



## Artículo

# **Efecto de la aplicación de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en factores de calidad de rodajas de manzana (*Malus domestica*)**

Effects of application of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) and thyme (*Thymus vulgaris*) essentials oils on quality factors of apple (*Malus domestica*) slices

Carlos Enrique **Ochoa Velasco\***, Juan José **Luna Guevara**, Francisco Javier **Pérez Gaspar**

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ingeniería Química,  
Colegio de Ingeniería Agroindustrial. 4 Oriente, Colonia Centro, Puebla, México.

\*Autor para la correspondencia: carlosenriqueov@hotmail.com

Aceptado 29-October-2012

## **Resumen**

El objetivo de este estudio fue evaluar algunos factores de calidad de rodajas de manzana sumergidas en soluciones de aceite esencial (AE) de orégano y tomillo. Rodajas de manzana fueron sumergidas en diferentes soluciones de AE: 100 ppm de AE de orégano (T1), 100 ppm de AE de tomillo (T2), 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo (T3), 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo (T4), 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo (T5); 100 ppm de ácido ascórbico (T6) y agua destilada estéril (T7) que se utilizó como control. Las rodajas de manzana fueron empacadas y almacenadas a 5 °C. Se evaluó el pH, sólidos solubles totales, acidez titulable, color, actividad de la polifenoloxidasas, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras durante 9 días y atributos sensoriales. Después de 9 días de almacenamiento las rodajas de manzana sumergidas en los tratamientos T1 y T3 presentaron menor valor de pH y menos oscurecimiento. T1 y T5 mostraron el menor cambio neto de color, esto se vio reflejado en una baja actividad de la polifenoloxidasas. La aplicación de AE incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6. Sin embargo, este incremento se redujo drásticamente después de 9 días de almacenamiento, obteniéndose una actividad

antioxidante del 32,1 y 35,2 % (respecto al inicio) en los tratamientos T6 y T4, respectivamente. Las bacterias aerobias mesófilas se inhibieron durante 3 días en las rodajas de manzana sumergidas en solución T1, mientras que después de 9 días las que presentaron la menor carga de bacterias fueron las rodajas de manzana sumergidas en T2 y T5. Los mohos y levaduras se inhibieron en los tratamientos T1, T2 y T5. Las rodajas de manzana con mayor aceptación sensorial por parte de los jueces fueron las de los tratamientos T4, T6 y T7 al inicio del almacenamiento y de los tratamientos T4, T5 y T6 después de 6 días.

**Palabras claves:** aceite esencial, actividad antioxidante, efecto antimicrobiano, manzana, orégano, tomillo.

### Abstract

The aim of this research was evaluated some quality factors on apple slices immersed in essential oil (EO) solutions of oregano and thyme. Apple slices were immersed in different aqueous EO solutions: 100 ppm of oregano EO (T1), 100 ppm of thyme EO (T2), 75:25 ppm of oregano:thyme EO (T3), 50:50 ppm of oregano:thyme EO (T4), 25:75 ppm of oregano:thyme EO (T5), 100 ppm of ascorbic acid (T6) and sterile distilled water (T7) that was used as control. Apple slices were packed and stored at 5 °C. During 9 days were evaluated the pH, total soluble solids, titratable acidity, color, polyphenol oxidase activity, phenolic compounds, antioxidant activity, aerobic mesophilic bacteria and molds and yeasts. Also sensorial attributes. After 9 days of storage, apple slices dipped in treatments T1 y T3 had the lowest pH value and less browning. T1 and T5 showed the lowest total color change and this was represented in the low polyphenol oxidase activity. The EO solutions significantly increased ( $p < 0,05$ ) phenolic compounds and antioxidant activity in T2, T3, T4, T5 and T6 treatments. However, this increase was drastically reduced after 9 days of storage, resulting in antioxidant activity of 32.1 and 35.2 % (from the beginning) in treatments T6 and T4, respectively. Aerobic mesophilic bacteria were inhibited during 3 days in apple slices dipped in T1 solution. After 9 days of storage apple slices dipped in T2 and T5 had the lowest bacterial load. Molds and yeasts were inhibited in treatments T1, T2, and T5. Apple slices with higher sensory acceptance by judges were treatment T4, T6 and T7 at the beginning of the storage and T4, T5, and T6 after 6 days.

**Key words:** antimicrobial effect, antioxidant activity, apple, essential oil, oregano, thyme.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y vegetales frescos cortados o listos para consumo se ha incrementado (Pereira *et al.*, 2004). Para obtenerlos se utilizan métodos físicos simples tales como lavado, pelado, cortado, molido, desinfectado, empaçado y almacenamiento en refrigeración (Artés, 2000). La principal ventaja de las frutas frescas cortadas es el corto tiempo para su preparación por parte del consumidor y

que la ración se consume totalmente (Francis *et al.*, 1999; Sloan, 2002). Algunas desventajas de las frutas frescas cortadas son debidas a los cambios físicos, químicos y biológicos (Varoquaux y Wiley, 1994). El cortado causa que se pongan en contacto enzimas con el substrato provocando el oscurecimiento, principal problema en los productos frescos cortados; generado por la degradación de los fenoles por la polifenoloxidasas (PPO) en presencia de oxígeno (Artés *et al.*, 1998; Sapers y Miller, 1998).

Diferentes técnicas se han aplicado para evitar el oscurecimiento enzimático tales como sulfitos, empacado en atmósfera modificada, bajas temperaturas e inhibidores de oscurecimiento que tienen efectos adversos a la salud (Jiménez y García-Carmona, 1999; Reyes-Moreno *et al.*, 2002). En manzanas frescas cortadas se han utilizado agentes anti-oscurecimiento como el ácido ascórbico e iso-ascórbico, ácido cítrico, 4-hexilresorcinol, cisteína y glutatión (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2007).

El interés por la aplicación de los aceites esenciales (AE) durante la pre y poscosecha en vegetales se ha incrementado (Roller y Seedhar, 2002; Tripathi y Dubey, 2004). Lanciotti *et al.* (2004) informaron que el AE de los cítricos puede ser un buen recurso para incrementar la vida útil de frutas mínimamente procesadas. AE de especias como el orégano (*Lippia graveolens* Kunth) y el tomillo (*Thymus vulgaris* L.) han sido estudiados como agentes antimicrobianos y antioxidantes (Jiang *et al.*, 2012). La utilización de AE de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*T. vulgaris*), entre otros, sobre el control poscosecha de la podredumbre causada por hongos (*Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*) en 4 cultivares de manzana ('Golden Delicious', 'Granny Smith', 'Red Chief', 'Royal Gala') ha mostrado ser significativamente eficaz (Lopez-Reyes *et al.*, 2010). En *P. expansum*, aislado de manzana, se ha logrado la mayor reducción con el componente timol a concentración de 250 ppm (Camele *et al.*, 2012). Especies de orégano y tomillo contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos, tales como, carvacrol, timol, *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, entre otros (Viuda-Martos *et al.*, 2007; Guerra-A *et al.*, 2008; Porte y Godoy, 2008; De Martino *et al.*, 2009; Wogiatzi *et al.*, 2009; Derwich *et al.*, 2010; Grigore *et al.*, 2010; Ortega-Nieblas *et al.*, 2011), que presentan actividad antioxidante similar a la del  $\alpha$ -tocoferol (Shiratsuchi *et al.*, 2012) y la vitamina C (Kim y Lee, 2004). Asimismo, su actividad antimicrobiana se ha

ensayado *in vitro* para inactivar bacterias, mohos y levaduras (Periago *et al.*, 2004; Burt *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la aplicación de aceite esencial de orégano, tomillo y sus combinaciones en características fisicoquímicas, actividad enzimática (polifenoloxidasas), compuestos fenólicos, actividad antioxidante, características microbiológicas y atributos sensoriales de rodajas de manzana durante su almacenamiento en refrigeración (5 °C).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materias primas y criterios de selección

Se utilizó manzana (*Malus domestica*) cv. 'Red Delicious', orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) que fueron adquiridos en un supermercado de Puebla, México. Los criterios de selección fueron: madurez comestible y libre de daños físicos y microbiológicos visibles.

### Extracción del aceite esencial (AE)

El AE de orégano y tomillo se extrajo mediante destilación por arrastre con vapor. Se colocaron 20 g de muestra en un destilador construido en la Universidad de las Américas (Puebla, México) y se dejó destilar con agua destilada durante 3 horas, tiempo en el cual se extrajeron aproximadamente 0,4 y 0,3 mL de AE de orégano y tomillo, respectivamente.

### Preparación de las muestras

Las manzanas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (150 ppm) durante 1 minuto, pelaron y rebanaron (5 mm de espesor) manualmente con cuchillo de acero inoxidable y se sumergieron (1 min) en soluciones acuosas de AE de orégano y tomillo. Las soluciones preparadas fueron de la siguien-

te manera: 100 ppm de AE de orégano (T1), 100 ppm de AE de tomillo (T2), 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo (T3), 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo (T4), 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo (T5), 100 ppm de ácido ascórbico (T6) y agua destilada estéril (T7) se utilizó como tratamiento control. Las concentraciones de AE de orégano y tomillo se seleccionaron en función de ensayos preliminares realizados (no se muestran los datos). Las rodajas de manzana fueron empacadas en cajas de polietileno cristal (15x15x10 cm) y almacenadas a 5 °C en un congelador-refrigerador comercial (marca TORREY, modelo CV16). Cada 3 días, durante 9 días, se evaluaron los cambios en algunos parámetros de calidad. Los sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, color, actividad de la enzima PPO, compuestos fenólicos y actividad antioxidante se determinaron en pulpa de manzana, obtenida por la homogenización de las rodajas de manzana utilizando un procesador Black & Decker® (Towson, Maryland, USA).

### Características fisicoquímicas

Los sólidos solubles totales, pH y acidez titulable se evaluaron siguiendo los métodos 932.12, 981.12 y 942.15 de la AOAC (2000), respectivamente.

### Color

Las rodajas de manzana se colocaron en una caja petri para determinar las coordenadas de color L (luminosidad, blanco-negro), a (rojo-verde) y b (amarillo-azul) de la escala Hunter, utilizando un colorímetro Colorgard® System/05 (BYK-Gardner GmbH, Geretsried, Alemania) en modo reflectancia. Con las coordenadas L, a y b se calculó el cambio neto de color ( $\Delta E$ ) utilizando la Ec. 1.

Ecuación (1):

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

Donde  $L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$  y  $L$ ,  $a$  y  $b$  son las coordenadas de color al inicio y durante el tiempo de almacenamiento, respectivamente.

### Actividad de la polifenoloxidasasa (PPO)

La actividad de la PPO (Ec. 2) se determinó siguiendo el método de Pizzocaro *et al.* (1993) con modificaciones. Se obtuvo el extracto enzimático de la molienda de 5,0 g de pulpa de manzana con 5,0 mL de buffer McIlvaine (pH = 6,5); el extracto se centrifugó (centrífuga Marathon™ 21K/R, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) a 4000 rpm durante 40 minutos (4 °C). 1,0 mL de solución de catecol (0,175 M) se mezcló con 2,0 mL de buffer McIlvaine y 0,5 mL del extracto enzimático. La absorbancia se determinó a 420 nm en un espectrofotómetro UV-visible marca UNICO®, modelo 2800H (United Products & Instruments, Inc., Dayton, NJ, USA) durante 3 min cada 10 segundos. Con los datos obtenidos (absorbancia versus tiempo) se realizó un gráfico y se tomó la parte lineal de la curva para calcular la actividad de la PPO.

Ecuación (2) 
$$\frac{U}{g} = \frac{A \cdot 60 \cdot V}{v \cdot 0,001 \cdot M}$$

Donde:

U/g : actividad enzimática, definida como el cambio de 0,001 en el valor de absorbancia por minuto y expresado por gramo

A : absorbancia de la muestra, adimensional

V : volumen de la muestra homogenizada con buffer, mL

v : volumen del extracto enzimático usado en la reacción, mL

M : masa empleada para hacer el extracto enzimático, g

### Compuestos fenólicos

El contenido de compuestos fenólicos en pulpa de manzana se determinó siguiendo el método propuesto por Gao *et al.* (2000) con modificaciones. 2,0 mL de agua destilada se colocaron en un tubo ámbar, posteriormente 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Química, S. A., Toluca, México) y 100 µL de jugo de manzana. Esta mezcla se homogenizó completamente y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiental (25 °C). Posteriormente, se agregó 1,0 mL de una solución de carbonato de sodio (20 % p/v) y se agitó vigorosamente. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental y en oscuridad. Se evaluó la absorbancia a 765 nm y se calculó el contenido de compuestos fenólicos (Ec. 3) utilizando una curva estándar de ácido gálico.

$$\text{Ecuación (3)} \quad \text{AG} = \left( \frac{A - b}{m} \right) \times 100$$

Donde:

AG : contenido de ácido gálico, mg de ácido gálico/mL

A : absorbancia de la muestra, adimensional

b : intercepto

m : pendiente de la curva estándar

### Actividad antioxidante

La actividad antioxidante en rodajas de manzana se determinó siguiendo el método propuesto por Kuskoski *et al.* (2004). El radical ABTS<sup>•+</sup> se formó colocando 5,0 mL de agua destilada con 3,3 mg de persulfato de potasio y 19,4 mg de reactivo de ABTS en un tubo ámbar. El radical se mezcló completamente y se dejó reposar por 16 horas en la oscuridad y a temperatura ambiental. Se mezcló el radical ABTS<sup>•+</sup> con etanol absoluto hasta alcanzar una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  a 754 nm. Este valor de absorbancia se tomó como la absorbancia

inicial ( $A_i$ ). Posteriormente, 80 µL de jugo de manzana se mezcló con 3,920 mL del radical de ABTS<sup>•+</sup> y se dejó reaccionar durante 7 minutos ( $A_f$ ). La actividad antioxidante se calculó usando una curva estándar de Trolox con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ecuación (4)} \quad \text{UI} = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100$$

$$\text{Ecuación (5)} \quad \text{UT} = \frac{\text{UI} - m}{b} \times 100$$

Donde:

UI : porcentaje de inhibición

UT : cantidad de Trolox, mg Trolox/mL

b : intercepto

m : pendiente (absorbancia/(mg Trolox/mL)) de la curva estándar

### Análisis microbiológicos

A las rodajas de manzana, luego de la sumersión en las distintas soluciones, se les realizó análisis de bacterias aerobias mesófilas (BAM) y de mohos y levaduras (MyL). Las BAM y MyL se sembraron en agar nutritivo (BD Bioxon, Cuautitlán Itzcalli, México) y agar papa dextrosa acidificado (10 % de ácido tartárico) (BD Bioxon), de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas NOM-092-SSA1-1994 y la NOM-111-SSA1-1994, respectivamente (NOM, 1995a; NOM, 1995b). Las cajas Petri para las BAM se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 1 ó 2 días, mientras que las cajas Petri para ML se incubaron durante 5 días a  $25 \pm 2$  °C. Se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/g) al inicio ( $N_0$ ) y a los diferentes tiempos de almacenamiento (N).

### Evaluación sensorial

Las rodajas de manzana fueron evaluadas sensorialmente por 30 jueces no

entrenados mediante una escala hedónica de 5 puntos (Larmond, 1987); donde 5 significó 'me gusta mucho', 4 'me gusta moderadamente', 3 'ni me gusta ni me disgusta', 2 'me disgusta moderadamente' y 1 'me disgusta mucho'. Los atributos evaluados fueron: color, olor, textura, sabor y aceptación general.

### Análisis estadístico

Todos los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa Minitab® Statistical Software, versión 14 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Un valor de  $p$  de 0,05 se utilizó para decidir la existencia o no de diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características antioxidantes de las muestras

En el Cuadro 1 se presenta el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de la manzana, AE de orégano y de tomillo. Rössle *et al.* (2010) indicaron que el contenido de compuestos fenólicos en purés de manzanas con piel de 10 cultivares ('Shampion', 'Jonica', 'Gloster', 'Topaz', 'Ariwa', 'Rajka', 'Idared', 'Cortland', 'Alwa y 'Braeburn') se encuentra entre 863,9-1849,1 y 985,7-1600,6 mg de ácido gálico/100 g de muestra seca para 2 temporadas evaluadas, respectivamente. Lo cual confirma que el cultivar y la temporada de cultivo afectan de manera importante los compuestos fenólicos de la manzana y en general de las frutas. El valor de actividad antioxidante se encontró dentro del intervalo informado por Oszmiański y Wojdyło (2008) en puré de manzana (43-146 mg de Trolox/100 g). En el mismo sentido, Iordanescu *et al.* (2012) mostraron que entre distintos cultivares rumanos de manzanas se presentaron diferencias entre sus propiedades antioxidantes y compuestos bioactivos, como también, por

consecuencia de diferentes estados de maduración. Los autores agregan que existió correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total.

Por otra parte, se observó una mayor concentración de compuestos fenólicos en tomillo que en orégano, y por tanto mayor actividad antioxidante. Los compuestos responsables de la actividad antioxidante en el AE de orégano (*Oreganum vulgare*) son el carvacrol (67,04 %), seguido del terpineol y el  $p$ -cimeno con 14,95 y 6,55 %, respectivamente (Guerra-A. *et al.*, 2008). Mientras que en el AE de tomillo (*T. vulgaris* L.) los principales compuestos con actividad antioxidante son el timol y carvacrol (Schwarz *et al.*, 1996), siendo el timol el principal componente responsable de la actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2005). La composición de AE para una misma especie, puede variar en función de la región geográfica. Ortega-Nieblas *et al.* (2011) concluyeron, que en la composición química de AE de hojas de orégano (*Lippia palmeri* S. Wats) recolectadas en 2 localidades de México, en una localidad, los componentes más abundantes en la especie incluyeron  $p$ -cimeno, timol, isoaromandreno, carvacrol,  $\gamma$ -terpineno, y en la otra, carvacrol, timol,  $p$ -cimeno, cariofileno.

### Características fisicoquímicas

En el Cuadro 2 se presentan los sólidos solubles totales, el pH y la acidez titulable de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C. Se observó a los 9 días, un incremento en los sólidos solubles totales en los tratamientos con AE y ácido ascórbico. Biegańska-Marecik y Czapski (2007) observaron un incremento de sólidos solubles totales de 12,4 a 12,8 % en rodajas de manzana, cuando fueron impregnadas con soluciones de ácido ascórbico (0,5 %) + ácido cítrico (1,0 %). Los sólidos solubles totales se incrementaron durante el tiempo de almacenamiento, probablemente debido a la deshidratación que presentaron las rodajas de

**Cuadro 1.-** Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de manzana, aceite esencial de orégano y de tomillo.\*

Componente	Manzana	Orégano	Tomillo
Compuestos fenólicos (mg de ácido gálico/100 mL)	30,9 ± 1,7	100 ± 10	827 ± 10
Actividad antioxidante (mg de Trolox/100 mL)	86,5 ± 1,4	310 ± 40	2090 ± 36

\*Los valores son promedios de tres repeticiones. Valor ± desviación estándar.

**Cuadro 2.-** Características fisicoquímicas de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones durante almacenamiento a 5 °C.\*

Tratamiento	Sólidos solubles totales (%)		pH		Acidez titulable (mg ácido málico/g)	
	0 días	9 días	0 días	9 días	0 días	9 días
T1	10,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	17,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,86 ± 0,0 <sup>d</sup>	4,00 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,14 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,0 <sup>a</sup>
T2	10,4 ± 0,1 <sup>d</sup>	16,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	3,95 ± 0,0 <sup>c</sup>	4,05 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,0 <sup>b</sup>
T3	11,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	3,93 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,96 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,14 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,0 <sup>a</sup>
T4	9,9 ± 0,1 <sup>e</sup>	15,3 ± 0,2 <sup>d</sup>	4,06 ± 0,0 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,0 <sup>a</sup>
T5	10,1 ± 0,1 <sup>e</sup>	18,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,02 ± 0,0 <sup>b</sup>	4,10 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,0 <sup>a</sup>
T6	11,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	3,96 ± 0,0 <sup>c</sup>	4,03 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,14 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,0 <sup>a</sup>
T7	9,4 ± 0,1 <sup>f</sup>	14,2 ± 0,2 <sup>e</sup>	3,72 ± 0,0 <sup>e</sup>	4,16 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,0 <sup>b</sup>

T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

\* Valores de las columnas con la misma letra en superíndices no presentan diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Valor ± desviación estándar.

manzana. En el tratamiento control (T7) se observó, a los 9 días, el menor valor de sólidos solubles totales (14,2 % ± 0,2 %) ( $p < 0,05$ ) que se debió probablemente a que los microorganismos emplearon los azúcares como alimento para su desarrollo, o bien a una mayor actividad metabólica de las rodajas de manzana (Aguayo-Giménez, 2003), mientras que T5

presentó el mayor valor (18,8 ± 0,1) conformando un solo grupo homogéneo ( $p < 0,05$ ).

La aplicación de AE de orégano y tomillo incrementó el pH en las rodajas de manzana el día 0, pasando de 3,72 a 4,06 en T4 ( $p < 0,05$ ). Después de 9 días de almacenamiento a 5 °C se observó un mayor

incremento de pH en las rodajas de manzana utilizadas como control (4,16 en T7), mientras que el tratamiento T3 presentó el menor valor de pH (3,96), seguido de T1 (4,00) ( $p < 0,05$ ). Un menor valor de pH causa disminución del oscurecimiento enzimático (Cortez-Vega *et al.*, 2008). La aplicación de AE y ácido ascórbico mantuvo más estable el pH de las rodajas de manzana durante 9 días de almacenamiento. Leyva-López *et al.* (2011) publicaron incrementos de pH en un intervalo general de 5,39 a 5,92 en *Carica papaya* var. Maradol fresca cortada, previamente sumergida en soluciones de cloruro y lactato de sodio, después de 8 días de almacenamiento a 5 °C.

La aplicación de AE de orégano y tomillo inicialmente incrementó ligeramente la acidez titulable en los diferentes tratamientos. En T5 el incremento fue significativo ( $p < 0,05$ ). Después de 9 días de almacenamiento se observó un incremento de la acidez titulable en todos los tratamientos. El incremento fue mayor

en los tratamientos T1, T3, T4, T5 y T6, conformando un solo grupo homogéneo. El incremento en la acidez titulable pudo deberse a la actividad metabólica de las frutas que genera ácidos orgánicos durante el proceso de respiración (Aguayo-Giménez, 2003). Buta *et al.* (1999) presentaron incrementos (a 7 días de almacenamiento) en el contenido de ácido málico (mg/g) en manzana fresca cortada tratada con la combinación de soluciones de 4-hexilresorcinol 0,001 M, ácido isoascórbico 0,5 M, propionato de calcio 0,05 M y benzoato de sodio 0,025 M. Asimismo, Lamikanra *et al.* (2000), en melón (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud. cv. Mission) fresco cortado después de 2 días de almacenamiento a 20 °C apreciaron incrementos en la acidez (0,21-1,61 g/100 mL).

### Color

En el Cuadro 3 se presentan las coordenadas de color L, a y b al inicio y final

**Cuadro 3.-** Coordenadas de color L, a y b de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones durante almacenamiento a 5 °C.\*

Tratamiento	Coordenadas de color						$\Delta E$ (9 días)
	L	a (0 días)	b	L	a (9 días)	b	
T1	53,7±0,3 <sup>bc</sup>	-0,5±0,1 <sup>a</sup>	22,4±1,3 <sup>a</sup>	30,9±5,6 <sup>a</sup>	-0,5±0,1 <sup>e</sup>	12,8±0,2 <sup>a</sup>	21,8±0,7 <sup>b</sup>
T2	56,2±2,7 <sup>abc</sup>	-1,2±0,4 <sup>ab</sup>	23,8±1,3 <sup>a</sup>	33,1±0,0 <sup>a</sup>	-0,2±0,0 <sup>d</sup>	11,7±0,1 <sup>a</sup>	26,1±2,9 <sup>ab</sup>
T3	60,6±1,8 <sup>a</sup>	-2,3±0,4 <sup>bc</sup>	24,5±0,7 <sup>a</sup>	34,6±0,1 <sup>a</sup>	-0,5±0,0 <sup>e</sup>	12,2±0,1 <sup>a</sup>	28,8±1,9 <sup>a</sup>
T4	58,8±3,3 <sup>ab</sup>	-3,1±0,6 <sup>c</sup>	23,6±0,5 <sup>a</sup>	33,8±0,1 <sup>a</sup>	-0,3±0,0 <sup>d</sup>	12,4±0,1 <sup>a</sup>	27,5±3,2 <sup>ab</sup>
T5	52,3±0,8 <sup>c</sup>	-0,8±0,4 <sup>a</sup>	23,7±0,8 <sup>a</sup>	33,3±0,2 <sup>a</sup>	0,6±0,0 <sup>c</sup>	11,7±0,1 <sup>a</sup>	22,5±1,2 <sup>b</sup>
T6	60,7±2,5 <sup>a</sup>	-2,9±0,8 <sup>c</sup>	23,2±0,4 <sup>a</sup>	34,5±0,1 <sup>a</sup>	0,9±0,1 <sup>b</sup>	10,6±0,1 <sup>a</sup>	29,3±2,4 <sup>a</sup>
T7	55,6±2,5 <sup>abc</sup>	-2,0±0,2 <sup>bc</sup>	24,0±2,1 <sup>a</sup>	33,5±0,5 <sup>a</sup>	1,5±0,0 <sup>a</sup>	4,5±1,6 <sup>b</sup>	29,7±2,2 <sup>a</sup>

T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

\* Valores de las columnas con la misma letra en superíndices no presentan diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Valor  $\pm$  desviación estándar.



del tiempo de almacenamiento (5 °C) de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones. Al inicio, la aplicación de las soluciones afectó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) la coordenada de luminosidad (L) con respecto al control; en T5 y T1 hubo decremento de L. También afectó a la coordenada a, donde T1 y T5 presentaron valores mayores ( $p < 0,05$ ). La coordenada b no se vio afectada ( $p > 0,05$ ) en ninguno de los tratamientos. Las variaciones iniciales suelen ser propias y consecuentes de la aplicación de las soluciones. Buta *et al.* (1999) reflejaron gráficamente el mismo comportamiento inicial de las coordenadas en la aplicación de diversas soluciones sobre manzana fresca cortada. Después de 9 días de almacenamiento, los cambios apreciables en la variación de las coordenadas de color (Cuadro 3), se ilustran en la Fig. 1. La coordenada L disminuyó con el tiempo en todos los tratamientos, no observándose diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellos al noveno día. La coordenada a se incrementó en todos los tratamientos, excepto en T1 que se mantuvo estable. T1 y T3, conformando un grupo homogéneo, fueron los tratamientos que presentaron menor valor de a, el día 9; estos tratamientos fueron los que coincidentemente presentaron menor valor de pH. La coordenada b disminuyó en todos los tratamientos después de 9 días de almacenamiento; sin embargo, el tratamiento control (T7) fue el que presentó el menor valor de b ( $p < 0,05$ ) y los demás tratamientos conformaron un solo grupo ( $p > 0,05$ ). El mayor cambio neto de color se apreció en los tratamientos T7, T6 y T3 (Cuadro 3) los cuales conformaron un solo grupo sin diferencias entre ellos ( $p > 0,05$ ) y el menor en los tratamientos T1 y T5, grupo que difirió de los demás tratamientos ( $p < 0,05$ ).

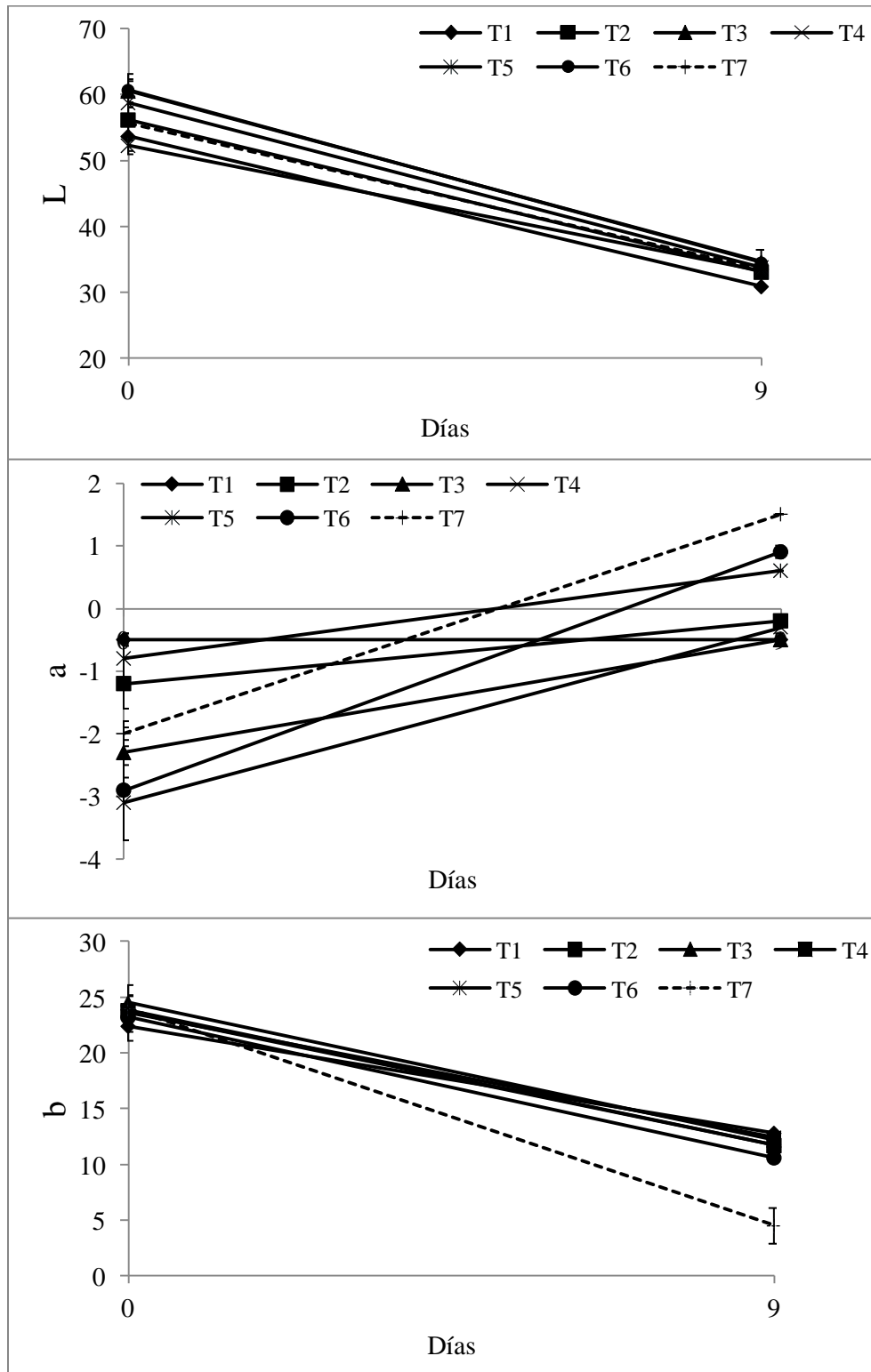
Un mayor valor de la coordenada a indica un mayor oscurecimiento (Biegańska-Marecik y Czapski, 2007), por lo que independientemente de los valores de L, los tratamientos T1 y T3 presentaron menor

oscurecimiento o pardeamiento el día 9. En manzana, Eissa *et al.* (2008) expresan que cuando un material no se somete a tratamiento térmico, se asume que el oscurecimiento es consecuencia de la actividad enzimática de la PPO. Estos autores observaron que la aplicación de extractos de AE de clavo (*Eugenia aromatica*), albahaca (*Ocimum basilicum*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y salvia (*Salvia officinalis*) a jugo de manzana almacenado en refrigeración (4 °C) durante 4 semanas, se tradujo en aumentos progresivos de la coordenada a, pero considerablemente menores respecto a un tratamiento control, especialmente con limoncillo, clavo y romero.

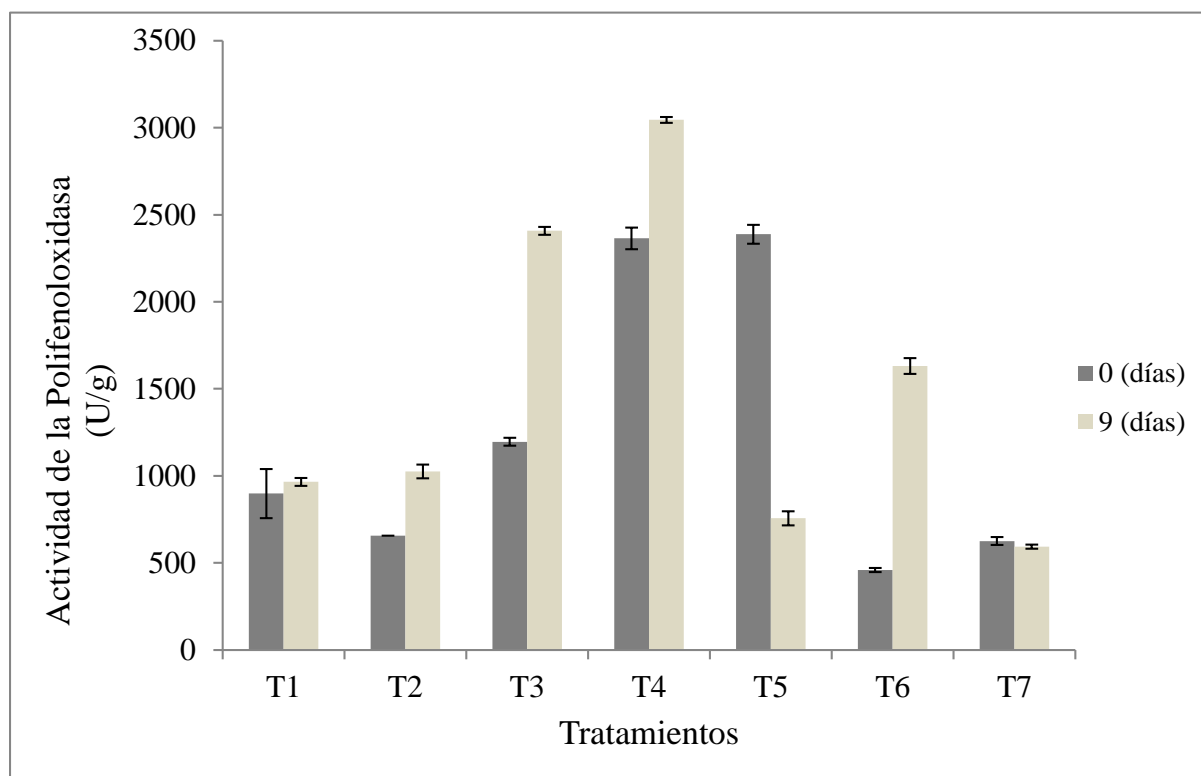
Por otra parte, Baldwin *et al.* (1996) señalan que el procesamiento mínimo de manzana sumergida en ácido ascórbico retiene mejor el color que en manzanas sin tratamiento, y en tal sentido, T6 fue el tratamiento que presentó menor valor de la coordenada a (luego de T4) al inicio, pero mayor valor (luego del control), a los 9 días. Ha sido observado por Biegańska-Marecik y Czapski (2007), que concentraciones de ácidos de 0,1 % no inhiben efectivamente el oscurecimiento enzimático de rodajas de manzana.

### Actividad de la polifenoloxidasa (PPO)

La Fig. 2 presenta la actividad de la PPO en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C. La actividad de la PPO en manzana puede presentar alta variabilidad (Trejo-González y Soto-Valdez, 1991; Kołodziejczyk *et al.*, 2010). Para 22 cultivares de manzana, Kołodziejczyk *et al.* (2010) tabularon valores de actividad PPO que presentaron alta variabilidad, en intervalo desde 2,3 (cv. Rebella) hasta 240,6 U/g (cv. Melfree). Los valores tabulados por los autores pueden interpretarse como bajos al comparar con lo mostrado en la Fig. 2 para el control; por lo que es necesario aclarar que en este estudio la concentración del extracto enzimático fue de



**Figura 1.-** Coordenadas de color L, a y b de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones durante almacenamiento a 5 °C.



T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

**Figura 2.-** Actividad de la polifenoloxidasasa en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C.

1,0 g de muestra en 1,0 mL de buffer, mientras que en el trabajo de Kołodziejczyk *et al.* (2010) la concentración del extracto enzimático fue de 0,4 g de muestra en 1,0 mL de buffer. Asimismo, al momento de generar la reacción enzimática en el trabajo de Kołodziejczyk *et al.* (2010) la concentración del extracto enzimático en la reacción fue de 10 %, mientras que en este estudio la concentración fue de 14,2 %.

Las rodajas de manzana sumergidas en las soluciones T1, T3, T4 y T5 presentaron un incremento inicial significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad, esto fue probablemente debido a las altas concentraciones de compuestos fenólicos que pueden comportarse como agentes prooxidantes en lugar de agentes reductores (Robards *et al.*, 1999). Pérez-Trueba (2003)

informaron que los flavonoides son excelentes antioxidantes debido a combinaciones en sus propiedades (como agentes quelantes, secuestrantes y su acción sobre enzimas). Sin embargo, mediante mecanismos como la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I) y generación de especies reactivas al oxígeno, ejercen acciones prooxidantes. Los resultados en T1 y T5 se corresponden con lo indicado en relación al color inicial, en la subsección anterior. Después de 9 días de almacenamiento, en las rodajas de manzana del tratamiento T1 no se observó incremento significativo ( $p > 0,05$ ) de la actividad y de manera similar ocurrió con el tratamiento T2. Se destaca que T1 fue el tratamiento que mantuvo estable el valor de la coordenada a. Por otra parte, en el

tratamiento T5 se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la actividad enzimática, lo cual está en concordancia con el bajo cambio neto de color en dicho tratamiento. Alikhani *et al.* (2009) mediante la aplicación de AE de tomillo en concentraciones de 250 y 400 ppm, disminuyó la actividad enzimática de la peroxidasa y por tanto el oscurecimiento enzimático en peras. Asimismo, Eissa *et al.* (2008) encontraron que la adición de extractos de AE de limoncillo, clavo, romero, albahaca y salvia a jugo de manzana almacenado durante 4 semanas a 4 °C, permitió inhibir la actividad de la PPO en relaciones porcentuales desde 22,81 hasta 92,65 %, siendo los tres primeros los que presentaron porcentajes de inhibición mayores al 78 %. Los AE eliminan el oxígeno cosustrato y de esta forma se previene el oscurecimiento enzimático (Mousavizadeh y Sedaghatoor, 2011). Biegańska-Marecik y Czapski (2007) haciendo referencia al efecto de compuestos inhibidores del oscurecimiento enzimático, expresan que las diferencias en el mecanismo de su acción hacen posible el uso de varios agentes simultáneamente, lo que facilita la utilización de su sinergia y mejora su actividad en comparación con aquellos utilizados individualmente.

Por otra parte, las rodajas de manzana del tratamiento T6 presentaron la menor actividad enzimática inicialmente, en concordancia anterior con un menor valor de la coordenada a, aunque a los 9 días se incrementó. Whitaker y Lee (1995) señalan que el ácido ascórbico reduce las *o*-quinonas y *o*-difenoles, y también tiene acción directa sobre la actividad de la PPO. Suttirak y Manurakchinakorn (2010) describen en relación a la efectividad de la aplicación de ácido ascórbico a concentración de 1 %, que en manzanas cv. ‘Golden Delicious’ no inhiben el oscurecimiento y activa a la PPO, pero sí ha sido efectivo para los cultivares ‘Fuji’ y ‘Liberty’.

### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C se presentan en el Cuadro 4. Inicialmente el contenido de compuestos fenólicos se incrementó en los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6, y solamente en el tratamiento T1, el contenido de compuestos fenólicos fue menor y similar al tratamiento control (T7). Este incremento en el contenido de compuestos fenólicos se debió probablemente a los fenoles como el carvacrol y timol presentes en los aceites esenciales de orégano y tomillo (Veres *et al.*, 2003 Serrano *et al.*, 2008). Después de 3 días de almacenamiento a 5 °C, se observó una disminución de los compuestos fenólicos, quizás debido a la oxidación de los mismos o a la pérdida de compuestos volátiles de los AE y del ácido ascórbico. El cortado de las manzanas, expone estos compuestos al oxígeno del aire, a la luz y libera enzimas de degradación de polifenólicos como la PPO (Rössle *et al.*, 2010). La pérdida fue progresiva hasta los 9 días de almacenamiento y solo los tratamientos T5 y T6, representando un grupo homogéneo ( $p > 0,05$ ), presentaron un contenido de compuestos fenólicos mayor significativamente ( $p < 0,05$ ) al tratamiento control (T7), los otros ensayos presentaron valores de compuestos fenólicos menores al valor del control. Lo observado en T5, pudiera estar relacionado en parte, a que este tratamiento mostró una disminución significativa y predominante de la actividad enzimática. Rössle *et al.* (2010) cuantificaron altos valores de compuestos fenólicos en diferentes cultivares de manzana con piel, mínimamente procesada y observaron que en 9 de 10 cultivares, se redujeron significativamente después de 5 días de almacenamiento a 2 - 4 °C. En general, los grupos principales de compuestos fenólicos en manzanas son ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles, dihidrochalconas y antocianinas. Algunos compuestos fenólicos identificados en manzanas son el ácido clorogénico, catequina, procianidinas, quercetinas y floridizina (Schieber *et al.*, 2001; Veberic *et al.*, 2005; Oszmiański y Wojdyło, 2008).

**Cuadro 4.-** Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C.

Tratamiento	Compuestos fenólicos (mg de ácido gálico/100 mL)				Actividad antioxidante (mg de Trolox/100 mL)			
	0 (días)	3	6	9	0	3	6	9
T1	25,7±2 <sup>f</sup>	22,4±1 <sup>d</sup>	23,7±2 <sup>b</sup>	21,9±0 <sup>c</sup>	45,5±1 <sup>e</sup>	43,3±3 <sup>c</sup>	32,6±4 <sup>c</sup>	31,2±1 <sup>c</sup>
T2	47,2±0 <sup>c</sup>	42,9±2 <sup>b</sup>	20,1±3 <sup>b</sup>	13,3±0 <sup>d</sup>	108,8±2 <sup>a</sup>	102,4±9 <sup>a</sup>	47,1±1 <sup>b</sup>	33,7±2 <sup>c</sup>
T3	53,1±0 <sup>b</sup>	48,9±3 <sup>ab</sup>	23,1±1 <sup>b</sup>	15,3±1 <sup>d</sup>	104,9±2 <sup>ab</sup>	98,0±0 <sup>ab</sup>	39,8±4 <sup>bc</sup>	31,2±2 <sup>c</sup>
T4	38,3±2 <sup>d</sup>	35,6±1 <sup>c</sup>	28,5±1 <sup>b</sup>	22,7±1 <sup>c</sup>	104,2±5 <sup>ab</sup>	70,8±1 <sup>b</sup>	80,0±1 <sup>a</sup>	67,5±3 <sup>a</sup>
T5	35,6±1 <sup>de</sup>	28,3±4 <sup>cd</sup>	32,2±3 <sup>b</sup>	29,9±0 <sup>a</sup>	93,5±1 <sup>cd</sup>	72,2±7 <sup>b</sup>	34,6±6 <sup>bc</sup>	27,6±1 <sup>c</sup>
T6	61,5±2 <sup>a</sup>	53,8±0 <sup>a</sup>	46,2±7 <sup>a</sup>	31,6±0 <sup>a</sup>	97,4±1 <sup>bc</sup>	76,4±9 <sup>ab</sup>	81,2±4 <sup>a</sup>	66,1±5 <sup>a</sup>
T7	30,9±2 <sup>e</sup>	22,0±1 <sup>d</sup>	28,7±1 <sup>b</sup>	26,8±2 <sup>b</sup>	86,5±5 <sup>d</sup>	85,9±3 <sup>ab</sup>	72,9±4 <sup>a</sup>	54,2±3 <sup>b</sup>

T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

\* Valores de las columnas con la misma letra en superíndices no presentan diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Valor  $\pm$  desviación estándar.

### Actividad antioxidante

En el mismo Cuadro 4 se presentan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C. Inicialmente, la aplicación de AE incrementó de manera significativa ( $p < 0,05$ ) la actividad antioxidante en los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6 en relación al tratamiento control (T7), aunque fue observado que el valor de T1 fue menor a T7. Esto fue debido a que las especias orégano y tomillo presentan compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Abdalla y Roozen, 2001; Burt, 2004) que incrementaron la actividad de las rodajas al ser sumergidas en las soluciones, principalmente en T2 que fue la solución con AE de tomillo puro. Un menor valor en T1 puede atribuirse en parte, a que este tratamiento

fue el que presentó menor contenido de compuestos fenólicos y corresponde a la solución con AE de orégano puro. El contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante fue mayor en tomillo que en orégano, como se mostró en el Cuadro 1. Por otro lado es necesario destacar, que cuando se utilizan distintos agentes o compuestos combinados en diferentes relaciones o concentraciones, se pueden suceder efectos aditivos, sinérgicos y/o antagónicos (Rodríguez-Sauceda, 2011).

Al transcurrir el tiempo la tendencia fue disminución de la actividad antioxidante y a los 9 días de almacenamiento fueron los tratamientos T4 y T6 los que presentaron mayor actividad (reducciones de 35,2 y 32,1 % respecto al inicio). La aplicación de AE puro de tomillo en manzana (cv. 'Red Delicious') fresca cortada ejerce un efecto en la actividad

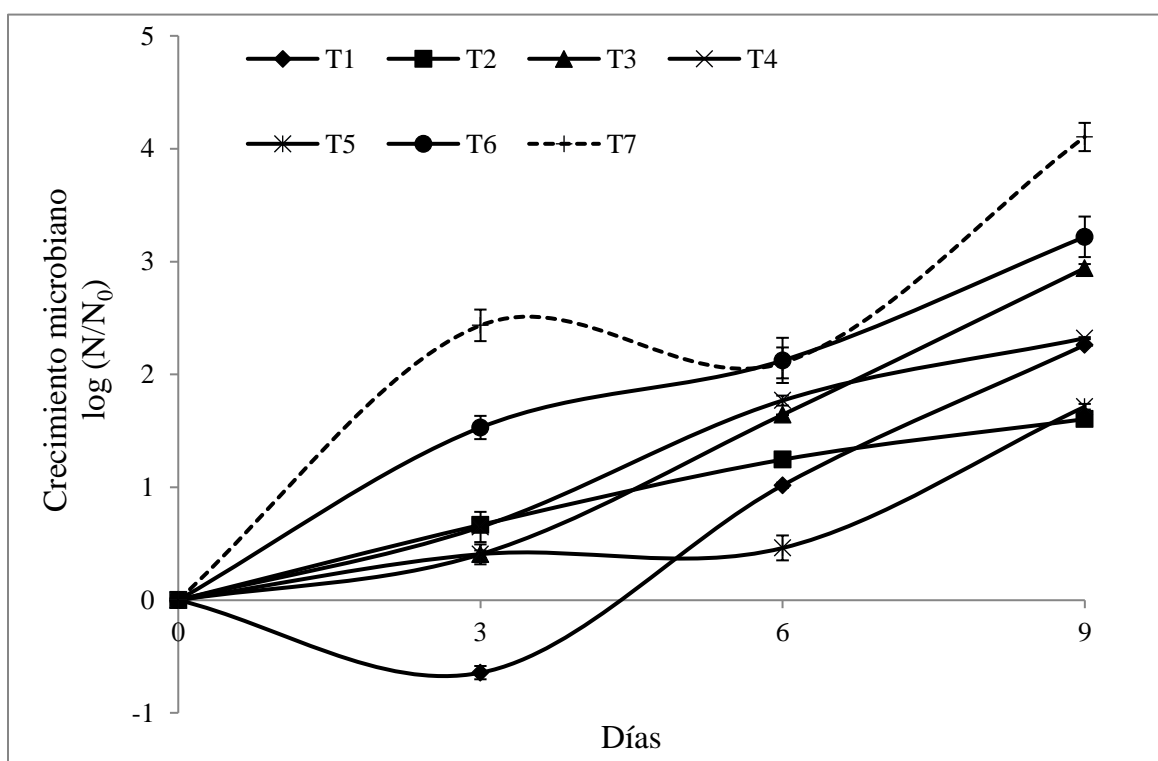
antioxidante que va en función de la concentración de AE. Mousavizadeh y Sedaghatthoor *et al.* (2011) utilizaron concentraciones de 50 µl de AE de tomillo (*T. vulgaris*) en 100 mL solución y la actividad antioxidante fue de 79 %, mientras que al incrementar la dosis a 100 y 200 µl la actividad antioxidante fue de 47 % y 58 %, respectivamente. Probablemente la reducción de la actividad antioxidante en las rodajas de manzana durante el almacenamiento fue debido a la exposición de los tejidos a diferentes factores tales como la luz, el oxígeno y enzimas, entre otros (Mittler, 2002; Lascano *et al.*, 2003). Ha sido demostrado que la combinación de extractos de orégano (*Origanum vulgare* spp.) en concentraciones de 50 ppm con extractos de semillas de ajowan (*Trachyspermum ammi*) y hojas de borraja india (*Plectranthus amboinicus*), por sinergia, mejora la actividad antioxidante (Khanum *et al.*, 2011).

### Crecimiento microbiano

El control de la carga microbiana en frutas mínimamente procesadas o frutas frescas cortadas es importante debido a que la protección natural con la que cuentan ha sido removida y los tejidos son expuestos al crecimiento microbiano (Brackett, 1997). En la aplicación de AE en frutas frescas cortadas, ha sido informado que inhiben el crecimiento microbiano (Muche y Rupasinghe, 2011). Los compuestos fenólicos presentes en orégano y tomillo no solo tienen actividad antioxidante sino que también ejercen acción como antimicrobianos (Roller y Seedhar, 2002; Soković *et al.*, 2007; Bassolé *et al.*, 2012). Existe evidencia que explica que los AE pueden actuar más fuertemente como antimicrobianos por el efecto aditivo de sus principales componentes antimicrobianos, indicando que los componentes de menor importancia también juegan un rol y/o que puede haber sinergia entre los componentes e incluso un resultado puede ser antagónico al deseado (Burt *et al.*, 2005).

La Fig. 3 presenta el crecimiento de BAM en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C. Las rodajas de manzana del tratamiento T1 presentaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del crecimiento microbiano después de 3 días de almacenamiento, mientras que los otros ensayos con AE no presentaron diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Después de 9 días de almacenamiento las rodajas de manzana del tratamiento T2 y T5 presentaron menor cantidad de BAM (UFC/g) y las muestras sin tratamiento (T7) presentaron mayor recuento ( $3,4 \times 10^6$  UFC/g), seguido del tratamiento T6 con  $5,7 \times 10^5$  UFC/g; en estos 2 tratamientos, los crecimientos de BAM fueron superiores al límite microbiológico básico máximo permisible establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994 con  $1,5 \times 10^5$  UFC/g, referido a ensaladas verdes, crudas o de frutas (NOM, 1995c).

Burt *et al.* (2005), en la medición de la actividad antimicrobiana de AE de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*T. vulgaris*) contra *E. coli* O157:H7, han informado que el carvacrol y el timol son los principales componentes antibacterianos de AE de orégano y tomillo (por aditividad), y su actividad parece estar relacionada con la actividad antibacteriana del aceite puro y no está influenciada por la presencia de *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, que no tuvo efecto antibacteriano aparente. Sin embargo, otros componentes menores pueden tener un efecto antagonista sobre la acción de carvacrol y timol. Di Pasqua *et al.* (2005) determinaron actividad antimicrobiana en AE de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*T. vulgaris* L.), entre otros evaluados, con efecto bactericida y bacteriostático sobre varios microorganismos patógenos y bacterias esporuladas. Por otro lado, De Martino *et al.* (2009) señalan en relación a los AE de orégano y su actividad antimicrobiana, que dependiendo del quimiotipo, un AE puede ser más activo que otro, la actividad estar relacionada con el carvacrol y timol, y parte de ésta ser resultante



T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

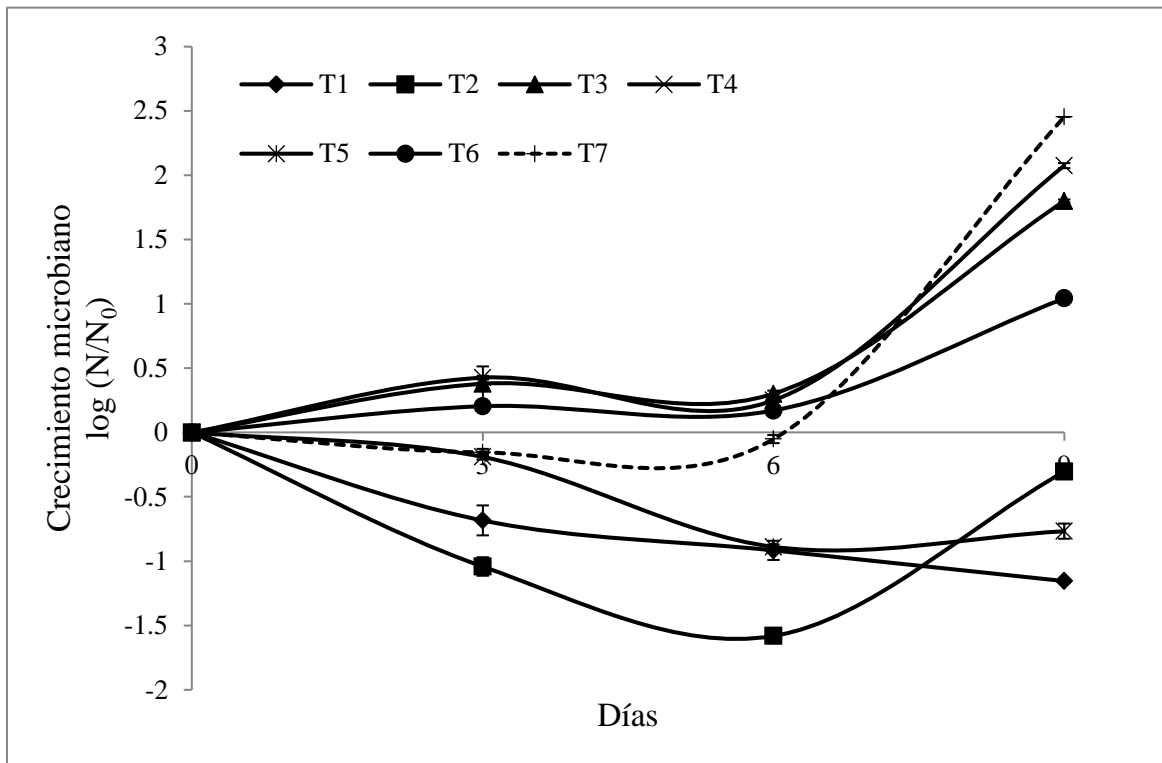
N/N<sub>0</sub>: Indica el número de unidades formadoras de colonias al tiempo 3, 6 y 9.

**Figura 3.-** Crecimiento de bacterias mesófilas aerobias en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C.

de la sinergia entre componentes activos tales como, *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno. Ortega-Nieblas *et al.* (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana de AE de orégano (*Lippia palmeri* S. Wats) de 2 localidades, contra 4 bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*) y 6 Gram-negativas (*Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* K88, *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* ATCC25922). Todos los microorganismos fueron sensibles a los AE, especialmente *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*, sin embargo la actividad antimicrobiana varió con respecto al origen de la planta. El AE

de orégano puede causar inhibición debido a daños en la integridad de la membrana celular, afectando además, a la homeostasis del pH y el equilibrio de los iones inorgánicos (Lambert *et al.*, 2001).

El crecimiento de MyH fue menor al crecimiento de BAM en todos los tratamientos y se observó después de 6 días de almacenamiento en casi todos los tratamientos (Fig. 4). Los tratamientos T1 y T5 presentaron constante reducción del crecimiento microbiano durante todo el tiempo de almacenamiento a 5 °C y en T2 también se inhibieron. T7 (control) presentó el mayor crecimiento microbiano después de 9 días de almacenamiento. Los AE poseen actividad antimicrobiana contra BAM y



T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

N/N<sub>0</sub>: Indica el número de unidades formadoras de colonias al tiempo 3, 6 y 9.

**Figura 4.-** Crecimiento de mohos y levaduras en rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C.

también contra MyL (Beuchat, 2001; Nychas *et al.*, 2003). Se ha observado actividad antimicrobiana con efecto fungicida y fungistático en AE de orégano (*Origanum*) (Adams *et al.*, 2011) y tomillo (*T. vulgaris* L.) (Shabnum y Wagay, 2011). Wogiatzi *et al.* (2009) ensayaron la actividad antifúngica de biotipos de oréganos (*Origanum vulgare* y *Origanum onites*) de 4 regiones en Grecia (Leptokaria, Rapsani, Itea, Ios) y evidenciaron que todos los AE presentaron actividad antifúngica, inhibiendo significativamente especies patógenas de plantas (*Pythium* spp., *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) and *Sclerotinia sclerotiorum*). El AE obtenido de *O. vulgare*, de Rapsani, dio

el mas alto rendimiento. Especies de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*) y *Penicillium* (*P. aurantiogriseum*, *P. glabrum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*) aisladas de tortas y ensaladas frescas de diversos vegetales, fueron reducidas o inhibidas por la acción antifúngica de un extracto comercial de orégano (*Origanum vulgare* L.) a distintas concentraciones (0,35-2,50 mL/100 mL). A mayor concentración del extracto el efecto inhibitorio fue mayor (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012).

En relación a los AE del tomillo, la especie *T. vulgaris* ha mostrado fuerte actividad antifúngica. Soković *et al.* (2009) publicaron



que a concentración de 0,25 µL/mL inhibe a *Alternaria alternata*, *Fusarium tricinctum*, varias especies de *Aspergillus* y dermatomicetos; y a menor concentración (0,125 µL/mL) inhibe a *Phomopsis helianthi* y *Cladosporium cladosporioides*. Los autores señalan que el AE de *T. tosevii* posee potencial antifúngico ligeramente inferior al de *T. vulgaris*. Los componentes activos de las especias a bajas concentraciones pueden interactuar sinérgicamente con otros factores para aumentar el efecto conservante (Eissa *et al.*, 2008).

**Atributos sensoriales**

En el Cuadro 5 se presenta la evaluación sensorial de las rodajas de manzana al día 0 y 6 de almacenamiento a 5 °C. Se puede observar que al tiempo 0 de almacenamiento las rodajas con mayor calificación promedio fueron las sumergidas en ácido ascórbico (T6) (‘me gusta moderadamente’ - ‘me gusta mucho’), seguida

de las rodajas de manzanas sumergidas en la solución T4 y las rodajas de manzana del control (T7) (‘ni me gusta ni me disgusta’ - ‘me gusta moderadamente’). A los 6 días de almacenamiento se observó una tendencia similar al tiempo 0 de almacenamiento, es decir, las rodajas de manzana que más gustaron a los consumidores fueron las del tratamiento T6, seguido del tratamiento T5 y T4. Las rodajas de manzana del tratamiento T1, T2 y T3 fueron las que, en general, tuvieron menor aceptación en los atributos olor y sabor. No obstante, la aceptación promedio de éstas, se incrementó del día 0 al día 6, en parte debido a una mejoría en el sabor de las rodajas de manzana.

Muchos extractos de especias poseen actividad antimicrobiana pero, a concentraciones requeridas para actividad antimicrobiana, pudieran causar que un alimento sea incomedible para la mayoría de los consumidores (Davidson y Zivanovic, 2003).

**Cuadro 5.-** Evaluación sensorial de rodajas de manzana sumergidas en las distintas soluciones y almacenadas a 5 °C.

Tratamiento	Color	Olor	Textura	Sabor	Apariencia general	Promedio
Día 0 de almacenamiento						
T1	3,75	2,50	3,63	2,25	3,13	3,05 ± 0,7
T2	3,71	2,38	4,25	2,46	3,42	3,24 ± 0,8
T3	2,71	2,63	3,38	2,50	2,79	2,80 ± 0,3
T4	4,21	3,38	4,38	3,17	4,04	3,83 ± 0,5
T5	2,50	3,21	3,29	3,17	2,67	2,97 ± 0,4
T6	4,58	4,58	4,75	4,63	4,50	4,61 ± 0,1
T7	3,00	4,50	3,71	4,67	3,29	3,83 ± 0,7
Día 6 de almacenamiento						
T1	3,63	3,04	3,50	2,75	3,58	3,30 ± 0,4
T2	3,88	2,88	4,13	3,46	3,75	3,43 ± 0,7
T3	3,42	2,46	3,13	2,96	3,25	3,04 ± 0,4
T4	3,50	3,13	3,71	3,50	3,58	3,48 ± 0,2
T5	3,71	3,71	3,58	3,46	3,54	3,60 ± 0,1
T6	4,21	4,21	3,92	4,08	4,00	4,08 ± 0,1
T7	2,75	2,75	3,25	3,75	2,63	3,20 ± 0,5

T1: 100 ppm de AE de orégano. T2: 100 ppm de AE de tomillo. T3: 75:25 ppm de AE de orégano:tomillo. T4: 50:50 ppm de AE de orégano:tomillo. T5: 25:75 ppm de AE de orégano:tomillo. T6: 100 ppm de ácido ascórbico. T7: agua destilada como tratamiento control.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir, que después de 9 días, la aplicación de aceite esencial de orégano y tomillo pudo evitar el incremento de la coordenada de color a, factor que puede afectar la percepción de los consumidores. Los tratamientos T1, T2 y T5 mantuvieron y/o redujeron la actividad de la polifenoloxidasas. Los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se incrementaron al inicio en los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T6; no obstante, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se redujeron durante el tiempo de almacenamiento. El tratamiento T1 inhibió por 3 días el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas, mientras que los mohos y levaduras fueron inhibidos en los tratamientos T1, T2 y T5. Los jueces, para el día 6, expresaron mayor preferencia por las rodajas de manzana sumergidas en ácido ascórbico (T6), seguida de las sumergidas en las soluciones T5 y T4.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. José Ángel Guerrero Beltrán, a la Universidad de las Américas Puebla y al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP) por su apoyo en la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, Ahmed E. and Roozen, Jacques P. 2001. The effects of stabilised extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. *European Food Research and Technology*. 212(5):551-560.
- Adams, Amber; Kumar, Satyanshu; Clauson, Marck and Sahi, Shivendra. 2011. Anti-yeast activities of *Origanum* oil against human pathogenic yeasts. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2(2):103-107.
- Aguayo-Giménez, Encarnación. 2003. Innovaciones tecnológicas en la conservación de melón y tomate procesado en fresco. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena. España.
- Alikhani, M.; Sharifani, M.; Azizi, M.; Hemmati, K.H. and Mousavizadeh, S.J. 2009. The effect of some natural compounds in shelf-life and quality of pear fruit (Esfahan Shah mive cultivar). *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*. 16(3):158-171.
- AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. (17ma. ed.). Gaithersburg, USA.
- Artés, F. 2000. Productos vegetales procesados en fresco. En *Aplicación del frío a los alimentos*. (pp. 127-141). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Artés, F.; Castañer, M. and Gil, M.I. 1998. Review: enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*. 4(6):377-389.
- Baldwin, E.A.; Nisperos, M.O.; Chen, X. and Hagenmaier, R.D. 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*. 9(2):151-163.
- Bassolé, Imaël Henri Nestor and Juliani, H. Rodolfo. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 17(4):3989-4006.
- Beuchat, Larry R. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. In *Microbial Food Contamination*. (pp. 149-169). (2nd. ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Biegańska-Marecik, Róża and Czapski, Janusz. 2007. The effect of selected compounds as

- inhibitors of enzymatic browning and softening of minimally processed apples. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 6(3):37-49.
- Brackett, R. 1997. Alteración microbiológica y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. En *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A.
- Burt, Sara. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3):223-253.
- Burt, Sara A.; Vlieland, René; Haagsman, Henk P. and Veldhuizen, Edwin J.A. 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*. 68(5):919-926.
- Buta, George J.; Moline, Harold E.; Spaulding, David W. and Wang, Chiew, Y. 1999. Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(1):1-6.
- Camele, Ippolito; Altieri, Luciana; De Martino, Laura; De Feo, Vincenzo; Mancini, Emilia and Rana, Gian Luigi. 2012. *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2):2290-2300.
- Cortez-Vega, William Renzo; Becerra-Prado, Angélica María; Marqués-Soares, Juliana and Graciano-Fonseca, Gustavo. 2008. Effect of L-ascorbic acid and sodium metabisulfite in the inhibition of the enzymatic browning of minimally processed apple. *International Journal of Agricultural Research*. 3(3):196-201.
- Davidson, P.M. and Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. In *Food preservation techniques*. (pp. 5-30). Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC - Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- De Martino, Laura; De Feo, Vincenzo; Formisano, Carmen; Mignola, Enrico and Senatore, Felice. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (southern Italy). *Molecules*. 14(8):2735-2746.
- Derwich, Elhoussine; Benziane, Zineb; Manar, Abdellatif; Boukir, Abdellatif and Taouil, Rachid. 2010. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of the essential oils of *Origanum vulgare* from Morocco. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 5(2):120-129.
- Di Pasqua, Rosangela; De Feo, Vincenzo; Villani, Francesco and Mauriello, Gianluigi. 2005. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*. 55(2):139-143.
- Eissa, H.; Abd-Elfattah, S.; Abu-Seif, F.A. 2008. Anti-microbial, anti-browning and anti-mycotoxigenic activities of some essential oil extracts in apple juice. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 58(4):425-432.
- Francis, Gillian A.; Thomas, Christopher; O'Beirne, David. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*. 34(1):1-22.
- Gao, Xiangqun; Ohlander, María; Jeppsson, Niklas; Björk, Lars and Trajkovski, Viktor. 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(5):1485-1490.

- Grigore, A.; Paraschi, Ina; Colceru-Mihul, S.; Bubueanu, C.; Draghici, E. and Ichim, M. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. Romanian Biotechnological Letters. 15(4):5436-5443.
- Guerra-A., Carlos, M.; Galán.O., Jorge, A.; Méndez-A., Jonh J. y Murillo-A., Elizabeth. 2008. Evaluación del efecto del extracto de orégano (*Oreganum vulgare*) sobre algunos parámetros productivos de cerdos destetos. Revista Tumbaga. 3:16-29.
- Iordanescu, Olimpia; Alexa, Ersilia; Micu, Roxana and Poiana, Mariana Atena. 2012. Bioactive compounds and antioxidant properties at different maturity stages of apple cultivars from Romania. Journal of Food, Agriculture & Environment. 10(1):147-151.
- Jiang, Tianjia; Feng, Lifang and Zheng, Xiaolin. 2012. Effect of chitosan coating enriched with thyme oil on postharvest quality and shelf life of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60(1):188-196.
- Jiménez, Mercedes and García-Carmona, Francisco. 1999. Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79(14):1993-2000.
- Khanum, Hafeeza; Ramalakshmi, Kulathooran; Srinivas, Pullabhatla and Borse, Babasaheb Bhaskarrao. 2011. Synergistic antioxidant action of oregano, ajowan and borage extracts. Food and Nutrition Sciences. 2(5):387-392.
- Kim, Dae Ok and Lee, Chang Yong. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44(4):253-273.
- Kocić-Tanackov, Sunčica D.; Dimić, Gordana R.; Tanackov, Ilija J.; Pejin, Dušanka J.; Mojović, Ljiljana V. and Pejin, Jelena D. 2012. Antifungal activity of oregano (*Oreganum vulgare* L.) extract on the growth of *Fusarium* and *Penicillium* species isolated from food. Hemijska Industrija. 66(1):33-41.
- Kołodziejczyk, Krzysztof; Milala, Joanna; Sójka, Michał; Kosmala, Monika and Markowski, Jarosław. 2010. Polyphenol oxidase activity in selected apple cultivars. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 18(2):51-61.
- Kuskoski, E. Marta; Asuero, Agustín G.; García-Parrilla, M. ; Troncoso, Ana M. y Fett, Roseane. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brasil). 24(4):691-693.
- Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Cootes, P.J. and Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology. 91(3):453-462.
- Lamikanra, O.; Chen, J.C.; Banks, D. and Hunter, P.A. 2000. Biochemical and microbial changes during the storage of minimally processed cantaloupe. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(12):5955-5961.
- Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, F.; Belletti, N.; Guerzoni, M.E. and Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Science & Technology. 15(3-4):201-208.
- Larmond, E. 1987. Sensory evaluation can be objective. In Objective methods in food quality assessment. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Lascano, H. Ramiro; Melchiorre, Mariana N.; Luna, Celina M. and Trippi, Victoria S. 2003. Effect of photooxidative stress

- induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Science*. 164(5):841-848.
- Lee, Seung Jo; Umamo, Katumi; Shibamoto, Takayuki and Lee, Kwang Geun. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 91(1):131-137.
- Leyva-López, Nayely; Heredia, J. Basilio; Contreras-Angulo, Laura Aracely; Muy-Rangel, María Dolores; Campos-Sauceda, Juan Pedro y González-Lizarraga, Irma. 2011. Sales de calcio mejoran vida de anaquel y aceptabilidad general de papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol) fresca cortada. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2(1):001-015.
- Lopez-Reyes, Jorge Giovanni; Spadaro, Davide; Gullino, Maria Lodovica and Garibaldi, Angelo. 2010. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(3):171-177.
- Mittler, Ron. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plants Science*. 7(9):405-410.
- Mousavizadeh, Seyyed Javad and Sedaghatoor, Shahram. 2011. Apple and quince peroxidase activity in response to essential oils application. *African Journal of Biotechnology*. 10(57):12319-12325.
- Muche, Bizuayehu Mengstie and Rupasinghe, H.P. Vasantha. 2011. Natural antimicrobial agents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L. and *C. cassia*) and vanilla (*Vanilla planifolia*, *V. pompona*, and *V. tahitensis*) for extending the shelf-life of fresh-cut fruits. *Ethiopian Journal of Applied Sciences and Technology*. 2(1):1-13.
- NOM. 1995a. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- NOM. 1995b. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>
- NOM. 1995c. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>
- Nychas, G.J.E.; Skandamis, P.N. and Tassou, C.C. 2003. Antimicrobials from herbs and spices. In *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. (pp. 176-200). Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC - Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Ortega-Nieblas, Ma. Magdalena; Robles-Burgueño, Ma. Refugio; Acedo-Félix, Evelia; González-León, Alberto; Morales-Trejo, Adriana and Vázquez-Moreno, Luz. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(1):11-17.
- Oszmiański, Jan and Wojdyło, Aneta. 2008. Polyphenol content and antioxidative activity in apple purées with rhubarb juice supplement. *International Journal of Food Science & Technology*. 43(3):501-509.
- Pereira, L.M.; Rodrigues, A.C.C.; Sarantópoulos, C.I.G.L.; Junqueira, V.C.A.; Cunha, R.L. and Hubinder, M.D. 2004. Influence of modified atmosphere packaging and osmotic dehydration on the quality maintenance of minimally processed guavas. *Journal of Food Science*. 69(4):FEP172-FEP177.
- Pérez-Trueba, Gilberto. 2003. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista*

- Cubana de Investigaciones Biomédicas. 22(1):48-57.
- Periago, Paula M.; Delgado, Begoña; Fernández, Pablo S. and Palop, Alfredo. 2004. Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. *Journal of Food Protection*. 67(7):1408-1416.
- Pizzocaro, Francesco; Torreggiani, Danila and Gilardi, Gianluca. 1993. Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*. 17(1):21-30.
- Porte, Alexandre and Godoy, Ronoel L.O. 2008. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Journal of the Serbian Chemical Society*. 73(3):307-310.
- Raybaudi-Massilia, Rosa M.; Mosqueda-Melgar, Jonathan; Sobrino-López, Ángel; Soliva-Fortuny, Robert and Martín-Belloso, Olga. 2007. Shelf-life extension of fresh-cut "Fuji" apples at different ripeness stages using natural substances. *Postharvest Biology and Technology*. 45(2):265-275.
- Reyes-Moreno, C.; Parra-Inzunza, M.A.; Milán-Carrillo, J. and Zazueta-Niebla, J.A. 2002. A response surface methodology approach to optimise pretreatments to prevent enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) cubes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(1):69-79.
- Robards, Kevin; Prenzler, Paul D.; Tucker, Greg; Swatsitang, Prasan and Glover, William. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66(4):401-436.
- Rodríguez-Sauceda, Elvia Nereyda. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 7(1):153-170.
- Roller, S. and Seedhar, P. 2002. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwi fruit at 4° and 8 °C. *Letters in Applied Microbiology*. 35(5):390-394.
- Rössle, Christian; Wijngaard, Hilde H.; Gormley, Ronan T.; Butler, Francis and Brunton, Nigel. 2010. Effect of storage on the content of polyphenols of minimally processed skin-on apple wedges from ten cultivars and two growing seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(3):1609-1614.
- Sapers, Gerald M. and Miller, Robert L. 1998. Browning inhibition in fresh-cut pears. *Journal of Food Science*. 63(2):342-346.
- Schieber, Andreas; Keller, Petra and Carle, Reinhold. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 910(2):265-273.
- Schwarz, Karin; Ernst, Hedda and Ternes, Waldemar. 1996. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70(2): 217-223.
- Serrano, María; Martínez-Romero, Domingo; Guillén, Fabián; Valverde, Juan Miguel; Zapata, Pedro Javier; Castillo, Salvador and Valero, Daniel. 2008. The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science & Technology*. 19(9):464-471.
- Shabnum, Shazia and Wagay, Muzafar G. 2011. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development*. 11:83-94.
- Shiratsuchi, Hideki; Chang, Shaina; Wei, Alfreda; El-Ghorab, Ahmed H. and Shibamoto, Takayuki. 2012. Biological activities of low-molecular weight compounds found in foods and plants. *Journal of Food and Drug Analysis*. 20(Suppl.1):359-365.

- Sloan, A. Elizabeth. 2002. The top 10 functional food trends: the next generation. *Food Technology*. 56(4):32-57.
- Soković, Marina; Marin, Petar D.; Brkić, Dejan and van Griensven, Leo J.L.D. 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*. 1(2):220-226.
- Soković, Marina D.; Vukojević, Jelena; Marin, Petar D. Brkić, Dejan D. Vajs, Vlatka and van Griensven, Leo J.L.D. 2009. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*. 14(1):238-249.
- Suttirak, Weerayuth and Manurakchinakorn, Supralee. 2010. Potential application of ascorbic acid, citric acid and oxalic acid for browning inhibition in fresh-cut fruits and vegetables. *Walailak Journal of Science and Technology*. 7(1):5-14.
- Trejo-González, Augusto y Soto-Valdez, Herlinda. 1991. Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from 'Anna' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(4):672-675.
- Tripathi, Pramila and Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32(3):235-245.
- Varoquaux, Patrick and Wiley, Robert C. 1994. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In *Minimally processed refrigerated fruits & vegetables* (pp. 221-258). New York, NY, USA: Chapman & Hall, Inc.
- Veberic, Robert; Trobec, Mateja; Herbinger, Karin; Hofer, Melanie; Grill, Dieter and Stampar, Franci. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(10):1687-1694.
- Veres, K.; Varga, E.; Dobos, Á.; Hajdú, Zs.; Máthé, I.; Németh, É. and Szabó, K. 2003. Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. and *O. vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letswaart. *Chromatographia*. 57(1-2):95-98.
- Viuda-Martos, M.; Ruíz-Navajas, Y.; Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J.A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*. 27(1):91-101.
- Whitaker, John R. and Lee, Chang Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention* (pp. 2-7). ACS Symposium Series, Vol. 600. Washington D. C., USA: American Chemical Society.
- Wogiatzi, E.; Gougoulas, N.; Papachatzis, A.; Vagelas, I. and Chouliaras, N. 2009. Chemical composition and antimicrobial effects of Greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 23(3):1322-1324.