



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Estudio perfil de compuestos volátiles de un nuevo  
material para preservación de alimentos a bajas  
temperaturas**

**Volatile compound profile study of a new material for food  
preservation at low temperatures**

Autor

Eire López Arroyos

Director

Esther Asensio Casas

Facultad de Veterinaria

2024

---



# Índice

Resumen.....	1
Abstract .....	2
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1. Material en contacto con alimentos .....	3
1.2. Aceites esenciales .....	4
1.2.1 Aceites esenciales de orégano y canela .....	5
1.3. Hongo <i>Botrytis cinerea</i> .....	6
1.4. Uso de papel como material en contacto con los alimentos .....	6
<b>2. Justificación y objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>9</b>
3.1. Descripción de las muestras de material para envase activo .....	9
3.1.1. Preparación de los papeles recubiertos .....	9
3.1.2. Diseño de los experimentos .....	9
3.2. Análisis de las muestras mediante microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplado a cromatografía de gases (GC-MS) .....	10
3.2.1. Identificación de compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC/MS .....	10
3.3. Actividad antifúngica de los papeles recubiertos frente al hongo <i>Botrytis cinerea</i> .....	11
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>13</b>
4.1. Identificación de los compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC/MS.....	13
4.2. Resultados análisis de papeles recubiertos mediante HS-SPME-GC/MS.....	18
4.3. Resultados de los ensayos in vitro frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	22
4.3.1. Actividad antifúngica papeles recubiertos frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
4.4. Comparación resultados análisis compuestos volátiles con actividad antifúngica frente a <i>Botrytis cinerea</i> .....	23
4.4.1. Análisis ANOVA para el papel recubierto 1.8T .....	24
4.4.2. Análisis ANOVA para el papel recubierto 2.6T .....	24
<b>5. Conclusiones/Conclusions.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Valoración personal.....</b>	<b>31</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>33</b>



## Resumen

En este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo el análisis e identificación de compuestos volátiles provenientes de aceites esenciales (orégano y canela hojas) presentes en dos tipos de emulsiones con las que se ha realizado el recubrimiento de láminas de papel para uso alimentario, almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración, siguiendo su evolución semanal hasta los 38 días de su preparación.

El análisis de los compuestos volátiles se ha realizado mediante microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplado a cromatografía de gases (GC/MS). Para su identificación, se ha trabajado con disoluciones de patrones analíticos y se han calculado los índices de Kovats. Como resultado, se han identificado una gran cantidad de compuestos (48). Dado que se busca relacionar la evolución de estos compuestos con su eficacia frente al hongo *Botrytis cinerea*, se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto volátil frente a hongos, seleccionando 18 compuestos volátiles del total de compuestos identificados.

Los resultados semanales obtenidos del análisis de los papeles, muestran una disminución de los mismos conforme aumenta el tiempo desde su preparación. Además, se ha visto la influencia del tipo de almidón utilizado para el recubrimiento y su relación con la temperatura de almacenamiento.

A partir de los resultados de la actividad antifúngica “in vitro” frente *Botrytis cinerea* se ha buscado una posible relación con los resultados de los análisis, para ello, se ha realizado un análisis ANOVA. Se ha observado que la eficacia de la actividad antifúngica “in vitro” de los compuestos y el tipo de almidón son factores dependientes de la temperatura de almacenamiento, para uno de los papeles. Además, se han identificado varios problemas en el análisis de los compuestos volátiles mayoritarios (safrol, carvacrol y eugenol) en los aceites esenciales, que condicionarán trabajos futuros.

## Abstract

In this Final Degree Project, we have carried out the analysis and identification of volatile compounds from essential oils (oregano and cinnamon leaves) present in two types of emulsions used to coat sheets of paper for food use, stored at room temperature and refrigerated, following their weekly evolution until 38 days after their preparation.

The analysis of volatile compounds was carried out by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas chromatography (GC/MS). For their identification, analytical standard solutions were used and Kovats indices were calculated. As a result, a large number of compounds have been identified (48). Since the aim is to relate the evolution of these compounds to their efficacy against the fungus *Botrytis cinerea*, a literature review of the minimum inhibitory concentration (MIC) of each volatile compound against fungi was carried out, selecting 18 volatile compounds from the total number of compounds identified.

The weekly results obtained from the analysis of the papers show a decrease of these compounds as the time since their preparation increases. In addition, the influence of the type of starch used for the coating and its relationship with the storage temperature has been observed.

Based on the results of the *in vitro* antifungal activity against *Botrytis cinerea*, a possible relationship with the results of the analyses was sought, for which an ANOVA analysis was carried out. It has been observed that the efficacy of the *in vitro* antifungal activity of the compounds and the type of starch are storage temperature-dependent factors for one of the papers. In addition, several problems have been identified in the analysis of the major volatile compounds (safrole, carvacrol and eugenol) in essential oils, which will condition future work.

## 1. Introducción

### 1.1. Material en contacto con alimentos

Una amplia gama de diferentes materiales (plásticos, metal, papel y cartón, etc.) se encuentran en contacto con los alimentos durante su producción, preparación, distribución y almacenamiento, antes de que finalmente se consuman. Un material en contacto con alimentos no debe transferir sus componentes a los alimentos, en cantidades que representen un peligro para la salud humana, provocando una modificación inaceptable de la composición de los alimentos o alterando las características organolépticas de estos.

Según la definición legal del Reglamento (CE) nº 1935/2004, los materiales en contacto con alimentos (MCA) son *“a) materiales destinados a entrar en contacto con alimentos, b) materiales que ya están en contacto con alimentos o c) materiales que razonablemente se pueda esperar que entren en contacto con los alimentos o transfieran sus constituyentes a los alimentos en condiciones de uso normal o previsible”*. Se pueden encontrar una gran variedad de materiales en contacto con alimentos, desde vidrio, papel/cartón y metales hasta polímeros como polipropileno, estireno y silicona o combinaciones de estos. Algunas de sus funciones más importantes son prolongar la vida útil de los alimentos, facilitar el almacenamiento e informar al consumidor. Las sustancias presentes en estos materiales ya sean añadidas o no, pueden liberarse del material en contacto con los alimentos a los propios alimentos mediante un proceso denominado migración (Dittman et al., 2022).

Desde el punto de vista químico, la migración puede describirse como la *“transferencia de masa desde un material de embalaje a los alimentos provocada por un gradiente de concentración entre el embalaje y el producto de relleno”*. Esta migración depende de varios parámetros, incluidas las propiedades intrínsecas del material en contacto con los alimentos, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia migratoria, las características del alimento y las condiciones de contacto con los alimentos. La migración tiene lugar hasta que se alcanza un equilibrio en todo el sistema (Dittman et al., 2022).

Dentro de los materiales en contacto con los alimentos, existen los denominados *“materiales o envases activos”*. Éstos están destinados a prolongar y mantener la vida útil o mejorar el estado del alimento envasado. También, están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias al alimento o a la atmósfera interior, consiguiendo con ello alargar la vida útil del mismo sin resultar perjudicial para el consumidor (Reglamento (CE) nº 450/2009). El envase activo se puede definir como la *“incorporación de agentes funcionales en el material para extender la vida útil de la calidad del*

*producto con el objetivo de modificar la atmósfera alrededor del producto, como son antioxidantes, antimicrobianos y antifúngicos” (Gaikwad et al., 2018, 2019, 2020).*

Los envases activos se pueden clasificar en varias categorías, como quimioactivos y bioactivos, según el tipo de aditivo incorporado en el material con el que se fabrica el envase. Los agentes quimioactivos son aditivos químicos sintéticos y los agentes bioactivos hacen referencia a aditivos de origen natural. Potencialmente, pueden afectar la composición química del alimento y a la atmósfera gaseosa dentro del envase (Janjarasskul & Suppakul, 2018).

Además, el desarrollo de envases con propiedades antioxidantes reduce o inhibe la actividad de radicales libres en los alimentos y en la atmósfera del envase. La incorporación al envase de compuestos antimicrobianos provenientes de sustancias de origen natural, como los aceites esenciales, son muy importantes ya que disminuyen el crecimiento de microorganismos. Del mismo modo que, compuestos con propiedades antifúngicas pueden inhibir el crecimiento de mohos en los alimentos, dado que son agentes fungistáticos (Rout et al., 2022).

## 1.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas producidas naturalmente como metabolitos secundarios, por una especie vegetal específica, debido a las reacciones enzimáticas de los metabolitos primarios (Ahmad et al., 2021). Los principales compuestos químicos presentes en los aceites esenciales se agrupan, según su composición química, en grandes familias, como son los terpenos, fenilpropanoides e hidrocarburos, entre otros (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017), dependiendo de las características edafoclimáticas de la planta de donde se obtiene el aceite esencial. Se encuentran formados en un 95% por compuestos volátiles, constituidos principalmente por monoterpenos e hidrocarburos sesquiterpénicos, así como sus derivados oxigenados; alcoholes, aldehídos alifáticos, ésteres, éteres, cetonas y fenoles (Ceballos-Toro & Londoño-Giraldo, 2017; Adlakun et al., 2016). El 5% restante lo constituyen compuestos no volátiles, como es el caso de determinados hidrocarburos, ácidos grasos, carotenoides, ceras y flavonoides (Adlakun et al., 2016). Uno de los problemas que presenta el uso de aceites esenciales en la preparación de envases activos es su elevada volatilidad, pudiendo “transmitir” olores al envase o material utilizado, así como a los alimentos que contiene.

Es ampliamente conocido el uso de aceites esenciales en la industria alimentaria, dadas sus conocidas propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antifúngicas. Los aceites esenciales, entre otros, contienen compuestos fenólicos con propiedades bactericidas y

antioxidantes, que pueden reducir o incluso erradicar la presencia de microorganismos, así como el proceso de oxidación de lípidos. La función de estos compuestos es alterar la pared celular, lo que provoca la fuga de contenidos citoplasmáticos y, finalmente, la muerte celular (Tariq et al., 2019).

Los aceites esenciales pueden aplicarse directamente a los alimentos o incorporarse en el envase, para liberarse durante el almacenamiento o transporte de los alimentos, aumentando la vida útil de estos productos. Por ello, es de gran utilidad la adición de aceites esenciales en envases activos, que se han incorporado en forma de película o de recubrimiento; donde las películas son films delgados se pueden aplicar como capa, paquete, envoltorio o separador de capas. Por otro lado, los recubrimientos son suspensiones líquidas de calidad alimentaria que se fijan a la superficie del alimento o del material del que se fabrica el envase, como una capa delgada, mediante técnicas de pulverización, esparcimiento o inmersión (Ebrahimzadeh et al., 2023).

### 1.2.1. Aceites esenciales de canela y orégano

Se ha demostrado que tanto el aceite esencial de orégano como de canela son potentes agentes fúngicos e inhibidores de patógenos, principalmente debido a su alto contenido en compuestos fenólicos volátiles, como linalol, eugenol, mentol, cinamaldehído, timol y carvacrol, que alteran las membranas celulares de los hongos impidiendo su crecimiento (Tariq, et al., 2019).

En concreto, el aceite esencial de canela es un conservante natural extraído de la canela, que se utiliza desde hace mucho tiempo, y está compuesto principalmente de varias sustancias activas como eugenol, aldehídos y ácidos cinámicos. El aceite esencial de canela es ampliamente utilizado como agente antimicrobiano, antifúngico y antioxidante en la conservación de alimentos (Chu et al., 2020). Estas propiedades antifúngicas y antioxidantes son debidas a la presencia de compuestos volátiles como el eugenol y el cinamaldehído (Combrinck et al., 2011). Son capaces de dañar las células fúngicas, retardando así el desarrollo de mohos como *Botrytis cinerea* (Ayala-Zavala et al., 2008; Combrinck et al., 2011), y son altamente capaces de neutralizar los radicales libres (Singh et al., 2007).

Por otro lado, el aceite esencial de orégano se encuentra entre los aceites esenciales más investigados debido a sus propiedades antifúngicas, previniendo el crecimiento de un amplio espectro de hongos, como el *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. o *Penicillium* sp. El aceite esencial de orégano está compuesto principalmente por compuestos monoterpenoides y monoterpenos, que han demostrado efectos antioxidantes y antimicrobianos, como ya se ha

comentado anteriormente, debido a compuestos como el carvacrol, timol y p-cimeno (Bedoya-Serna, et al., 2018).

### 1.3. Hongo *Botrytis cinerea*

Uno de los patógenos de mayor impacto en la industria alimentaria es el hongo *Botrytis cinerea* (Petrasch et al., 2019). Causa el conocido como “moho gris” en frutos y órganos senescentes, pero también puede afectar a los tejidos vegetativos (Meng et al., 2024). El inóculo de este hongo es muy abundante, ubicuo y es difícil de controlar debido a la creciente resistencia a los fungicidas (Shao et al., 2021).

En la industria alimentaria, el control de calidad de las materias primas durante el proceso de elaboración es fundamental para la satisfacción del consumidor y el resultado final. La invasión de hongos patógenos durante la cosecha y manipulación provoca el rápido deterioro de los alimentos, traducándose en importantes pérdidas y una considerable reducción del tiempo y capacidad de almacenamiento (Barea-Ramos et al., 2024). La enfermedad del “moho gris”, causada por *Botrytis cinerea*, es responsable de importantes pérdidas durante el almacenamiento y transporte (Bu et al., 2021).

### 1.4. Uso de papel como material en contacto con los alimentos

Los materiales en contacto con alimentos a base de papel son una opción favorable debido a su naturaleza biodegradable, reciclable y sostenible (Oloyede & Lignou, 2021) y se utilizan comúnmente en la industria alimentaria. Sin embargo, su baja barrera contra la humedad puede afectar la integridad y la vida útil del producto. En condiciones ambientales apropiadas, puede tener lugar crecimiento microbiano, proveniente del producto, del medio ambiente o del propio material (Guzińska et al., 2012). Los mohos pueden prosperar en el papel debido a la presencia de fuentes de carbono como la celulosa y el almidón, lo que genera posibles problemas de deterioro (Anfossi et al., 2016). Además, estos mohos tienen enzimas degradativas que pueden descomponer y degradar rápidamente el material del papel, causando potencialmente deterioro y problemas de seguridad, especialmente si se producen micotoxinas (Zaffora et al., 2024).

## 2. Justificación y objetivos

En la actualidad, la industria alimentaria se ha visto obligada a desarrollar nuevas técnicas de conservación de frutas y verduras, debido a la preocupación de los consumidores por aspectos como la calidad, la seguridad alimentaria y el desperdicio alimentario. Una de las alternativas a estudiar es la aplicación de aceites esenciales en materiales en contacto con los alimentos para alargar la vida útil de estos productos. Se ha demostrado que los aceites esenciales, derivados de especies vegetales, contienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes con el objetivo de controlar enfermedades producidas por hongos, como *Botrytis cinerea*, en el transporte y almacenamiento de los alimentos.

En este contexto, desde el Grupo Universitario de Investigación de Química Analítica (GUIA) en colaboración con la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (EEAD) se lleva trabajando desde 2022, en el proyecto TED2021-129138B-C21: Desarrollo de nuevas soluciones ecológicas y sostenibles de envases activos para fruta fresca, de la Agencia Estatal de Investigación. Este Trabajo Fin de Grado (TFG) se integra dentro del proyecto y abarca una de las partes a estudiar y poder correlacionar con el resto del proyecto.

Se ha establecido como objetivo principal de este TFG, extender la vida útil de los alimentos, minimizando el desperdicio alimentario y garantizando la seguridad alimentaria. Para ello, se evaluará un nuevo material cada 7 días, almacenado en dos condiciones de temperatura diferentes (temperatura ambiente y refrigerado), identificando los compuestos volátiles presentes en el material y con propiedades antifúngicas mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplado a cromatografía de gases (GC/MS). Para conseguir este objetivo principal, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- i. Análisis de muestras del nuevo material (papel) mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) con detección mediante cromatografía de gases (GC/MS), transcurridos 3, 10, 17, 24, 31 y 38 días desde su preparación.
- ii. Determinación del perfil de compuestos volátiles, principalmente terpenos con características antifúngicas, que presentan las diferentes preparaciones de muestra, en las condiciones adecuadas para simular el contacto con alimentos.
- iii. Comparación de los resultados obtenidos con los ensayos llevados a cabo frente a microorganismos (in vitro) y con alimentos reales (in vivo).



### 3. Metodología

#### 3.1. Descripción de las muestras de material para envase activo

Para la realización de este TFG se ha trabajado únicamente con dos tipos de muestras del nuevo material, resultado de estudios previos llevados a cabo en el grupo de investigación. Las muestras a estudiar son dos tipos de láminas de papel recubiertas por una emulsión, que contiene una mezcla de aceites esenciales, almacenadas a temperatura ambiente o en refrigeración (entre 6 – 8 °C, como en el frigorífico de casa). La composición de los dos tipos de papeles recubiertos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición emulsiones que recubren cada lámina de papel.

Código	Tipo de almidón	Composición
1.8T	HI-CAT	82% almidón (8% w/w) + 10% Tween 80 + 8% AEs (orégano y canela hojas)
Control 1.8T		90% almidón (8% w/w) + 10% Tween 80
2.6T	EVO 280	84% almidón (10% w/w) + 10% Tween 80 + 6% AEs (orégano y canela hojas)
Control 2.6T		90% almidón (10% w/w) + 10% Tween 80

*Tween 80: surfactante que facilita el recubrimiento del papel; AEs: aceites esenciales.*

##### 3.1.1. Preparación de los papeles recubiertos

Para llevar a cabo el recubrimiento de las muestras a estudiar (tiras de 10 × 13 cm), se añaden 4 – 5 mL de emulsión sobre el papel correspondiente, resultando un espesor húmedo de recubrimiento aplicado de 120 µm. A continuación, se coloca la lámina de papel en una extendedora y se hace pasar la emulsión rápidamente. Una vez recubiertas las láminas, se dejaron secar a temperatura ambiente las del experimento a esa temperatura y las otras muestras se guardaron a temperatura de refrigeración, todas ellas en bolsas Zip cerradas.

##### 3.1.2. Diseño de los experimentos

El diseño de experimentos se llevó a cabo de la siguiente manera; de cada tipo de papel (1.8T y 2.6T) se prepararon tres réplicas diferentes (6 muestras) junto con tres réplicas de los papeles control (control 1.8T y control 2.6T) de cada una de las muestras (6 controles) y se almacenaron a dos temperaturas, para analizar cada 7 días. En concreto, los días de análisis fueron: a los 3, 10, 17, 24, 31 y 38 días, desde su preparación. Por lo que, las tandas de análisis semanales comprendían (6 + 6) muestras x 2 temperaturas + blancos de análisis, un total de 32 muestras.

La selección de las fechas de análisis, de los compuestos volátiles presentes en las muestras de papel recubierto, corresponden a los mismos tiempos de análisis en los que anteriormente se realizaron las pruebas “in vitro” frente al hongo *Botrytis cinerea*.

### 3.2. Análisis de las muestras mediante microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplado a cromatografía de gases (GC-MS)

Para el análisis de las muestras de papel recubierto mediante HS-SPME-GC/MS, éstas se cortaron en cuadrados de un tamaño de 1 cm × 1 cm y se guardaron en placas Petri correctamente clasificadas hasta su análisis. Para el análisis, se pesó en balanza analítica, una cantidad de papel de 0,0200 g ± 0,0001 y se introdujo en un vial de 20 mL.

Para la determinación de los compuestos volátiles presentes en las muestras de papel recubierto, se utilizó como método de análisis la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a la cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS). Como ya se ha comentado anteriormente, en cada tanda de análisis realizada cada 7 días, se analizaron 32 muestras incluidos papeles recubiertos con y sin aceites esenciales y blancos. Las condiciones de trabajo (HS-SPME-GC/MS) en las que se trabajó se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones instrumentales análisis mediante HS-SPME-GC/MS.

Módulo HS-SPME	Equipo GC/MS
Fibra SPME: (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm	Columna capilar: HP-5
Tiempo de incubación: 2 min	Horno: 50 °C 5 min, 5 °C/min hasta 100 °C y 10 °C/min hasta 300 °C y mantener 2 min
Temperatura de extracción: 60 °C	Solvent delay 5 min
Tiempo de extracción: 15 min	Modo SCAN: m/z de 45 a 400
Tiempo de desorción: 2 min	

#### 3.2.1. Identificación de compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC/MS

Una vez analizadas las muestras mediante HS-SPME-GC/MS, lo siguiente consistió en llevar a cabo la identificación de los compuestos volátiles presentes. Para la identificación de los compuestos volátiles detectados se llevó a cabo una primera búsqueda por comparación con la biblioteca NIST Chemistry WebBook de espectros (m/z) del equipo GC-MS. Se identificaron todos aquellos compuestos con un match > 80%. Para corroborar la identificación correcta de los compuestos, primero se inyectó una disolución multipatrón con todos los patrones analíticos de los que se disponía en el laboratorio: alfa-terpineno, alfa-terpineol, alcohol bencílico, bencil benzoato, beta-cariofileno, beta-mirceno, carvacrol, D-(+)-canfor, endo-borneol, eugenol, 3-fenil propanol, gamma-terpineno, alfa-humuleno, linalol, metil

eugenol y terpinen-4-ol. A continuación, se inyectó una disolución de alcanos (de C9 a C20) para el cálculo de los índices de Kovats.

El índice de Kovats es un método de cálculo de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, de forma que ayuda a identificar positivamente los componentes de una mezcla (Kovats, 1958). El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, y el número de átomos de carbono en una molécula. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos. Para la cromatografía isotérmica, el índice de Kovats viene dado por la ecuación. Para una cromatografía de gradiente, el índice de Kovats está dado por la ecuación:

$$I = \left[ \frac{t_{R(\text{desconocido})} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right] \times (100 \times z) + (100 \times n)$$

Donde  $I$  es el *índice de retención de Kovats*,  $n$  es el número de átomos de carbono en el alcano anterior más pequeño,  $N$  es el número de átomos del alcano posterior,  $z$  es la diferencia de átomos entre alcano anterior y posterior, y por último  $t_R$  es el tiempo de retención.

### 3.3. Actividad antifúngica de los papeles recubiertos frente al hongo *Botrytis cinerea*

Dentro del proyecto TED2021-129138B-C21, en el laboratorio de microbiología que tiene el grupo GUIA (Grupo Universitario de Investigación Analítica) de la Universidad de Zaragoza, se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de la eficacia antifúngica en fase vapor de los papeles recubiertos seleccionados, papel 1.8T y papel 2.6T, frente al hongo *Botrytis cinerea*. Dado que los resultados de estos ensayos se van a comparar con los obtenidos del análisis de los compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC/MS, a continuación, se va a describir brevemente la metodología seguida.

Los dos papeles recubiertos se prepararon, secaron al aire a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas individuales tipo Zip a las dos temperaturas de estudio. La evaluación de la actividad antifúngica se realizó a los 3, 10, 17, 24 y 31 días. Para ello, se cortaron muestras de papel (1 cm x 1 cm), tres réplicas, y se colocaron en el centro de la tapa de placas de SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) previamente inoculadas con  $10^6$  CFU/mL de *Botrytis cinerea*. Las pacas de incubaron a 25 °C durante 7 días, al final de los cuales se visualizó la presencia/ausencia de crecimiento fúngico.



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Identificación de los compuestos volátiles mediante HS-SPME-GC/MS

Tras el análisis de los papeles, mediante HS-SPME-GC/MS, se llevó a cabo la identificación de los compuestos volátiles de interés, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. La Tabla 3 muestra todos los compuestos volátiles identificados tras su búsqueda en la biblioteca de espectros (NIST) del equipo GC/MS, la comparación con los tiempos de retención y espectros (m/z) de los patrones de los que se disponía en el laboratorio y, por último, los índices de retención (Kovats index = KI) calculados frente a los teóricos.

Tabla 3. Lista de compuestos volátiles identificados mediante HS-SPME-GC/MS.

tR (min)	compuesto	Nº CAS	KI <sub>calculado</sub>	KI <sub>tablas</sub>	Propiedades microbiológicas
9,43	benzaldehído	100-52-7	<b>960</b>	962±3	-
10,16	1-octen-3-ol	3391-86-4	<b>980</b>	980±2	"mushroom alcohol"
10,59	beta-mirceno*	123-35-3	<b>992</b>	991±2	Monoterpeno. Analgésico, antiinflamatorio, antibiótico...
10,74	3-octanol	589-98-0	<b>996</b>	994±3	-
11,42	alfa-terpineno*	99-86-5	<b>1016</b>	1017±2	Monoterpeno. Antioxidante y antifúngico
11,70	p-cimeno	99-87-6	<b>1024</b>	1025±2	-
11,84	beta-felandreno	555-10-2	<b>1029</b>	1031±2	Aditivo de aceites esenciales. Antioxidante y antifúngico
11,92	1,8-cineol	470-82-6	<b>1031</b>	1030±3	Monoterpeno. Insecticida y repelente de insectos
12,05	alcohol bencílico*	100-51-6	<b>1031</b>	1032±2	Antibacteriano y antifúngico
12,88	gamma-terpineno*	99-85-4	<b>1035</b>	1036±4	Monoterpeno. Antioxidante vía oral
13,16	cis-sabineno hidrato	15537-55-0	<b>1059</b>	1060±3	-
13,36	linalol oxido	5989-33-3	<b>1073</b>	1074±4	Componente aceites perfume y/o aromas
13,90	trans-linalol oxido	34995-77-2	<b>1089</b>	1086±5	Familia de los oxolanos
14,37	linalol*	78-70-6	<b>1104</b>	1099±2	Monoterpeno acíclico. Agente antimicrobiano
14,41	nonanal	124-19-6	<b>1105</b>	1104±2	-
14,96	cis-para-menth-2-en-1-ol	29803-82-5	<b>1125</b>	1122±3	-
15,62	D-(+)-canfor*	464-49-3	<b>1149</b>	1143±9	Usos medicinales
16,26	endo-borneol*	507-70-0	<b>1171</b>	1167±2	Monoterpeno alcohólico. Antioxidante y antiviral
16,52	terpinen-4-ol*	562-74-3	<b>1181</b>	1177±2	Monoterpeno. Bactericida, antifúngico y antiinflamatorio
16,86	alfa-terpineol*	98-55-5	<b>1193</b>	1189±2	Fuerte antimicrobiano. Antifúngico
18,00	metil carvacrol	6379-73-3	<b>1247</b>	1244±2	Antibacteriano
18,14	3-fenilpropanol*		<b>1254</b>	1232±7	<b>Mal identificado</b>
18,92	safrol	94-59-7	<b>1293</b>	1287±2	Fenilpropanoide. Insecticida
19,25	carvacrol*	499-75-2	<b>1302</b>	1299±2	Responsable olor orégano. Fenilmonoterpenoide. Antioxidante, antibacteriano, antifúngico
20,35	eugenol*	97-53-0	<b>1351</b>	1357±3	Antibacteriano, antifúngico y antioxidante
20,84	metil eugenol*	93-15-2	<b>1413</b>	1402±3	Antifúngico

20,94	o-alilguaiacol	579-60-2	<b>1420</b>	1429±17	-
21,15	beta-cariofileno*	87-44-5	<b>1429</b>	1419±3	-
21,28	10,10-dimetil-2,6-dimetilene biciclo [7.2.0]undecano	357414-37-0	<b>1444</b>	1440	-
21,43	acetato de cinamilo	103-54-8	<b>1455</b>	1445±5	Nuevo agente antibacteriano de amplio espectro
21,51	trans-iso Eugenol	5932-68-3	<b>1461</b>	1454±6	-
21,61	alfa-humuleno*	6753-98-6	<b>1468</b>	1454±3	Antiinflamatorio
21,68	2,6-di-tert-butilquinona	719-22-2	<b>1473</b>	1471±5	Contaminación cruzada
21,88	6-metoxi-3-metil benzofurano	29040-52-6	<b>1488</b>	-	Antifúngico
22,26	beta-bisaboleno	495-61-4	<b>1516</b>	1509±3	Sesquiterpeno
22,39	gamma-cadineno	39029-41-9	<b>1526</b>	1513±2	-
22,50	eugenol acetato	93-28-7	<b>1535</b>	1524±2	Antimicrobiano y antioxidante
22,60	vainillil metil cetona	2503-46-0	<b>1543</b>	1544±5	-
23,23	espatulenol	6750-60-3	<b>1573</b>	1576±2	Sesquiterpeno. Antimicrobiano y antioxidante
23,31	(-)-cariofileno oxide	1139-30-6	<b>1580</b>	1581±2	Analgésico y antiinflamatorio
23,62	humuleno-1,2-epóxido	19888-34-7	<b>1626</b>	1606±2	Mal identificado
23,81	cubenol	21284-22-0	<b>1643</b>	1642±3	-
23,92	10,10-dimetil-2,6-dimetilenebiciclo[7.2.0]undecano-5β-ol	19431-80-2	<b>1652</b>	1644	-
24,15	isoaromadendreno epóxido	-	<b>1672</b>	1589±10	Mal identificado
25,32	bencil benzoato*	120-51-4	<b>1778</b>	1772±4	Antisarna, acaricida y fungicida activo por vía oral
25,72	2-etilhexil salicilato	118-60-5	<b>1815</b>	1811±5	Contaminación cruzada
26,05	laurato de isoamilo	6309-51-9	<b>1847</b>	1846±2	-
26,28	galaxolide	1222-05-5	<b>1870</b>	1851	Mal identificado

\*Compuestos identificados con el correspondiente patrón analítico.

Se identificaron 48 compuestos volátiles, de los cuales se descartaron seis, cuatro de ellos: el 3-fenilpropanol, humuleno-1,2-epóxido, isoaromadendreno epóxido y galaxolide por estar mal identificados, y los dos restantes: el 2,6-di-tert-butilquinona y 2-etilhexil salicilato por considerarse contaminación cruzada del laboratorio. Con respecto a la disolución multipatrón que se analizó, se confirmó la identificación correcta de los compuestos patrón en las muestras analizadas, salvo el caso ya mencionado del 3-fenilpropanol que se identificaba a un tiempo diferente (17,73 min).

En las Figuras 1a y 1b se muestran las comparaciones de los cromatogramas obtenidos para ambas muestras de papel recubierto. Se puede apreciar que el perfil cromatográfico es muy similar, dado que la composición de ambos papeles también lo es (8% y 6% de la misma mezcla de aceites esenciales).

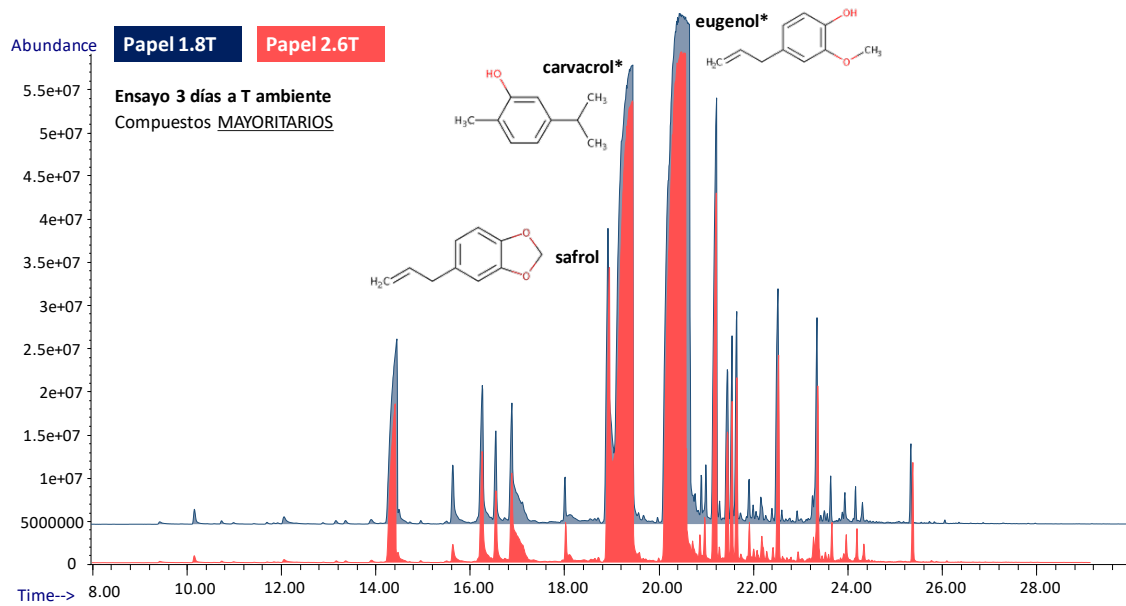


Figura 1a. Cromatogramas papel 1.8T y 2.6T tras ensayo 3 días a T ambiente. Mayoritarios.

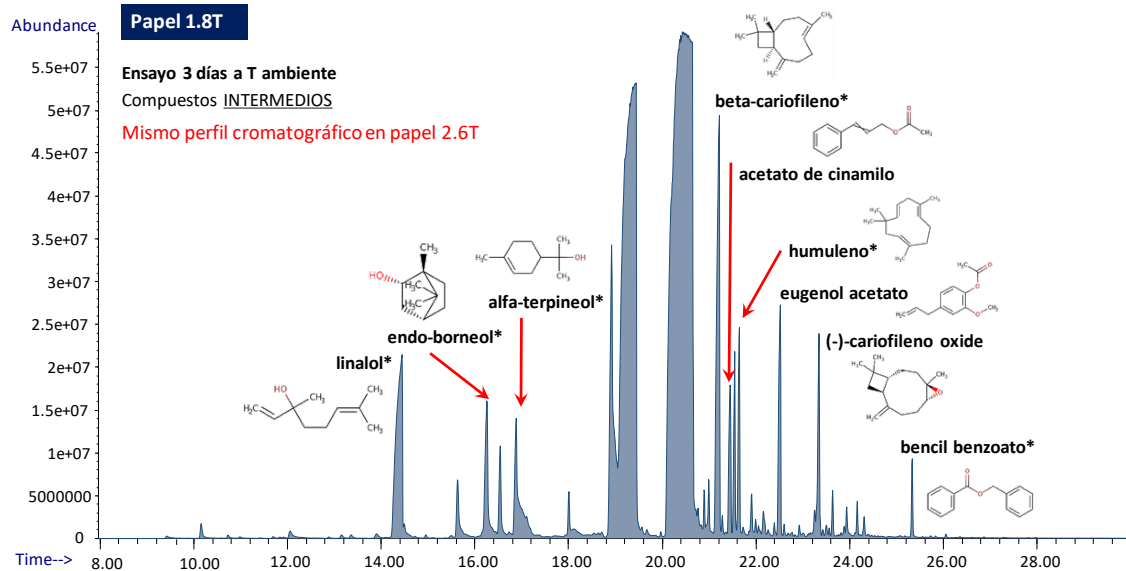


Figura 1b. Cromatograma papel 1.8T tras ensayo 3 días a T ambiente. Intermedios.

Dado el alto número de compuestos identificados y con idea de poder relacionar su presencia con la eficacia fungicida frente a *Botrytis cinerea*, se llevó a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de buscar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto volátil identificado frente al hongo *Botrytis cinerea*. Se trata de la “*mínima concentración del agente antifúngico que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa fúngica dada*” (Cavaliere, 2005). Se encontró bibliografía con datos de MIC para algunos compuestos de manera individual, frente a *Botrytis cinerea* u otros hongos, y para aceites esenciales donde al menos 1/3 de su composición (% área) lo conforma un compuesto volátil estudiado en las muestras de papel y en los aceites esenciales empleados. En la Tabla 4 se muestra la revisión bibliográfica realizada.

Tabla 4. Resumen revisión bibliográfica sobre concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos volátiles identificados.

Compuestos identificados en los papeles CON actividad encontrada en bibliografía					
compuesto	Nº CAS	Actividad/microorganismo	MIC	Referencia	Comentarios
3-octanol	589-98-0	Antifúngico/ <i>Botrytis cinerea</i>	0,015 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112525">https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2023.112525</a>	Antifúngico tanto in vitro como in vivo. Sugieren 3-octanol induce autofagia, reduce viabilidad celular, suprime germinación e inhibe desarrollo de <i>B. cinerea</i> en la fruta poscosecha
alfa-terpineol	98-55-5	Antibacteriano/ <i>Penicillium d.</i>	2 - 8 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1186/s40529-015-0116-4">https://doi.org/10.1186/s40529-015-0116-4</a>	Puede afectar síntesis pared celular y provocar su ruptura. Sugieren que tratamiento con alfa-terpineol inhibe crecimiento <i>Penicillium d.</i>
carvacrol	499-75-2	Antifúngico/ <i>Botrytis cinerea</i>	0,12 – 0,14 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0">https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0</a>	Timol y carvacrol reprimen crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> . Antifúngicos prometedores para controlar patógenos del tomate después de la cosecha
o-alilguaiacol	579-60-2	Antibacteriano/ <i>Staphylococcus a.</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Listeria i.</i> ; <i>Pseudomonas a.</i> ; <i>Salmonella e.</i> y <i>Bacillus c.</i>	≤ 220 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04418">https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04418</a>	La mayoría de los compuestos ensayados presentaron valores de MIC ≤ 220 µg/mL para todas las bacterias ensayadas
trans-iso Eugenol	5932-68-3	Antifúngico/ <i>Rhizopus s.</i> y <i>Absidia c.</i> Antifúngico/ <i>Fusarium g.</i>	< 400 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.1007/s11356-019-04278-z">https://doi.org/10.1007/s11356-019-04278-z</a> <a href="https://doi.org/10.1007/s42161-021-00875-5">https://doi.org/10.1007/s42161-021-00875-5</a>	-
alfa-humuleno	6753-98-6	Antifúngico/ <i>Cryptococcus n.</i> ; <i>Candida g.</i> y <i>Candida k.</i>	1,5 - 105 µg/mL	2018080607322726-RNP-EO_1407-035 PDF (www.acgpubs.org)	Aíslan fracciones de aceite de Cannabis sativa y prueban con compuesto puro (MIC)
eugenol acetato	93-28-7	Antifúngico/ <i>Candida spp.</i>	0,1 - 0,4 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.012">https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.012</a>	-
(-)-cariofileno oxido	1139-30-6	Antifúngico/ <i>Sclerotinia s.</i> ; <i>Fusarium o.</i> y <i>Alternaria b</i>	125 µg/mL; 62,5 µg/mL y 250 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.3390/microorganisms9010168">https://doi.org/10.3390/microorganisms9010168</a>	-
bencil benzoato	120-51-4	Antifúngico/ <i>Colletotrichum m.</i>	0,5 - 4 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1007/s13197-020-04288-7">https://doi.org/10.1007/s13197-020-04288-7</a>	-

Aceite esencial (AE) con actividad antifúngica en bibliografía en los que al menos 1/3 de su composición lo conforma un compuesto volátil encontrado en los papeles						
compuesto	Nº CAS	Actividad/microorganismo	MIC	Referencia	Comentarios	
beta-mirceno	123-35-3	Antifúngico/ <i>Fusarium o.</i> y <i>Colletotrichum a.</i>	0,140 - 0,154 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.4067/s0718-58392011000100009">https://doi.org/10.4067/s0718-58392011000100009</a>	Aceite esencial de carrubio como alternativa a fungicidas sintéticos para controlar enfermedades fúngicas	
alfa-terpineno	99-86-5	Antifúngico/ <i>Fusarium o.</i>	0,177 µL/mL	<a href="http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1028-47962012000100006&amp;lng=es">http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S1028-47962012000100006&amp;lng=es</a>	Aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> presenta una importante actividad fungicida sobre <i>Fusarium o.</i>	
linalol	78-70-6	Antifúngico/ <i>Epicoccum n.</i> ; <i>Bipolaris s.</i> ; <i>Aspergillus n.</i> ; <i>Aspergillus o.</i> ; <i>Penicillium sp.</i> y <i>Trichoderma v.</i>	0,1 - 2,0 µL/mL y 10 - 100 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.016">https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.016</a>	Aceite esencial orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ). Hongo más susceptible al tratamiento <i>Epicoccum n.</i>	
D-(+)-canfor	464-49-3	Antifúngico/ <i>Colletotrichum g.</i> ; <b><i>Botrytis cinerea</i></b> y <i>Fusarium g.</i>	30 - 38 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.3390/molecules27092695">https://doi.org/10.3390/molecules27092695</a>	Aceite esencial alcanfor ( <i>Cinnamomum camphora</i> ) buena actividad frente hongos fitopatógenos, como <i>Botrytis cinerea</i> . Posible uso potencial como conservante natural frutas/verduras	
endo-borneol	507-70-0	Antifúngico/ <i>Fusarium s.</i>	2000 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104996">https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104996</a>	Aceite esencial alcanfor ( <i>Cinnamomum camphora</i> ) muy potente como agente fungistático seguro y ecológico para el tratamiento de hongos y enfermedades fúngicas causadas por <i>Fusarium spp.</i>	
terpinen-4-ol	562-74-3	Antifúngico/ <i>Aspergillus n.</i>	0,6 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x">https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02059.x</a>	Componentes aceite esencial del árbol del té ( <i>Melaleuca alternifolia</i> ), presentaron actividad antifúngica	
safrol	94-59-7	Antifúngico/ <i>Aspergillus t.</i> ; <i>Aspergillus a.</i> ; <i>Pitiriasis v.</i> ; <i>Penicillium o.</i> ; <i>Sparisoma v.</i> ; <i>Funiculosum f.</i> y <i>Sporotrich s.</i>	25 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1002/ptr.1516">https://doi.org/10.1002/ptr.1516</a>	Aceite esencial sasafrás ( <i>Sassafras albidum</i> ) componente principal safrol. Y aceite esencial de canela mostró la mayor actividad antifúngica	
eugenol	97-53-0	Antifúngico/ <i>Aspergillus f.</i>	0,15 µL/mL	<a href="https://doi.org/10.1007/s12161-010-9177-x">https://doi.org/10.1007/s12161-010-9177-x</a>	Eugenol principal componente aceite esencial laurel ( <i>Cinnamomum tamala</i> )	
acetato cinamilo	103-54-8	Antifúngico/ <i>Trametes v.</i> ; <i>Lenzites b.</i> y <i>Laetiporus s.</i>	150 - 273 µg/mL	<a href="https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.030">https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.030</a>	-	

Una vez revisados los compuestos identificados, y según la bibliografía encontrada para el estudio de la eficacia antifúngica de los papeles recubiertos se seleccionaron los siguientes 18 compuestos: beta-mirceno, 3-octanol, alfa-terpineno, linalol, D-(+)-canfor, endo-borneol, terpinen-4-ol, alfa-terpineol, safrol, carvacrol, eugenol, o-alilguaicol, acetato de cinamilo, trans-isoeugenol, alfa-humuleno, eugenol acetato, (-)-cariofileno oxido y bencil benzoato.

#### 4.2. Resultados análisis de papeles recubiertos mediante HS-SPME-GC/MS

En el análisis de las muestras, para los compuestos seleccionados, se realizó la integración de sus correspondientes picos cromatográficos mediante el programa *Enhanced Data Analysis*, obteniendo un valor de área de cada compuesto identificado, expresado en unidades de área. Dicho procedimiento se llevó a cabo con las tres réplicas de cada una de las dos muestras (papel 1.8T y papel 2.6T) para las dos temperaturas de almacenamiento y los tiempos de ensayo: 3, 10, 17, 24, 31 y 38 días.

Además, se analizaron las muestras correspondientes a los papeles con recubrimiento, pero sin aceites esenciales (control 1.8T y control 2.6T) donde se observó que no aparecía ningún compuesto volátil que también se identificase cuando el recubrimiento tiene aceites esenciales. Por otro lado, se analizaron los blancos de inyección con objeto de eliminar posibles contaminaciones de la fibra SPME tras los análisis de las muestras recubiertas con aceites esenciales.

Con objeto de poder observar la evolución de los compuestos seleccionados en función del tipo de muestra, tiempo transcurrido y temperatura de almacenamiento; dado que algunos de ellos están presentes en altos % y otros en bajos %; se han clasificado en tres grupos: compuestos mayoritarios (áreas del orden  $10^{10}$ ), compuestos intermedios (áreas del orden de  $10^9$ ) y compuestos minoritarios (áreas del orden de  $10^7$ ). En las siguientes Figuras se muestra la comparación de áreas para el papel 1.8T y el papel 2.6T, con sus desviaciones estándar correspondientes, de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente.

## Papel 1.8T

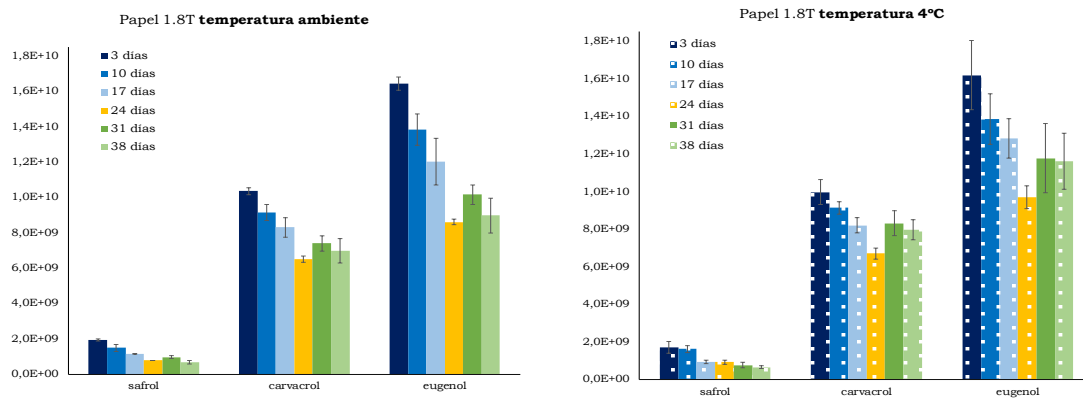


Figura 2. Áreas de compuestos mayoritarios (papel 1.8T) T ambiente y a 6 – 8 °C.

En la Figura 2, se observa que las áreas en las semanas iniciales (3, 10 y 17 días) de los tres compuestos mayoritarios (safrol, carvacrol y eugenol) son muy similares, independientemente de la temperatura de almacenamiento; y que conforme avanza el tiempo, en general, van disminuyendo.

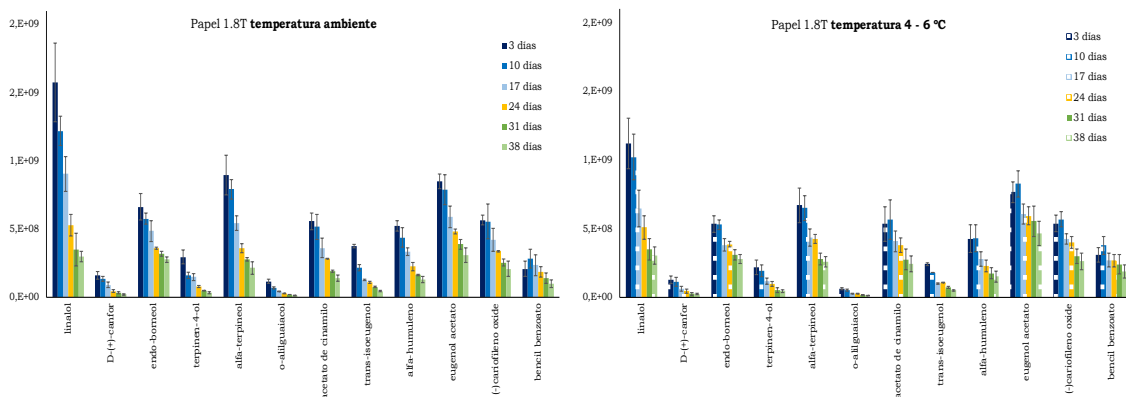


Figura 3. Áreas de compuestos intermedios (papel 1.8T) T ambiente y a 6 – 8 °C.

En la Figura 3 donde se comparan las áreas de los compuestos intermedios (linalol, D-(+)-canfor, endo-borneol, terpinen-4-ol, alfa-terpineol, o-alilguaicol, acetato de cinamilo, trans-isoeugenol, alfa-humuleno, eugenol acetato, (-)-cariofileno oxide y bencil benzoato) se observan también valores muy similares en los resultados a las dos temperaturas de almacenamiento; y se ve claramente que con el tiempo los valores van disminuyendo; apreciándose que las tres primeras semanas (3, 10 y 17 días) la disminución del área es más apreciable que a lo largo del resto de semanas (24, 31 y 38 días), donde es mucho más “suave” la disminución.

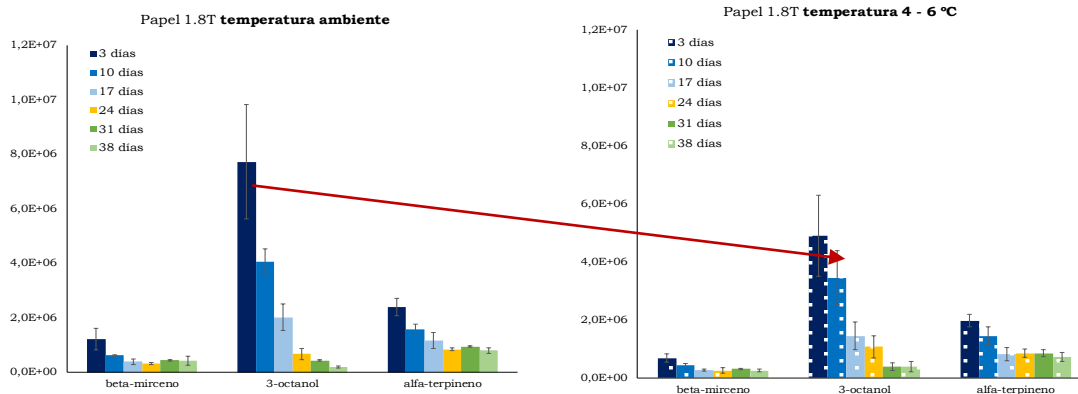


Figura 4. Áreas de compuestos minoritarios (papel 1.8T) T ambiente y a 6 – 8 °C.

En la Figura 4, se observa que, en el caso de los compuestos minoritarios, el 3-octanol muestra una cantidad inicial (3 días) mayor cuando se almacena a temperatura ambiente que cuando se hace refrigerado; y para el caso del beta-mirceno y alfa-terpineno a 3 días también se observa un área ligeramente mayor a temperatura ambiente, siendo junto con el 3-octanol los compuestos más volátiles identificados. Como en los casos anteriores, conforme pasa el tiempo las áreas van disminuyendo, siendo más apreciable las tres primeras semanas.

**Papel 2.6T**

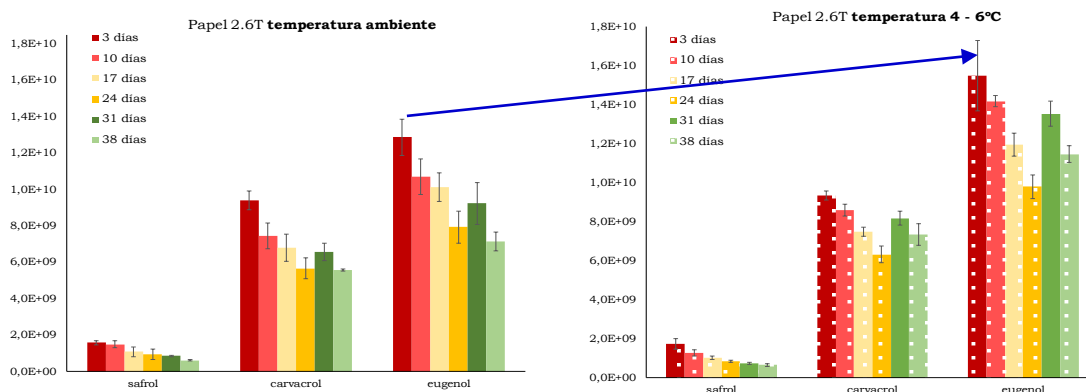


Figura 5. Áreas de compuestos mayoritarios (papel 2.6T) T ambiente y a 6 – 8 °C.

En la Figura 5, se observa que en las semanas iniciales (3, 10 y 17 días) en el caso del eugenol el área es mayor cuando se almacena refrigerado, mientras que en el caso del safrol y carvacrol los valores de área son muy similares a ambas temperaturas. Será interesante ver si con el resto de compuestos sucede algo parecido, dado que el almidón usado para el recubrimiento en el papel 2.6T es diferente, con propiedades distintas, que el del papel 1.8T.

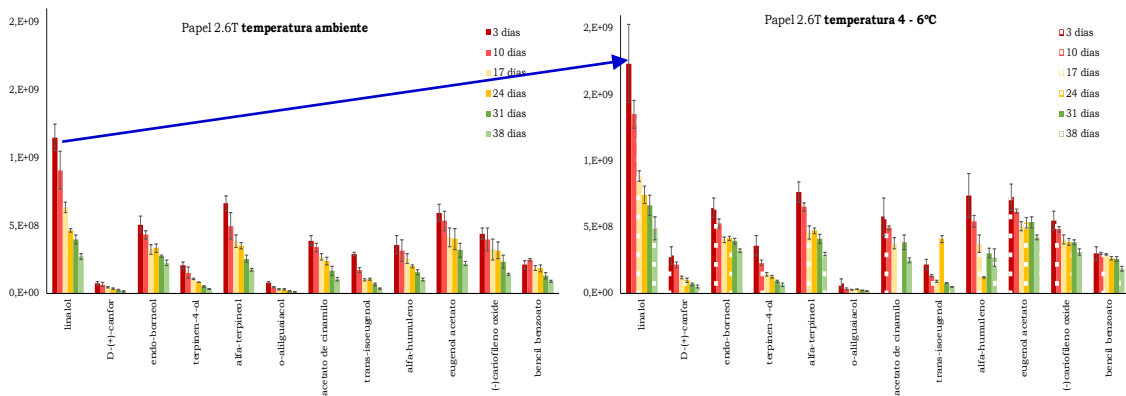


Figura 6. Áreas de compuestos intermedios (papel 2.6T)  $T$  ambiente y a  $6 - 8^{\circ}\text{C}$ .

En la Figura 6, como ya se ha observado anteriormente para el eugenol, las áreas de las semanas iniciales (3, 10 y 17 días) de todos los compuestos, son mayores cuando el papel se almacena refrigerado que cuando se almacena a temperatura ambiente. Una posible explicación a este comportamiento puede estar relacionada con el tipo de almidón utilizado para realizar el recubrimiento de los papeles. Los almidones utilizados tienen las siguientes características:

- Almidón HI-CAT (en papel 1.8T): catiónico, agente de resistencia en seco y para emulsionar agente de encolado ASA (alkenyl succinic anhydride).
- Almidón EVO 280 (en papel 2.6T): térmicamente modificado, buenas propiedades filmógenas y aplicación superficial tanto en papeles especiales como en papeles y cartones estucados.

El almidón EVO 280 tiene buenas propiedades filmógenas, por lo que puede “retener” más el aceite esencial cuando se almacena refrigerado, y por eso cuando luego se calienta para analizar mediante HS-SPME-GC/MS desprende mayor cantidad de compuestos volátiles, ya que no ha “perdido” tanto como cuando se almacena a temperatura ambiente. Lo que indica que, para este caso particular, existe una liberación de la mezcla de los aceites dependiente de la temperatura de almacenamiento.

En las Figuras 7 y 8 se comparan los dos papeles recubiertos a las dos temperaturas de almacenamiento, para ver si se observa este mismo comportamiento. Es importante señalar que el % de aceites esenciales en el papel 1.8T es ligeramente mayor (8%) frente al del papel 2.6T (6%).

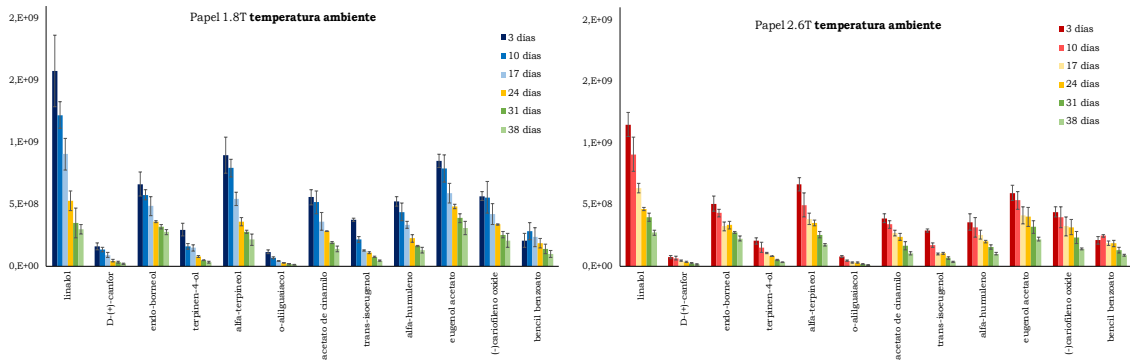


Figura 7. Áreas de compuestos intermedios (papel 1.8T y papel 2.6T) T ambiente.

En el caso de la Figura 7 (T ambiente) se observa que en el papel 1.8T las áreas son ligeramente superiores a las del papel 2.6T, tal y como cabría esperar dado el que es mayor el % de aceites esenciales.

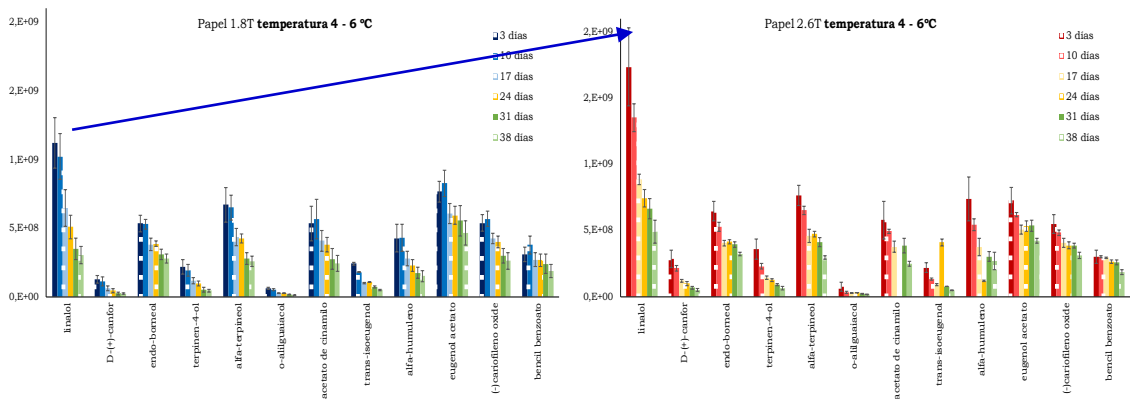


Figura 8. Áreas de compuestos intermedios (papel 1.8T y papel 2.6T) a 6 – 8 °C.

Mientras que en la Figura 8, se observa lo comentado anteriormente; si bien el papel 2.6T tiene menor % de aceites esenciales, cuando se almacena refrigerado “retiene” más los compuestos volátiles, de manera que cuando luego se analizan mediante HS-SPME-GC/MS son mayores las áreas de los compuestos, como en la Figura 6. Estos resultados ponen de manifiesto una mayor efectividad y estabilidad del almidón EVO 280 cuando el papel se almacena refrigerado.

Si se continúa comparando las áreas de los compuestos minoritarios, en el papel 2.6T se observa (Figura 9) el mismo comportamiento que para los compuestos intermedios, y puede estar relacionado con el tipo de almidón utilizado para el recubrimiento. Igual que en los casos anteriores, en las tres primeras semanas la disminución de las áreas es mayor que en las tres últimas semanas.

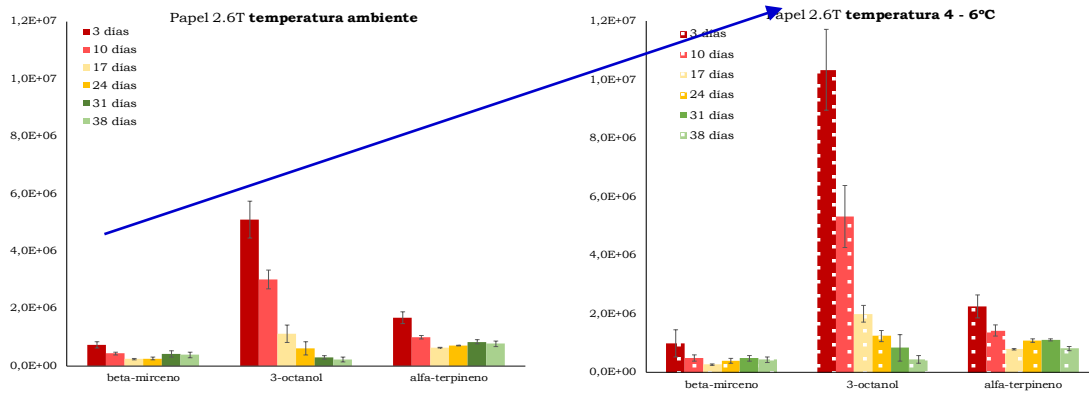


Figura 9. Áreas de compuestos minoritarios (papel 2.6T) T ambiente y a 6 – 8 °C.

### 4.3. Resultados de los ensayos in vitro frente a *Botrytis cinerea*

#### 4.3.1. Actividad antifúngica papeles recubiertos frente a *Botrytis cinerea*

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, los resultados obtenidos de los ensayos “in vitro” frente a *Botrytis cinerea* se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados ensayos actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*.

Papel recubierto 1.8T	
Temperatura ambiente	Inhibición total a los <b>31 días</b>
Temperatura refrigerada	Inhibición total a los <b>31 días</b>
Papel recubierto 2.6T	
Temperatura ambiente	Crecimiento a los <b>24 días</b>
Temperatura refrigerada	Inhibición total a los <b>31 días</b>

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis “in vitro”, se puede ver que el papel recubierto 1.8T funciona frente a *Botrytis cinerea*, transcurrido 1 mes, e independientemente de la temperatura de almacenamiento. En el caso del papel recubierto 2.6T, si se almacena a temperatura ambiente, a los 24 días ya no es eficaz frente a *Botrytis cinerea*, mientras que si se almacena refrigerado sigue siendo eficaz transcurrido 1 mes, como en el caso del papel recubierto 1.8T.

### 4.4. Comparación resultados análisis compuestos volátiles con actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*

Con el objetivo de poder ver si existe una correlación entre los resultados del análisis de los compuestos volátiles presentes en los papeles recubiertos, y la actividad antifúngica de los mismos, se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), con los resultados obtenidos.

#### 4.4.1. Análisis ANOVA para el papel recubierto 1.8T

En el caso del papel recubierto 1.8T los ensayos de actividad antifúngica muestran que, independientemente de la temperatura de almacenamiento, sigue siendo eficaz frente a *Botrytis cinerea* a los 31 días de la preparación del papel recubierto. En los resultados mostrados de la evolución de las áreas de los compuestos volátiles seleccionados (Figuras 2, 3 y 4) ya se había podido apreciar que los resultados, para ambas temperaturas, eran similares.

Para ver si están relacionados los resultados analíticos con la actividad antifúngica, se han comparado los resultados de las áreas de los compuestos seleccionados a los 31 días, a las dos temperaturas, para ver que no hay diferencias significativas, es decir que  $p \geq 0,05$ . En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del ANOVA realizado.

Tabla 6. Resultados análisis ANOVA papel 1.8T (31 días) a temperatura ambiente y refrigerado.

Compuesto	p	Compuesto	p
beta-mirceno	0,0018	carvacrol	0,1191
3-octanol	0,6617	eugenol	0,2228
alfa-terpineno	0,2886	o-alilguaiaicol	0,4232
linalol	0,9997	acetato de cinamilo	0,1290
D-(+)-canfor	0,2850	trans-isoeugenol	0,5762
endo-borneol	0,7019	alfa-humuleno	0,6370
terpinen-4-ol	0,7337	eugenol acetato	0,0677
alfa-terpineol	0,9896	(-)-cariofileno oxido	0,2582
safrol	0,1261	bencil benzoato	0,1017

Los resultados obtenidos muestran que, para todos los compuestos seleccionados, salvo el beta-mirceno, no existen diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en las áreas, a los 31 días, cuando sigue existiendo inhibición total frente a *Botrytis cinerea*, independientemente de la temperatura de almacenamientos. En este caso, la eficacia del papel a los 31 días no depende de la temperatura de almacenamiento. El beta-mirceno es el compuesto más volátil de todos los estudiados, por lo que es normal que pasados 31 días puedan existir diferencias significativas al comparar las áreas tras el almacenamiento a las dos temperaturas. Disminuye en mayor medida cuando se almacena refrigerado, posiblemente debido al tipo del almidón utilizado (HI-CAT), donde su “resistencia en seco” puede estar relacionada con el hecho de que retiene “mejor” los compuestos volátiles cuando se almacena a T ambiente, que cuando lo hace refrigerado, donde existe humedad.

#### 4.4.2. Análisis ANOVA para el papel recubierto 2.6T

En el caso del papel recubierto 2.6T los ensayos de actividad antifúngica muestran que, a los 24 días hay crecimiento de *Botrytis cinerea* cuando se almacena a temperatura ambiente, pero a ese tiempo sigue siendo eficaz (inhibición total) si se almacena refrigerado. Dado que los compuestos volátiles identificados provenientes de los aceites esenciales utilizados están

relacionados con la actividad antifúngica, deberían existir diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar las áreas a los 24 días. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos del ANOVA realizado.

Tabla 7. Resultados análisis ANOVA papel 2.6T (24 días) a temperatura ambiente y refrigerado.

Compuesto	<i>p</i>	Compuesto	<i>p</i>
beta-mirceno	0,074	carvacrol	0,179
3-octanol	0,020	eugenol	0,038
alfa-terpineno	0,001	o-alilguaiacol	0,470
linalol	0,002	acetato de cinamilo	0,001
D-(+)-canfor	0,002	trans-iseoeugenol	0,649
endo-borneol	0,016	alfa-humuleno	0,0001
terpinen-4-ol	0,002	eugenol acetato	0,060
alfa-terpineol	0,002	(-)-cariofileno oxido	0,144
safrol	0,599	bencil benzoato	0,008

Los resultados obtenidos muestran que, para la mayoría (11) de los compuestos seleccionados (3-octanol, alfa-terpineno, linalol, D-(+)-canfor, endo-borneol, terpinen-4-ol, alfa-terpineol, eugenol, acetato de cinamilo, alfa-humuleno y bencil benzoato) existen diferencias significativas en el valor de su área cuando el papel se almacena a distinta temperatura. Para estos compuestos, la eficacia del papel a los 24 días depende de la temperatura de almacenamiento. Por otro lado, existen siete compuestos (beta-mirceno, safrol, carvacrol, o-alilguaiacol, trans-iseoeugenol, eugenol acetato y (-)-cariofileno oxide), donde no existen diferencias significativas en el valor de su área cuando el papel se almacena a distinta temperatura. Para estos compuestos, la eficacia a los 24 días no depende de la temperatura.

Es importante destacar que la eficacia de los aceites esenciales frente a crecimiento de hongos y bacterias es una suma de la actividad de todos los compuestos presentes en el aceite esencial, con un efecto claramente sinérgico; con lo que no se puede establecer que únicamente los compuestos volátiles que muestran diferencias significativas sean los responsables directos de la actividad antifúngica del papel recubierto.

Además, en los resultados del análisis ANOVA se puede observar, que dos de los tres compuestos mayoritarios, con actividad antifúngica muy conocida, como son el safrol y el carvacrol no muestran diferencias significativas entre los 24 y 31 días; lo cual resulta muy extraño. Estos resultados, junto con los obtenidos del análisis HS-SPME-GC/MS (Figuras 2 y 5) donde se puede ver que las áreas de safrol, carvacrol y eugenol a los 31 y 38 días aumentan ligeramente (en ambos papeles y a las dos temperaturas), en lugar de seguir disminuyendo como el resto de compuestos volátiles, pusieron de manifiesto algo que ya se sospechaba conforme se realizaba el estudio. Es posible que el safrol, carvacrol y eugenol estén

“saturando” la fibra SPME y la retención de los mismos no es la correcta ni cuantitativa, obteniendo unos resultados “dudosos”.

La posibilidad de disminuir la cantidad de papel a analizar, para que estos compuestos estuviesen en menor concentración, y por tanto no saturasen la fibra SPME fue inviable dada la, ya de por sí, pequeña cantidad de muestra de papel utilizada (0,02 g) y la posibilidad de seguir saturando la fibra y dejar de identificar el resto de compuestos volátiles de interés y que no son mayoritarios. Es por ello, que el siguiente paso que se va a hacer en este estudio, es analizar los papeles recubiertos únicamente mediante HS-GC/MS sin microextracción, con objeto de identificar únicamente los tres compuestos mayoritarios, y poder establecer de manera correcta su evolución en el recubrimiento a lo largo del periodo de estudio, así como aprovechar para ampliar el tiempo en los ensayos “in vitro” hasta crecimiento del hongo estudiado.

## 5. Conclusiones

En este Trabajo Fin de Grado, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- i. Tras el análisis de los papeles recubiertos mediante HS-SPME-GC/MS, de acuerdo con los experimentos realizados, se seleccionaron 18 compuestos volátiles de interés. Se llevó a cabo una revisión bibliográfica, en función su carácter antifúngico, de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto o del aceite esencial que lo contiene en una gran cantidad (más de 1/3 de su composición).
- ii. El análisis de los papeles 1.8T, tal y como se esperaba, muestra que los valores van disminuyendo conforme pasa el tiempo desde su preparación, a las distintas temperaturas de almacenamiento. Se observa que en las tres primeras semanas (3, 10 y 17 días) la disminución es más apreciable que el resto de semanas (24, 31 y 38 días). Los ensayos de actividad antifúngica para este papel 1.8T muestran que, independientemente de la temperatura de almacenamiento, sigue siendo eficaz frente a *Botrytis cinerea* a los 31 días de la preparación.
- iii. El análisis ANOVA realizado para el papel 1.8T, muestra que la eficacia del papel a los 31 días no depende de la temperatura de almacenamiento. De los 18 compuestos estudiados, únicamente el beta-mirceno muestra diferencias significativas entre ambas temperaturas de almacenamiento.
- iv. El análisis de los papeles 2.6T, al igual que para el papel 1.8T, muestra que los valores van disminuyendo conforme pasa el tiempo desde su preparación, a las distintas temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, en este caso se observa que cuando el papel se almacena refrigerado, los valores de las semanas iniciales (3, 10 y 17 días) de todos los compuestos, son mayores que cuando se almacena a temperatura ambiente. El almidón EVO 280 con el que se ha preparado la emulsión de este papel tiene buenas propiedades filmógenas, por lo que puede “retener” más el aceite esencial cuando se almacena refrigerado, y por eso cuando luego se calienta para analizar mediante HS-SPME-GC/MS desprende mayor cantidad de compuestos volátiles, ya que no ha “perdido” tanto como cuando se almacena a temperatura ambiente.
- v. Los ensayos de actividad antifúngica para este papel 2.6T muestran que, en este caso sí que influye la temperatura de almacenamiento, dado que es eficaz frente a *Botrytis cinerea* a los 24 días si se almacena a temperatura ambiente, pero se alcanzan los 31 días de eficacia si se almacena refrigerado.
- vi. En el análisis ANOVA realizado para el papel 2.8T los resultados obtenidos muestran que, para la mayoría (11) de los compuestos seleccionados (3-octanol, alfa-terpineno, linalol,

D-(+)-canfor, endo-borneol, terpinen-4-ol, alfa-terpineol, eugenol, acetato de cinamilo, alfa-humuleno y bencil benzoato) existen diferencias significativas según la temperatura de almacenamiento. Si bien, existen siete compuestos (beta-mirceno, safrol, carvacrol, o-alilguaiacol, trans-isoeugenol, eugenol acetato y (-)-cariofileno oxide), donde no existen diferencias significativas. Para estos compuestos, la eficacia a los 24 días no depende de la temperatura.

- vii. Por último, los resultados del análisis HS-SPME-GC/MS como del análisis ANOVA realizado, para los tres compuestos mayoritarios: safrol, carvacrol y eugenol muestran resultados “anómalos” aumentando ligeramente a los 31 y 38 días (en ambos papeles y a las dos temperaturas), en lugar de seguir disminuyendo como el resto de compuestos volátiles. Es posible que el safrol, carvacrol y eugenol estén “saturando” la fibra SPME y la retención de los mismos no es la correcta ni cuantitativa, obteniendo unos resultados “dudosos”. Se va a continuar el estudio de estos compuestos en otras condiciones que permitan el correcto análisis de su evolución en los papeles estudiados.

## Conclusions

In this Final Degree Project, the following conclusions have been reached:

i. After analysis of the coated papers by HS-SPME-GC/MS, 18 volatile compounds of interest were selected according to the experiments carried out. A literature review was carried out, according to their antifungal character, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each compound or the essential oil containing it in a large amount (more than 1/3 of its composition).

ii. The analysis of the 1.8T papers, as expected, shows that the values decrease as time passes since their preparation, at different storage temperatures. It is observed that in the first three weeks (3, 10 and 17 days) the decrease is more appreciable than in the remaining weeks (24, 31 and 38 days). The antifungal activity tests for this 1.8T paper show that, regardless of the storage temperature, it is still effective against *Botrytis cinerea* 31 days after preparation.

iii. The ANOVA analysis performed for the 1.8T paper shows that the efficacy of the paper at 31 days does not depend on the storage temperature. Of the 18 compounds studied, only beta-myrcene shows significant differences between the two storage temperatures.

iv. The analysis of the 2.6T paper, as for the 1.8T paper, shows that the values decrease as time passes since its preparation, at different storage temperatures. However, in this case it is observed that when the paper is stored refrigerated, the values for the initial weeks (3, 10 and 17 days) of all the compounds are higher than when stored at room temperature. The EVO 280 starch with which the emulsion of this paper has been prepared has good filmogenic properties, so it can 'retain' more of the essential oil when stored refrigerated, and that is why when it is then heated for analysis by HS-SPME-GC/MS it gives off more volatile compounds, since it has not 'lost' as much as when stored at room temperature.

v. The antifungal activity tests for this 2.6T paper show that, in this case, the storage temperature does have an influence, since it is effective against *Botrytis cinerea* after 24 days if stored at room temperature, but it is effective for 31 days if stored refrigerated.

vi. In the ANOVA analysis performed for the 2.8T paper, the results obtained show that for most (11) of the selected compounds (3-octanol, alpha-terpinene, linalool, D-(+)-canfor, endo-borneol, terpinen-4-ol, alpha-terpineol, eugenol, cinnamyl acetate, alpha-humulene and benzyl benzoate) there are significant differences according to storage temperature. However, there are seven compounds (beta-myrcene, safrole, carvacrol, o-allylguaiacol, trans-isoeugenol, eugenol acetate and (-)-caryophyllene oxide), where there are no significant differences. For these compounds, efficacy at 24 days is not temperature-dependent.

vii. Finally, the results of the HS-SPME-GC/MS analysis as well as the ANOVA analysis performed, for the three major compounds: safrole, carvacrol and eugenol show 'anomalous' results, increasing slightly at 31 and 38 days (in both papers and at both temperatures), instead of continuing to decrease like the rest of the volatile compounds. It is possible that safrole, carvacrol and eugenol are 'saturating' the SPME fibre and their retention is neither correct nor quantitative, obtaining 'doubtful' results. The study of these compounds will continue under other conditions that will allow the correct analysis of their evolution in the studied papers.

## 6. Valoración personal

La realización de este Trabajo Fin de Grado me ha permitido aplicar los conocimientos adquiridos en este grado, en relación con la asignatura de Química Analítica.

La elaboración de este trabajo de tipo experimental ha implicado la dedicación de muchas horas al trabajo en el laboratorio, por lo que, considero que ha mejorado mi autonomía y habilidades en la preparación y manipulación de muestras, y en la utilización del cromatógrafo. Por otro lado, este trabajo me ha aportado una mayor experiencia en el diseño y optimización de experimentos, y especialmente, en el análisis y tratamiento de datos. También, he aprendido de otros aspectos importantes como la gestión del tiempo y el proceso de trabajo en equipo con otras partes del grupo Universitario de Investigación de Química Analítica (GUIA). Además, me ha dado la oportunidad de conocer el desarrollo y el inmenso trabajo y tiempo que conlleva este tipo de proyectos de investigación.

En general, mi valoración ha sido positiva en lo personal y en lo profesional. También, quiero agradecer a mi tutora Esther Asensio por el apoyo y enseñarme otro enfoque más analítico en el campo de la ciencia y tecnología de los alimentos. Por otra parte, agradezco al proyecto TED2021-129138B-C21: Desarrollo de nuevas soluciones ecológicas y sostenibles de envases activos para fruta fresca (EcoFruitPack), de la Agencia Estatal de Investigación, en especial a Filomena Silva, Laura Aguerri y Marinelly Quintero, personal del laboratorio de microbiología del grupo GUIA ubicado en el I3A.



## 7. Bibliografía

- Adelakun, E., Oyelade, J.O., Olanipekun, B.F. & Adelakun, Y. (2016). "Use of essential oils in food preservation". In book: *Essential Oils in Food Preservation, Flavour and Safety*. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00007-9
- Ahmad A.; Elisha I.L.; van Vuuren S. & Viljoen A. (2021). "Volatile phenolics: A comprehensive review of the anti-infective properties of an important class of essential oil constituents". *Phytochemistry*, 190, 112864. DOI: 10.1016/j.phytochem.2021.112864
- Anfossi, L., Giovannoli, C. & Baggiani, C. (2016). "Mycotoxin detection". *Current Opinion in Biotechnology*, 37:120-126. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.11.005
- Barea-Ramos, J.D., Rodríguez, M.J., Calvo, P., Melendez, F., Lozano, F. & Martín-Vertedor, D. (2024). "Inhibition of *Botrytis cinerea* in tomatoes by allyl-isothiocyanate release from black mustard (*Brassica nigra*) seeds and detection by E-nose". *Food Chemistry*, Volume 432, 137222. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137222
- Bedoya-Serna, C.M., Dacanal, G. C., Fernandes, A. M. & Pinho, S.C. (2018). "Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (*Origanum vulgare*) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese". *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 49(4), pages 929-935. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.05.004
- Bu, S., Munir, P., He, Y., Li, Y., Wu, X., Li, B., Kong, P. y He, Y. (2021). "Bacillus subtilis L1–21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*". *Biological Control*, Volume 157, 104568. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104568
- Cavaliere, S. J. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano. *Disponible en: <https://www3.paho.org/spanish/ad/ths/ev/05.pdf>* [Consultado 14-05-2024].
- Ceballos-Toro, V. & Londoño-Giraldo, L.M. (2017). "Aceites esenciales en la conservación de alimentos". *Microciencia*. DOI: 10.18041/2323-0320/MICROCIENCIA.0.2017.3659
- Combrinck, S., Regnier, T. & Pougoue-Kamatou, G.P. (2011). "In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit". *Industrial Crops and Products*, Volume 33(2), pages 344-349. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.11.011
- Chu, Y., Chengcheng, G., Liu, X., Zhang, N., Tian, X., Feng, X., Yang, Y., Shen, X. & Tang, X. (2020). "Improvement of storage quality of strawberries by pullulan coatings incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsion". *LWT*, Volume 122(7), 109054. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109054

- Dittmann, B., Schmid, P. & Kemmer, D. (2022). "Role of food contact materials in the safety assessment of potentially hazardous substances and in the dietary exposure of infants". *Global Pediatrics*, Volume 2, 100013. DOI: 10.1016/j.gped.2022.100013
- Ebrahimzadeh, S., Biswas, D., Roy, S. & McClements, D.J. (2023). "Incorporation of essential oils in edible seaweed-based films: A comprehensive review". *Trends in Food Science & Technology*, Volume 135, Pages 43-56. DOI: 10.1016/j.tifs.2023.03.015
- Gaikwad, K.K., Singh, S. & Lee, Y.S. (2018). "Oxygen scavenging films in food packaging". *Environmental Chemistry Letters*, Volume 16(2), Pages 523-538. DOI: 10.1007/s10311-018-0705-z
- Gaikwad, K.K., Singh, S. & Lee, Y.S. (2019). "Antimicrobial and improved barrier properties of natural phenolic compound-coated polymeric films for active packaging applications". *Journal of Coatings Technology and Research*, Volume 16(1), Pages 147-157. DOI: 10.1007/s11998-018-0109-9
- Gaikwad, K.K., Singh, S. & Negi, Y.S. (2020). "Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce". *Environmental Chemistry Letters*, Volume 18(2), Pages 269-284. DOI: 10.1007/s10311-019-00938-1
- Guzinska, K., Owczarek, M. & Dymel, M. (2012). "Investigation in the microbiological purity of paper and board packaging intended for contact with food". *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, Volume 96(6), Pages 186-190. [Consultado 23-04-2024].
- Janjarasskul, T. & Suppakul, P. (2018). "Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 58(5), Pages 808-831. DOI: 10.1080/10408398.2016.1225278
- Kovats, E. "Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone". *Helvetica Chimica Acta*, Volume 41: 1915-32, 1958. [Consultado 7-05-2024].
- Meng, L., Audenaert, K., Van Labeke, M.C. & Höfte, M. (2024). "Detection of Botrytis cinerea on strawberry leaves upon mycelial infection through imaging technique". *Scientia Horticulturae*, Volume 330, 113071. DOI: 10.1016/j.scienta.2024.113071
- Moghaddam, M. & Mehdizadeh, L. (2017). "Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents". In book: *Soft Chemistry and Food Fermentation*. DOI: 10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8
- Oloyede, O.O. & Lignou, S. (2021). "Sustainable paper-based packaging: A consumer's perspective". *Foods*, Volume 10(5), pages 10-35. DOI: 10.3390/foods10051035
- Petrasch, S., Knapp, S.J., Van Kan, J.A.L. & Blanco-Ulate, B. (2019). "Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis*

- cinerea*". *Molecular Plant Pathology*, Volume 20(6), Pages 877-892. DOI: 10.1111/mpp.12794
- Rout, S., Tambe. S., Deshmukh, R. K., Mali, S., Cruz, J., Srivastav, P.P., Amin, P. D., Gaikwad, K.K., Aguiar Andrade, E.H. & Santana de Oliveira, M. (2022). "Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging". *Trends in Food Science & Technology*, Volume 129, Pages 421-439. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.10.012
- Shao, D., Smith, D.L., Kabbage, M. & Roth M. G. (2021). "Effectors of plant necrotrophic fungi". *Frontiers in Plant Science*, Volume 12, 687713. DOI: 10.3389/fpls.2021.687713
- Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. & Catalan, C.A. (2007). "A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents". *Food Chemical and Toxicology*, Volume 45(9), 165061. DOI: 10.1016/j.fct.2007.02.031
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H. & Rather, M.A. (2019). "A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens". *Microbial Pathogenesis*, Volume 134, 103580. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103580
- Zaffora, B., Coisne, L. & Gerard, C. (2024). "Survival models to estimate time to visible mold growth on new paper-based food-contact materials under varying environmental conditions". *LWT*, Volume 193, 115767. DOI: 10.1016/j.lwt.2024.115767
- Zheng, L., Zhang, J., Wu, X., Gu, X., Wang, S. & Zhang, H. (2021). "A novel biocontrol strain *Pantoea jilinensis* D25 for effective biocontrol of tomato gray mold (causative agent *Botrytis cinerea*)". *Biological Control*, Volume 164, 104766. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104766

## Referencias legales. Legislación comunitaria

- Reglamento (CE) 450/2009 de la Comisión, de 29 de mayo de 2009, sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos. *Disponible en:* <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:135:0003:0011:ES:PDF> [Consultado 18-04-2024].
- Reglamento (CE) nº 1935/2004 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. *Disponible en:* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004R1935-20210327> [Consultado 18-04-2024].