se sometieron al ensayo de forma independiente con el objetivo de comprobar la difusión de los compuestos activos a través del film.

Un bote de 250 mL y con un diámetro de boca de 6 cm se rellenó con 41,72 g de simulante. El film se colocó en la boca del bote y tras cerrar y asegurar su hermeticidad, se gira el conjunto para favorecer el contacto del simulante con la cara del film a estudiar. La superficie de film en contacto con el simulante era 28,27 cm², lo que permite guardar aproximadamente la relación establecida en la legislación: 1 kg por 6 dm² (figura III.57). Las muestras se almace-

naron a 40 °C y durante 10 días, según lo establecido en la Directiva 97/48/CE (97/48/CE). Pasado ese tiempo, se giran los botes a su posición original, se retira el film, se pesa el contenido de simulante y se extrae de la muestra la cantidad necesaria para la determinación de los compuestos migrados en las condiciones optimizadas.

■ FIGURA III.57

Esquema del sistema experimental en los ensayos de migración específica



Los ensayos de migración se realizaron por triplicado. Los analitos migrados del plástico a los simulantes A, B y C se extrajeron por la técnica L-SDME y se analizaron por GC-MS. El simulante D (isooctano), se inyectó directamente en el equipo de GC-MS, previa adición del estándar interno (verbenona). Las láminas de PP y PE/EVOH, sin adición de componente activo, aptas para contacto con alimentos según especificaciones de fabricante, constituyeron los blancos de análisis.

9.2.3. Características físico químicas de los analitos analizados

La selección de los compuestos a analizar se basó en el estudio de los componentes volátiles de los aceites esenciales (ver capítulo 7). A esta lista se le añadió el tributil citrato, plastificante y estabilizante de calor, habitual en los films destinados a envase alimentario.

En la tabla III.29 se muestran las propiedades físico-químicos de los analitos seleccionados, así como su límite de migración específica SML (*Directiva 2002/72/CE*) y el número FL o número de aromatizante (*Decisión 2002/113/CE*) para aquellos compuestos destinados a entrar en contacto con alimentos.

TABLA III.29

CAS (Chemical Abstract Service), solubilidad en agua a 25 °C, log $P_{\text{octanol-agua}}$, límite de migración específica (SML) y n°FL (sustancia aromatizante). (a) No debe alterar las características organolépticas del alimento

Compuesto	CAS	Solubilidad en agua 25°C (mg/L)	^a Log $P_{\text{octanol-agua}}$	pKa	SML (mg/kg)	n° FL
α -Pinoeno	80-56-8	2,49	4,83		60	01.004
Canfeno	79-92-5	4,6	4,22			01.009
β -Pinoeno	18172-67-3	9,22	4,35		60	01.003
<i>p</i> -Cimeno	99-87-6	23,4	4,10			01.002
Limoneno	5989-27-5	13,8	4,57			01.046
1,8-Cineol	470-82-6	3500	2,74			03.001
α -Terpinoleno	586-62-9	9,5	4,47			01.005
Linalol	78-70-6	1590	2,97			02.013
Canfor	76-22-2	1600	2,38		(a)	07.006
Borneol	464-43-7	740	2,85			02.016
Estragol	140-67-0	178	3,47			04.010
Cinamaldehído	14371-10-9	3760	1,82			05.014
Timol	89-83-8	900	3,30	10,6		04.006
Bornil acetato	76-49-3	23,2	3,86			09.017
Carvacrol	499-75-2	1250	3,49	10,6		04.031
Eugenol	97-53-0	2460	2,27	10,2	0,02	04.003
β -Cariofileno	87-44-5	0,0743	6,30			01.007
α -Humuleno	6753-98-6	0,0177	6,95			01.043
Bencil benzoato	120-51-4	15,4	3,97			09.727
Tributil citrato	77-94-1	247	3,28			09.511

^aFuente: SRC (www.syres.com/esc/phsydemo.htm)

9.2.4. Microextracción por gota en fase líquida

Una gota de 2,5 μL de 6 $\mu\text{g/g}$ de verbenona en *p*-xileno se suspende durante el tiempo requerido en el interior de un vial de 4 ó 20 mL, conteniendo una disolución acuosa de terpenos. Pasado ese tiempo, la gota se retrae y se inyecta en un GC/MS.

9.2.5. Optimización y características analíticas del método L-SDME

A partir de una disolución patrón conteniendo aproximadamente 650 $\mu\text{g/g}$ de concentración de los estándares en etanol, se prepararon, en botes de vidrio ámbar de 250 mL y, 24 horas antes a la realización de los ensayos, disoluciones de 2,0 $\mu\text{g/g}$ en los simulante A (agua destilada), B (3% (m/v) de ácido acético en agua) y C (10% (v/v) de etanol en agua). Las disoluciones se almacenaban en nevera hasta el día siguiente, cuando se tomaba de los botes la muestra necesaria para la realización de cada uno de los ensayos de optimización.

La relación normalizada entre el área del compuesto y el área del estándar interno (verbenona) constituye la respuesta objetivo en la optimización. Esta respuesta, con el fin de eliminar distorsiones en el modelado, se normalizó respecto a la mediana de las relaciones obtenidas para cada punto del diseño. El proceso se llevó a cabo de manera conjunta (global) para todos los analitos e individual para cada uno de ellos.

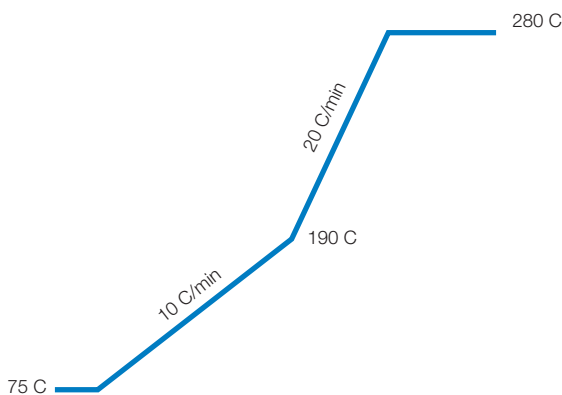
Para la determinación de la robustez, repetibilidad y precisión intermedia se emplearon disoluciones de terpenos, preparadas 24 h antes, a concentración 0,05 $\mu\text{g/g}$ en simulante A, B y C, concentración del mismo orden de magnitud que la correspondiente al límite de migración específica (SML) de eugenol.

9.2.6. Análisis por GC-MS

El análisis de las muestras se efectuó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas 5973 como detector. La columna capilar escogida para separar los analitos fue una HP-5 MS (60 m x 0,25 mm; 0,25 μm de espesor). La temperatura de inyección fue 270 $^{\circ}\text{C}$, en modo splitless durante 18 s. El programa de temperaturas del horno cromatográfico se muestra en la figura III.58.

■ FIGURA III.58

Programa de temperatura del horno cromatográfico



La temperatura de la interfase fue de 280 $^{\circ}\text{C}$ y el flujo de gas portador, helio de 99,999 pureza, constante a 1 mL/min. La cuantificación de la migración en los simulantes A, B y C se realizó en modo scan, en un rango de 45 a 250 m/z y a una velocidad de barrido de 6,61 u.m.a/s. Las muestras de simulante D se inyectaron en modo scan y se cuantificaron en modo SIM (Selective Ion Monitoring), con las siguientes relaciones masa/carga: α -pineno, canfeno, β -pineno, α -terpinoleno y linalol, m/z 93 y 121; *p*-cimeno, limoneno y 1,8-cineol, m/z 119, 68 y 134; canfor, borneol y estragol m/z 95y 148; verbenona, m/z 107 y 135; cinamaldehído, timol, bornil acetato y carvacrol, m/z 131, 135 y 95; eugenol, m/z 164; β -cariofileno, m/z 133, 105 y α -humulene, m/z 93.

9.3. RESULTADOS Y DICUSIÓN

9.3.1. Ensayos de migración global

Los resultados de los ensayos de migración global se muestran en la tabla III.30.

TABLA III.30

Valores de migración global (mg/dm²) para los films antimicrobianos con un 4% de esencia

		Blanco	C4	Ca4	Or4	enrCa4
Sim.A	PP	n.d.	n.d.	1,24±0,03	n.d.	0,02±0,02
	PE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sim.B	PP	0,01±0,02	n.d.	0,32±0,05	n.d.	0,14±0,10
	PE	0,11±0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sim.C	PP	n.d.	n.d.	n.d.	0,09±0,08	n.d.
	PE	0,05±0,02	n.d.	0,02±0,01	n.d.	n.d.
Sim.D	PP	0,06±0,03	0,24±0,16	0,32±0,19	0,13±0,10	n.d.
	PE	n.d.	0,84±0,40	1,49±1,08	0,41±0,24	0,12±0,04

n.d.: no detectado. C: clavo, Ca: canela, Or: orégano, enrCa: canela enriquecida

Como simulante graso (D) se empleó isooctano. Las razones de esta elección se basan, en primer lugar, en su mayor compatibilidad con el sistema de análisis (GC-MS) que facilita la inyección directa, y en segundo lugar, por razones de seguridad alimentaria, al sobreestimar la migración de los alimentos sólidos, tal y como se mencionó en la sección II.

Los valores de migración global calculados no sobrepasan, en ningún caso, el límite establecido por la Legislación Europea en la Directiva 2002/72 (2002/72/CE), de 10 mg/dm².

Las mayores migraciones se producen en el simulante D, simulante graso. Debido a su carácter lipofílico, la solubilidad de los polímeros PP, PE/EVOH es mayor en los disolventes apolares. En este caso, el isooctano, simulante más apolar, penetra con mayor facilidad entre las cadenas poliméricas, consiguiendo una mayor extracción (migración) de los componentes orgánicos del film.

En el resto de simulantes, sólo se detectó migración global en polipropileno para la esencia de canela y la esencia de canela enriquecida en cinamaldehído. En el capítulo anterior se demostró la menor interacción entre los componentes activos del film y el polipropileno, por lo que los compuestos procedentes de los aceites esenciales se liberan con mayor facilidad a simulantes acuosos (A, B y C) desde el film PP que desde el film PE/EVOH. En el caso del simulante graso, su mayor poder de penetración en la estructura interna del film, origina una mayor migración en los films de PE/EVOH que en los de PP.

En cualquier caso, y desde el punto de vista de la migración global, la utilización de los films activos, en los que se ha incorporado producto activo en un 4%, no entraña ningún riesgo en la salud del consumidor. No obstante, esta información general debe completarse mediante los ensayos de migración específica, en los que se determinará la inocuidad de los films antimicrobianos.

9.3.2. Ensayos de migración específica

9.3.2.1. Optimización del método de extracción L-SDME: simulantes A, B y C

La elección del disolvente de extracción más apropiado es una decisión muy importante para lograr una selectividad adecuada de los analitos. El *p*-xileno con un punto de ebullición elevado (se reducen las pérdidas por evaporación), una tensión superficial elevada (fuerzas de cohesión en la interfase para evitar la re-disolución), y un valor de log P similar a la mayoría de los analitos de interés, fue el disolvente de extracción escogido entre los candidatos que se muestran en la tabla III.31 y seleccionados en base a la bibliografía consultada (Psillakis y Kalogerakis, 2001 y 2002; López-Blanco *et al.*, 2003; Batlle y Nerín, 2004).

■ TABLA III.31

Propiedades de los disolventes de extracción

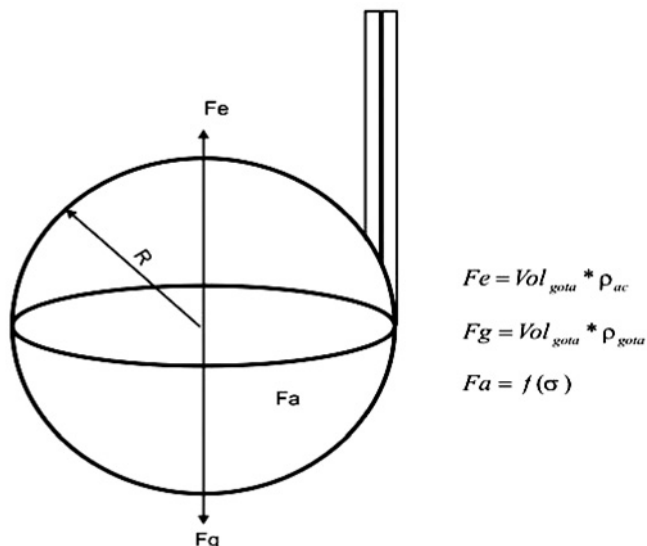
Disolvente de extracción	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 25 °C)	Tensión superficial (din cm ⁻¹)	Log P	Temperatura de ebullición (°C)
<i>n</i> -Hexano	9,5	17,91	3,90	68,7
Diclorometano	1320	28,12	1,25	40
<i>p</i> -Xileno	162	28,30	3,20	138,3
Isooctano	2,44	18,77	4,09	99,2
Tolueno	526	28,53	2,73	110,6

Fuente: www.chemfinder.com

El resto de variables a optimizar fueron:

- Volumen de la gota (Vg): Cuanto mayor es el volumen de la gota, mayor es la cantidad de analitos extraídos, debido al incremento de la superficie de la interfase L-L. Sin embargo, las gotas de gran tamaño son más inestables. La gota se mantiene en el bisel de la jeringa por la acción de tres fuerzas (ver figura III.59).

■ FIGURA III.59

Esquema de las fuerzas que interviene en la suspensión de la gota en la punta de la jeringa

$$F_e = Vol_{gotas} * \rho_{ac}$$

$$F_g = Vol_{gotas} * \rho_{gotas}$$

$$F_a = f(\sigma)$$

F_e : empuje; F_g : gravedad; F_a : adhesión; Vol_{gotas} : volumen de la gota; ρ_{gotas} : densidad de la gota; ρ_{ac} : densidad de la disolución acuosa; σ : tensión superficial.

Cuando $F_e - F_g$ es mayor que F_a debido al aumento del volumen ($\rho_{ac} > \rho_{gota}$), la gota comienza a desplazarse lentamente hacia la superficie desde la punta de la jeringa (He y Lee, 1997). Además, la inyección de grandes volúmenes produce un ensanchamiento en los picos cromatográficos.

- **Tiempo de extracción (Ti):** La L-SDME no es un método de extracción total, ya que los analitos se reparten entre la fase acuosa y la fase orgánica (microgota) en función de la constante de reparto. Aunque la máxima sensibilidad se alcanza en el equilibrio, éste se suele alcanzar a tiempos de trabajo del orden de 30 minutos o superiores, de manera que por razones operativas (entre las que ocupa un lugar relevante el aumento en la ratio de pérdida de gotas con el tiempo), se suele trabajar a tiempos más cortos. Por lo tanto, para que las características analíticas del método no se vean comprometidas, es necesario llevar a cabo un control exhaustivo de este tiempo.
- **Grado de agitación (Ag):** La agitación de la muestra mejora la extracción y reduce el tiempo en que se alcanza el equilibrio. La teoría de la capa límite para la transferencia global de materia, propuesta por Nernst (Nernst, 1904) y desarrollada por Lewis y Whitman (Lewis y Whitman, 1924; Cussler, 1984) explica este hecho. Según esta teoría, el coeficiente de transferencia de masa para la fase acuosa es inversamente proporcional al espesor de la capa límite (δ). Al aumentar el grado de agitación, se aumenta la turbulencia y disminuye δ . No obstante, demasiada turbulencia puede ocasionar el desprendimiento de la gota (Psillakis y Kalogerakis, 2001).
- **Adición de sal (Sa):** La adición de sal incrementa la fuerza iónica de la disolución. Generalmente, la adición de sal reduce la solubilidad de los analitos en la fase acuosa (efecto salting-out). Sin embargo, en varios estudios se ha mostrado un efecto adverso con la presencia de sal (Psillakis y Kalogerakis, 2002; López-Blanco *et al.*, 2003; Lambropoulou *et al.*, 2004), atribuido a la variación de las propiedades físicas en de la capa límite o film de difusión de Nernst, responsables de la disminución de la velocidad de difusión. Palit (Palit *et al.*, 2005) demostró que, aunque el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio aumenta con la presencia de sal, se logra una mayor extracción de los analitos.
- **Temperatura de extracción (Te):** Los efectos de la variación de la temperatura en la microextracción son diversos. Además de los efectos puramente prácticos, es evidente que un incremento de temperatura aumenta el coeficiente de difusión en la capa límite, pero disminuye el coeficiente de partición en la fase orgánica (Lord y Pawliszyn, 2000), de forma que el equilibrio se alcanza a tiempos más cortos, pero con una concentración menor de analito extraído. Otra implicación, relacionada con la anterior, viene dada por el hecho de que si no se trabaja en condiciones de equilibrio, la cantidad extraída aumenta por el incremento de la difusión a través de la capa límite.
- **Volumen de vial (Vv):** El volumen del vial, y más concretamente su forma, puede afectar a la estabilidad de la gota. La proximidad de las paredes del vial a la gota tiene varios efectos como por ejemplo el que la gota, por tensión superficial, se desestabiliza y dispersa en la superficie de la pared.
- **Volumen de llenado (%V):** El volumen de llenado tiene una relación directamente proporcional con la masa de analito presente en la fase acuosa.

La optimización de las condiciones de extracción se realizó en dos pasos. En una primera aproximación se obtuvieron las variables relevantes para cada simulante mediante un diseño de experimentos tipo Plackett-Burman (Plackett y Burman, 1946) que incluía ocho variables

a dos niveles y tres experimentos en el punto central. En la tabla III.32, se muestra el rango experimental de los factores seleccionados para el estudio. Se incluyó una variable azar (Ra), que no implica variación experimental alguna, como medida de la calidad del método. En este primer paso el criterio de optimización seguido fue la obtención de la máxima sensibilidad, calculada como la suma del área normalizada de todos los analitos.

■ TABLA III.32

Rango experimental de los factores de optimización considerados y su valor óptimo

Factores	Rango experimental	Valores óptimos		
		Sim A	Sim B	Sim C
Volumen vial (Vv (mL))	4, 10, 20	4	4	20
%llenado (%V)	50-90	90	50	50
Volumen de gota (Vg (μL))	0,5-2,5	2,5	2,5	2,5
Tiempo de extracción (Ti (min))	0,5-10	10	10	10
Temperatura de extracción (Te (°C))	30-80	30	30	60
%Sal (Sa)	0-10	0	0	0
Agitación (Ag (rpm))	100-400	100	400	100

En negrita, los factores significativos para cada simulante.

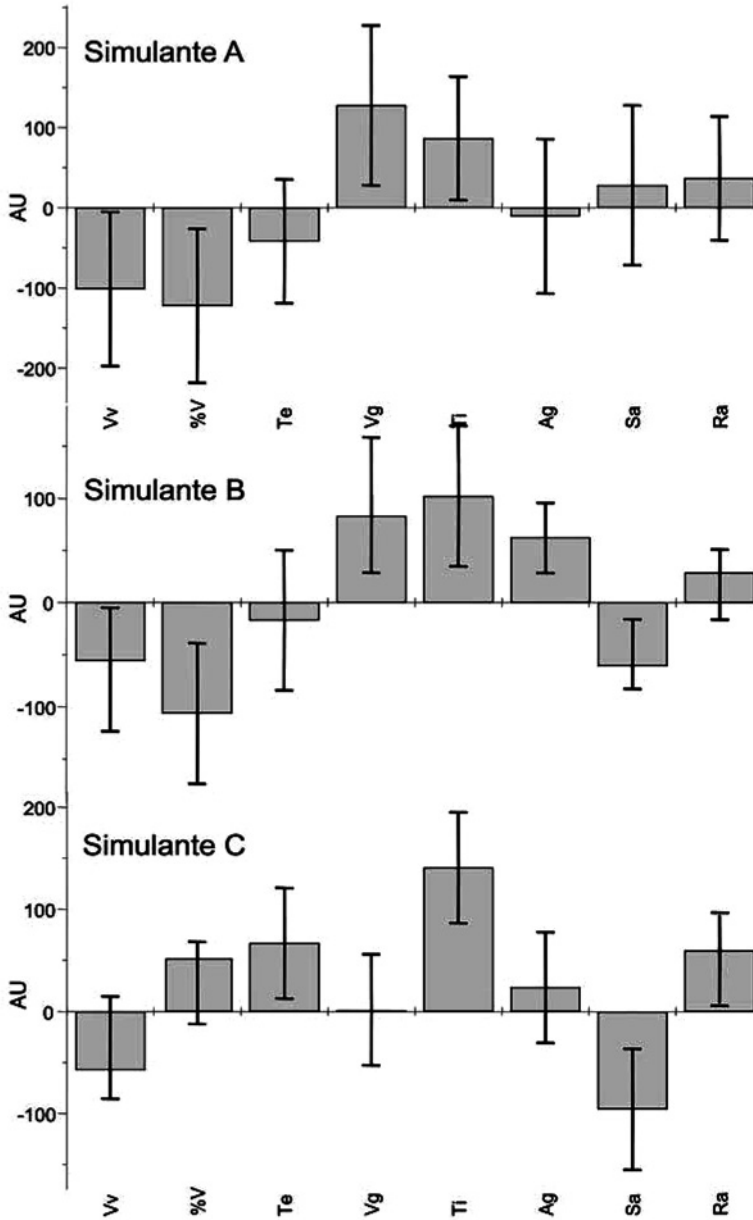
El volumen del vial (Vv), el volumen de llenado (%V), el volumen de gota (Vg) y el tiempo de extracción (Ti) son las variables más relevantes para los simulantes A y B (figura III.60). La extracción en estos simulantes se ve favorecida por un menor volumen de vial y muestra (disminuyendo el efecto de la difusión en la masa acuosa), y un mayor tiempo de extracción y volumen de gota (aumentando la superficie de la interfase). En el simulante B, 3% de ácido acético (m/m), también son significativos los factores de agitación (Ag), correlacionado positivamente, y el porcentaje de sal (Sa), correlacionado negativamente.

Para los compuestos con elevados coeficientes de reparto (K), la transferencia de masa en la fase acuosa es la etapa limitante. Sin embargo, cuanto más pequeño es el valor de K, es imprescindible considerar la transferencia de masa en ambas fases líquidas (Jeannot y Cantwell, 1996). Esta teoría se ilustra en el simulante C, que con un 10% de etanol, es menos inmiscible en *p*-xileno que los otros dos simulantes. En este caso, la temperatura de extracción (Te), que incrementa la difusión en el seno de la fase orgánica y acuosa, se convierte en un factor a tener en cuenta. El tiempo de extracción y el porcentaje en sal son igualmente variables significativas en este simulante (figura III.60).

En todo caso, estas conclusiones deben ser tomadas con precaución, ya que las interacciones entre variables no están incluidas en el modelo de "screening". Es destacable que la variable ficticia Ra no tiene relevancia en el caso de los modelos obtenidos para los simulantes A y B. Sin embargo, para el simulante C (10% v/v EtOH) la barra de error del coeficiente no cruza el valor nulo, lo que le asigna una teórica influencia positiva, pero con poco peso global. Este hecho indica que las variables seleccionadas no describen en su totalidad el proceso, lo que en principio obligaría a redefinir las mismas, incluyendo parámetros relacionados con miscibilidad y redisolución. Sin embargo, debido a su bajo peso estadístico no se llevó a cabo la reforma del modelo.

FIGURA III.60

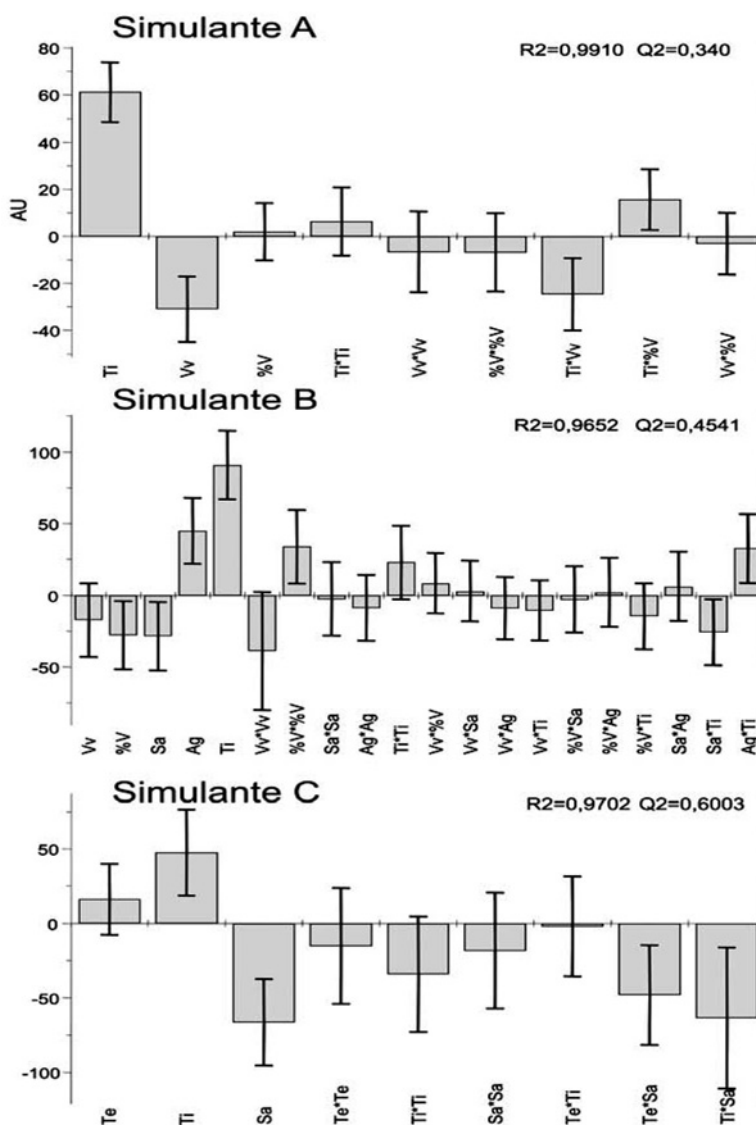
Factores relevantes en L-SDME de los terpenos de los simulantes A, B y C



En el siguiente paso de la optimización se calculó la superficie de respuesta para los tres simulantes según el modelo cuadrático de Box Behnken, que propone experimentos para el valor medio del rango de los factores relevantes, además de un experimento por triplicado en el punto central. La figura III.61 muestra los factores significativos y los coeficientes para el global de los analitos, así como los valores descriptivos R^2 y Q^2 .

■ FIGURA III.61

Coefficientes para los factores significativos en la superficie de respuesta



Para los simulantes A y B, el tiempo de extracción (T_i) es el factor más influyente, lo que indica que en ningún caso se ha alcanzado el equilibrio. Así, un incremento en el tiempo de extracción se correlaciona de forma directa con un incremento en la cantidad extraída, como demuestra el valor positivo de los coeficientes de la variable en el modelo. Para el simulante A, cuanto menor es el volumen del vial (V_v), mayor cantidad de analitos se extraen. Aunque el porcentaje de llenado ($\%V$) no tiene importancia como variable independiente, si ejerce influencia a través de la interacción cruzada $T_i*\%V$.

La agitación (Ag) favorece la extracción en el simulante B, al aumentar la transferencia de materia por la disminución del espesor de la capa límite. El coeficiente de la interacción cruzada $Ag*T_i$ es positivo, lo que significa que ambas variables actúan en el mismo sentido. El resto de variables significativas para el simulante B son el porcentaje de llenado ($\%V$), la fuerza iónica de la fase acuosa (S_a), el término cuadrático $\%V*\%V$ y la interacción cruzada S_a*T_i . En este caso, la adición de sal produce un efecto contrario al conocido como "salting-out". La variación de las propiedades de la capa límite o film de Nernst, como consecuencia del aumento en la fuerza iónica de la fase acuosa, ha ocasionado una disminución en la velocidad de transferencia. Al contrario que en el estudio de Palit (Palit *et al.*, 2005), el incremento del tiempo de extracción en los experimentos con mayor contenido salino no mejora el proceso, tal y como indica el coeficiente negativo del término S_a*T_i .

Los coeficientes representados en la figura III.61 para el simulante B son representativos de la tendencia global, marcada por los analitos linalol, canfor, borneol, estragol, cinamaldehído, timol, bornil acetato, carvacrol, eugenol, β -cariofileno, α -humuleno, bencil benzoato y tributil citrato. Para los analitos más volátiles (α -pineno, canfeno, β -pineno, p -cimeno, limoneno y α -terpinoleno), el volumen del vial (V_v) y las interacciones cruzadas $\%V*T_i$ y S_a*Ag también son factores relevantes.

La variable más significativa en la extracción de los analitos del simulante C es la fuerza iónica (S_a), seguida de la interacción cruzada T_i*S_a , ambas correlacionadas negativamente. Al igual que en el simulante B, la variación de las propiedades físicas de la capa límite con la adición de sal disminuye la velocidad de transferencia de materia, y por tanto, la cantidad total de masa transferida. En este simulante, tampoco se ha conseguido alcanzar el equilibrio, razón por la que el tiempo de extracción (T_i), es un factor relevante con influencia positiva en la extracción. La importancia de la temperatura de extracción (T_e) en la extracción global se refleja en la interacción cruzada T_e*S_a . En cambio, la extracción de p -cimeno, limoneno, a -terpinoleno, β -cariofileno y α -humuleno aumenta con la temperatura. Para estos analitos, la temperatura también ejerce su efecto en la interacción cruzada T_e*T_i .

Los valores óptimos obtenidos de las superficies de respuesta se muestran en la tabla III.32.

9.3.2.2. Características analíticas del método

La validación del método se realizó mediante el cálculo de la robustez, precisión, rango lineal y límites de detección (ver tablas III.33 y III.34).

La robustez se define como la insensibilidad del método ante fluctuaciones en el valor de las variables de procedimiento. Dichas fluctuaciones son muy pequeñas y difíciles de prevenir. La robustez se evaluó mediante un diseño de Plackett-Burman de las variables significativas con una variación de $\pm 10\%$. La influencia de las variables se determinó por comparación entre los coeficientes obtenidos para cada variable y sus barras de error. Como las barras de error cruzan el eje de abscisas, el valor de los coeficientes puede ser negativo o positivo, lo que impli-

ca que los factores no son influyentes, y por consiguiente, los métodos son robustos. Este fue el caso para todos los factores considerados.

■ TABLA III.33

Robustez (Rob), repetibilidad (Repet) y precisión (Prec.), expresadas como %RSD

	Simulante A			Simulante B			Simulante C		
	Rob.	Repet n=8	Prec.	Rob.	Repet n=8	Prec.	Rob.	Repet n=8	Prec.
<i>p</i> -Cimeno	Si	9%	15%	Si	10%	11%	Si	18%	11%
Limoneno	Si	22%	16%	Si	12%	11%	Si	13%	10%
1,8-Cineol	Si	7%	4%	Si	20%	4%	Si	13%	12%
Linalol	Si	10%	8%	Si	18%	15%	Si	10%	13%
Canfor	Si	10%	5%	Si	13%	12%	Si	7%	15%
Borneol	Si	12%	11%	Si	16%	15%	Si	11%	12%
Estragol	Si	13%	2%	Si	15%	12%	Si	10%	18%
Cinamaldehído	Si	8%	10%	Si	19%	8%	Si	14%	18%
Timol	Si	14%	10%	Si	16%	14%	Si	13%	6%
Bornil acetato	Si	13%	11%	Si	16%	16%	Si	12%	16%
Carvacrol	Si	14%	2%	Si	16%	15%	Si	11%	15%
Eugenol	Si	15%	15%	Si	13%	7%	Si	4%	14%
Bencil Benzoato	Si	12%	17%	Si	24%	18%	Si	16%	16%
Tributil citrato	Si	7%	15%	Si	21%	12%	Si	18%	8%
TOTAL	Si	12%	5%	Si	15%	12%	Si	14%	13%

La precisión, para los analitos mostrados en la tabla III.34, fue evaluada según dos parámetros: la repetibilidad (misma muestra analizada con el mismo método en un corto intervalo de tiempo) y precisión a concentraciones bajas (misma muestra pero analizada en diferentes días). Los resultados, expresados como porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) y mostrados en la tabla III.33, son similares para ambas definiciones y para los tres simulantes.

■ TABLA III.34

Rectas de calibrado $Y:A/A_{\text{verbenona}}; X:C/C_{\text{verbenona}}$, rango lineal y límite de detección (LOD)

	Recta calibrado	Linealidad ($\mu\text{g/g}$)	R^2 (n=8)	LOD ($\mu\text{g/g}$)
SIMULANTE A				
1. <i>p</i> -Cimeno	$Y=11,058 \cdot X - 0,021$	0,023-1,61	0,9863	0,020
2. Limoneno	$Y=1,8531 \cdot X + 0,0317$	0,013-1,50	0,9320	0,001
3. 1,8-Cineol	$Y=98,986 \cdot X - 0,02198$	0,024-1,65	0,9976	0,016
4. Linalol	$Y=68,521 \cdot X - 0,1567$	0,015-1,76	0,9959	0,005
5. Canfor	$Y=83,877 \cdot X - 0,0579$	0,012-1,46	0,9959	0,005
6. Borneol	$Y=28,366 \cdot X - 0,0095$	0,012-1,45	0,9998	0,006
7. Estragol	$Y=66,172 \cdot X - 0,0438$	0,014-1,66	0,9990	0,005
8. Cinamaldehído	$Y=108,02 \cdot X - 0,6267$	0,051-2,23	0,9961	0,043
9. Timol	$Y=98,71 \cdot X - 0,0942$	0,012-1,44	0,9989	0,011
10. Bornil acetato	$Y=52,735 \cdot X + 0,001$	0,020-1,61	0,9965	0,007
11. Carvacrol	$Y=150,01 \cdot X - 0,316$	0,024-1,49	0,9957	0,019
12. Eugenol	$Y=76,416 \cdot X - 0,3235$	0,033-2,29	0,9950	0,030
13. Bencil benzoato	$Y=11,162 \cdot X + 0,194$	0,026-2,05	0,9919	0,017
14. Tributil citrato	$Y=3,7832 \cdot X + 0,0484$	0,010-1,52	0,9776	0,005

TABLA III.34 (continuación)

		Recta calibrado	Linealidad ($\mu\text{g/g}$)	R^2 (n=8)	LOD ($\mu\text{g/g}$)
SIMULANTE B	1. <i>p</i> -Cimeno	$Y=353,84 \cdot X+0,5226$	0,006-1,62	0,9953	0,020
	2. Limoneno	$Y=35,12 \cdot X+0,6028$	0,007-1,51	0,9545	0,001
	3. 1,8-Cineol	$Y=250,89 \cdot X-7,0947$	0,026-1,65	0,9904	0,017
	4. Linalol	$Y=1282 \cdot X-0,8152$	0,007-1,77	0,9978	0,003
	5. Canfor	$Y=3465,4 \cdot X-6,3844$	0,023-1,46	0,9917	0,011
	6. Borneol	$Y=773,31 \cdot X-0,377$	0,011-1,45	0,9941	0,006
	7. Estragol	$Y=3385,6 \cdot X-1,2886$	0,010-1,66	0,9945	0,005
	8. Cinamaldehído	$Y=3975,4 \cdot X-23,384$	0,051-2,24	0,9954	0,035
	9. Timol	$Y=3876 \cdot X-7,6259$	0,023-1,44	0,9924	0,012
	10. Bornil acetato	$Y=2335,5 \cdot X+0,2497$	0,006-1,49	0,9940	0,002
	11. Carvacrol	$Y=3987,8 \cdot X-15,32$	0,035-1,49	0,9950	0,023
	12. Eugenol	$Y=2730,2 \cdot X-9,78$	0,036-2,30	0,9916	0,022
	13. Bencil benzoato	$Y=673,69 \cdot X+12,438$	0,024-3,91	0,9909	0,005
	14. Tributil citrato	$Y=228,26 \cdot X+5,4779$	0,006-1,54	0,9948	0,004
SIMULANTE C	1. <i>p</i> -Cimeno	$Y=48,589 \cdot X+0,0299$	0,020-2,75	0,9907	0,013
	2. Limoneno	$Y=27,928 \cdot X-0,0686$	0,033-1,63	0,9904	0,026
	3. 1,8-Cineol	$Y=135,58 \cdot X+0,68$	0,006-1,78	0,9947	0,001
	4. Linalol	$Y=89,825 \cdot X+1,2038$	0,005-3,01	0,9931	0,001
	5. Canfor	$Y=110,89 \cdot X+0,9292$	0,004-2,48	0,9911	0,001
	6. Borneol	$Y=32,286 \cdot X+0,2083$	0,004-2,46	0,9890	0,001
	7. Estragol	$Y=162,87 \cdot X-0,3511$	0,023-1,80	0,9978	0,018
	8. Cinamaldehído	$Y=89,386 \cdot X+0,7435$	0,051-2,24	0,9954	0,021
	9. Timol	$Y=123,1 \cdot X+0,5211$	0,010-2,46	0,9911	0,005
	10. Bornil acetato	$Y=157,43 \cdot X-0,4548$	0,025-2,74	0,9937	0,018
	11. Carvacrol	$Y=114,68 \cdot X+0,5187$	0,005-2,53	0,9917	0,001
	12. Eugenol	$Y=82,321 \cdot X+0,3071$	0,006-3,90	0,9974	0,002
	13. Bencil benzoato	$Y=32,414 \cdot X-0,3616$	0,150-4,24	0,9968	0,102
	14. Tributil citrato	$Y=19,291 \cdot X+0,1369$	0,004-2,58	0,9945	0,001

La linealidad se determinó por una regresión por mínimos cuadrados. Los resultados obtenidos (tabla III.33) demuestran que los métodos son lineales en tres órdenes de magnitud. El efecto de la matriz en la extracción por L-SDME queda patente por la diferencia en las pendientes de las rectas de calibrado. Las máximas sensibilidades se obtuvieron en la extracción del simulante B (3% ácido acético).

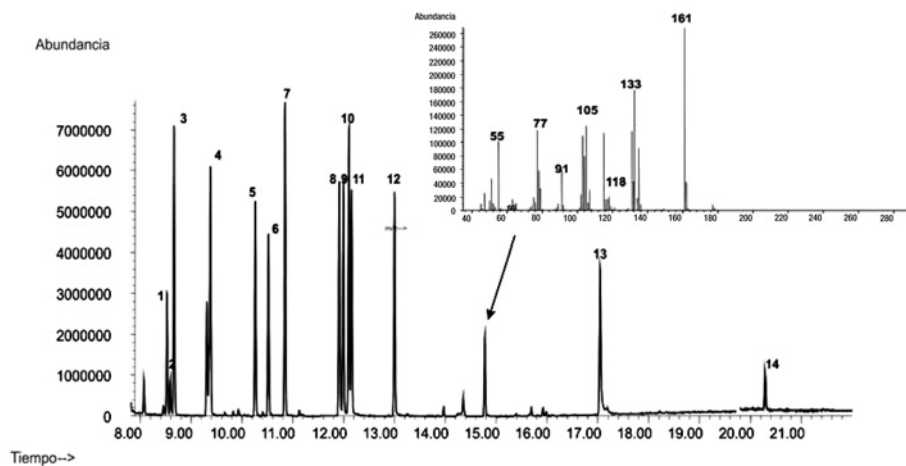
Los límites de detección (LOD) se calcularon utilizando la precisión a concentraciones bajas y la recta de calibrado. El producto de la desviación estándar, obtenido en los ensayos de precisión, y el valor *t* del *t*-student, para 8 grados de libertad (9 experimentos) a un nivel de confianza del 95% se introduce en la recta de calibrado. El valor obtenido (multiplicado por la concentración del estándar interno, 6 $\mu\text{g/g}$) se define como el límite de detección (Currie, 1995). Los mayores valores de LOD se obtuvieron en el simulante B. Entre los analitos, el cinamaldehído, compuesto muy inestable por sus características químicas, presentó los mayores LODs.

Para la mayoría de los analitos, su extracción desde el simulante A es más sensible que desde el simulante C, con la excepción de cinamaldehído, bencil benzoato y citroflex. En los cromatogramas correspondientes a la extracción del simulante C (figura III.62), se ha observado la aparición de un pico a 14,85 min, que no era identificado por la espectroscopia de la librería

Wiley 275. Sin embargo, y gracias a su espectro de masas, se logró identificar el compuesto como resultado de la reacción entre el cinamaldehído y el etanol presente en la matriz para formar el acetal correspondiente (figura III.63).

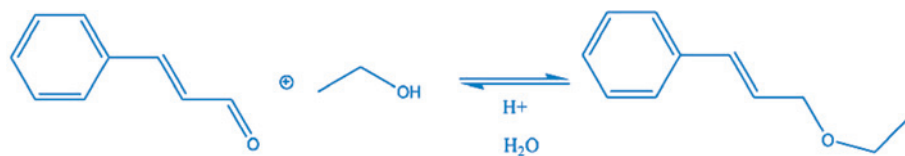
■ FIGURA III.62

Cromatograma de un patrón extraído del simulante C. Espectro de masas del pico detectado a los 14,85 min. Identificación de los picos ver tabla III.34



■ FIGURA III.63

Reacción entre el cinamaldehído y el etanol para formar el acetal



Hay que destacar que, aunque la disolución patrón está hecha con etanol, no se detectaron trazas de este compuesto en ninguno de los otros dos simulantes, debido a que la reacción se invierte en presencia de agua o ácido.

En el simulante A, y sobre todo en el simulante B, se detectó la presencia de α -terpineol y 1-terpine-4-ol (figuras III.64 y III.65), procedentes de la adición de un electrófilo (agua) al doble enlace del limoneno (Torssell, 1984).

FIGURA III.64

Cromatograma: patrón extraído del simulante B. Identificación, ver tabla III.34

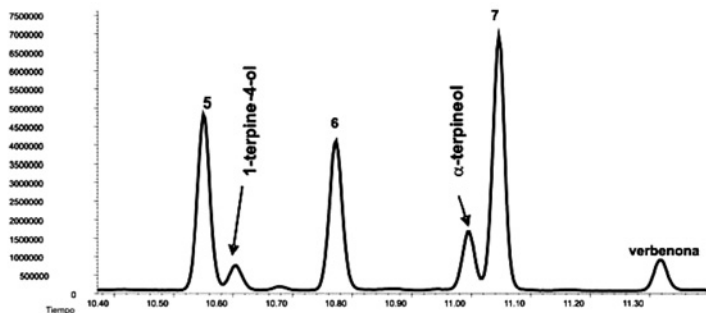
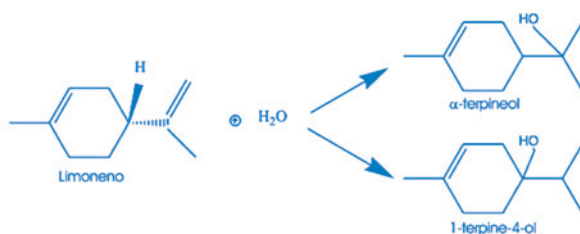


FIGURA III.65

Reacción de adición de agua al limoneno para dar α -terpineol y 1-terpine-4-ol

Por último, hay que señalar que no se han determinado los parámetros analíticos para el α -pineno, canfeno, β -pineno, α -terpinoleno, β -cariofileno y α -humuleno. Se trata de compuestos muy poco solubles en agua, y cuya presencia sólo se pudo analizar cuantitativamente para los dos primeros puntos de la recta de calibrado ($\approx 0,8 \mu\text{g/g}$), por lo que no se pudo determinar ni su repetibilidad ni su precisión, a las concentraciones a las que se realizaron los experimentos ($\approx 0,05 \mu\text{g/g}$).

9.3.2.3. Recta de calibrado para el simulante D

Las rectas de calibrado obtenidos para los diferentes analitos en el simulante D (isooctano) se muestran en la tabla III.35.

TABLA III.35

Recta de calibrado para el simulante D (Y:A/A_{verbenona}; X:C/C_{verbenona})

Compuesto	Recta calibrado	R ²	Compuesto	Recta calibrado	R _s
α -Pineno	Y=7,3376*X-0,9991	0,9991	Canfeno	Y=5,4545*X-2,8236	0,9990
p-Cimeno	Y=15,453*X-7,492	0,9989	Limoneno	Y=6,2736*X-3,4252	0,9989
1,8-Cineol	Y=2,5144*X-10,334	0,9992	Linalol	Y=3,1046*X-1,7825	0,9987
Canfor	Y=3,7489*X-1,4929	0,9992	Borneol	Y=8,1006*X-3,331	0,9991
Estragol	Y=4,2837*X-2,9677	0,9983	Cinamaldehído	Y=2,067*X-6,1266	0,9834
Timol	Y=9,5333*X-5,8231	0,9984	Bornil acetato	Y=4,3454*X-1,225	0,9996
Carvacrol	Y=8,7886*X-5,7382	0,9985	Eugenol	Y=2,9873*X-5,9248	0,9932
β -Cariofileno	Y=4,2572*X-2,116	0,9989	α -Humuleno	Y=4,9477*X-2,6291	0,9990
			Tributil Citrato	Y=1,5964*X-0,8192	0,9929

9.3.2.4. Ensayos de migración específica

Los ensayos de migración han demostrado la validez de las láminas antimicrobianas para ser utilizadas en contacto directo con los alimentos. Por un lado, todas las sustancias que forman parte de la composición inicial del aceite esencial están consideradas como agentes aromatizantes por la Comisión Europea (*Decisión 2002/113/CE*). Además, la cantidad total de sustancias migradas no supera, en ningún caso, el límite máximo establecido de migración global de 60 mg/kg (*Directiva 2002/72/CE*). Aunque la migración de eugenol en los simulantes A y B ($\approx 0,10$ mg/kg) es más elevada que el límite de migración específico establecido para este compuesto (0,02 mg/kg), no hay que considerar el eugenol como un compuesto aislado que se añade directamente al envase. El eugenol es un constituyente de un aceite esencial cuya utilización como aromatizante está permitida, siempre y cuando su empleo no conlleve una alteración de las características organolépticas y de salubridad del alimento (*Directiva 89/107/CEE*).

En los simulantes en contacto con las láminas con canela enriquecida se han detectado cinamaldehído (cis (Z)-, y trans (E)-), eugenol, tributil citrato y trazas de linalol. En el simulante D también aparecieron trazas de *p*-cimeno y limoneno, terpenos cuya solubilidad en agua es menor (tabla III.29). Las láminas con orégano transfirieron timol, carvacrol, tributil citrato y trazas de 1,8-cineol, α -terpinenol y 1-terpine-4-ol, eugenol, borneol y canfor. En el simulante D se detectó la presencia de α -pineno, canfeno, β -cariofileno y α -humuleno, compuestos muy liposolubles, por lo que son extraídos muy fácilmente por un disolvente (isooctano) de características de similares (figuras III.66 y III.67).

■ FIGURA III.66

Cromatograma de la migración de PE/EVOH-Or4% al simulante B

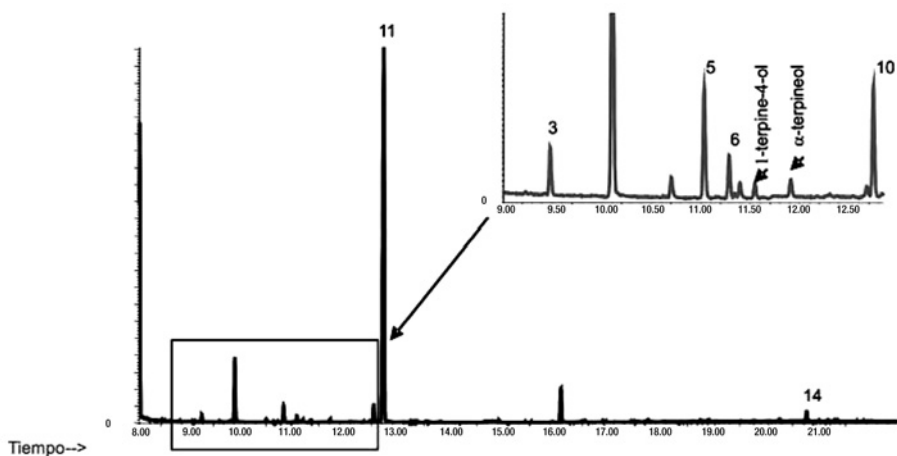
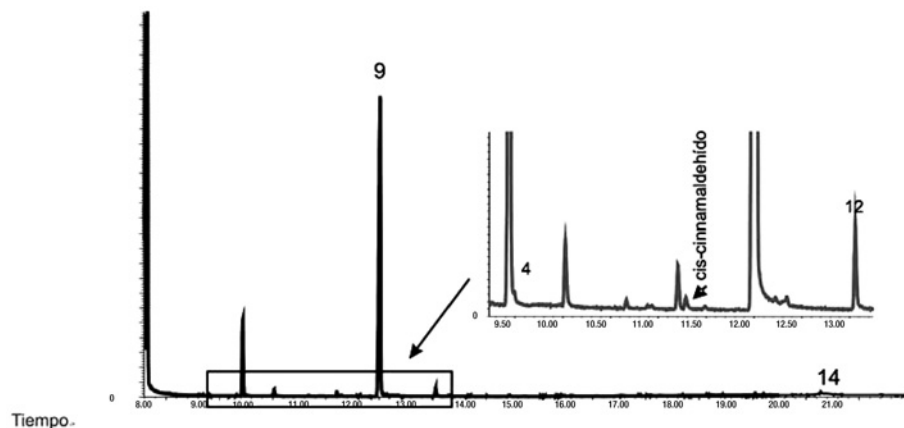


FIGURA III.67

Cromatograma de la migración de PP-enrCa4% al simulante C



En general, los valores de migración para la cara con el aceite esencial incorporado son indiferentes del material del film. En la figura III.68, se muestra la migración desde PP y PE/EVOH con orégano y canela enriquecida.

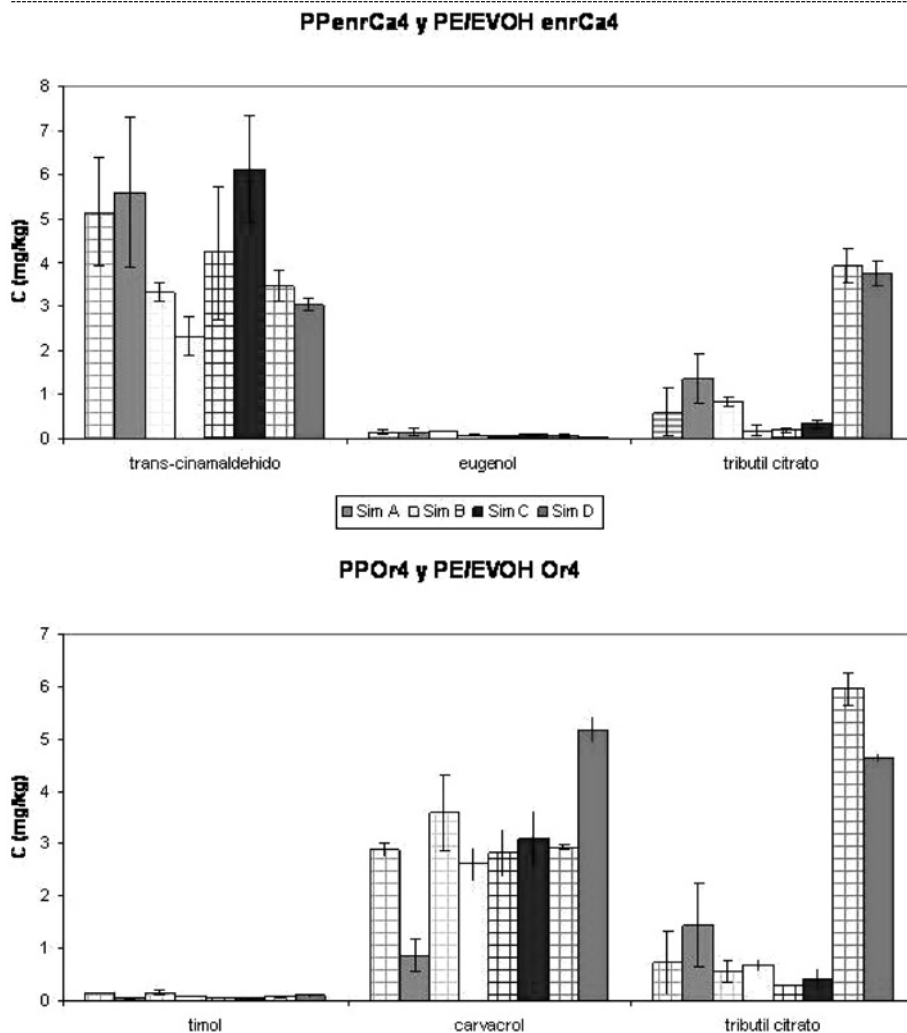
La migración de cinamaldehído es más elevada en los simulantes A y C que en los simulantes B y D. El cinamaldehído es el analito más polar ($\log P_{\text{octanol-agua}} 1,82$), y por tanto, se extrae con mayor facilidad por disolventes acuosos. El simulante B, a pesar de ser acuoso, es un disolvente ácido con mayor facilidad para atacar a una molécula tan reactiva como la de cinamaldehído.

Las mayores concentraciones de tributil citrato, empleado como plastificante y presente tanto en el film activo de orégano como en el de canela enriquecida, se detectaron en el simulante D.

Los ensayos en los que el simulante se pone en contacto con la cara de la lámina que no lleva sustancia activa permiten comprobar el comportamiento de difusión de las diferentes moléculas activas y de simulante a través del film.

FIGURA III.68

Migración desde la cara de las láminas de PP (barras con trama) y PE/EVOH (barras sólidas) donde se ha incorporado el aceite esencial a los simulantes A, B, C y D



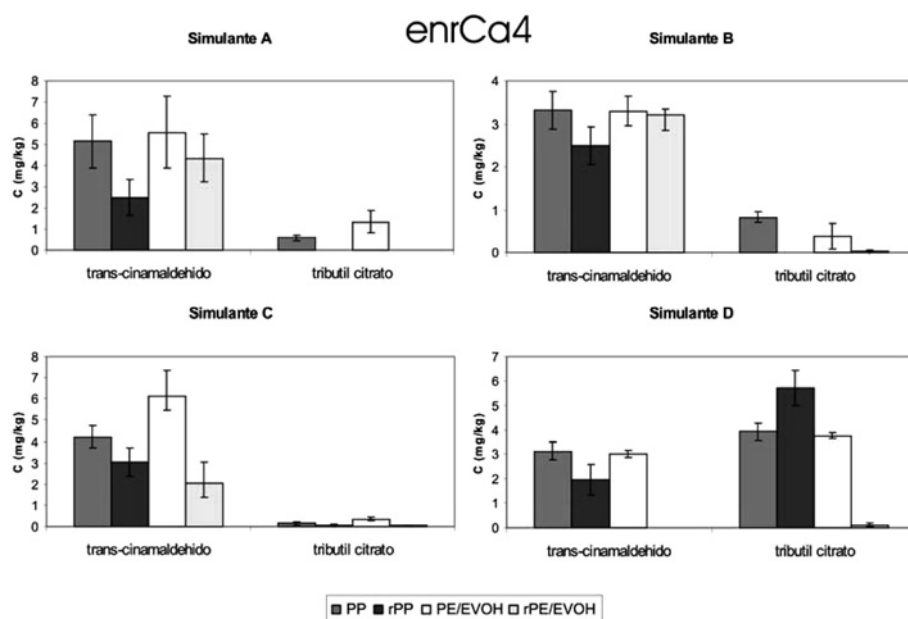
En las figuras III.69 y III.70 se comprueba cómo la difusión a través de la capa del film depende de la naturaleza del migrante (tamaño), del simulante y del film.

Los valores de migración de PE/EVOH, tanto si la cara de contacto llevaba aplicada la sustancia activa como si no, son similares en los disolventes acuosos. El film de polipropileno, pese a su menor espesor, es más apolar que el de PE/EVOH por lo que los simulantes acuosos (A, B y C) no penetran tan fácilmente en su estructura. En consecuencia, las moléculas de menor tamaño, carvacrol y sobre todo la de cinamaldehído, son solubilizadas y transportadas a través

del film plástico hasta el seno del simulante. La molécula de tributil citrato, al ser mucho más grande, presenta mayores problemas difusionales. Por lo tanto, los valores detectados en los simulantes acuosos cuando los ensayos se realizaron con PE/EVOH son menores cuando la cara con sustancia activa no estaba en contacto directo con el simulante. Además de la difusión hay un efecto claro de solubilidad. Las moléculas de mayor tamaño también son menos solubles en medios acuosos, lo cual confirma los resultados obtenidos.

FIGURA III.69

Migración desde los films que llevan incorporado esencia de canela enriquecida al 4% (enrCa4) en la cara en contacto con simulante y en la cara sin contacto (r)

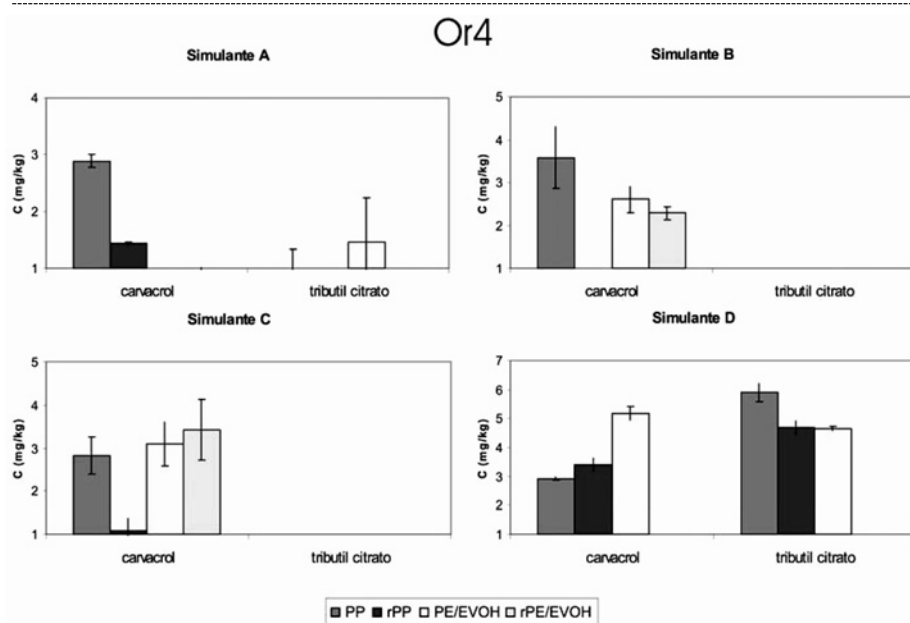


No obstante, la migración de cinamaldehído desde PE/EVOH hasta el simulante C disminuye si no existe contacto directo con la cara que lleva incorporada la esencia de canela enriquecida. La reacción entre el etanol y el cinamaldehído para formar el acetal (figura III.63) durante la difusión a través del film explicaría esta disminución. Como consecuencia de la difusión la concentración de los agentes activos no se iguala en toda la masa de los polímeros. En especial, cuando hay una segunda capa de EVOH en la que se fijan los compuestos por fuerzas intermoleculares, la difusión está impedida y por tanto la mayor concentración permanece en la capa activa en la que se han incorporado.

La migración desde PP en el simulante D es independiente del contacto directo entre el isot octano y las sustancias activas. El simulante D, con mayor carácter lipofílico, penetra en la estructura del polipropileno, extrayendo los analitos. En cambio en el film de PE/EVOH, el EVOH actúa de barrera impidiendo la difusión de los analitos a su través, por las mismas razones apuntadas anteriormente.

FIGURA III.70

Migración desde los films que llevan incorporado esencia de orégano al 4% (Or4) en la cara en contacto con simulante y en la cara sin contacto (r)



A la vista de los resultados, se puede afirmar que tanto los films que llevan incorporada esencia de canela enriquecida en cinamaldehído como los que contienen esencia de orégano, ambos al 4%, son adecuados para contacto alimentario y que su utilización no supone riesgo alguno para la salud humana. No obstante, antes de lanzar el producto al mercado habrá que comprobar que no se alteran las características organolépticas del producto, tal y como marca la Directiva 89/107/CEE. Sin embargo, dada la gran variedad de alimentos, se recomienda que dichas pruebas se efectúen para cada caso particular.

En este capítulo también se ha demostrado el potencial de la técnica de L-SDME para la extracción de terpenos desde simulantes acuosos. Se trata de un técnica barata, de fácil manejo y con la que se obtienen resultados satisfactorios. Asimismo, se ha comprobado la reacción entre el cinamaldehído y el etanol, lo que explicaría la pérdida de efectividad antimicrobiana de este analito en los experimentos realizados en el capítulo 7. Como consecuencia de esta evidencia experimental, habrá que tener en cuenta la posible falta de actividad antimicrobiana del film elaborado a partir de canela enriquecida cuando se envasen alimentos con cierto carácter hidroalcohólico.

Conclusiones

Del trabajo realizado se extraen las siguientes conclusiones:

1. Aplicaciones a alta temperatura

1. El Tenax o MPPO, simulante sintético recomendado por la legislación europea para la simulación del comportamiento de alimentos sólidos, sobreestima la migración de algunos compuestos volátiles para alimentos con poco contenido en materia grasa, pero subestima la migración de estos compuestos a alimentos con gran porcentaje lipídico.
2. La matriz del alimento, concretamente la materia grasa, desempeña un papel muy importante en el proceso de migración desde el envase al alimento, ya que favorece la retención de sustancias con características similares. Por lo tanto, a la hora de diseñar los experimentos de migración que validen un envase diseñado para entrar en contacto alimentario en aplicaciones a alta temperatura hay que considerar el alimento al que va destinado. Alimentos con un contenido importante en grasa favorecerán la acumulación de contaminantes orgánicos lipofílicos procedentes del material de envase. En este sentido, la leche en polvo entera, con un contenido en grasa de 23%, constituye, por su naturaleza, precio, manejabilidad y comportamiento, una buena alternativa para aplicaciones en las que no se requirieran temperaturas superiores a 121 °C.
3. Las nuevas resinas poliméricas, LiChrolut® EN y Bond Elut® ENV, son apropiadas para utilizarse en muestreos gas sólido con desorción térmica. Ambas resinas combinan unas excelentes propiedades de retención a temperatura ambiente con unas propiedades en desorción térmica similares a las del Tenax® TA. Los resultados obtenidos con el modelo de dos parámetros destacan una reducción sustancial (entre 60 y 400 veces comparadas con trampas de Tenax estándar) en las dimensiones de las trampas de sorbente necesarias para asegurar la retención de los compuestos orgánicos volátiles analizados.

2. Envase activo antimicrobiano

1. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en fase vapor es función de los compuestos que se liberan a la atmósfera. La esencia de orégano, caracterizada por la liberación de carvacrol, fue el aceite esencial más efectivo, seguido del clavo y la canela, cuya atmósfera se caracteriza por la presencia de eugenol. La esencia de tomillo exhibió un escaso poder de inhibición, en comparación con las referencias bibliográficas, debido a su menor contenido en timol. Por otro lado, los vapores generados por los aceites esenciales de romero, albahaca, eneldo y jengibre no inhibieron el crecimiento de ninguno de los microorganismos ensayados.
2. Los hongos (mohos y levaduras) fueron los microorganismos más sensibles frente a la acción de los vapores generados por los aceites esenciales, seguidos de las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. Por el contrario, *Pseudomonas aeruginosa*, que únicamente se vio afectada por la presencia de esencia de orégano, fue el microorganismo más resistente.
3. Los aceites esenciales de orégano, de clavo y de canela poseen un efecto -cida para todos los microorganismos ensayados; sólo se observó un efecto fungiestático en el crecimiento de *Aspergillus flavus* bajo la atmósfera generada por la canela y el clavo. El aceite esencial de tomillo, en cambio, presenta un efecto -estático.

4. La estructura química de los constituyentes individuales de los aceites esenciales es clave en el mecanismo de inhibición, siendo los derivados fenólicos (timol y carvacrol) y los aldehídos (cinamaldehído) los agentes más activos.
5. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se incrementa si se enriquecen en uno de sus componentes más activos. La esencia de canela enriquecida en cinamaldehído y la esencia de tomillo enriquecida en timol exhibieron una mayor capacidad de inhibición que sus respectivas esencias puras. El incremento de actividad no se debe únicamente al aumento en la cantidad de agente activo, sino a la aparición de efectos sinérgicos, probablemente entre cinamaldehído y eugenol (canela enriquecida) o timol-carvacrol y *p*-cimeno (tomillo enriquecido). El aceite esencial de canela enriquecido, aparte de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, posee un efecto –cida para todos los microorganismos ensayados, incluido *Aspergillus flavus*. La esencia de tomillo fortalecida, por el contrario, posee un efecto –estático sobre *Aspergillus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Salmonella choleraesuis*.
6. La incorporación de agentes antifúngicos naturales en envases activos está limitada por las características físicas (actividad de agua y pH) del alimento a envasar. El efecto antimicrobiano se ve favorecido por la baja actividad de agua.
7. Se ha demostrado la menor eficacia del cinamaldehído a pH bajos y en alimentos con un cierto contenido hidroalcohólico (por reacción del grupo aldehído con el grupo alcohol para formar un acetal), por lo que es conveniente sustituirlo por timol o carvacrol cuando se envasen este tipo de alimentos. Los isómeros carvacrol y timol, por lo general, proporcionan un efecto aditivo frente a la inhibición de mohos.
8. Se ha demostrado la validez de la técnica HS-SDME para el muestreo y cuantificación de los agentes antimicrobianos en la fase vapor generada por los distintos aceites esenciales y soluciones antimicrobianas derivadas. Su simplicidad, economía y versatilidad para el acoplamiento con el resto de técnicas convencionales de análisis, la convierten en una técnica de gran futuro para el muestreo de volátiles y semivolátiles de diversa naturaleza.
9. El seguimiento de la atmósfera generada por los aceites esenciales más efectivos ha revelado que los compuestos más volátiles (α -pineno, β -pineno, canfeno, *p*-cimeno y limoneno) se incorporan con mayor rapidez al espacio de cabeza, mientras que la liberación de los agentes antimicrobianos menos volátiles, como timol, carvacrol, eugenol y cinamaldehído, es más progresiva. Este hecho es coherente con el mayor efecto de los agentes antimicrobianos durante la fase lag del crecimiento microbiano.
10. La presencia de microorganismos, al metabolizar los componentes liberados por los diferentes aceites esenciales, influye sobre la composición de la atmósfera. Las mayores diferencias entre la atmósfera generada en ausencia/presencia de microorganismos se produjeron para el agente antimicrobiano menos activo, el aceite esencial de tomillo.
11. Los films de PP o PE/EVOH, que incorporan una capa activa que contiene un 4% en peso de esencia de canela enriquecida o esencia de orégano, exhiben unas excelentes propiedades antifúngicas. Aumentando la cantidad de aceites esenciales (8% canela enriquecida y 12% el de orégano) se consigue la inhibición total de la mayoría de las bacterias. La capacidad inhibitoria antifúngica de los films antimicrobianos está garantizada durante un período de tiempo superior a los dos meses.

12. La liberación de los componentes activos (cinamaldehído, carvacrol y timol) es más rápida desde los films de PP que desde los films de PE/EVOH. La presencia de grupos funcionales en el copolímero PE/EVOH conduce a una mayor retención o inmovilización de los agentes antimicrobianos en el interior de la matriz polimérica. La interacción que se establece entre los grupos funcionales de la matriz polimérica y el cinamaldehído es diferente que la establecida entre el timol y el carvacrol, como demuestra las diferencias obtenidas en los perfiles de composición de la atmósfera.
13. Se ha demostrado la validez de la técnica L-SDME para la extracción de terpenos desde simulantes acuosos.
14. Los films antifúngicos, con un 4% en peso de esencia de canela enriquecida o esencia de orégano, son aptos para uso en contacto con cualquier tipo de alimento, tal y como demuestran los resultados obtenidos en los ensayos de migración.

Las perspectivas futuras de este nuevo envase antimicrobiano son muy halagüeñas. No obstante, todavía queda mucho por hacer. Actualmente, el grupo de investigación está realizando ensayos de envasado real con distintos tipos de alimentos. Las matrices alimentarias, más complejas en composición que los medios de cultivo, pueden interactuar, como se ha demostrado, con los agentes activos, disminuyendo su efectividad. Por lo tanto, se proponen soluciones “a medida” para cada tipo de alimento, en función de su microflora natural, composición y capacidad de adsorción de los agentes antimicrobianos.

Glosario de siglas

GLOSARIO DE SIGLAS

AESA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
CE	Comunidad Europea
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CEE	Comunidad Económica Europea
CFU	Unidades formadoras de colonias
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FIC	Concentración inhibitoria fraccionada
EAA	Ácido etilenacrílico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EMA	Acrilato de etilenmetil
EMAA	Ácido de etilenmetacrilato
EVA	Acetato de etilenvinilo
GC	Cromatografía de gases
GRAS	Sustancias generalmente reconocidas como seguras
HDPE	Polietileno de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS	Espacio de cabeza
LC	Cromatografía de líquidos
LDPE	Polietileno de baja densidad
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAP	Atmósfera modificada
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MPPPO	Óxido modificado de polifenileno
MS	Espectrometría de masas
PC	Policarbonato
PCA	Análisis por componentes principales
PET	Polietilenteraftalato de etilo
PE/EVOH	Copolímero de etileno y alcohol etilvinílico
PLS	Regresión por mínimos cuadrados parciales
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
PVDC	Policloruro de vinilideno
P&T	Purga y trampa
RSD	Desviación estándar relativa

RSM	Modelo de superficie de respuesta
SAN	Copolímero de estireno y acrilonitrilo
SDME	Microextracción por gota
SFE	Extracción en fase sólida
SIM	Registro selectivo de iones
SML	Límite de migración específica
SPME	Microextracción en fase sólida
UV	Ultravioleta

Referencias bibliográficas

- ABLER L., KLAPES N., SHELDON B. y KLAENHAMMER T. (1995) Inactivation of food-borne pathogens with maginin peptides. *J. Food Prot.* 58. 381-388.
- ACOSTA D. (2001) Interacción envase-alimento en aplicaciones de alta temperatura. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- ADAM M., JUKLOVÁ M., BAJER T., EISNER A. y VENTURA K. (2005) Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for the analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *J. Chromatogr. A.* 1084. 2-6.
- ADAMS A., DEMYTTENAERE J.C.R. y DE KIMPE N. (2003) Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* an investigation of the culture conditions. *Food Chem.* 80. 525-534.
- AGELOPOULOS N.G. y PICKETT J.A. (1998) Headspace in chemical ecology: Effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *J. Chem. Ecol.* 24. 1161-1172.
- AHVENAINEN R. y HURME E. (1997) Active and smart packaging for meeting consumer demands for quality and safety. *Food Addit. Contam.* 14. 753-763.
- ALIGIANNIS N., KALPOUTZAKIS E., MITAKU S. y CHINOI I.B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* Species. *J. Agric. Food Chem.* 49. 4168-4170.
- AL-MALAIKA S., GOONETILEKA M.D.R.J. y SCOTT G. (1991) Migration of 4-substituted 2-hydroxy benzophenones in low-density polyethylene: Part I-Diffusion characteristics. *Polym. Deg. Stab.* 32. 231-247.
- ALNAFOURI A.J. y FRANZ R. (1999) A study on the equivalence of olive oil and the EU official substitutive test media for migration testing at high temperatures. *Food Addit. Contam.* 16. 419-431.
- AN D., HWANG Y., CHO S. y LEE D. (1998) Packaging of fresh curled lettuce and cucumber by using low density polyethylene films impregnated with antimicrobial agents. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27. 675-681.
- AN D., KIM Y., LEE S., PAIK H. y LEE D. (2000) Antimicrobial low density polyethylene film coated with bacteriocins in binder medium. *Food Sci. Biotechnol.* 9. 14-20.
- ANDREWS S., DE GRAAF H. y STAMATION H. (1997) Optimisation of methodology for enumeration of xerophilic yeasts from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 35. 109-116.
- ANNON. (1995) Packaging material has antimicrobial effect (Dry Company Ltd., Japón). *Japan Packag. News.*
- APPENDINI P. y HOTCHKISS J.H. (1997) Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films. *Packag. Technol. Sci.* 10. 271-279.
- APPENDINI P. y HOTCHKISS J.H. (2001) Surface modification of poly(styrene) by the attachment of an antimicrobial peptide. *J. Appl Polym. Sci.* 81. 609-616.
- APPENDINI P. y HOTCHKISS J.H. (2002) Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg Technol.* 3. 113-126.
- ASAKURA T., DEMURA M. y NISHIYAMA Y. (1991) C-13 NMR spectral assignment of 5 polyolefins determined from the chemical-shift calculation and the polymerization mechanism. *Macromolec.* 24. 2334-2340.
- AURELA B., KULMALA H. y SODERHJELM L. (1999) Phthalates in paper and board packaging and their migration into Tenax and sugar. *Food Addit. Contam.* 16. 571-577.

- AURELA B., OHRA-AHO y., SODERHJELM L. (2001) Migration of alkylbenzenes from packaging into food ant Tenax (R). *Packag. Tech. Sci.* 14. 71-77
- AURELI P., CONSTANTINI A. y ZOLEA S. (1992) Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55. 344-348.
- AZZOUZ M.A. y BULLERMAN L.B. (1982) Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Food Prot.* 45. 1298-1301.
- BAGAMBOULA C.F., UYTENDAELE M. y DEVEBERE J. (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Food Microbiol.* 21. 33-42.
- BALTUSSEN E., SNIJDERS H., JANSSEN H.G., SANDRA P. y CRAMERS C.A. (1998) Determination of phenylurea herbicides in water samples using on-line sorptive preconcentration and high-performance liquid chromatography with UV and electrospray mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 802. 285-295.
- BARNBY-SMITH F.M. (1992) Bacteriocins: Applications in food preservation. *Trends Food Sci. Technol.* 3. 133-137.
- BASHEER C. y LEE H.K. (2004) Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1057. 163-169.
- BATLLE R., COLMSJÖ A. y NILSSON U. (2001) Determination of gaseous toluene diisocyanate by use of solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation. *Fres. J Anal. Chem.* 369. 524-529.
- BATLLE R., CARLSSON H., TÖLLBACK P., COLMSJÖ A. y CRESCENZI C. (2003) Enhanced detection of nitroaromatic explosive vapors combining solid-phase extraction-air sampling, supercritical fluid extraction, and large-volume injection-GC. *Anal. Chem.* 75. 3137-3144.
- Battle R., Nerín C. (2004) Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants. *J. Chromat. A.* 1045. 29-35.
- BEGIN A. y VAN CALSTEREN M.R. (1999) Antimicrobial films produced from chitosan. *Int. J. Biolog. Macromol.* 26. 63-67.
- BEGLEY T.H., DENNISON J.L. y HOLLIFIELD H.C. (1990) Migration into food of polyethylene terephthalate (PET) cyclic oligomers from PET microwave susceptor packaging. *Food Addit. Contam.* 7. 797-803.
- BEGLEY T.H., BILES J.E. y HOLLIFIELD H.C. (1991) Migration of an epoxy adhesive compound into a food-simulating liquid and food from microwave susceptor packaging. *J. Agric. Food Chem.* 39. 1944-1945.
- BELAICHE T., TANTAOUI-ELARAKI A. y IBRAHIMY A. (1995) Application of a two levels factorial design to study the antimicrobial activity of three terpenes. *Sci. Alim.* 15. 571-578.
- BENITO-PEÑA E., PARTAL-RODERA A.I., LEÓN-GONZÁLEZ M.E. y MORENO-BONDI M.C. (2006) Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Anal. Chim. Acta.* 556. 415-422.
- BENTAYEB K. (2004) Determinación de antioxidantes naturales en un envase activo. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza.

- BENTAYEB K., RUBIO C., BATLLE R. y NERÍN C. (2006) Direct determination of carnosic acid as a marker of the antioxidant activity of a new packaging based on rosemary natural extract. Enviado a *Anal. Chim. Acta*.
- BERENZON S. y SAGUY I.S. (1998) Oxygen absorbers for extension of crackers shelf-life. *Food Sci. Technol.* 31. 1-5.
- BESHARATI-SEIDANI A., JABBARI A. y YAMINI Y. (2005) Headspace solvent microextraction: A very rapid method for identification of Iranian *Pimpinella anisum* seed. *Anal. Chim. Acta.* 530. 155-161.
- BHARATHI S., TAMESH M.N. y VARADARAJ M.C. (2001) Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. *Food Control.* 12. 275-284.
- BIANCHI F., CARERI M., MARENGO E. y MUSCI M. (2002) Use of experimental desing for the purge-and-trap gas chromatography-mass spectrometry determination of methyl *tert.*-butyl ether, *tert.*-butyl alcohol and BTEX in groundwater at trace level. *J. Chromatogr. A.* 975. 113-121.
- BISHOP C.D. (1995) Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J. Essent Oil Res.* 7. 641-644.
- BOOKER J.L. y FRIESE M.A. (1989) Safety of microwave-interactive paperboard packaging materials. *Food Technol.* 43. 110-8.
- BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SIMIN N. y ANACKOV G. (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* 54. 1822-1828.
- BRISTON J.H. y KATAN L.L. (1974) *Plastics in contact with food*. Food Trace Press. London.
- BRODY A.L. (2000) New food packaging polymer and processing techniques. *Food Technol.* 54. 72-74.
- BRODY A.L. (2001) What's the hottest in food packaging technology today? *Food Technol.* 55. 82-84.
- BROWN R.H. y PURNELL C.J. (1979) Collection and analysis of trace organic vapor pollutants in ambient atmospheres-performance of a Tenax-GC adsorbent tube. *J. Chromatogr. A.* 178. 79-90.
- BROWN W.E. *Plastics in food packaging*. (1992) Properties, design and fabrication. Marcel Dekker, New Cork.
- BURT S. y REINDERS R.D. (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36. 162-167.
- BURT S. (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94. 223-253.
- CACCIONI D.R.L., GARDINI F., LANCIOTTI R. y GUERZONI M.E. (1997) Antifungal activity of natural volatile compounds in relation to their vapour pressure. *Sci. Alim.* 17. 21-34.
- CACCIONI D.R.L., GUIZZARDI M., BIONDI D.M., RENDA A. y RUBERTO C. (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* 43. 73-79.
- CAO J., QI M., ZHANG Y., ZHOU S., SHAO Q. y FU R. (2006) Analysis of volatile compounds in *Curcuma wenyujin* Y.H. Chen et C. Ling by headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 561. 88-95.
- CAREAGA M., FERNÁNDEZ E., DORANTES L., MOTA L., JARAMILLO M.E. y HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H. (2003) Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimuri*

- um* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *Int. J. Food Microbiol.* 83. 331-335.
- CARVALHO C.C.C.R. y FONSECA M.M.R. (2006) Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24. 134-142.
- CASTLE L., JICKELLS S.M., SHARMAN M., GRAMSHAW J.W., GILBERT J. (1988) Migration of the plasticizer acetyltributyl citrate from plastic film into foods during microwave cooking and other domestic use. *J. Food Prot.* 51. 916-919.
- CASTLE L., MAYO A., CREWS C., GILBERT J. (1989) Migration of poly(ethylene-terephthalate) (PET) oligomers from pet plastics into foods during microwave and conventional cooking and into bottled beverages. *J. Food Prot.* 52. 337-342.
- CASTLE L., JICKELLS S.M., GILBERT J., HARRISON N. (1990) Migration testing of plastics and microwave-active materials for high-temperature food-use applications. *Food Addit. Contam.* 7. 779-796.
- CASTLE L. (1995) Ensayos de migración para plásticos en contacto alimentario en aplicaciones de alta temperatura. *Migración de sustancias químicas desde el envase al alimentos. Revisión sobre ciencia y tecnología de los alimentos.* Watson D., y Meah M., editores. Ed Acribia. 37-60.
- CATALÁ R. y GAVARA R. (2002) Fundamentos y mecanismos de la migración. *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos.* Catalá R. y Gavara R., editores. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Valencia.
- CERRUTTI P. y ALZAMORA S.M. (1996) Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. *Int. J. Food Microbiol.* 29. 379-386.
- CHEN Y. y PAWLISZYN J. (2003) Time-weighted average passive sampling with a solid-phase microextraction device. *Anal. Chem.* 75. 2004-2010.
- CHORIANOPOULOS N., KALPOUTZAKIS E., ALIGIANNIS N., MITAKU S., NYCHAS G.J. y HAROUTOUNIAN S.A. (2004) Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 52. 8261-8267.
- CHRISTIE G., CHRISTOV V., CORRIGAN P., GOUBRAN F., HOLMES R., LYON T., POHLNER D. y SMART P. (1997) Fungicide boxes for storage of grapes (reprinted from Proceedings of the 10 th IAPRI World Conference on Packaging). *Food Australia.* 49. 580-582.
- CHUNG S., CHO S. y LEE D. (1998) Modified atmosphere packaging of fresh strawberries by antimicrobial plastic films. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30. 1140-1145.
- CLOETE T.E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodegr. Biodegr.* 51. 277-282.
- CODEX STANT 107. (1981) Norma General del Codex para el etiquetado de aditivos alimentarios que se venden como tales.
- CONNER D.E. y BEUCHAT L.R. (1984a) Effect of essential oils from plant on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* 49, 429-434.
- CONNER D.E. y BEUCHAT L.R. (1984b) Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Env. Microbiol.* 47. 229-233.
- CONNER D.E. (1993) Naturally occurring compounds. *Antimicrobials in Food.* Marcel Dekker. Nueva York. pp 539-569.

- COOK D.W., O'LEARY P., HUNSUCKER J.C., SLOAN E.M., BOWERS J.C., BLODGETT R.J. y DEPAOLA A. (2002) *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: A national survey from June 1998 to July (1999) *J. Food Prot.* 65. 79-87.
- CORRY J.E.L. Relationships of water activities to fungal growth. (1987) *Food and Beverage Mycology*. Avi Book. Van Nostrand-Reinhold, New York, pp 51-100.
- COX D.R. y OAKES D. (1984) Analysis of survival data. Chapman & Hall. London.
- CSIRO Australia. 1994. DFST Fact Sheet: Active Packaging. DFST Information Services.
- CULLEN J.S. y VAYLEN N.L. 1994. Carbon dioxide absorbent packet and process. *US Patent* 5322701.
- CUQ B., GONTARD N. y GUILBERT S. (1995) Edible films and coatings as active layers. *Active food packaging*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. pp. 111-142.
- CURRIE L.A. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure & Appl. Chem.* 67. 1699-1723.
- CURRIE L.A. (1999) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta.* 391. 105-126.
- CUSSLER E.L. (1984) *Difussion: Mass transfer in fluid systems*. Cambridge University Press. Cambridge.
- DAESCHEL M. y MCGUIRE J. (1995) Bactericidal surfaces and articles with attached bacteriocin. *US patent* 5451369.
- DAFERERA D.J., ZIOGAS B.N. y POLISSIOU M.G. (2000) GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48. 2576-2581.
- DAIFAS D.P., SMITH J.P., TARTE I., BLANCHFIELD B. y AUSTIN J.W. (2000) Effect of ethanol vapour on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in a high moisture bakery product. *J. Food Safety.* 20. 111-125.
- DAVIDSON P.M. (2001) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., editores. *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. 2ªed. ASM Press, Washington, pp 593-628.
- DEANS S.G. y RITCHIE G. (1987) Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5. 165-180.
- Decisión 2002/113/CE de la Comisión, de 23 de enero de 2002, por la que se modifica la Decisión 1999/217/CE por lo que respecta al repertorio de sustancias aromatizantes utilizadas en o sobre los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial n° L 049 de 20/02/2002* p. 0001 – 0160.
- DE KLERK A. (2006) Reactivity differences of octenes over solid phosphoric acid. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45. 578-584.
- De KRUIJF N., VAN BEST M., RIJK R., SIPILÄINEN-MALM T., LOSADA P.P. y DE MEULENAER B. (2002) Active and intelligent packaging: Applications and regulatory aspects. *Food Addit. Contam.* 19. 144-162.
- DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B. y MAZZA G. (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74. 101-109.
- DELGADO B., FERNÁNDEZ P.S., PALOP A. y PERIAGO P.M. (2004) Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiol.* 21. 327-334.

- DEMYTTENAERE J. y DE KIMPE N. (2001) Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. *J. Molec. Catal. B.* 11. 265-270.
- DEMYTTENAERE J., VAN BELLEGHEM K. y DE KIMPE N. (2001) Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochem.* 57. 199-208.
- DENG C.H., LI N. y ZHANG X.M. (2004) Rapid determination of essential oil in *Acorus tatarinowii* Schott. by pressurized hot water extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1059. 149-155.
- DEVLIEGHERE F., VERMEIREN L., BOCKSTAL A. y DEBEVERE J. (2000a) Study on antimicrobial activity of a food packaging material containing potassium sorbate. *Acta Alimentaria.* 29. 137-146.
- DEVLIEGHERE F., VERMEIREN L., JACOBS M. y DEBEVERE J. (2000b) The effectiveness of hexamethylenetetramine-incorporated plastic for the active packaging of foods. *Packag. Technol. Sci.* 13. 117-121.
- DEVLIEGHERE F., VERMEIREN L. y DEBEVERE J. (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14. 273-285.
- DILLON R.J. (1994) Antimicrobial agents associated with insects. *Natural antimicrobial systems on food preservation.* Dillon V.M. Board R.G. Oxon. pp 223-254.
- Directiva 76/893/CEE del Consejo del 23 de diciembre de 1976 relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL340 del 9/12/76.
- Directiva 78/142/CEE del Consejo del 30 de enero de 1978 relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos que contengan cloruro de vinilo monómero, destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL44 del 15/2/78.
- Directiva 80/590/CEE de la Comisión del 9 de junio de 1980 relativa a la determinación del símbolo que puede acompañar a los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL213 del 16/8/80.
- Directiva 80/766/CEE de la Comisión del 8 de julio de 1980 relativa a la determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del contenido de cloruro de vinilo monómero en los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL151 del 19/6/80.
- Directiva 81/432/CEE de la Comisión del 29 de abril de 1981 sobre la determinación del método comunitario de análisis para el control oficial del cloruro de vinilo monómero cedido por los materiales y objetos a los productos alimenticios. Diario Oficial nºL167 del 14/6/81.
- Directiva 82/711/CEE de la Comisión del 18 de octubre de 1982 que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL297 del 23/10/82.
- Directiva 83/229/CEE del Consejo del 25 de abril de 1983 relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL123 del 11/5/83.
- Directiva 85/572/CEE del Consejo del 19 de diciembre de 1985 por la que se determina la lista de los simulantes que deben utilizarse para controlar la migración de los componentes de

- los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL372 del 31/12/85.
- Directiva 86/388/CEE de la Comisión del 23 de julio de 1986 que modifica la Directiva 83/229/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL228 del 17/8/86.
- Directiva 89/107/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1989 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano. Diario Oficial NºL040 del 11/01/1989.
- Directiva 89/109/CEE del Consejo del 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL40 del 11/2/89.
- Directiva 90/128/CEE de la Comisión del 23 de febrero de 1990 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL75 del 21/3/90.
- Directiva 92/15/CEE de la Comisión del 11 de marzo de 1992 que modifica la Directiva 83/229/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de legislaciones de los Estados miembros sobre los materiales y objetos de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL228 del 16/4/92.
- Directiva 92/39/CEE de la Comisión del 14 de mayo de 1992 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL168 del 23/6/92.
- Directiva 93/8/CEE de la Comisión del 15 de marzo de 1993 por la que se modifica la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL90 del 14/4/93.
- Directiva 93/9/CEE de la Comisión del 15 de marzo de 1993 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL90 del 14/4/93.
- Directiva 93/10/CEE de la Comisión del 15 de marzo de 1993 relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL93 del 17/4/93.
- Directiva 93/111/CE de la Comisión del 10 de diciembre de 1993 por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL310 del 14/12/93.
- Directiva 95/3/CE de la Comisión del 14 de febrero de 1995 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL41 del 23/2/95.
- Directiva 96/11/CE de la Comisión del 5 de marzo de 1996 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL61 del 12/3/96.
- Directiva 97/48/CE de la Comisión del 29 de julio de 1997 por la que se modifica la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación

- de la migración de los constituyentes de los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. Diario Oficial nºL222 del 12/8/97.
- Directiva 1999/91/CE de la Comisión del 23 de noviembre de 1999 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL310 del 4/12/99.
- Directiva 2001/61/CE de la Comisión del 8 de agosto de 2001 relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL215 del 9/8/(2001)
- Directiva 2001/62/CE de la Comisión del 9 de agosto de 2001 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL221 del 17/8/(2001)
- Directiva 2002/17/CE de la Comisión del 21 de febrero de 2002 por la que se modifica la Directiva 90/128/CEE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL58 del 28/2/2002.
- Directiva 2002/72/CE de la Comisión del 6 de agosto de 2002 relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL220 del 15/8/2002.
- Directiva 2004/13/CE de la Comisión del 29 de enero de 2004 por la que se modifica la Directiva 2001/61/CE relativa a la utilización de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL27 del 30/1/2004.
- Directiva 2004/14/CE de la Comisión del 29 de enero de 2004 por la que se modifica la Directiva 93/10/CEE relativa a los materiales y objetos de película de celulosa regenerada destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL27 del 30/1/2004.
- Directiva 2004/19/CE de la Comisión del 1 de marzo de 2004 por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL71 del 10/3/2004.
- Directiva 2005/79/CE de la Comisión del 18 de noviembre de 2005 por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL302 del 19/11/2005.
- DOBIAS J., VOLDRICH M., MAREK M. y DEROVSKY M. (1998) Active packaging-immobilization of preservatives on/in packaging materials. *Lebensmittelchemie*. 52. 33-36.
- DOORES S. (1993) Organic acids. *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker. Nueva York. pp 95-136.
- DORMAN H.J.D. y DEANS S.G. (1999) Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Bacter.* 88. 308-316.
- DUFOUR M., SIMMONDS R.S. y BRENDER P.J. (2003) Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* 85. 249-258.

- EDRIS A.E., GIRGIS B.S. y FADEL H.H.M. (2003) Recovery of volatile aroma components from aqueous waste stream using an activated carbon column. *Food Chem.* 82. 195-202.
- EL-KHATEIB T. y EL-RAHMAN H. (1987) Effect of garlic and *Lactobacillus plantarum* on growth of *Salmonella typhimurium* in Egyptian fresh sausage and beef burger. *J. Food Prot.* 50. 310-311.
- ELLIS D.I. y GOODACRE R. (2001) Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: Current status and future trends. *Tr. Food Sci. Technol.* 12. 414-424.
- FAKHARI A.R., SALEHI P., HEYDARI R., EBRAHIMI S.N. y HADDAD P.R. (2005) Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Chromatogr. A.* 1098. 14-18.
- FARAG R.S., DAW Z.Y., HEWEDI F.M. y EL-BAROUTY G.S.A. (1989) Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.* 52. 665-667.
- FEIGENBAUM A., SCHOLLER D., BOUQUANT J., BRIGOT G., FERRIER D., FRANZ R., LILLEMARCK L., RIQUET A.M., PETERSEN J.H., VAN LIEROP B. y YAGOUBI N. (2002) Safety and quality of food contact materials. Part 1: Evaluation of analytical strategies to introduce migration testing good manufacturing practice. *Food Addit. Contam.* 19. 184-201.
- FERNÁNDEZ M. (2000) Active food packaging. *Food Sci. Tech. Int.* 6. 97-108.
- FERNÁNDEZ C. (2003) Estudio de la migración de componentes no volátiles en envases alimentarios durante su calentamiento en horno microondas. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- FERNANDO W.P.N., LARRIVEE M.L. y POOLE C.F. (1993) Investigation of the kinetic-properties of particle-loaded membranes for solid-phase extraction by forced flow planar chromatography. *Anal. Chem.* 65. 588-595.
- FERREIRA V., JARAUTA I., ORTEGA L. y CACHO J. (2004) Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid-liquid distribution coefficients. Application to the determination of aliphatic lactones in wine. *J. Chromatog. A.* 1025. 147-156.
- FIROUZI R., AZADBAKHT M. y NABINEDJAD A. (1998) Anti-listerial activity of essential oils of some plants. *J. Appl. Anim. Res.* 14. 75-80.
- FITZGERALD D.J., STRATFORD M., GASSON M.J. y NARBAD A. (2005) Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *J. Agric. Food Chem.* 53. 1769-1775.
- FLORES J.D., DOCK L.L. y HAN J.H. (1997) Active packaging technologies and applications. *Food Cosmet. Drug Packag.* 20. 10-17.
- FOTI M.C., INGOLD K.U. (2003) Mechanism of lipid peroxidation by g-terpinene, a usual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* 51. 2758-2765.
- FRANK W. y FRANK H. (1990) The micro-trap: An alternative to cryofocussing in capillary gas-chromatography. *Chromatographia.* 29. 571-574.
- FRANKE I., WIJMA E. y BOUMA K. (2002) Shelf life extension of pre-baked buns by an active packaging ethanol emitter. *Food Addit. Contam.* 19. 314-322.
- FULGSANG C.C., JOHANSEN C., CHRISTGAU S. y ADLER-NISSEN J. (1995) Antimicrobial enzymes: Applications and future potential in the food industry. *Trends Sci. Technol.* 6. 390-396.

- GALOTTO M.J. (1995) Evaluación de la permeabilidad de los materiales poliméricos a los gases permanentes. Los materiales plásticos de alta barrera en el diseño de envases. Alternativas y perspectivas de futuro. Conferencia en ITENE, Valencia.
- GARDINI F., LACIOTTI R., CACCIONI D.R.L. y GUERZONI M.E. (1997) Antifungal activity of hexanal as dependent on its vapour pressure. *J. Agric. Food Chem.* 45. 4297-4302.
- GAVARA R. y HERNÁNDEZ R.J. (1994) The effect of water on the transport of oxygen through nylon-6-films. *J Polym. Sci. Part B: Pol. Phys.* 32. 2375-2382.
- GILBERT S.G. (1985) Food package compatibility. *Food Technol.* 39. 54-56.
- GILL C.O. y MCGINNIS J.C. (1995) The use of oxygen scavengers to prevent the transient discoloration of ground beef packaged under controlled oxygen-depleted atmospheres. *Meat Sci.* 41. 19-27.
- Gill A.O., DELAQUIS P., RUSSO P., HOLLEY R.A., (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *Int. J. Food Microbiol.* 73. 83-92.
- GNANASEKHARAN V., FLOROS J.D. (1997) Migration and sorption phenomena in packaged foods. *Crit. Rev. Food Sci.* 37. 519-559.
- GODDUHN A. y DUFFY L.K. (2003) Multi-generation health risks of persistent organic pollution in the far north: use of precautionary approach in the Stockholm Convention. *Env. Sci. Pol.* 6. 341-353.
- GOLDBERG S., DOYLE R., ROSENBERG M. (1990) Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *J. Bacteriol.* 172. 5650-5654.
- GÓRECKI T. y PAWLISZYN J. (1997) Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. 1. Theoretical considerations. *Analyst.* 122. 1079-1086.
- GÖRGENYI M., DEWULF J. y VAN LANGENHOVE H. (2002) Temperature dependence of Henry's law constant in an extended temperature range. *Chemosphere.* 48. 757-762.
- GOYDAN R., SCHWOPE A.D., REID R.C. y CRAMER G. (1990) High-temperature migration of antioxidants from polyolefins. *Food Addit. Contam.* 7. 323-337.
- GRAY P.N. (2000) Generation of active Microatmosphere™ environments from and in packages. International Conference on Active and Intelligent Packaging. *CCFRA Conference Proceedings.*
- GREEN C.E. y ABRAHAM M.H. (2000) Investigation into the effects of temperature and stirring rate on the solid-phase extraction of diuron from water using a C₁₈ extraction disk. *J. Chromatogr. A.* 85. 41-49.
- GUILBERT S., CUQ B. y GONTARD N. (1997) Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Addit. Contam.* 14. 741-751.
- GUILBERT S. (1998) Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. *Food Preservation by moisture control.* Elsevier. pp 199-219.
- HAASUM I. y NIELSEN P.V. (1998) Ecophysiological characterization of some food-borne fungi in relation to pH and water activity under atmospheric compositions. *J. Appl. Microbiol.* 84. 451-461.
- Halek G., Garg A. 1989. Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. *J. Food Safety.* 9. 215-222.
- HAMMER K.A., CARSON C.F. y RILEY T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86.985-990.

- HAN J.H. y FLOROS J. (1997) Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activities. *J. Plastic Film Sheet*. 13. 287-289.
- HAN J.H. y FLOROS J. (1998a) Potassium sorbate diffusivity in American processed and mozzarella cheeses. *J. Food Sci*. 63. 435-437.
- HAN J.H. y FLOROS J. (1998b) Simulating diffusion model and determining diffusivity of potassium sorbate through plastics to develop antimicrobial packaging film. *J. Food Proc. Preserv*. 22. 107-202.
- HAN J.H. (2002) Active food packaging. www.wmrc.com/businessbriefing/pdf/foodtechn2002/reference/ref14.pdf.
- HANSEN R., PIPPL C., MIDKIFF D. y NEUWIRTH J. (1989) Antimicrobial absorbent food pad. *US Patent 4865855*.
- HAO Y.Y., BRACKETT R.E. y DOYLE M.P. (1998a) Efficacy of plant extract in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol*. 15. 367-378.
- HAO Y.Y., BRACKETT R.E. y DOYLE M.P. (1998b) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated beef. *J. Food Prot*. 61. 307-312.
- HARPAZ S., GLATMAN L., DRABKIN V. y GELMAN A. (2003) Effects of herbal essential oils used to extend the shelf-life of freshwater-reared Asian Sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J. Food Prot*. 66. 410-417.
- HARPER M. (2000) Sorbent trapping of volatile organic compound from air. *J. Chromatogr. A*. 885. 129-151.
- HASEGAWA N., MATSUMOTO Y., HOSHINO A. y IWASHITA K. (1999) Comparison of the effects of *Wasaba japonica* and allyl isothiocyanate on the growth of four strains of *V. parahaemolyticus* in lean and fatty tuna meat suspensions. *Int. J. Food Microbiol*. 49. 27-44.
- HAUGAARD V.K., UDSEN A.M., MORTENSEN G., HØEGH L., PETERSON K. y MONAHAN F. (2000) Food Biopackaging. Biobased packaging materials for the food industry. Claus J. Weber.
- HAYNIE S.L., CRUM G.A. y DOELE B.A. (1995) Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39. 301-307.
- HE Y. y LEE H.K. (1997) Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional syringe. *Anal. Chem*. 69. 4634-4640.
- HEATH R.J., RUBIN J.R., HOLLAND D.R., ZHANG E., SNOW M.E. y ROCK C.O. (1999) Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biolog. Chem*. 274. 11110-11114.
- HÉBERGER K. y GÖRGENYI M. (2001) Estimation of molar heat capacities in solution from gas chromatographic data. *J. Chromatogr. Sci*. 39. 113-120.
- HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T., POL I., SMID E.J., GORRIES L.G.M. y VON WRIGTH A. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem*. 46. 3590-3595.
- HENNION M.C. y PICHON V. (1994) Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Env. Sci. Technol*. 28. 576-583.
- HENNION M.C. (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 856. 3-54.
- HEW C.M., HAJMEER M.N., FARVER T.B., GLOVER J.M. y OLIVER D.O. (2005) Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in chorizos. *J. Food Prot*. 68. 2039-2046.

- HOLLEY R.A. y PATEL D. (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22. 273-292.
- HONG S.I., PARK J.D. y KIM D.M. (2000) Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Sci. Biotechnol.* 9. 38-42.
- HORI H., TANAKA I. y AKIYAMA T. (1989) Thermal-desorption efficiencies of 2-component organic-solvents from activated carbon. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 50. 24-29.
- HOTCHKISS J.H. (1997) Food-packaging interactions influencing quality and safety. *Food Addit. Contam.* 14. 601-607.
- HUCK C.W. y BONN G.K. (2000) Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *J. Chromatog. A.* 885. 51-72.
- HUERGA M.A. (2004) Estudio de la atmósfera generada por un envase activo antimicrobiano. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Zaragoza.
- Ishitani T. (1995) Active packaging for food quality preservation in Japan. *Foods and Packaging Materials-Chemical Interactions*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. pp 177-188.
- JEANNOT M.A. y CANTWELL F.F. (1996) Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.* 68. 2236-2240.
- JEANNOT M.A. y CANTWELL F.F. (1997) Mass transfer and characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. *Anal. Chem.* 69. 235-239.
- JICKELLS S.M., GRAMSHAW J.W., CASTLE L. y GILBERT J. (1992) The effect of microwave-energy on specific migration from food contact plastics. *Food Addit. Contam.* 9. 19-27.
- JICKELLS S.M. y CASTLE L. (1993) Combined compositional analysis and threshold of regulation as possible control measure for microwave susceptors. *Food Addit. Contam.* 10. 647-663.
- JOHN P.W.M. (1996) Nesting Plackett-Burman designs. *Stat. Prob. Lett.* 27. 221-223.
- KABARA J.J. (1991) Phenols and chelators. *Food Preserv.* Russel, N.J., Gould G.W., editores. Blackie & Son, Glasgow. pp 44-71.
- KARATZAS A.K., KETS E.P.W., SMID E.J. y BENNIK M.H.J. (2001) The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* 90. 463-469.
- KATZ F. (1998) New research in packaging. *Food Technol.* 52. 56.
- KIM J.M., MARSHALL M.R., CORNELL J.A., PRESTON L.F. y WEI C.I. (1995) Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *J. Food Sci.* 60. 1364-1368.
- KIM H.Y., LEE Y.J., HONG K.H., KWON Y.K., SIM K.C., LEE J.Y., CHO H.Y., DIM I.S., HAN S.B., LEE C.W., SHIN I.S. y CHO J.S. (2001) Isolation of antimicrobial substances from natural products and their preservative effects. *Food Sci. Biotechnol.* 10. 59-71.
- KLOSOWSKI A., PETTERSSON J. y ROERAADE J. (2004) Thick film traps with an irregular film. Preparation and evaluation. *J. Chromatogr. A.* 1035. 159-165.
- KONSTANTOPOULOU I., VASSILOPOULOU L., MAVRAGANI-TISPIDOU P. y SCOURAS Z.G. (1992) Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oil extracts from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. *Experientia.* 48. 616-619.
- KORAI H., MANABE Y. y YAMADA Y. (1994) Mode of bactericidal action of zirconium phosphate ceramics containing silver ions in the crystal structure. *J. Antibact. Antifun. Agents.* 22. 591-601.

- KROUPA A., DEWULF J., VAN LAGENHOVE H. y VIDEN I. (2004) Breakthrough characteristics of volatile organic compounds in the -10 to +170 °C temperature range on Tenax TA determined by microtrap technology. *J. Chromatogr. A.* 1038. 215-223.
- KURITA N., MIYAJI M., KURANE R., TAKAHARA Y. y ICHIMURA K. (1979) Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Agric. Biolog. Chem.* 43. 2365-2371.
- LABUZA T.P. y BREENE W.M. (1989) Applications of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J. Food Prot. Pres.* 13. 1-69.
- LACHOWICZ K.J., JONES G.P., BRIGGS D.R., BIENVENU F.E., WAN J., WILCOCK A. y COVENTRY M.J. (1998) The synergistic preservative effect of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 26. 209-214.
- LAMBERT R.J.W., SKANDAMIS P.N., COOTE P.J. y NYCHAS G.J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91. 453-462.
- LAMBROPOULOU D.A., PSILLAKIS E., ALBANIS T.A. y KALOGERAKIS N. (2004) Single-drop microextraction for the analysis of organophosphorous insecticides in water. *Anal. Chim. Acta.* 516. 205-211.
- LANCIOTTI R., BELLETTI N., PATRIGNANI F., GIANOTTI A., GARDINI F. y GUERZONI M.E. (2003) Application of hexanal, (E)-2-hexenal, and hexyl acetate to improve the safety of fresh-sliced apples. *J. Agric. Food Chem.* 51. 2958-2963.
- LANQ Q.Y., WAI C.M., ANG C.Y.M., CUI Y.Y., HEINZE T.M., MATTIA A. y DINOVI M. (2004) Sample preparation and determination of Ginkgo terpene trilactones in selected beverage, snack, and dietary supplement products by liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *J. AOAC Int.* 87. 815-826.
- LARRIVEE M.L. y POOLE C.F. (1994) Solvation parameter model for the prediction of breakthrough volumes in solid-phase extraction with particle-loaded membranes. *Anal. Chem.* 66. 139-146.
- LEGAN J.D., VOYSEY P.A. (1991) Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacter.* 70. 361-371.
- LEMAY M.J., CHOQUETTE J., DELAQUIS P.J., GARIPEY C., RODRIGUES N. y SAUCIER L. (2002) Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *Int. J. Food Microb.* 78. 217-226.
- LEVY C.W., ROUJEINIKOVA A., SEDELNIKOVA S., BAKER P.J., STUITJE A.R., SLABAS A.R., RICE D.W. y RAFFERTY J.B. (1999) Molecular basis of triclosan activity. *Nature.* 398. 383-384.
- LEWIS W.K. y WHITMAN W.G. (1924) Principles of gas adsorption. *Ind. Eng. Chem.* 16. 1215-1220.
- LICKLY T.D., BELL C.D. y LEHR K.M. (1990) The migration of Irganox 1010 antioxidant from high-density polyethylene and polypropylene into a series of potential fatty-food simulants. *Food Addit. Contam.* 7. 805-814.
- LINDMARK-HENRIKSSON M., ISAKSSON D., VANEK T., VALTEROVA I., HÖGBERG H.E. y SJÖDIN K. (2004) Transformation of terpenes using a *Picea abies* suspension culture. *J. Biotechnol.* 107. 173-184.

- LINSSEN J.P.H. y REITSMA J.C.E. (1996) Comparison of migration of styrene monomer from high impact polystyrene in oil in water emulsions and fatty foods. *J. Polym. Eng.* 15. 133-138.
- LIS-BALCHIN M., DEANS S.G. y EAGLESHAM E. (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flav. Frag. J.* 13. 98-104.
- LISKA I. (2000) Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview. *J. Chromatogr. A.* 885. 3-16.
- LIU H. y DASGUPTA P.K. (1996) Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal. Chem.* 68. 1817-1821.
- LONGBOTTOM C.J., CARSON C.F., HAMMER K.A., MEE B.J. y RILEY T.V. (2004) Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tee tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *J. Antimicrobiol. Chemoth.* 54. 383-392.
- LÓPEZ E.F. y GÓMEZ E.F. (2000) Comparison of solvents for determination of monoterpenes in wine using liquid-liquid extraction. *Chromatographia.* 52. 798-802.
- LÓPEZ P., SÁNCHEZ C., BATLLE R. y NERÍN C. (2005) Solid- and vapour-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.* 53. 6939-6946.
- LÓPEZ P., HUERGA M.A., BATLLE R. y NERÍN C. (2006) Use of solid phase microextraction in diffusive sampling of the atmosphere generated by different essential oils. *Anal. Chim. Acta.* 559. 97-104.
- LÓPEZ-BLANCO M.C., BLANCO-CID S., CANCHO-GRANDE B. y SIMAL-GÁNDARA J. (2003) Application of single-drop microextraction and comparison with solid-phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of a- and b-endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr. A.* 984. 245-252.
- LÓPEZ-MALO A., ALZAMORA S.M. y PALOU E. (2002) *Aspergillus flavus* dose-response curves to selected natural and synthetic antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.* 73. 213-218.
- LÓPEZ-MALO A., MARIS S. y PALOU E. (2005) *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 99. 11-128.
- LORD H. y PAWLISZYN J. (2000) Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A.* 902. 17-63.
- LORENSON C., BALL M.D., HEWITT B.C. y BELLAVANCE D. (1990) Nonuniform heating of foods packaged in microwaveable containers. *Tappi J.* 73. 265-267.
- LÖVKVIST P. y JÖNSSON J.A. (1987) Capacity of sampling and preconcentration columns with a low number of theoretical plates. *Anal. Chem.* 59. 818-821.
- Lück E., Jager M. (1997) *Antimicrobial food additives: characteristics, uses and effects*. Berlín. Springer.
- LUND F., FILTENBORG O., WESTFALL S. y FRISVAD J.C. (1996) Associated mycoflora on rye bread. *Let. Appl. Microbiol.* 23. 213-217.
- MACKAY D. y FRASER A. (2000) Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. *Env. Pol.* 110. 375-391.
- MAHMOUD B.S.M., YAMAZAKI K., MIYASHITA K., KAWAI Y., SHIN I. y SUZUKI T. (2006a) Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convective air-drying. *Int. J. Food Microbiol.* 106. 331-337.

- MAHMOUD B.S.M., YAMAZAKI K., MIYASHITA K., SHIN I. y SUZUKI T. (2006b) A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food Chem.* 99. 656-662.
- MANN C.M., COX S.D. y MARKHAM J.L. (2000) The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.* 30. 294-297.
- MANURA J. (2004) Calculation and use of breakthrough volume Data, SIS <http://www.sisweb.com/index/referenc/resin10.htm>
- MARI M., BERTOLINI P. y PRATELLA G.C. (2003) Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J. Appl. Microbiol.* 94. 761-766.
- MARTÍNEZ E., LACORTE S., LLOBET I., VIANA P. y BARCELÓ D. (2002) Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatr. A.* 959. 181-190
- MATAN N., RIMKEEREE H., MAWSON A.J., CHOMPREEEDA P., HARUTHAINASAN V. y PARKER M. (2006) Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 107. 180-185.
- MBANDI E. y SHELEF L.A. (2001) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. *J. Food Prot.* 64. 640-644.
- MERCK KGaA. Specifications of LiChrolut® EN. <http://chrombook.merck.de/chrombook/index.jsp>
- MERMELSTEIN N.H. (1998) Enzyme developments. *Food Technol.* 52. 122-135.
- MILLER K.G. y POOLE C.F. (1994) Methodological approach for evaluating operational parameters and the characterization of a popular sorbent for solid-phase extraction by high-pressure liquid-chromatography. *HRC-J. High Res. Chromatogr.* 17. 125-134.
- MING X., WEBER G., AYRES J. y SANDINE W. (1997) Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J. Food Sci.* 62. 413-415.
- MOLEYAR V. y NARASIMHAM P. (1992) Antibacterial activity of essential oil components. *Int. J. Food Microbiol.* 16. 337-342.
- MORTENSEN G., BERTELSEN G. y NIELSEN P.V. (2004) Packaging of cheeses. *Handbook of food and beverage fermentation technology*. Marcel Decker. pp 327-342.
- MOUREY A. y CANILLAC N. (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control.* 13. 289-292.
- MULLIN J. y BOWS J. (1993) Temperature-measurement during microwave cooking. *Food Addit. Contam.* 10. 663-672.
- MUNDO M.A., PADILLA-ZAKOUR O.I. y WOROBO R.W. (2004) Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol.* 97. 1-8.
- Muthukumarasamy P., Han J.H., Holley R.A. (2003) Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *E. coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. *J. Food Prot.* 66. 2038-2044.
- NAKAMURA H. y HOSHINO J. (1983) *Techniques for the preservation of food by employment of an oxygen absorber*. Technical Information (Tokyo: Mishubishi Gas Chemical Co., Ageless Division). pp 1-45.
- NATRAJAN N. y SHELDON B.W. (2000a) Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *J. Food Prot.* 63. 1189-1196.

- NATRAJAN N. y SHELDON B.W. (2000b) Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. *J. Food Prot.* 63. 1268-1272.
- NAZER A.I., KOBILINSKY A., THOLOZAN J.L. y DUBOIS-BRISSONNET F. (2005) Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *typhimurium*: a synergistic effect? *Food Microbiol.* 22. 391-398.
- NERÍN C., RUBIO C., CACHO J y SALAFRANCA J. (1995) Determination of styrene in olive oil by an automatic purge-and-trap system coupled to gas-chromatography mass-spectrometry. *Chromatographia.* 41. 216-220.
- NERÍN C., RUBIO C., CACHO J. y SALAFRANCA J. (1998) Parts-per-trillion determination of styrene in yoghurt by purge-and-trap gas chromatography with mass spectrometry detection. *Food Addit. Contam.* 15. 346-354.
- NERÍN C. (2002) Migración en poliolefinas. *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos*. Catalá R. y Gavara R., editores. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC. pp 205-229.
- NERÍN C. y ACOSTA D. (2002) Behavior of some solid food simulants in contact with several plastics used in microwave ovens. *J. Agric. Food Chem.* 50. 7488-7492.
- Nerín C., ACOSTA D. y RUBIO C. (2002) Potencial migration release of volatile compounds from plastic containers destined for food use in microwave ovens. *Food Addit. Contam.* 19. 594-601.
- NERÍN C. y ASENSIO E. (2004) Behaviour of organic pollutants in paper and board samples intended to be in contact with food. *Anal. Chim. Acta.* 508. 185-191.
- NERÍN C., TOVAR L., DJENANE D., CAMO J., SALAFRANCA J., BELTRÁN J.A. y RONCALES P. (2006) Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. Aceptado en *J. Agric. Food Chem.*
- NERNST W. (1904) Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z. Phys. Chem.* 47. 52-55.
- NEETLES C. y BAREFOOT S.F. (1993) Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 60. 219-229
- NIELSEN P.V. y RÍOS R. (2000) Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* 60. 219-229.
- NIELSEN P.V. (2004) Packaging, quality control, and sanitation of bakery products. *Handbook of food and beverage fermentation technology*. Marcel Decker. pp 783-797.
- NORTHOLT M.D., FRISVAD J.C. y SAMSON R.A. (1995) Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Barn. pp 243-250.
- OPALCHENOVA G. y OBRESHKOVA D. (2003) Comparative studies on the activity of basil-an essential oil from *Ocimum basilicum* L.-against multidrug resistant clinical isolates of genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *J. Microbiol. Met.* 54. 105-110.
- OPPERMAN W.J., FOURIE J.F., SANDERSON R.D. y BRITZ T.J. (1999) A monolithic device for in-package SO₂ generation for the control of postharvest *Botrytis* decay of table grapes. *J. Food Quality.* 22. 427-438.
- ORTEGA L., LÓPEZ R., CACHO J. y FERREIRA V. (2001) The use of solid-liquid distribution coefficients to determine retention properties of Porapak-Q resins. Determination of optimal

- conditions to isolate alkyl-methoxypyrazines and beta-damascenone from wine. *J. Chromatogr. A*. 931. 31-39.
- OUATTARA B., SIMARD R.E., HOLLEY R.A., PIETTE G.J.P. y BÉGIN A. (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organism. *Int. J. Food Microbiol.* 37. 155-157.
- OUATTARA B., SIMARD R., PIETTE G., BEGIN A. y HOLLEY R. (2000a) Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *J. Food Sci.* 65. 768-772.
- OUATTARA B., SIMARD R., PIETTE G., BEGIN A. y HOLLEY R. (2000b) Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* 62. 139-148.
- PADGET T., HAN I. y DAWSON P. (1998) Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *J. Food Prot.* 61. 1330-1335.
- PADGET T., HAN I. y DAWSON P. (2000) Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *J. Food Proc. Preserv.* 24. 423-432.
- PALIT M., PARDASANI D., GUPTA A.K. y DUBEY D.K. (2005) Application of single drop microextraction for analysis of chemical warfare agents and related compounds in water by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77. 711-717.
- PANDEY R., KALRA A., TANDON S., MEHROTRA N., SINGH H.N. y KUMAR S. (2000) Essential oil compounds as a potent source of nematocidal compounds. *J. Phytopathol.* 148. 501-502.
- PANDIT V.A. y SHELEF L.A. (1994) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.* 11. 57-63.
- PARK S. y CHOE S. (2005) The compatibilizing effect of maleic anhydride in ethylene-vinyl acetate (EVA)/ethylene-alpha-olefin copolymer blends. *Macrom. Res.* 13. 297-305.
- PARKER G., WRIGHT M. y ROSSI D.T. (1996) Design and evaluation of an automated solid-phase extraction method development system for use with biological fluids. *Anal. Chem.* 68. 2437-2441.
- PASTORELLI S. (2002) Aspectos analíticos en los envases activos, inteligentes y reciclaje de materiales plásticos: Futuras tecnologías para el envasado alimentario. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- PAWLISZYN J. (1997) *Solid-phase microextraction, theory and practice*. Wiley-VCH. New York
- PEETERS M., GODERIS B., REYNAERS H. y MATHOT V. (1999) Morphology of homogeneous copolymers of ethylene and 1-octene. II. Structural changes on annealing. *J. Pol. Sci Part B: Pol. Phy.* 37. 83-100.
- PETTERSSON E.M. (2001) Volatiles from potential hosts of *Rhopalicus tutela* a bark beetle parasitoid. *J. Chem. Ecol.* 27. 2219-2231.
- PEZO D., SALAFRANCA J. y NERÍN C. (2006) Design of a method for generation of gas-phase hydroxyl radicals, and use of HPLC with fluorescence detection to assess the antioxidant capacity of natural essential oils. *Anal. Bioanal Chem.* 385. 1241-1246.
- PITT, H. (1997) *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional. London.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (1977) Influence of solute and hydrogen-ion concentration on water relations of some xerophilic fungi. *J. Gen. Microbiol.* 101. 35-40.

- PLACKETT R.L. y BURMAN J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 33. 305-325.
- POOLE C.F., GUNATILLEKA A.K. y SETHURAMAN R. (2000) Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*. 885. 17-39.
- POOLE S.K. y POOLE C.F. (1995) Influence of solvent effects on the breakthrough volume in solid-phase extraction using porous polymer particle-loaded membranes. *Analyst*. 120. 1733-1738.
- PRINDLE R.F. y WRIGHT E.S. (1977) Phenolic compounds. *Disinfection, sterilization and preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- PRZYJAZNY A. y KOKOSA J.M. (2002) Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction. *J. Chromatogr. A*. 977. 143-153.
- PSILLAKIS E. y KALOGERAKIS N. (2001) Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *J. Chromatogr. A*. 907. 211-219.
- PSILLAKIS E. y KALOGERAKIS N. (2002) Developments in single-drop microextraction. *Trends Anal. Chem.* 21. 53-63.
- PUGH S.R. (1994) Modelling migration from food packaging into food. *Food Science Reviews. Vol 2. Chemical migration from food packaging*. Watson, D.H., Meah, M.N., editores. Ellis Horwood. Chichester. pp 137-155.
- RABENHORST J. (1996) Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46. 470-474.
- RASOOLI I. y MIRMOSTAFA S.A. (2003) Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotshayanus* and *Thymus persicus*. *J. Agric. Food Chem.* 21. 2200-2205.
- Reglamento (CE) nº1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE. Diario Oficial nºL338 del 13/11/2004.
- Reglamento (CE) nº1895/2005 de la Comisión del 18 de noviembre de 2005, relativo a la restricción en el uso de determinados derivados epoxídicos en materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial nºL302 del 18/11/2005.
- REYNIER A., DOLE P. y FEIGENBAUM A. (2002a) Integrated approach of migration prediction using numerical modelling associated to experimental determination of key parameters. *Food Addit. Contam.* 19. 42-55.
- REYNIER A., DOLE P. y FEIGENBAUM A. (2002b) Migration of additives from polymers into food simulants: numerical solution of a mathematical model taking into account polymer interactions. *Food Addit. Contam.* 19. 82-102.
- RICE J. (1989) Gas emitting wafers: A cost-effective MAP approach. *Food Process.* 46. 56-58.
- RICQUET A.M., WOLFF N., LAOUBI S., VERGNAUD J.M. y FEIGENBAUM A. (1998) Food and packaging interactions: determination of the kinetic parameters of olive oil diffusion in polypropylene using concentration profiles. *Food Addit. Contam.* 19. 690-700.
- RISCH S.J., HEIKKILA K., WILLIAMS R. (1991) Analysis of volatiles produced in foods and packages during microwave cooking. *ACS Sym. Series.* 473. 1-10.

- RISCH S. 1993. Safety assessment of microwave susceptor and other high-temperature packaging materials. *Food Addit. Contam.* 10. 655-661.
- RODRÍGUEZ I., LLOMPART M.P. y CELA R. (2000) Solid-phase extraction of phenols. *J. Chromatogr. A.* 885. 291-304.
- ROMERO J., RUBIO C., BATLLE R. y NERÍN C. (2006) Headspace single-drop microextraction for the detection of potential antimicrobial agents. Enviado a *Anal. Chim. Acta*.
- ROONEY M.L. (1995) Active packaging in polymer films. *Active food packaging*. Blackie Academic and Professional. Londres.
- ROSELL M., LACORTE S., GINEBRED A. y BARCELÓ D. (2003) Simultaneous determination of methyl *tert.*-butyl ether and its degradation products, other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalonian groundwater by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 995. 171-184.
- SALAFRANCA J., CACHO J. y NERÍN C. (2000) Determination of volatile and semi-volatile model contaminants in recycled high-impact polystyrene from food-contact applications. Comparison of extraction by purge-and-trap, co-evaporation, and total dissolution. *Chromatographia.* 51. 615-622.
- SAMSON R.A., HOWKSTRA E.S., FRISVAD J.C. y FILTENBORG O. (2000) Introduction to food and airborne fungi. Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.
- SANTOYO S., CAVERO S., JAIME L., IBÁÑEZ E., SENORANS F.J. y REGLERO G. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* 68. 790-795.
- SARAUULLO A., MARTOS P.A. y PAWLISZYN J. (1997) Water analysis by solid phase microextraction based on physical chemical properties of the coating. *Anal. Chem.* 69. 1992-(1998)
- SCANELL A.G.M., HILL C., ROSS R.P., MARX S., HARMEIER W. y ARENDT E.K. (2000) Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin". *Int. J. Food Microb.* 79. 35-45.
- SCHOZEN K., OHSHIMA T., USHIO H., TAKIGUCHI A. y KOIZUMI C. (1997) Effects of antioxidants in processed anchovy during storage. *Food Sci. Technol.* 30. 2-8.
- SCHWOPE A.D., TILL D.E., EHNTHOLT D.J., SIDMAN K.R., WHELAN R.H., SCHWARTZ P.S. y REID R.C. (1987) Migration of BHT and Irganox-1010 from low density polyethylene (LDPE) to foods and food-simulating liquids. *Food Chem. Toxicol.* 25. 317-329.
- SCORA K.M. y SCORA R.W. (1998) Effect of volatiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. ulaiense*. *J. Basic. Microbiol.* 38. 405-412.
- SCORTICHINI M. y ROSSI P. (1991) Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (burryl) winslow *et al.* *J. Appl. Bacter.* 71. 109-112.
- SHARIATI-FEIZABADI S., YAMINI Y. y BAHRAMIFAR N. (2003) Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Anal. Chim. Acta.* 489. 21-31.
- SHARMAN M., HONEYBONE C.A., JICKELLS S.M. y CASTLE L. (1995) Detection of residues of the epoxy adhesive component bisphenol-A diclycidyl ether (BADGE) in microwave susceptors and its migration into food. *Food Addit. Contam.* 12. 779-787.
- SHELEF L.A. (1983) Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety.* 6. 29-44.
- SHELEF L.A. y SEITER J.A. (1993) Indirect antimicrobials. *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker. Londres. pp 539-569.

- SHEN G. y LEE H.K. (2002) Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Anal. Chem.* 74. 648-654.
- SHEN G. y LEE H.K. (2003) Headspace liquid-phase microextraction of chlorobenzenes in soil with gas chromatography-electron capture detector. *Anal. Chem.* 75. 98-103.
- SHERMAN L. (1998) Biocides keep the best of your plastics. *Plastic Technol.* 44. 45-48.
- SIDES A., ROBARDS K. y HELLIWEL S. (2000) Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends Anal. Chem.* 19. 332-329.
- SIMONEAU C., THEOBALD A., RONCARI P., HANNAERT P. y ANKLAM E. (2002) Time-temperature study of the kinetics of migration of BADGE (bisphenyl-A-dicycidyl-ether) into a fatty medium. *Food Addit. Contam.* 19. 73-78.
- SINGH A., SINGH R.K., BHUNIA A.K. y SINGH N. (2003) Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss u.-Technol.* 36. 787-794.
- SIRAGUSA G., CUTTER C. y WILLET J. (1999) Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16. 229-235.
- SIS Inc, Tenax™ TA. (2004) Adsorbent Resin Physical Properties. <http://www.sisweb.com/index/referenc/tenaxtam.htm>
- SKANDAMIS P., KOUTSOUMANIS K., FASSEAS K. y NYCHAS G.J.E. (2001) Inhibition of oregano oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian J. Food Sci.* 13. 65-75.
- SKANDAMIS P., TSIGARIDA E. y NYCHAS G.J.E. (2002) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic VP/MAP conditions. *Food Microbiol.* 19. 97-103.
- SKJEVRAK I., DUE A., GJERSTAD K.O. y HERIKSTAD H. (2003) Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. *Water Res.* 37. 1912-1920.
- SMITH C.K, MOORE C.A., ELAHI E.N., SMART A.T.S. y HOTCHKISS S.A.M. (2000) Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168. 188-199.
- SMITH J.P., OORAIKUL B., KOERSEN W., JACKSON E.D. y LAWRENCE R.A. (1986) Novel approach to oxygen control in modified atmosphere packaging of bakery products. *Food Microbiol.* 3. 315-320.
- SMITH, J.P., HOSHINO, J. y ABE, Y. (1995) Interactive packaging involving sachet technology. *Active Food Packaging*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. pp 143-172.
- SMITH-PALMER A., STEWART J. y FYFE L. (2001) The potential application of essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 18. 463-470.
- SNOW N.H. y SLACK G.C. (2002) Head-pace analysis in modern gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 21. 608-617.
- SOARES N.F.F. y HOTCHKISS J.H. (1998a) Bitterness reduction in grapefruit juice through active packaging. *Pack. Technol. Sci.* 11. 9-18.
- SOARES N.F.F. y HOTCHKISS J.H. (1998b) Naringinase immobilisation in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *J. Food Sci.* 63. 61-65.
- SOLIMAN K.M. y BADEAA R.I. (2002) Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxic.* 40. 1669-1675.
- STANNET V. y YASUDA H. (1965) *Testing the Polymers*. J.V. Smith, Interscience, Nueva York.

- STARTIN J.R., SHARMAN M., ROSE M.D., PARKER I., MERCER A.J., CASTLE L. y GILBERT J. (1987) Migration from plasticized films into foods. 1. Migration of di-(2-ethylhexyl)adipate from PVC films during home-use and microwave cooking. *Food Addit. Contam.* 4. 385-398.
- STECCHINI M.L., SARAI I. y GIAVEDONI P. (1993) Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Prot.* 46. 406-409.
- SUDARSHAN N.R., HOOVER D.G. y KNORR D. (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 6. 257-272.
- SUHR K.I. y NIELSEN P.V. (2004) Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *Int. J. Food Microbiol.* 95. 67-78.
- SUHR K.I. y NIELSEN P.V. (2005) Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *J. Food Sci.* 70. 37-44.
- SUPELCO. SIGMA-ALDRICH Co. (2006)
http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Datanodes.html?cat_path=989103,989104&id=989104&supelco_name=Products
- SUPPAKUL P., MILTZ J., SONNEVELD K. y BIGGER S.W. (2003a) Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its application. *J. Food Sci.* 68. 408-420.
- SUPPAKUL P., MILTZ J., SONNEVELD K. y BIGGER S.W. (2003b) Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging and its application. *J. Agric. Food Chem.* 51. 3197-3207.
- TANG W.C., HEMM I. y EISENBRAND G. (2000) Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene. *Toxicology.* 144. 39-50
- TANKEVICUITE A., KAZLAUSKAS R. y VICKACKAITE V. (2001) Headspace extraction of alcohols into a single-drop. *Analyst.* 126. 1674-1677.
- TASSOU C.C., DROSINOS E.H. y NYCHAS G.J.E. (1995) Effect of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 78. 593-600.
- TAWFIK M.S. y HUYGHEBAERT A. (1998) Polystyrene cups and containers: styrene migration. *Food Addit. Contam.* 15. 592-599.
- THOMAS P., BRUSHAN B. y JOSHI M.R. (1995) Comparison of the effect of gamma irradiation, heat-radiation combination, and sulphur dioxide generating pads on decay and quality of grapes. *J. Food Sci. Technol.* 32. 477-481.
- THURMAN E.M. y MILLS M.S. (1998) *Solid-phase extraction: principles and practice*. Wiley-Interscience.
- TING W.T.E. y DEIBEL K.E. (1992) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* at two temperatures. *J. Food Safety.* 12. 129-137.
- TORSELL K.B.G. (1984) *Natural Product Chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*. Apotekarsocieteten y Taylor & Francis. Londres.
- TOVAR L. (2003) Estudio y optimización de un envase activo para alimentos. Proyecto Fin Carrera. Universidad de Zaragoza.
- TOVAR L., SALAFRANCA J., SÁNCHEZ C. y NERÍN C. (2005) Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *J. Agric. Food Chem.* 53. 5270-5275.

- ULTEE A. y SMID E.J. (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* 64. 373-378.
- ULTEE A., BENNIK M.H. y MOEZELAAR R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Env. Microbiol.* 68. 1561-1568.
- VAARA M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer-membrane. *Microbiol. Rev.* 56. 395-411.
- VALERO M. y GINER M.J. (2006) Effect of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 106. 90-94.
- VALVERDE J.M., GUILLÉN F., MARTÍNEZ-ROMERO D., CASTILLO S., SERRANO M. y VALERO D. (2005) Improvement of table grapes quality and safety by the combination of modified atmosphere packaging (MAP) and eugenol, menthol or thymol. *J. Agric. Food Chem.* 53. 7458-7464.
- VAN DE BRAAK S.A.A.J. y LEIJTEN G.C.J.J. (1999) Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI. Centre for the Promotion of Imports from Developing countries. p. 116.
- VAN DER OOST R., BEYER J. y VERMEULEN N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Env. Tox. Pharm.* 13. 57-149.
- VAN WILLIGE R.W.G., LINSSEN J.P.H., MEINDERS M.B.J., VAN DER STEGE H.J. y VORAGEN A.G.J. (2002) Influence of flavour adsorption on oxygen permeation through LDPE, PP, PC and PET plastics food packaging. *Food Addit. Contam.* 19. 303-313.
- VARIAN Inc. Bond Elut ENV. 2003 http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/_consum/samprep/spe/packed/polymeric/env&cid=IPQKNJNFI
- VELDHUIZEN E.J.A., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN J.L.M., ZWIJTZER C., BURT S. y HAAGSMAN H. (2006) Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* 54. 1874-1879.
- VENKATESH R., HARRISSON S., HADDLETON D.M. y KLUMPERMAN B. (2004a) Olefin copolymerization via controlled radical polymerization: Copolymerization of acrylate and 1-octene. *Macromolecules.* 37. 4406-4416.
- VENKATESH R., YAJJOU L., KONING C.E. y KLUMPERMAN B. (2004b) Novel brush copolymers via controlled radical polymerization. *Macrom. Chem. Phy.* 205. 2161-2168.
- VENTURA K., DOSTAL M., CHURACEK J. (1993) Retention characteristics of some volatile compounds on Tenax GR. *J. Chromatogr. A.* 642. 379-382.
- VERMEIREN L., DEVLIEGHERE F., VAN BEST M., DE KRUIJ N. y DEBEVERE J. (1999) Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 10. 77-86.
- VERMEIREN L., DEVLIEGHERE F. y DEBEVERE J. (2002) Effectiveness of some recent antimicrobial concepts. *Food Addit. Contam.* 19. 163-171.
- WAN J., WILCOCK A. y COVENRY M.J. (1998) The use of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84. 152-158.
- WARD S.M., DELAQUIS P.J., HOLLLEY R.A. y MAZZA G. (1998) Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roasted beef by volatile horseradish distillates. *Food Res. Int.* 31. 19-26.
- WELLINGHOFF S. (1995) Chlorine dioxide generating polymer packaging films. *US Patent* 3605609

- WENDAKOON C.N. y SAKAGUCHI M. (1993) Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *J. Food Prot.* 56. 410-413.
- WENG Y. y HOTCHKISS J. (1993) Anhydrides as antimycotic agents added to polyethylene films for food packaging. *Pack. Technol. Sci.* 6. 123-128.
- WENG Y., CHEN M. y CHEN W. (1997) Benzoyl chloride modified ionomer films as antimicrobial food packaging materials. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32. 229-234.
- WENG Y., CHEN M. y CHEN W. (1999) Antimicrobial food packaging materials form poly(ethylene-co-methacrylic acid). *Lebens. Wissen. Technol.* 32. 191-195.
- WESSLING C., NIELSEN T., LEUFVEN A. y JÄGERSTAD M. (1998) Mobility of α -tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. *Food Addit Contam.* 15. 709-715.
- WHITE R.L., BURGESS D.S., MANDURU M. y BOSSO J.A. (1996) Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrobiol. Agents Chemoth.* 40. 1914-1918.
- WILHOIT D. (1996) Film and method for surface treatment of foodstuffs with antimicrobial properties. *US patent 5573797*.
- WOOD D.C., MILLER J.M. y CHRIST I. (2004) Headspace liquid microextraction. *LC-GC Europe.* 17. 573-579.
- XIAO C., GAO S. y ZHANG L. (2000) Blend films from konjac glucomannan sodium alginate solutions and their preservative effect. *J. Appl. Polym. Sci.* 77. 617-626.
- YAMINI Y., HOJJATI M., HAJI-HOSSEINI M. y SHAMSIPUR M. (2004) Headspace solvent microextraction. A new method applied to the preconcentration of 2-butoxyethanol from aqueous solutions into a single microdrop. *Talanta.* 62. 265-270.
- YIN M.C., HWANG S.W. y CHAN K.C. (2002) Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.* 50. 6143-6147.
- YIN M.C. y CHEN W.S. (2003) Antioxidant and antimicrobial effect for four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci.* 63. 23-28.
- YUSTE J. y FUNG D.Y.C. (2002) Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon. *J. Food Prot.* 65. 1663-1666.
- ZAGORY D. (1995) Ethylene-removing packaging. *Active Food Packaging*. Blackie Academic and Professional. Londres.
- ZHAO L. y LEE H.K. (2002) Liquid-phase microextraction combined with hollow fiber as a sample preparation technique prior to gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74. 2486-2492.
- ZHU W., ASGHARI G. y LOCKWOOD G.B. (2000) Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia.* 71. 501-506.
- ZULOAGA O., ETXEBARRÍA N., FERNÁNDEZ L.A. y MADARIAGA J.M. (1999) MultiSimplex optimisation of purge-and-trap extraction of phenols in soil samples. *J. Chromatogr. A.* 849. 225-234.
- ZULOAGA O., ETXEBARRÍA N., FERNÁNDEZ L.A. y MADARIAGA J.M. (2000) MultiSimplex optimisation and comparison of different purge-and-trap extractions of volatile organic compounds in soil samples. *Anal. Chim. Acta.* 416. 43-53.

ISBN 978-84-691-8607-7



9 788469 186077

**CONSEJO ECONÓMICO
Y SOCIAL DE ARAGÓN**

Calle Costa, 18
50071 Zaragoza
Tel. 976 713 838
Fax 976 713 841
cesa@aragon.es



CESA