



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPORULADOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE ANTIMICROBIANOS NATURALES INMOVILIZADOS EN SISTEMAS FILTRANTES

Trabajo final de grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Alumno: Víctor José Garrido Momparler

Tutora: Ana Fuentes López

Cotutor: José Manuel Barat Baviera

Director experimental: David Tomás Fornés

Curso académico 2020-2021

Valencia, julio de 2021

Inactivación de microorganismos esporulados en productos lácteos mediante antimicrobianos naturales inmovilizados en sistemas filtrantes

Resumen

Para garantizar la calidad higiénico-sanitaria de la leche y sus derivados, la industria láctea utiliza tratamientos térmicos que permitan reducir la carga bacteriana y evitar el crecimiento de microorganismos no deseados. Sin embargo, existen determinadas bacterias termorresistentes y formadoras de esporas que son capaces de sobrevivir a dichos tratamientos, comprometiendo la seguridad de la leche y de los productos elaborados a partir de ella. El objetivo del presente trabajo es evaluar la efectividad de nuevos sistemas antimicrobianos de filtración como estrategia para prevenir toxiinfecciones alimentarias provocadas por microorganismos esporulados. El sistema de filtración se fundamentó en el uso de partículas de óxido de silicio de diferentes tamaños funcionalizadas con eugenol, y seleccionando como modelo de microorganismo termorresistente *Bacillus subtilis*. Para alcanzar el objetivo planteado, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del eugenol libre, así como en la matriz alimentaria. Los resultados obtenidos mostraron el efecto protector que ejerce la matriz alimentaria sobre las bacterias inoculadas frente al agente antimicrobiano. Una vez establecida la Concentración Mínima Inhibitoria del eugenol frente a *B. subtilis* en leche, se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana del eugenol inmovilizado en esta matriz. Los resultados obtenidos mostraron que la inmovilización del eugenol sobre las partículas de sílice no mejoró la capacidad antimicrobiana del compuesto libre. Ninguno de los tratamientos evaluados en el presente trabajo fue letal a las concentraciones y tiempos de estudio; sin embargo, las partículas de 75 y 200 μm funcionalizadas con eugenol mostraron un efecto bacteriostático, prolongando la fase de latencia del microorganismo expuesto.

Palabras clave: esporas, antimicrobianos naturales, filtración, leche, inactivación microbiana

Inactivation of sporulated microorganisms in dairy products by natural antimicrobials immobilized in filtering systems

Abstract

To guarantee the hygienic-sanitary quality of milk and its derivatives, the dairy industry uses heat treatments to reduce the bacterial load and prevent the growth of undesirable microorganisms. However, there are certain heat-resistant and spore-forming bacteria that are capable of surviving these treatments, compromising the safety of milk and the products made from it. The objective of the present work is to evaluate the effectiveness of new antimicrobial filtration systems as a strategy to prevent food toxicosis caused by sporulating microorganisms. The filtration system was based on the use of silicon oxide particles of different sizes functionalized with eugenol, and selecting *Bacillus subtilis* as a model of heat-resistant microorganism. To achieve the proposed objective, the *in vitro* antimicrobial activity of free eugenol, as well as in the food matrix, was evaluated. The results obtained showed the protective effect exerted by the food matrix on the inoculated bacteria against the antimicrobial agent. Once the Minimum Inhibitory Concentration of eugenol against *B. subtilis* in milk was established, the antimicrobial activity of eugenol immobilized in this matrix was evaluated. The results obtained showed that the immobilization of eugenol on silica particles did not improve the antimicrobial capacity of the free compound. None of the treatments evaluated in the present work was lethal at the concentrations and times of study; however, the 75 and 200 μm particles functionalized with eugenol showed a bacteriostatic effect, prolonging the latency phase of the exposed microorganism.

Key words: spores, natural antimicrobials, filtration, milk, microbial inactivation, microbial inactivation

Agradecimientos

A Ana, por el apoyo, esfuerzo, paciencia y dedicación. Por compartir conmigo tu experiencia y conocimiento. Eres un ejemplo a seguir Ana, muchísimas gracias.

A Cristina por la paciencia que ha tenido conmigo, siempre con una sonrisa, me has ayudado mucho.

A José Manuel y Édgar por hacerme sentir parte de esta gran familia que es la UPV.

A David por poner todos sus conocimientos al alcance de mi mano. Ha sido todo un privilegio.

A mi familia, siempre habéis estado ahí, en mis buenos y mis malos momentos, sin vosotros no habría sido posible hacer todo esto. Agradecer especialmente a María, la familia que se elige, gracias por estar ahí, por aguantarme y por quererme tal y como soy.

A Cora, Gala y Óscar, vuestro amor incondicional ha sido imprescindible para mí.

A mis compañeros/as de laboratorio por la paciencia, comprensión, y los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos.

En general a todo el profesorado de la UPV de los que he aprendido y me he formado. Me quedo con un poco de cada uno de vosotros.

A mis compañeros y amigos Paula, Miguel y Sadurní que me han guiado y ayudado estos años, por el ánimo que siempre me han infundido, hemos hecho un equipo estupendo.

Gracias a todos y a todas.

Índice de contenidos

1. Introducción	1
1.1. Leche y productos lácteos	1
1.2. Calidad higiénico-sanitaria de la leche y los productos lácteos.....	3
1.3. Tratamientos de conservación.....	5
1.4. Aceites esenciales y sus componentes bioactivos.....	7
1.5. Inmovilización de los EOC.....	7
2. Objetivos y plan de trabajo.....	9
2.1. Objetivos	9
2.2. Plan de trabajo	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1. Materiales y equipos.....	10
3.2. Ensayos de susceptibilidad microbiana: ensayos in vitro.....	11
3.3. Funcionalización de las partículas de sílice con eugenol.....	12
3.4. Caracterización de los materiales funcionalizados	13
3.5. Estudio de la efectividad de los materiales diseñados: ensayos in vivo	14
3.5.1. Ensayo preliminar	14
3.5.2. Evaluación de la actividad microbiana del eugenol libre en leche.	15
3.5.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana del eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa	15
4. Resultados y discusión	17
4.1. Ensayo de susceptibilidad microbiana: ensayos in vitro	17
4.2. Caracterización de los materiales funcionalizados	18
4.3. Estudio de la efectividad de los materiales diseñados: ensayos in vivo	21
4.3.1. Ensayo preliminar	21
4.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana del eugenol libre	22
4.3.3. Evaluación de la actividad microbiana del eugenol inmovilizado en partículas de sílice amorfa	23
5. Conclusiones	26
6. Referencias bibliográficas	27

Índice de tablas

Tabla 1. Pérdidas (%) de algunos nutrientes en la leche durante la aplicación de distintos tratamientos y período de almacenamiento. Fuente: Walstra et al. (2001).	6
Tabla 2. Rango de tamaño de partículas.	10
Tabla 3. Equipos utilizados en la realización de los ensayos.	11
Tabla 4. Concentraciones de eugenol libre en los ensayos in vitro de susceptibilidad microbiana.	11
Tabla 5. Diseño del ensayo con eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa.	16
Tabla 6. Diseño experimental para evaluar la inhibición del crecimiento microbiano. .	16
Tabla 7. Efecto de las concentraciones en el crecimiento de <i>B. subtilis</i> in vitro.	17
Tabla 8. Tamaños medios ponderados respecto al volumen y percentiles para las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.	18
Tabla 9. Potencial zeta (ζ) de las diferentes partículas de diferentes tamaños.	20
Tabla 10. Determinación del porcentaje en C, N y H de las muestras de diferentes tamaños medios.	20
Tabla 11. Cantidad de eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa.	21
Tabla 12. Concentración de partículas equivalente frente a concentración de eugenol.	21
Tabla 13. Resultados del ensayo preliminar.	22
Tabla 14. Resultados de la evaluación de actividad microbiana del eugenol libre.	22
Tabla 15. Crecimiento de los controles positivos del ensayo.	24
Tabla 16. Resultados de la evaluación de la inhibición de <i>B. subtilis</i> con eugenol inmovilizado.	24

Índice de figuras

Figura 1. Evolución del consumo de lácteos en España desde 2010 a 2019 Fuente: Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (MAPA) (2021).	2
Figura 2: Consumo de productos lácteos frescos y productos lácteos procesados expresados en sólidos de la leche. Fuente: OECD/FAO (2019).	2
Figura 3. Exportaciones de productos lácteos por regiones. Fuente: OECD/FAO (2019).	3
Figura 4. Molécula de Eugenol. Fuente: Bakkali et al. (2008).	7
Figura 5. Derivado aldehídico del eugenol obtenido tras la primera parte del proceso. Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).	12
Figura 6. Derivado alcoxisílico del eugenol. Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).	13
Figura 7. Partícula de sílice amorfa funcionalizada con eugenol Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).	13
Figura 8. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 50 μm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.	19
Figura 9. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 75 μm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.	19
Figura 10. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 200 μm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.	19
Figura 11. Comparación de crecimiento de <i>B. subtilis</i> con los distintos tratamientos del ensayo.	25

1. Introducción

1.1. Leche y productos lácteos

Según el Código Alimentario Español, “se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. La denominación genérica de leche comprende únicamente la leche natural de vaca, para otras hembras de animales domésticos, se deben designar indicando además el nombre de la especie correspondiente.” (R.D. 2484/1967).

Según la FAO, los productos lácteos producidos a nivel mundial son los siguientes (FAO, 2021):

- Leche líquida: El producto lácteo más consumido, elaborado y comercializado. Abarca todos los tipos de leches, como la lecha pasteurizada, normalizada, reconstituida, desnatada, la leche UHT, la leche enriquecida...
- Leches fermentadas: Se utilizan para fabricar otros productos lácteos y provienen de la fermentación de la leche mediante la intervención de microorganismos. Entre estos productos fermentados destacan el yogur y el kéfir.
- Quesos: Se obtienen mediante la coagulación de la caseína, que se separa del suero. Existen centenares de variedades de queso diferentes, cada uno con sus características propias. Las características diferenciadoras entre quesos vienen de las diferencias de composición de la leche, los tipos de leche empleados, y los procedimientos de elaboración y microorganismos utilizados en su fabricación.
- Mantequilla y ghee (mantequilla clarificada): Productos grasos derivados de la leche. La mantequilla se obtiene de la nata de la leche. El ghee se obtiene eliminando el agua de la mantequilla, lo que hace que este producto tenga una vida útil más larga que la mantequilla (de hasta dos años).
- Leche condensada: Se obtiene de la eliminación parcial del agua de la leche entera o desnatada. Se produce un tratamiento térmico y una concentración. Puede ser edulcorada o no edulcorada, aunque la mayor parte de la leche condensada es edulcorada.
- Leches evaporadas: Se obtiene de la eliminación parcial del agua de la leche entera o desnatada. Se debe hacer un tratamiento térmico para asegurar la estabilidad e inocuidad microbiológica de la leche.
- Leche en polvo: Se obtiene de la deshidratación de la leche, y generalmente se presenta en forma de polvo o gránulos. Es el ingrediente principal de las formulaciones nutritivas para bebés, tanto para reforzar el efecto de la leche materna, como para sustituirla por completo.
- Nata: Parte de la leche más rica en grasas, se obtiene tras el descremado o centrifugación de la leche.
- Sueros lácteos: Parte líquida de la leche que queda después de separar la leche cuajada en la fabricación del queso.
- Caseína: Es la proteína de la leche y es utilizada como ingrediente en varios productos, entre ellos, los quesos, productos de pastelería, pinturas y colas.

En España se consumieron en 2019 casi 5 millones de toneladas de productos lácteos (MAPA, 2021), aunque la tendencia de consumo observada en los últimos años es descendente.

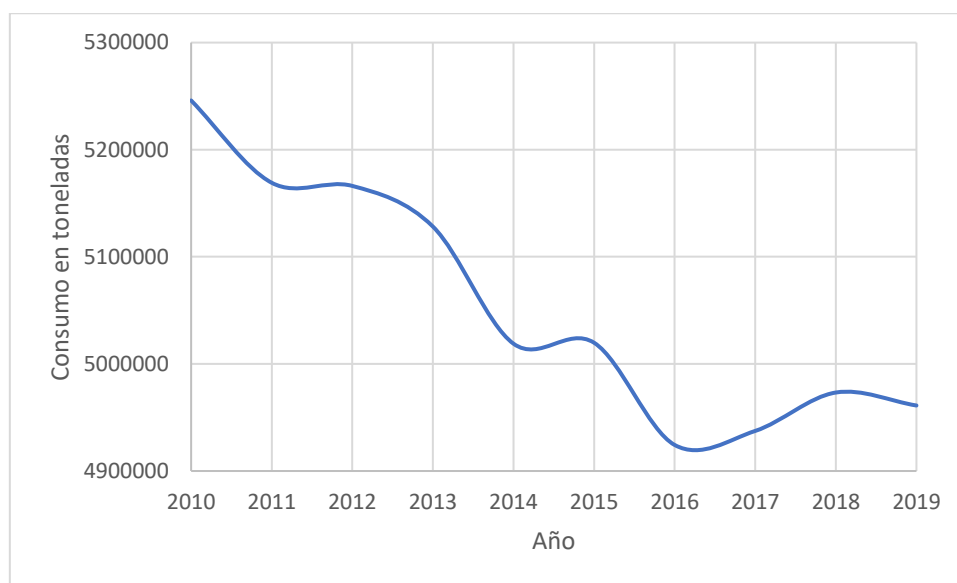


Figura 1. Evolución del consumo de lácteos en España desde 2010 a 2019 Fuente: Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (MAPA) (2021).

La mayoría de los productos lácteos a nivel mundial se consumen en forma de productos frescos. En Europa y Norte América, la demanda de productos lácteos frescos está cayendo, aumentando la demanda de productos lácteos procesados (FAO, 2019). La Figura 1.2 muestra el consumo actual y previsión de consumo de productos lácteos frescos y procesados en cada región del mundo, donde se muestran los países en vías de desarrollo como grandes consumidores de producto lácteo fresco.

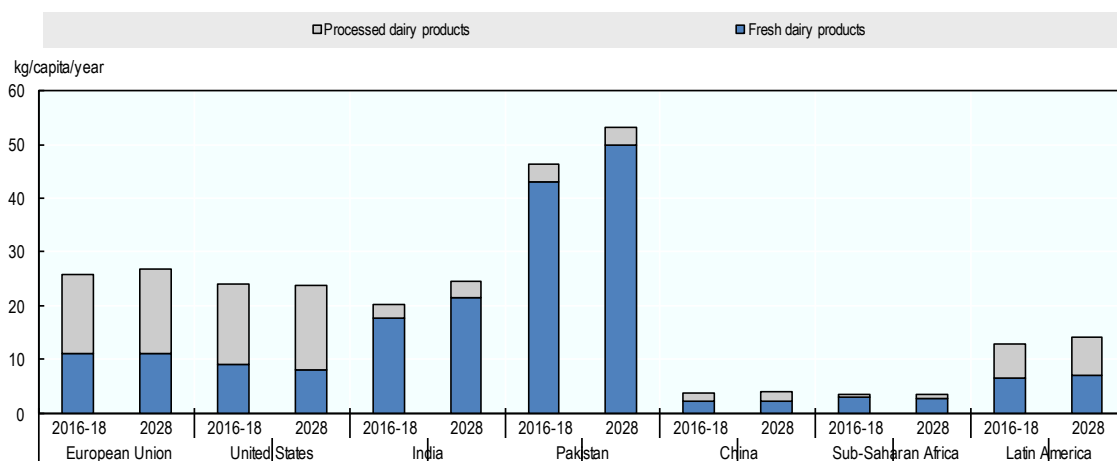


Figura 2: Consumo de productos lácteos frescos y productos lácteos procesados expresados en sólidos de la leche. Fuente: OECD/FAO (2019).

Respecto al comercio internacional de leche y productos lácteos, únicamente el 8 % de la leche fresca producida se comercia internacionalmente, debido a que se trata de un producto altamente perecedero y con un alto contenido en agua (que dificulta su transporte y almacenamiento, y beneficia la actividad microbiana). Las exportaciones se centran más, en productos lácteos con mejores características de conservación y/o un mayor valor comercial como leche en polvo, queso y mantequilla. Los mayores exportadores de productos lácteos a nivel mundial son Nueva Zelanda, Estados Unidos, la Unión Europea y Australia. Cabe destacar la demanda creciente de productos lácteos

de China, y, al no tener una infraestructura de producción de leche todavía, debe importarlos de otros países. Entre estos países se encuentran Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, aunque también importan productos lácteos de la Unión Europea, sobre todo, quesos. (OECD/FAO ,2019).

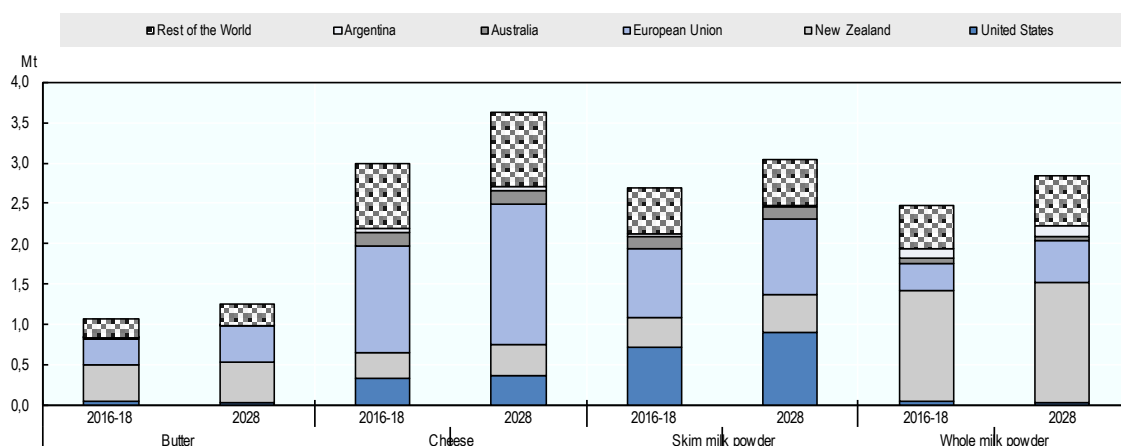


Figura 3. Exportaciones de productos lácteos por regiones. Fuente: OECD/FAO (2019).

1.2. Calidad higiénico-sanitaria de la leche y los productos lácteos

La calidad higiénico-sanitaria de la leche atiende a dos parámetros. La calidad higiénica, también denominada calidad bacteriológica, se refiere a la carga microbiana de la leche. Está relacionada con las condiciones higiénicas de la explotación, ya que la mayoría de las bacterias que se encuentran en la leche cruda se producen por contaminación ambiental. Por otra parte, la calidad sanitaria, se refiere al estado sanitario de los animales, y esto se traduce en las células somáticas que se encuentran en la leche, ya que este es un reflejo del estado sanitario del animal (BLANCO, 2010).

La leche cruda contiene una gran cantidad de microorganismos, algunos de ellos patógenos, que comenzaron a ser problemáticos, según el Libro Blanco sobre seguridad alimentaria (COMISIÓN EUROPEA, 2000), cuando generaron resistencia a los antibióticos, debido al abuso del suministro de estos antibióticos a los animales. Esto generó una alta incidencia de zoonosis, tales como campilobacteriosis, salmonelosis, las causadas por la *Escherichia coli*, enterococos y estafilococos (Díaz-Yubero, 2015). Las bacterias patógenas constituyen cerca del 90 % de las enfermedades transmitidas por los productos lácteos. (Vázquez-Ojeda, 2014).

La mayoría de los microorganismos son indeseables en la leche, bien por su patogenicidad o su capacidad de producir enzimas cuya actividad origina transformaciones indeseables en la leche. Entre los microorganismos alterantes en leche destacan *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. pyrogenes* o *S. uberis.*, Por otro lado, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus spp*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp*, *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium spp* son los microorganismos patógenos más peligrosos que pueden encontrarse en la leche cruda, los cuales no provocan alteración organoléptica del producto (Walstra et al., 2001).

Cualquier manipulación durante la producción, procesado, distribución y consumo tiene incidencia directa sobre la calidad y estabilidad de la leche. En este sentido, el mantenimiento de unas buenas prácticas de manipulación desde la producción (en las granjas) hasta la mesa (el consumidor final) son imprescindibles para garantizar la seguridad y calidad del producto.

La mayoría de los tratamientos de conservación tradicionales son procesos térmicos, que destruyen y/o inhiben la mayoría de los microorganismos presentes en la leche, aunque pueden encontrarse bacterias capaces de resistir a estos tratamientos térmicos.

Las bacterias termorresistentes más comunes en leche cruda son *Alcalígenes*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterias*, *Bacillus* y *Clostridium* (Ellner, 2000). Algunas de estas resisten las temperaturas mediante la formación de estructuras de resistencia denominadas esporas.

Los microorganismos esporulados son capaces de formar esporas que pueden resistir a las temperaturas de pasteurización. Algunos de estos microorganismos esporulados son aerobios, como *Bacillus* spp., o anaerobios estrictos como *Clostridium* spp. Algunas esporas son capaces de sobrevivir incluso al tratamiento UHT y al secado por pulverización (o atomización), por el que se obtiene la leche en polvo. En general, se admite que las esporas del género *Bacillus* son más resistentes que los del género *Clostridium* (Stumbo, 1965).

Algunos de estos microorganismos generan toxinas en sus formas vegetativas, lo cual supone un problema de seguridad alimentaria especialmente preocupante en los productos destinados a los consumidores con un sistema inmunitario más débil, como los preparados lácteos para lactantes y otros productos de alimentación infantil.

Uno de los microorganismos de interés en productos lácteos, incluyendo leches deshidratadas, es *Bacillus cereus*. Se trata de un microorganismo esporulado que puede estar presente en la leche de forma natural debido al ordeño de vacas con mastitis, o a la contaminación del producto en crudo por contacto con heno, paja, estiércol, el suelo, etc. Este microorganismo genera toxinas que pueden provocar intoxicaciones que producen síndrome emético y algunas que producen un síndrome diarreico, que presentan complicaciones, especialmente en la población infantil con un sistema inmunitario todavía en desarrollo (Di Pinto et al., 2013).

En los productos lácteos en polvo las esporas de *Bacillus cereus* no tienen las condiciones favorables necesarias para germinar; sin embargo, cuando el producto ha sido reconstituido y se almacena durante un tiempo, a temperatura ambiente, o, incluso en refrigeración, *B. cereus* es capaz de crecer a un ritmo muy alto. Estudios previos han evidenciado que *B. cereus* puede llegar a concentraciones de 10^7 UFC/mL en 24 h en el producto reconstituido dependiendo de la temperatura (Becker et al., 1994) y formar toxinas a temperaturas sobre 6°C, debido a su comportamiento psicrófilo (Buehner et al., 2015).

En 1994, un estudio realizado con alimentos para bebés y leches en polvo, empleando 261 muestras recogidas de 17 países, encontraron presencia de *B. cereus* en el 54 % de las muestras analizadas, a pesar de que estos productos habían pasado por un proceso industrial de esterilización y secado por atomización (Becker et al. 1994). En la actualidad, la presencia de *B. cereus* en alimentos continúa siendo un problema para la industria y para las autoridades sanitarias (Yang et al., 2021; Porcellato et al., 2021; Chang et al., 2021).

Bacillus subtilis es un microorganismo con características muy similares a *B. cereus*, por su capacidad de crear esporas en condiciones desfavorables, y también capaz de resistir tratamientos térmicos como la pasteurización (Elegbeleye et al., 2021). Estas esporas al igual que las de *B. cereus* pueden germinar bajo condiciones favorables (Trunet et al., 2019). Incluso se considera en farmacia como un indicador biológico para la validación del proceso de esterilización térmico (Pflug y Odlaug, 1986). La mayoría de las cepas de *B. subtilis* no presentan patogenicidad ni toxicidad, es por ello, que se ha utilizado como microorganismo esporulado de referencia para estudiar la efectividad de los tratamientos propuestos en el presente trabajo.

1.3. Tratamientos de conservación

Según el Código Alimentario Español, las leches conservadas son las procedentes de la leche natural manipuladas industrialmente para asegurar la duración de su aprovechamiento alimenticio por más de treinta días (R.D. 2484/1967). Dentro de este grupo, la leche se puede clasificar en:

- Leche esterilizada: “Leche natural sometida a un proceso tecnológico que asegure la destrucción de los gérmenes y la inactividad de sus formas de resistencia”.
- Leche evaporada: “Se conoce a la leche esterilizada privada de parte de su agua constituyente”.
- Leche condensada: Es la leche higienizada “concentrada con azúcar”, privada de parte de su agua de constitución y cuya conservación se consigue mediante la adición de sacarosa.
- Leche en polvo: “Es un producto seco y pulverulento que se obtiene mediante la deshidratación de la leche natural, o de la total o parcialmente desnatada, higienizada al estado líquido antes o durante el proceso de fabricación”.

Los tratamientos convencionales empleados en la industria para la conservación de la leche se basan en la aplicación de altas temperaturas para destruir los microorganismos. Dependiendo de la temperatura y el tiempo del tratamiento se clasifican en (Walstra et al., 2001):

- Pasteurización: La pasteurización asegura la destrucción de los microorganismos potencialmente peligrosos. Las condiciones de pasteurización habituales son el tratamiento de leche a 72 °C durante 15 segundos, 63 °C durante 30 minutos, o cualquier otra combinación de tiempo y temperatura que produzca el mismo efecto. Su principal ventaja es que no modifica las características biológicas ni su valor nutritivo; sin embargo, su vida útil es inferior a la alcanzada mediante otros tratamientos de conservación. La leche pasteurizada debe conservarse a una temperatura próxima a los 4 °C, siendo su vida útil inferior a 15 días.
- Esterilización: Se trata de una técnica en desuso, desplazada por los tratamientos UHT, aunque garantiza la destrucción completa de todos los microorganismos. La esterilización consiste en un tratamiento de la leche a 135 °C durante 2 s, enfriamiento rápido y envasado, en recipientes herméticos, donde se calienta entre 115-120 °C durante 20 min. La ventaja principal es que se puede conservar entre 6 y 9 meses a temperatura ambiente; sin embargo, afecta al valor nutricional y características sensoriales de la leche.
- Tratamiento UHT: (*Ultra High Temperature*). La leche se somete a un proceso de calentamiento que asegura la destrucción completa de los microorganismos seguido de un envasado en condiciones asépticas. El tratamiento térmico que se da es a temperaturas siempre superiores a 135 °C durante unos pocos segundos, dependiendo de la temperatura, desde 0,6 s a 150 °C a 6 s a 135 °C. La leche se conserva siempre en envases opacos para reducir las transformaciones químicas, físicas y organolépticas. La leche se puede conservar en estos envases cerrados hasta 6 meses a temperatura ambiente.

Aunque los tratamientos térmicos son eficaces para garantizar la seguridad del producto y favorecer la estabilidad microbiológica de la leche, presentan ciertas desventajas como son las pérdidas de nutrientes (Tabla 1). La pérdida de nutrientes viene determinada por

las condiciones de temperatura y tiempo del tratamiento, aunque hay otros factores como la exposición a la luz y la concentración de O₂, que inciden sobre la calidad y valor nutricional del producto (Walstra et al., 2001).

Tabla 1. Pérdidas (%) de algunos nutrientes en la leche durante la aplicación de distintos tratamientos y período de almacenamiento. Fuente: Walstra et al. (2001).

Tratamiento	Lisina disponible	Vit. B ₁ (tiamina)	Vit. B ₆ (piridoxal)	Vit. B ₉ (ácido fólico)	Vit. B ₁₂	Vit. C
<i>Pasterización</i>	0	5-10	0-5	3-5	3-10	5-20
<i>Esterilización UHT directa</i>	0	5-15	5-10	10-20	10-20	10-20
<i>Esterilización UHT (3 meses)</i>	2	10-20 ^{a,b}	20-50 ^a	30-100 ^b	20-50 ^b	30-100 ^b
<i>Esterilización en botella</i>	5-10	20-40	10-20	20-50	30-80	30-60

^a dependiendo de la exposición a la luz. ^b Dependiendo de la concentración de O₂

En los últimos años se ha investigado en alternativas a los tratamientos térmicos tradicionales, orientado a minimizar el impacto sobre el valor nutricional de la leche y al ahorro energético. Algunas de estas alternativas son el empleo de altas presiones hidrostáticas, la irradiación y la microfiltración.

El uso de altas presiones hidrostáticas (HHP): se basa en transmitir presiones altas al producto (de entre 100 y 1000 MPa) con el objetivo de reducir la población microbiana sin tener efectos significativos en el flavor o en componentes nutricionales. La inactivación microbiana causada por estas altas presiones hidrostáticas se debe a la desnaturalización de las enzimas y, a la modificación de la membrana y de la pared celular (De Lamo-Castellví et al., 2005).

Otro de los tratamientos empleados para inhibir crecimiento microbiano en leche es la irradiación, por la que se expone al alimento a radiaciones ionizantes a los alimentos de forma controlada. El mayor inconveniente de la irradiación es la aceptación por parte de los consumidores, los cuales perciben los alimentos irradiados como alimentos peligrosos y perjudiciales para la salud (Gunes y Tekin ,2006).

La microfiltración es otra de las técnicas estudiadas para la higienización de leche. Se trata del paso de producto a presión relativamente baja (a 1 bar aproximadamente) a través de una membrana semipermeable (normalmente de un material cerámico), con tamaño de poro entre 0,2 y 5 µm. Presenta la ventaja de que es capaz de retener a la mayoría de los microorganismos patógenos, y, que si se combina con alta temperatura es capaz de abaratar el coste energético, ya que para la esterilidad completa sería suficiente con un tratamiento térmico complementario de 115 °C durante 2 s, energéticamente más rentable que el tratamiento UHT convencional (135-150°C durante un tiempo inferior a 6 s, dependiendo de la temperatura empleada) (Fernández-García, 2012).

Estas tecnologías no se encuentran implementadas a nivel industrial, debido principalmente al elevado coste de inversión que requieren, tanto de equipos, como en nuevas instalaciones. Es por ello, que en la actualidad se continúa investigando en el desarrollo de nuevas tecnologías que garanticen la seguridad del producto con un menor coste de inversión y energético y con mayor aceptación por parte de los consumidores. En este sentido, el empleo de compuestos naturales con demostrada actividad

microbiana podrían ser una alternativa viable a los tratamientos de conservación de la leche convencionales.

1.4. Aceites esenciales y sus componentes bioactivos

Un tratamiento interesante para garantizar la seguridad de la leche y productos lácteos y prolongar su vida útil alternativo a los tratamientos térmicos podría ser la utilización de aceites esenciales o de sus compuestos bioactivos.

Los aceites esenciales son compuestos naturales, complejos y volátiles, que se forman en plantas aromáticas como metabolitos secundarios. Estos metabolitos son sintetizados por las plantas como estrategia de protección frente a bacterias, virus, hongos e insectos. Los aceites esenciales, así como sus componentes mayoritarios han sido empleados desde la antigüedad por sus propiedades antisépticas, medicinales, y por su fragancia. Su acción bactericida y fungicida, ha sido ampliamente investigada en diferentes ámbitos, como el médico y el agroalimentario (Bakkali et al., 2008).

Entre los componentes de aceites esenciales con aplicación en el área de la tecnología de alimentos destacan el eugenol, carvacrol, timol y cinamaldehído. El eugenol es un compuesto aromático fenólico, puede encontrarse mayoritariamente en el clavo (*Syzygium aromaticum* L.), de la familia botánica de las Myrtaceae. Su actividad antimicrobiana está vinculada con su capacidad para permeabilizar las membranas celulares e interactuar con las proteínas de membrana. Esta acción del eugenol ocurre principalmente por una permeabilización inespecífica, demostrándose ser la responsable del transporte de K⁺ y ATP fuera de las células (Gill y Holley, 2006a). La inhibición de la enzima ATPasa podría ser importante en su capacidad para matar células a concentraciones altas porque la generación de energía necesaria para su recuperación se ve perjudicada (Gill y Holley, 2006b).

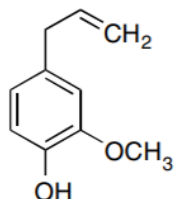


Figura 4. Molécula de Eugenol. Fuente: Bakkali et al. (2008).

En la actualidad, el uso de aceites esenciales y sus componentes está limitado en la industria alimentaria por su alta volatilidad, baja solubilidad en agua, impacto en las propiedades sensoriales del alimento, potencial toxicidad y fácil degradación (Ruíz-Rico et al., 2017).

1.5. Inmovilización de los EOC

Debido a las importantes limitaciones que presenta el uso de los aceites esenciales y los componentes de aceites esenciales (EOCs) en la industria alimentaria, se han propuesto nuevos modos de aplicación destinados a minimizar sus principales inconvenientes.

Una de las alternativas es la inmovilización de los compuestos de aceites esenciales en materiales inorgánicos mesoporosos, tales como sílice amorfa, MCM-41 y sílice pirogénica. La sílice amorfa es un aditivo alimentario (E-551), empleado como agente anti-aglomerante.

El anclaje covalente de estos EOC a estos soportes inorgánicos presenta una serie de ventajas respecto a la utilización de los compuestos libres. La principal ventaja de la inmovilización es que ha demostrado mejorar la estabilidad de los de los EOC, reducir su volatilidad y minimizar el impacto sensorial que supone el empleo de estas sustancias en los alimentos. (Ruíz-Rico et al., 2017). Además, el anclado de los EOCs a los soportes inorgánicos mantiene los grupos hidroxilos de los EOC libres, los cuales son los responsables de la actividad antimicrobiana de los EOCs.

En el presente estudio se ha trabajado en la utilización partículas de sílice funcionalizadas con eugenol.

Estudios previos del grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo, han investigado la viabilidad de estos soportes inorgánicos funcionalizados con EOCs como sistemas de filtración para eliminar microorganismos no deseados en algunos alimentos. En dichos estudios se ha evaluado la efectividad de estos sistemas de filtración sobre diferentes matrices alimentarias (Ruíz-Rico et al.,2021) evaluaron estos sistemas de filtración empleando vino blanco inoculado con *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus plantarum*, *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*, observando un reducción de 3 ciclos logarítmicos para los microorganismos evaluados y sin afectar a los parámetros fisicoquímicos del vino blanco. Otro estudio sobre estos soportes inorgánicos del mismo grupo de investigación evaluó estos sistemas de filtración empleando zumo de manzana inoculado con *Escherichia coli*, logrando una reducción de 5 ciclos logarítmicos sin un fuerte impacto en las características fisicoquímicas (Peña-Gómez et al., 2019).

2. Objetivos y plan de trabajo

2.1. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es evaluar la efectividad de nuevos sistemas antimicrobianos de filtración como estrategia para prevenir toxiinfecciones alimentarias provocadas por microorganismos esporulados en leche y productos lácteos.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la actividad antimicrobiana del eugenol para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* como microorganismo esporulado de referencia.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del eugenol inmovilizado en partículas de sílice amorfa como estrategia para inhibir el crecimiento de *B. subtilis*.
- Evaluar la efectividad del tratamiento de leche con eugenol inmovilizado en partículas de sílice amorfa para inhibir el crecimiento de *B. subtilis*.

2.2. Plan de trabajo

Para cumplir con los objetivos establecidos se elaboró el siguiente plan de trabajo:

1. Preparación y caracterización de los materiales antimicrobianos.
2. Estudio de la actividad antimicrobiana del eugenol sobre *B. subtilis* como microorganismo esporulado de referencia.
3. Estudio de la actividad antimicrobiana del eugenol inmovilizado en partículas de sílice sobre *B. subtilis*.
4. Estudio de la viabilidad del eugenol inmovilizado sobre el material filtrante para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* sobre leche.
5. Tratamiento de los datos.
6. Elaboración del informe final.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y equipos

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antimicrobiana del eugenol, suministrado al 99% (p/p) por la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España), inmovilizado sobre un soporte de sílice amorfa (tamaño de partícula medio de 50, 75 y 200 μm), suministrada también por la casa comercial Sigma-Aldrich (Madrid, España). En la Tabla 2 puede verse el rango de tamaño de partícula para cada tamaño de partícula medio.

Tabla 2. Rango de tamaño de partículas.

Tamaño medio de partícula (μm)	Tamaño mínimo (μm)	Tamaño máximo (μm)
50	30	75
75	50	110
200	150	250

Especificaciones dadas por el fabricante. (Sigma-Aldrich (Madrid, España)).

Los reactivos empleados para la funcionalización de las partículas de sílice con eugenol fueron trimetilamina, (3 Aminopropil)triétoxosilano (APTES), cloroformo, n-butanona, borohidruro sódico, vancomicina hidrocloreto y dimetilsulfóxido (DMSO) suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). También se utilizó acetonitrilo, HCl, MgSO_4 , KOH, H_2SO_4 e isopropanol suministrados por Scharlab S.A. (Barcelona, España).

Como microorganismo modelo se empleó *Bacillus subtilis* (CECT 461). La cepa fue suministrada liofilizada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, España), y recuperada según las instrucciones de la CECT.

Los medios de cultivo empleados en las determinaciones microbiológicas fueron : *Plate Count Agar* (PCA), *Brain Heart Infusion Broth* (BHI), *Mueller-Hinton Broth* (MHB) y agua de peptona tamponada, todos ellos suministrados por Scharlab S.A. (Barcelona, España).

La leche empleada en los ensayos fue Leche Desnatada UHT (Milbona, España).

En la Tabla 3 se muestra la relación de equipos empleados en los ensayos plasmados de ahora en adelante.

Tabla 3. Equipos utilizados en la realización de los ensayos.

Equipo	Casa comercial
Agitador magnético con calefacción J.P. Selecta modelo FB1 5001	J.P. Selecta S.A., Barcelona, España
Agitador vórtex para tubos de ensayo VWR modelo 444-1372	VWR, Leuven, Bélgica
Autoclave J.P. Selecta Pressoclave III Plus	J.P. Selecta S.A., Barcelona, España
Balanza Kern modelo EG 220-3NM	Kern & Sohn, Balingen, Alemania
Cabina de flujo laminar Telstar AH-100	Barcelona, España
Contador de colonias Interscience modelo Scan 100	Interscience, St. Nom, Francia
Estufa de incubación J.P. Selecta rango 0-80 °C con capacidad de 50 L	J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España
Analizador CHNOS VarioEI II	Elemental Analyses System GMHB, Langensbold, Alemania
Analizador de tamaño de partícula por difracción laser Mastersizer 2000	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido

3.2. Ensayos de susceptibilidad microbiana: ensayos in vitro

Se llevaron a cabo ensayos in vitro para estudiar la sensibilidad del *Bacillus subtilis* ante el eugenol libre. Para ello se siguió un método de macrodilución para la determinación de la sensibilidad microbiana, para obtener los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2015), con algunas modificaciones.

En estos ensayos se utilizó un rango alto de concentraciones de eugenol libre, establecidos inicialmente, a partir de los valores consultados en la bibliografía (Dorman y Deans, 2000; Jeyakumar y Lawrence, 2021; Barber et al., 2000).

A partir de los resultados obtenidos en las primeras experiencias se amplió el rango de concentraciones de eugenol. Las concentraciones ensayadas en estas pruebas se muestran en la tabla 4. Todas estas pruebas se realizaron por triplicado.

Tabla 4. Concentraciones de eugenol libre en los ensayos in vitro de susceptibilidad microbiana.

Ensayo	Concentración (µg/mL) eugenol libre
I	0,5-1-2-4
II	25-50-100-200-400
III	300-600-1200
IV	400-800-1600

La preparación de los inóculos se realizó mediante el método de suspensión directa de colonias. Para ello, se tomó una colonia de una placa de un cultivo puro de 24 h que, se transfirió a un tubo de ensayo con 10 mL del medio BHI. El tubo se agitó unos 10 s en el vórtex y se incubó a 37 °C durante 24 h, en condiciones aerobias.

Para la realización de la prueba se prepararon tubos con 5 mL de MHB estéril, con un 0,5 % de DMSO, y se inocularon con 50µL de inóculo. Para cada uno de los ensayos se preparó una disolución stock de eugenol del doble de la concentración más alta. Del stock de cada ensayo se pipetearon 5 mL a la concentración más alta de cada batería, y así sucesivamente hasta llegar a la concentración más baja. Todos estos tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. En esta prueba se empleó un control positivo (tubo de caldo MHB inoculado) y, dos controles negativos (un tubo con caldo MHB inoculado y con 20 mL de vancomicina hidrocloreuro y un tubo con caldo MHB sin inocular y la concentración más alta de eugenol). Los tubos se dejaron incubar a 37 °C durante 24 h, en condiciones aerobias.

Cuando finalizó el período de incubación, se prepararon diluciones decimales seriadas a partir de cada uno de los tubos empleando tubos de ensayo con 9 mL de agua de peptona tamponada. Estas diluciones se sembraron en superficie en placas de agar PCA y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Tras este período de incubación se procedió al recuento directo de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias.

3.3. Funcionalización de las partículas de sílice con eugenol

La funcionalización del eugenol comenzó con la creación de un derivado aldehídico del eugenol, para añadir un segundo grupo funcional, preservando así el grupo hidroxilo, que es responsable de la actividad antimicrobiana. Previamente, se tomaron 150 mL de agua, se calientan a 80 °C y se añadieron 3,3 mL de eugenol en un matraz de fondo redondo de 250 mL. El aldehído del eugenol se sintetizó siguiendo la reacción de ortoformilación de fenoles de Reimer-Tiemann. (Figura 5). Esta reacción se produjo mediante la adición de cloroformo en un medio básico fuerte proporcionado por el KOH. El cloroformo se añadió a razón de 1 mL/h durante 7 h. Una vez añadidos los 7 mL se deja a 60 °C durante toda la noche, en agitación suave empleando un agitador magnético.

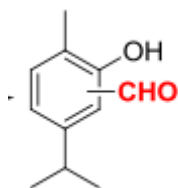


Figura 5. Derivado aldehídico del eugenol obtenido tras la primera parte del proceso. Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).

A continuación, la disolución se acidificó el medio con H₂SO₄ al 10% (v/v), hasta que alcanzó un pH de 2-3. La acidificación permite la separación de la fase orgánica y la inorgánica. Seguidamente, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con butanona, mediante la adición y posterior separación de la fase orgánica. La fase orgánica recogida se lavó y se volvió a separar empleando una disolución saturada de NaCl para eliminar los restos de H₂O que pudieran quedar.

La butanona se extrajo mediante destilación a vacío mediante el uso de un equipo evaporador rotativo.

Tras la extracción de la butanona, se recogió el producto obtenido, al que, se le añadió isopropanol como disolvente y APTES, dejando una hora a reflujo a 60 °C para la

reacción del grupo funcional aldehído, creando el derivado alcoxisílico del eugenol. (Figura 6).

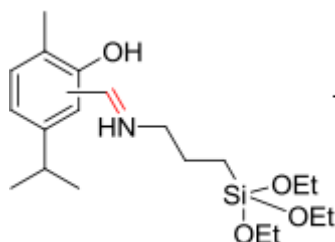


Figura 6. Derivado alcoxisílico del eugenol. Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).

Tras este paso, se procedió al anclado del derivado alcoxisílico a la sílice amorfa (Figura 7). Para ello, a la disolución anterior se añadió la sílice amorfa e isopropanol, manteniendo en agitación constante durante 4 h.

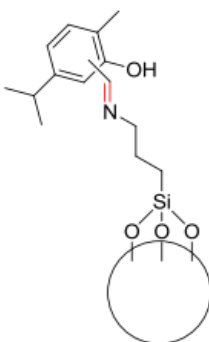


Figura 7. Partícula de sílice amorfa funcionalizada con eugenol Fuente: Ruíz-Rico et al. (2017).

Finalmente, se procedió al lavado del material con isopropanol y agua desionizada, centrifugando y retirando el sobrenadante hasta que el sobrenadante fuese incoloro. El material obtenido se dejó secar en una estufa de vacío a temperatura ambiente.

3.4. Caracterización de los materiales funcionalizados

La caracterización de los materiales obtenidos se llevó a cabo mediante: análisis de la distribución del tamaño de partícula mediante difracción láser, determinación del potencial zeta a través del cálculo de la movilidad electroforética, y análisis elemental para determinar la cantidad de eugenol anclado por cada gramo de partícula.

La determinación de la distribución del tamaño de partícula se llevó a cabo empleando un analizador de tamaño de partícula por difracción láser Mastersizer 2000 combinando información de dispersión de luz (LS) y de dispersión diferencial de intensidad polarizada (PIDS). El equipo mide los índices de difracción de las partículas, que son dependientes del tamaño de estas. Las muestras se diluyeron en agua desionizada, y fueron sonicadas durante 2 minutos en un baño de ultrasonidos para evitar la formación de agregados que interfiriese en la medida. Se trataron los resultados con ayuda del software proporcionado por Malvern Instruments Ltd, Mastersizer 2000.

Las medidas de potencial zeta (ζ) de las partículas sólidas se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZS a 25 °C. El Zetasizer Nano ZS calcula la movilidad

electroforética de las partículas para medir el potencial Z, que mide la magnitud de repulsión o atracción entre ellas. Las muestras se prepararon en agua desionizada con una concentración de 1 mg/mL, y fueron sonicadas en un baño de ultrasonidos durante 2 min para evitar la formación de agregados. Se tomaron 3 mL de cada muestra y se repitieron 3 veces, calculando el valor promedio.

Para el cálculo del rendimiento de la funcionalización de los materiales, se llevó a cabo el análisis elemental (C,H O y N) de las partículas obtenidas. Esta determinación se realizó mediante un análisis de combustión en un analizador CHNOS Vario El II.

3.5 Estudio de la efectividad de los materiales diseñados: ensayos in vivo

La evaluación de la efectividad de las partículas funcionalizadas con eugenol como estrategia de conservación realizó a cabo mediante diferentes pruebas. En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo preliminar donde se analizaron las condiciones de aplicación del tratamiento y la optimización del montaje experimental. Este ensayo permitió realizar una aproximación a las condiciones más adecuadas para la realización de las pruebas definitivas. A continuación, se evaluó la actividad antimicrobiana de las partículas inmovilizadas con eugenol empleando leche desnatada, completando el estudio con una última experiencia para comprobar la efectividad del tratamiento bajo las condiciones más interesantes.

El inóculo se preparó mediante el método de suspensión directa de colonia descrito anteriormente. La leche se inoculó hasta llegar a una concentración de 10^5 UFC/mL de *B. subtilis*.

3.5.1. Ensayo preliminar

Se realizó una experiencia para evaluar el efecto de las partículas sobre el crecimiento microbiano a tiempos cortos de exposición. Tal y como se ha comentado anteriormente, este ensayo previo se diseñó con el objetivo de establecer las condiciones de aplicación del tratamiento y la optimización del montaje experimental.

En este ensayo se evaluó la efectividad de las partículas funcionalizadas de tamaño medio de 50 μm , empleando como control positivo leche inoculada con *B. subtilis* sin partículas y un control negativo con la leche sin inocular. Asimismo, se incluyó en esta prueba una muestra de leche inoculada con estas mismas partículas sin funcionalizar, con el objetivo de discriminar si el posible efecto antimicrobiana era debido al compuesto anclado a la superficie de la partícula o a cualquier otro fenómeno físico y/o interacción de la propia partícula con el microorganismo de interés.

Este ensayo se llevó a cabo en viales estériles con 0,25 g de partículas y 15 mL de leche inoculada con *B. subtilis* con una carga microbiana final en el producto de 10^5 UFC/mL. Los viales con leche y partículas se mantuvieron en agitación constante en un incubador a 37 °C, siendo los tiempos de tratamiento evaluados 5, 15 y 30 min. Se prepararon también un vial control positivo (leche sin partículas) y un control negativo (leche sin inocular) para cada uno de los tiempos de tratamiento analizados. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Finalizado el tiempo de exposición, las muestras se filtraron mediante la aplicación de presiones positivas. Para ello, se introdujo la leche contenida en cada vial en una jeringa estéril acoplada a un filtro de nylon con un tamaño de poro de 1,2 μm . Aplicando la presión sobre el émbolo de la jeringa, se hizo pasar todo el contenido del vial, recogiendo la muestra en otro vial estéril. El tamaño de poro del filtro se seleccionó con el objetivo de retener únicamente las partículas disueltas en la leche, pero sin retener el microorganismo inoculado.

Finalizada la filtración, se realizó el análisis microbiológico de todas las muestras filtradas. Las muestras control no se filtraron.

3.5.2 Evaluación de la actividad microbiana del eugenol libre en leche.

Se evaluó la capacidad del eugenol libre para inhibir el crecimiento de *B. subtilis* en la matriz alimentaria seleccionada. Las concentraciones de eugenol evaluadas fueron 600, 1200 y 2400 µg/mL, y los tiempos de exposición del microorganismo a los compuesto activo fueron 1, 2, 4, 6 y 24 h. Estos valores de concentración fueron seleccionados a partir del ensayo in vitro realizado con eugenol libre.

Para la preparación de los viales se preparó una disolución stock de eugenol a una concentración de 10 mg/mL, en la que se añadió también DMSO para lograr la completa disolución del eugenol en la leche. Esta disolución stock se empleó para la preparación de las disoluciones finales ensayadas.

Los viales de leche con eugenol se inocularon hasta una concentración de *B. subtilis* de 10⁶ UFC/mL. Asimismo, se establecieron dos muestras control, un control positivo con leche inoculada sin eugenol, y otro control negativo con leche sin inocular.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, a partir de cada una de las muestras de leche se realizó una siembra en superficie en agar PCA. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

3.5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana del eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa

Esta experiencia se diseñó con el objetivo de estudiar la actividad antimicrobiana de las partículas funcionalizadas con eugenol para inhibir el crecimiento de *B. subtilis*.

Esta fase del trabajo se realizó en dos fases, en una primera fase se evaluó la efectividad del tratamiento con eugenol inmovilizado para alcanzar el objetivo de 5 ciclos logarítmicos de reducción bacteriana y en una segunda fase para evaluar el porcentaje de inhibición bacteriana alcanzada por los tratamientos más efectivos.

Las concentraciones de eugenol inmovilizado fueron las misma consideradas en el ensayo anterior (600, 1200 y 2400 µg/mL) y los tiempos de exposición del microorganismo a los compuesto activo fueron 1, 2, 4, 6 y 24 h.

Las condiciones de inoculación y la carga microbiana establecidas en este ensayo también fueron las mismas descritas en el ensayo realizado con eugenol libre.

Tabla 5. Diseño del ensayo con eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa.

Muestra	Tamaño partículas (µm)	Concentración de eugenol (µg/mL)
50-600	50	600
50-1200	50	1200
50-2400	50	2400
75-600	75	600
75-1200	75	1200
75-2400	75	2400
200-600	200	600
200-1200	200	1200
200-2400	200	2400
C+	-	0
C-	-	0
C 50	50	2400
C 75	75	2400
C 200	200	2400

A partir de los resultados obtenidos en la prueba anterior, se realizó una segunda experiencia para determinar el porcentaje de inhibición de *B. subtilis* en la matriz alimentaria.

La experiencia se diseñó considerando solamente la concentración más alta de eugenol evaluada en la fase anterior (2400 µg/mL), con los tres tamaños de partícula y manteniendo como tiempos de exposición 4, 6 y 24 horas. Se establecieron tres controles, un control positivo con la leche inoculada sin partículas, un control negativo con la leche sin inocular y un control negativo con las partículas a la máxima concentración estudiada. En la Tabla 6 se puede ver un resumen del diseño de la experiencia.

Tabla 6. Diseño experimental para evaluar la inhibición del crecimiento microbiano.

Muestra	Tamaño partículas (µm)	Concentración de eugenol (µg/mL)
50-2400	50	2400
75-2400	75	2400
200-2400	200	2400
C+	-	0
C-	-	0
C 50	50	2400
C 75	75	2400
C 200	200	2400

4. Resultados y discusión

4.1. Ensayo de susceptibilidad microbiana: ensayos in vitro

Se trabajó para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del eugenol frente a *B. subtilis*. Con el objetivo de establecer el rango de concentraciones a evaluar se realizó una revisión bibliográfica sobre la actividad antimicrobiana del eugenol. En la bibliografía se encontró una gran variabilidad respecto a los valores de una CMI del eugenol frente a *B. subtilis* desde 0,5 µg/mL (Jeyakumar et al., 2021) hasta 660 µg/mL (Barber et al., 2000). En otros estudios realizados empleando como microorganismos diana bacterias patógenas presentes en los alimentos se han obtenido valores de CMI para el eugenol mayores, siendo estos iguales a 500 µg/mL para *Salmonella typhimurium*, de 1000 µg/mL para *Escherichia coli*, y también de 1000 µg/mL para *Listeria monocytogenes* (Kim et al., 1995).

El eugenol también ha sido empleado por sus propiedades fungicidas, estableciendo valores CMI de entre 350 y 500 µg/mL, para la mayoría de los hongos que producen alteraciones en los alimentos y patógenos (Abbaszadeh et al., 2014).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se muestran en la Tabla 7. donde puede observarse la reducción logarítmica de los distintos tratamientos

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que concentraciones de eugenol inferiores a 400 µg/mL no afectaron al crecimiento de *B. subtilis*, ya que en el rango de concentración ente 0,5 a 400 µg/mL no hubo ninguna inhibición significativa del crecimiento respecto al control positivo del ensayo (datos no mostrados).

Tabla 7. Efecto de las concentraciones en el crecimiento de *B. subtilis* in vitro

Concentración eugenol (µg/mL)	Control positivo (UFC/mL)	Tratamiento (UFC/mL)	Reducción logarítmica
600	2,93E+07	70	5,62
600	5,62E+08	<10	7,75
600	5,62E+08	<10	7,75
800	2,93E+07	80	5,56
800	5,62E+08	<10	7,75
800	5,62E+08	<10	7,75
1200	2,93E+07	90	5,51
1600	2,93E+07	180	5,21

Se logró una inhibición de, al menos, cinco ciclos logarítmicos con las concentraciones a partir de 600 µg/mL de eugenol libre frente al crecimiento respecto del control positivo.

Se observó que a las concentraciones ensayadas más altas (1200 y 1600 µg/mL) se produce una reducción menor. Esto es debido a que el efecto bactericida del eugenol no sigue una relación estrictamente lineal, llega un punto en el que a más concentración no se consigue un efecto mejor si no que la población se mantiene constante.

A partir de los resultados obtenidos, se consideró un valor de CMI igual a 600 µg/mL, considerando esta concentración el punto de partida de los ensayos posteriores sobre la matriz alimentaria.

4.2. Caracterización de los materiales funcionalizados

Los materiales funcionalizados se caracterizaron mediante tres técnicas analíticas, la distribución del tamaño de las partículas, el potencial zeta (ζ), y un análisis elemental de C, N y H.

Aunque las especificaciones técnicas de las partículas de sílice amorfa dadas por el fabricante incluían el rango de tamaño y un tamaño medio de este material, es necesario conocer exactamente la distribución de las partículas, ya que las partículas pueden distribuirse de manera mono o polidispersa en el medio dependiendo de su estabilidad, que a la vez depende de la distribución del tamaño de partícula.

Cuando todas las partículas presentan un tamaño igual o similar se consideran monodispersas, aunque si tienen tamaños dispares se consideran polidispersas. La distribución del tamaño de partícula ayudará a predecir el comportamiento de agregación de las partículas, cuando se encuentren en dispersión.

En la Tabla 8 se muestran los valores de tamaños de partículas medios ponderados respecto al volumen que ocupan por tipo de partículas, así como su percentil 10, 50 y 90.

Tabla 8. Tamaños medios ponderados respecto al volumen y percentiles para las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.

Partícula	Media ponderada volumen (μm)	Percentil 10 (μm)	Percentil 50 (μm)	Percentil 90 (μm)
50 sin funcionalizar	57,77	25,57	57,32	91,26
50 funcionalizada	66,38	35,31	67,35	94,89
75 sin funcionalizar	101,47	71,88	98,42	135,72
75 funcionalizada	102,07	72,27	98,99	135,93
200 sin funcionalizar	236,40	162,56	228,82	320,67
200 funcionalizada	233,00	154,37	224,26	324,03

Los resultados muestran pequeñas diferencias entre las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar respecto de la distribución del tamaño para las de 50 μm . Las distribuciones de los tamaños de partícula para las partículas de 75 y 200 μm son prácticamente idénticos para la partícula funcionalizada y sin funcionalizar, En las próximas figuras se compara la distribución de los tamaños en partícula entre las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar de los distintos tamaños (Figuras 8 a 10).

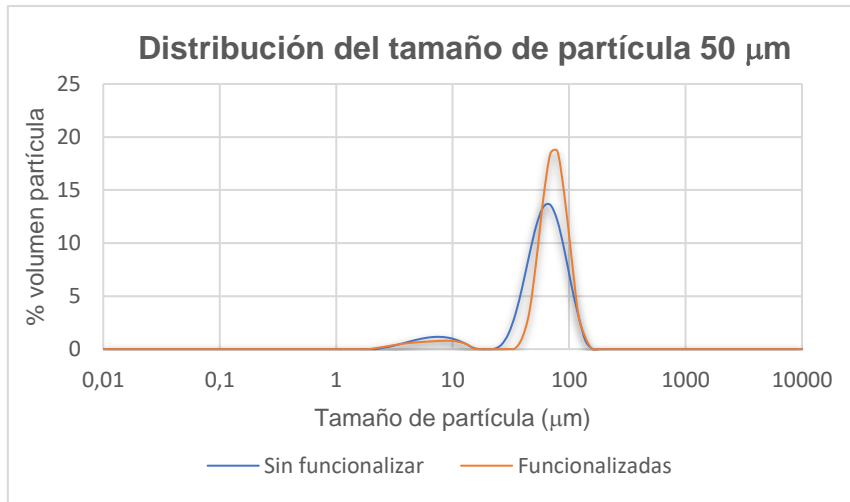


Figura 8. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 50 µm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.

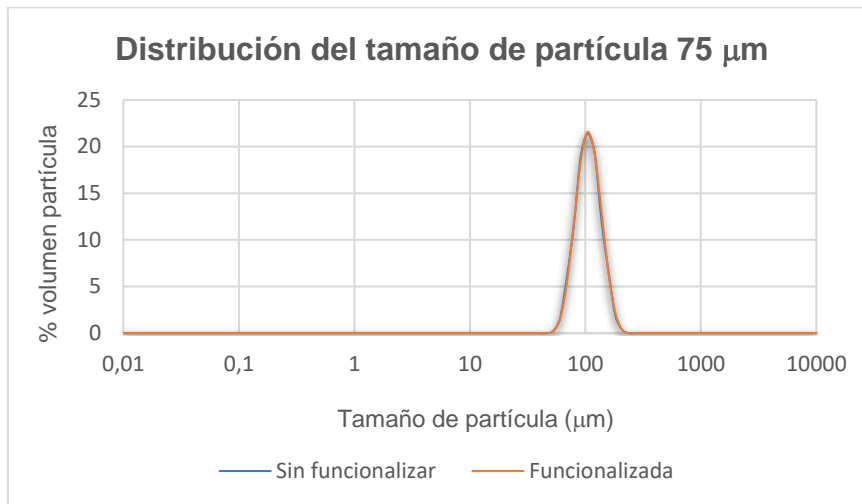


Figura 9. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 75 µm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.

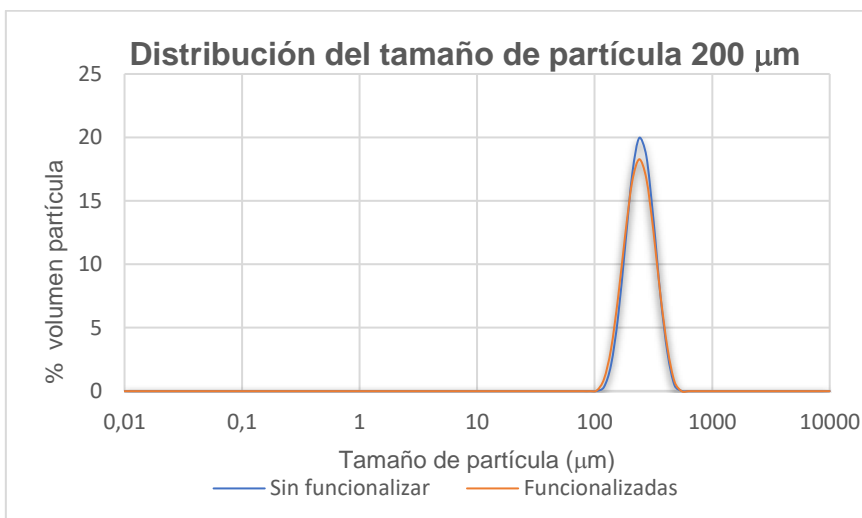


Figura 10. Comparación de la distribución del tamaño de partícula de 200 µm entre partículas funcionalizadas y sin funcionalizar.

En cada una de las seis distribuciones diferentes, al tener la mayoría de las partículas un tamaño similar pueden considerarse monodispersas, con poca tendencia a la formación de agregados debido a los diferentes tamaños de partícula presente en la muestra.

El potencial zeta (ζ) mide el grado de atracción o repulsión entre las partículas. Se midió el potencial zeta (ζ) de las partículas de los diferentes tamaños tanto funcionalizadas como sin funcionalizar. En la Tabla 9, se muestra, a modo de resumen el potencial zeta (ζ) de las distintas partículas de diferentes tamaños.

Tabla 9. Potencial zeta (ζ) de las diferentes partículas de diferentes tamaños.

Partícula	Potencial zeta (ζ) (mV)
50 μm sin funcionalizar	-26,38 \pm 2,67
50 μm funcionalizada	-10,06 \pm 2,02
75 μm sin funcionalizar	-25,62 \pm 1,26
75 μm funcionalizada	-17,93 \pm 1,09
200 μm sin funcionalizar	-20,79 \pm 1,51
200 μm funcionalizada	-14,81 \pm 1,93

Respecto a este parámetro es interesante destacar que cuando el valor zeta está contenido dentro del límite arbitrario establecido entre -30 y +30 mV, se considera que eléctricamente podrá formar dispersiones inestables, ligeramente cargadas. Mientras que, si está fuera de este rango se considera que formará dispersiones estables, con superficies altamente cargadas. Al encontrarse todos los resultados dentro de este rango de valores no se formarán dispersiones estables debido a la atracción o repulsión entre la superficie de las partículas.

Finalmente, con el objetivo de establecer el rendimiento de la funcionalización, se recurrió al análisis elemental de todos los materiales funcionalizados. Esta determinación era necesaria para calcular la cantidad exacta de partícula para alcanzar la concentración deseada. Los resultados de esta determinación instrumental se encuentran en la Tabla 10.

Tabla 10. Determinación del porcentaje en C, N y H de las muestras de diferentes tamaños medios.

Tamaño de partícula (μm)	N (%)	C (%)	H (%)
50	0,445 \pm 0,021	4,690 \pm 0,863	1,180 \pm 0,184
75	0,330 \pm 0,000	5,120 \pm 0,184	1,390 \pm 0,042
200	0,295 \pm 0,007	4,895 \pm 0,799	1,340 \pm 0,198

Para calcular la concentración de eugenol en las partículas, se trabajaron los valores promedio estequiométricamente. La cantidad de eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa, fue similar en todas las partículas, independientemente del tamaño con valores que oscilaron entre 0,0373 y 0,0450 g eugenol/g partícula, (Tabla 11). Estos resultados se encuentran dentro del rango de concentración obtenido en otros estudios

donde se ha evaluado el rendimiento de la inmovilización de eugenol en partículas de sílice amorfa. Los valores mostrados en estos trabajos oscilan entre 0,0358 (Peña-Gómez et al., 2019) y 0,086 g eugenol/ g partícula (Ruíz-Rico et al., 2021).

Tabla 11. Cantidad de eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa.

Tamaño de partícula (µm)	Cantidad eugenol inmovilizado (mmol EOC / g)	Cantidad eugenol inmovilizado (g EOC/ g)
50	0,2273 ± 0,0588	0,0373 ± 0,0097
75	0,2738 ± 0,0117	0,0450 ± 0,0019
200	0,2652 ± 0,0524	0,0435 ± 0,0086

Estos datos fueron utilizados para la preparación de las muestras del ensayo de la actividad antimicrobiana de eugenol inmovilizado (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración de partículas equivalente frente a concentración de eugenol.

Tamaño de partícula (µm)	Concentración de eugenol (µg/mL)	Concentración de partículas (mg/mL)
50	600	16,2
50	1200	32,4
50	2400	64,9
75	600	13,3
75	1200	26,7
75	2400	53,3
200	600	13,8
200	1200	27,6
200	2400	55,2

4.3. Estudio de la efectividad de los materiales diseñados: ensayos in vivo

Para evaluar la efectividad de los materiales diseñados, se llevaron a cabo tres ensayos. En el ensayo preliminar se analizaron las condiciones de aplicación del tratamiento y la optimización del montaje experimental. Un segundo ensayo para evaluar la capacidad bactericida de los materiales diseñados y del eugenol libre, estableciendo como objetivo una reducción de cinco unidades logarítmicas, y un último ensayo para evaluar la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* a la concentración más alta de eugenol inmovilizado en las partículas.

4.3.1. Ensayo preliminar

Este ensayo se efectuó para evaluar el efecto de las partículas sobre el crecimiento microbiano a tiempos cortos de exposición, manteniéndose en contacto mediante agitación. Posteriormente, se hizo pasar a la muestra por un filtro que retuvo a las partículas con el objetivo de separar el agente antimicrobiano de la matriz alimentaria, simulando su posible aplicación a nivel industrial.

Los resultados de los recuentos de los diferentes tratamientos aplicados se muestran en la Tabla 13. En el tubo control negativo (leche sin inocular) no se apreció crecimiento en ninguna dilución.

Tabla 13. Resultados del ensayo preliminar.

Tratamiento	Tiempo (min)	UFC/mL
Control positivo	30	5,0E+05
Sin funcionalizar	30	1,9E+05
Funcionalizada	5	1,9E+05
Funcionalizada	15	1,5E+05
Funcionalizada	30	6,5E+05

En las muestras de leche inoculada sin partículas se llegó a una concentración bacteriana de 5×10^5 UFC/mL, no observándose ningún efecto de las partículas respecto del control positivo. Estos resultados evidenciarían que el tratamiento aplicado no fue efectivo para alcanzar el objetivo establecido.

A partir de los resultados obtenidos en este ensayo se decidió, en los ensayos posteriores, establecer tiempos de exposición a las partículas más largos y no emplear la filtración previa al análisis microbiológico, ya que tras unos segundos de detenerse la agitación se observó que prácticamente la totalidad de las partículas habían precipitado en el vial. El hecho de evitar la filtración permitía reducir la manipulación de la muestra, con la consiguiente agilización del tratamiento y la reducción en el riesgo de una posible contaminación del producto.

4.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana del eugenol libre

El ensayo de la actividad antimicrobiana del eugenol libre sobre la matriz alimentaria sirvió para evaluar el efecto de la matriz alimentaria sobre la efectividad del eugenol. Se estableció como objetivo de este ensayo alcanzar una reducción de 5 unidades logarítmicas. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 14. Las muestras con las concentraciones de eugenol de 600 y 1200 $\mu\text{g/mL}$ en cada uno de los tiempos estudiados, y las de 2400 $\mu\text{g/mL}$ para los tiempos de 1, 2 y 4 horas, mostraron un número incontable de colonias ($>3,5$ log UFC/mL), evidenciando que estas concentraciones no fueron efectivas para validar la hipótesis de partida (reducción de carga microbiana en 5 ciclos logarítmicos).

Tabla 14. Resultados de la evaluación de actividad microbiana del eugenol libre.

Tratamiento	Tiempo (h)	Concentración eugenol ($\mu\text{g/mL}$)	UFC / mL	log (UFC/mL)
C+ 1h	1	0	1,54E+07	7,19
C+ 2h	2	0	2,55E+07	7,41
C+ 4h	4	0	2,13E+07	7,33
C+ 6h	6	0	1,66E+08	8,22
C+ 24h	24	0	1,14E+08	8,06
2400 6h	6	2400	70	1,85
2400 24 h	24	2400	55	1,74

En la tabla de resultados se aprecia que el eugenol libre en la concentración más alta inhibe el crecimiento de *B. subtilis* respecto de su crecimiento en ausencia del eugenol libre. A partir de las 6 h se observa una inhibición del crecimiento para la concentración de 2400 $\mu\text{g/mL}$, a pesar de que la CMI in vitro era de 600 $\mu\text{g/mL}$, al interactuar con la

matriz alimentaria la capacidad antimicrobiana del eugenol se ve perjudicada, y, por tanto, la concentración del compuesto libre requerida es superior (Hyltdgaard et al., 2012). Esta inhibición del crecimiento es, respecto del control positivo de, al menos, 6 concentraciones logarítmicas. Para tiempos inferiores la misma cantidad de eugenol no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento microbiano. Esto podría ser debido a que, hasta las 4 h de exposición las células se encuentran en fase de latencia, y, por ello, en un estado metabólica en la que el antimicrobiano no es capaz de inactivarlas (Chesney, 1916). Esta hipótesis parece confirmarse al observar el crecimiento microbiano de la muestra empleada como control positivo, donde hasta las 4 h se mantiene estable, con un ligero crecimiento, pero a las 6 h comienza a observarse un crecimiento exponencial.

Transcurrido el período de latencia, estas células se activan y entran en la fase de crecimiento exponencial, y su mayor actividad metabólica las hace más sensibles a cualquier cambio en su entorno, en este caso, la elevada concentración de eugenol (Buchanan, 1918).

4.3.3. Evaluación de la actividad microbiana del eugenol inmovilizado en partículas de sílice amorfa

El ensayo de la evaluación de la actividad microbiana del eugenol inmovilizado en las partículas de sílice amorfa sirvió para estudiar la eficacia del tratamiento de conservación en un alimento líquido, en este caso leche desnatada. Al igual que el caso anterior, el objetivo de este ensayo era lograr una reducción de 5 unidades logarítmicas de *B. subtilis*.

Se evaluó este efecto con los tres tamaños de partícula estudiados: 50 , 75 y 200 μm . Este ensayo se llevó a cabo en tres días distintos, por lo que, para cada día, se prepararon controles nuevos. Cada día se ensayó con un tamaño de partícula distinto. En los controles negativos no se apreció crecimiento microbiano.

A pesar de que diferentes estudios han establecido que la inmovilización permite reducir la concentración necesaria para inhibir el crecimiento microbiano respecto a el compuesto libre (Chen et al., 2009), la interacción con la matriz del alimento es compleja y difiere de un medio de cultivo estandarizado. La interacción de los aceites esenciales hidrofóbicos con la matriz alimentaria podría verse afectada por las grasas, el almidón y las proteínas, por lo que, debido a la interacción con la matriz del alimento, para alcanzar los mismos valores de inhibición, podrían ser necesarias concentraciones superiores a las obtenidas en el ensayo in vitro (Hyltdgaard et al., 2012). Debido a este efecto matriz se consideró una concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eugenol como la concentración de partida, siendo las concentraciones de eugenol empleadas de 600, 1200 y 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y los tiempos de exposición de 1, 2, 4, 6 y 24 horas.

Tras el tratamiento, todas las muestras presentaron crecimiento de *B. subtilis*, superando el límite de recuento en la siembra directa de la muestra ($>3,5$ log UFC/mL).

Este resultado, podría confirmar el efecto negativo que supone la interacción de los compuestos de la leche y el compuesto bioactivo, o debido a las características hidrófobas del eugenol en la matriz acuosa.

El control negativo de las partículas en la leche sin inocular mostró presencia de microorganismos en las partículas inmovilizadas con una concentración de 10 UFC/mL en las partículas de 50 μm , 2700 UFC/mL en las de 75 μm , y presencia de microorganismos por encima del límite de recuento en la siembra directa para el caso

de las partículas de 200 µm. El crecimiento de los controles positivos se observa en la Tabla 15 a modo de resumen.

Tabla 15. Crecimiento de los controles positivos del ensayo.

Muestra	Tamaño de partícula (µm)	Tiempo (h)	Leche inoculada (UFC/mL)	Recuento (UFC/mL)	Recuento (log UFC/mL)
50C+t1	50	1	2,99E+06	1,96E+07	7,29
50C+t2	50	2	2,99E+06	3,00E+07	7,48
50C+t3	50	4	2,99E+06	4,26E+08	8,63
50C+t4	50	6	2,99E+06	2,20E+08	8,34
50C+t5	50	24	2,99E+06	2,43E+08	8,39
75C+t1	75	1	1,41E+06	1,90E+06	6,28
75C+t2	75	2	1,41E+06	8,70E+06	6,94
75C+t3	75	4	1,41E+06	2,76E+08	8,44
75C+t4	75	6	1,41E+06	3,58E+08	8,55
75C+t5	75	24	1,41E+06	2,86E+08	8,46
200C+t1	200	1	6,90E+06	3,90E+06	6,59
200C+t2	200	2	6,90E+06	1,09E+07	7,04
200C+t3	200	4	6,90E+06	6,20E+07	7,79
200C+t4	200	6	6,90E+06	2,87E+08	8,46
200C+t5	200	24	6,90E+06	3,18E+08	8,50

La segunda parte de la evaluación de la actividad microbiana del eugenol inmovilizado se diseñó tras apreciar en el ensayo anterior que ninguna concentración en ninguno de los tiempos era capaz de disminuir el crecimiento en 5 ciclos logarítmicos.

Se diseñó esta experiencia con el objetivo de evidenciar una posible inhibición del crecimiento de *B. subtilis* en contacto con los materiales diseñados a una concentración de 2400 µg/mL en cada uno de los diferentes tratamientos (tiempos de exposición). En el control negativo con la leche sin inocular y sin partículas no se observó crecimiento microbiano. Los resultados de este ensayo se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados de la evaluación de la inhibición de *B. subtilis* con eugenol inmovilizado.

Código de muestra	Tiempo (h)	Tamaño partícula (µm)	Recuento (UFC/mL)	log (UFC/mL)
C+ 4h	4	-	3,20E+07	7,56
50 4h	4	50	4,70E+06	6,67
75 4h	4	75	3,98E+05	5,60
200 4h	4	200	4,00E+05	5,60
C+ 6h	6	-	4,80E+07	7,68
50 6h	6	50	2,15E+07	7,33
75 6h	6	75	7,40E+05	5,87
200 6h	6	200	2,24E+05	5,35
C+ 24h	24	-	1,14E+08	8,06
50 24h	24	50	1,93E+07	7,29
75 24h	24	75	1,65E+06	6,22
200 24h	24	200	2,26E+06	6,35

Si se compara cada tratamiento con el control positivo sin partículas correspondiente se ve una inhibición de crecimiento. La inhibición de crecimiento más alta corresponde al tratamiento de 24 h con el tamaño de partícula de 200 μm , con una reducción de 2,3 unidades logarítmicas. La inhibición de crecimiento más baja corresponde al tratamiento de 6 h con las partículas de 50 μm , correspondiente a 0,35 unidades logarítmicas.

En vista de estos resultados, las partículas de 75 y de 200 μm presentan un comportamiento bacteriostático, aunque no bactericida. Estos resultados podrían indicar que la exposición de *B. subtilis* a las partículas funcionalizadas con eugenol provocaría una prolongación de la fase de latencia, no observándose una reducción de la concentración bacteriana final. Las partículas de 50 μm presentan una pequeña inhibición del crecimiento respecto del control positivo (Figura 11).

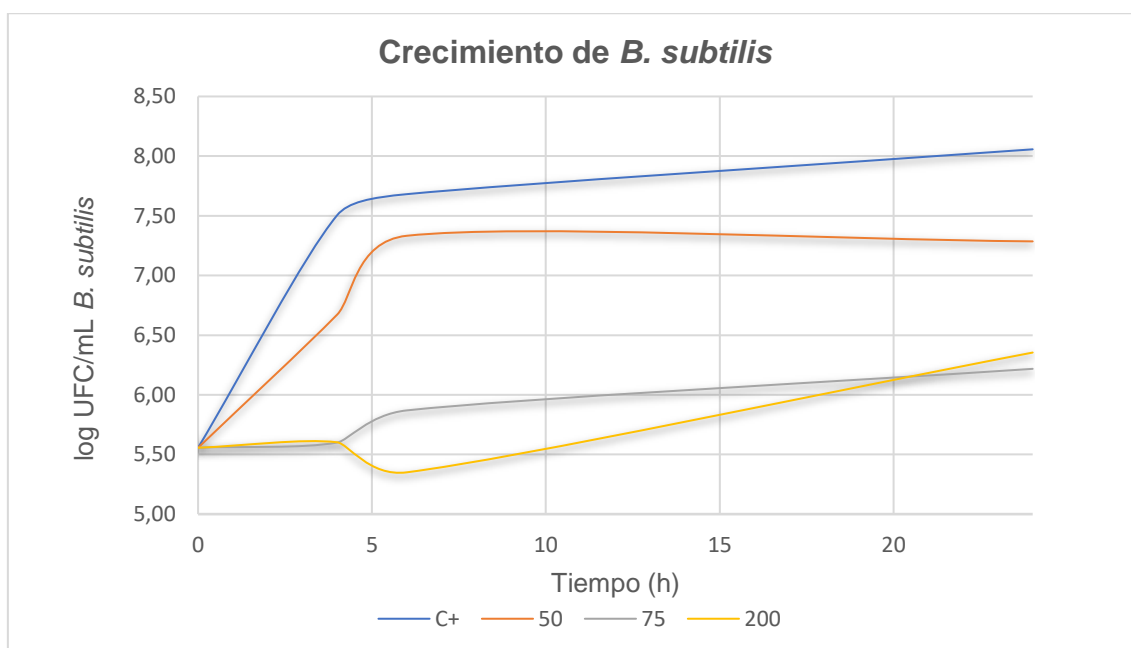


Figura 11. Comparación de crecimiento de *B. subtilis* con los distintos tratamientos del ensayo.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- La caracterización de las partículas ha evidenciado que el proceso de inmovilización fue correcto y el rendimiento de la funcionalización satisfactorio, independientemente del tamaño de partícula.
- El eugenol libre ha demostrado poseer efecto antimicrobiano frente a *B. subtilis*, microorganismo termorresistente seleccionado como modelo.
- Cuando el eugenol libre es empleado como agente antimicrobiano en la matriz alimentaria, los valores de su Concentración Mínima Inhibitoria aumentan, precisando una mayor concentración del compuesto bioactivo para alcanzar la misma efectividad que en el ensayo in vitro, debido a que la matriz analizada tiene un importante efecto protector de las bacterias inoculadas frente al agente antimicrobiano.
- La inmovilización del eugenol sobre partículas de sílice no mejora la capacidad antimicrobiana del compuesto libre.
- El eugenol inmovilizado sobre las partículas de 75 y 200 μm ha mostrado poseer cierto comportamiento bacteriostático, prolongando la fase de latencia del microorganismo expuesto.
- Ninguno de los tratamientos evaluados en el presente trabajo ha sido letal a las concentraciones y tiempos de estudio.
- El presente trabajo constituye una etapa inicial en el desarrollo de un sistema de filtración basado en el uso de partículas de óxido de silicio funcionalizadas con eugenol para inhibir el crecimiento de bacterias termorresistentes en leche y productos lácteos.

6. Referencias bibliográficas

- ABBASZADEH, S., SHARIFZADEH, A., SHOKRI, H., KHOSRAVI, A. R., & ABBASZADEH, A. (2014). *Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi*. *Journal de mycologie medicale*, 24(2), e51-e56.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M. (2008). *Biological effects of essential oils—a review*. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- BARBER, M. S., MCCONNELL, V. S., & DECAUX, B. S. (2000). *Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways*. *Phytochemistry*, 54(1), 53-56.
- BECKER, H., SCHALLER, G., VON WIESE, W., & TERPLAN, G. (1994). *Bacillus cereus in infant foods and dried milk products*. *International journal of food microbiology*, 23(1), 1-15.
- BLANCO (2010). *La productora de leche de calidad en origen: ¿ cómo se trabaja en las explotaciones de bovino lechero?* . *Frisona española*, 30(178), 106-111.
- BUCHANAN, R. E. (1918). *Life phases in a bacterial culture*. *The Journal of Infectious Diseases*, 109-125.
- BUEHNER, K. P., ANAND, S., & DJIRA, G. D. (2015). *Prevalence of thermophilic bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin*. *Journal of dairy science*, 98(5), 2861-2866.
- BURT, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- BURT, S. A., VLIELANDER, R., HAAGSMAN, H. P., & VELDHUIZEN, E. J. (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.
- CHANG, Y., XIE, Q., YANG, J., MA, L., & FENG, H. (2021). *The prevalence and characterization of Bacillus cereus isolated from raw and pasteurized buffalo milk in southwestern China*. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 3980-3989.
- CHEN, F., SHI, Z., NEOH, K. G., & KANG, E. T. (2009). *Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles*. *Biotechnology and bioengineering*, 104(1), 30-39.
- CHESNEY, A. M. (1916). *The latent period in the growth of bacteria*. *The Journal of experimental medicine*, 24(4), 387-418.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2015). *M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*.
- COMISIÓN EUROPEA. (2000). *Libro blanco sobre seguridad alimentaria*. Bruselas.
- DE LAMO-CASTELLVÍ, S., CAPELLAS, M., LÓPEZ-PEDEMONTE, T., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M., GUAMIS, B., & ROIG-SAGUÉS, A. X. (2005). *4.2 Behavior of Yersinia enterocolitica strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure*. *BEHAVIOUR OF PATHOGENIC GRAM NEGATIVE BACTERIA INOCULATED IN MILK AND MODEL CHEESE TREATED WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE*, 68(3), 65.

- DI PINTO, A., BONERBA, E., BOZZO, G., CECI, E., TERIO, V., & TANTILLO, G. (2013). *Occurrence of potentially enterotoxigenic Bacillus cereus in infant milk powder*. *European Food Research and Technology*, 237(2), 275-279.
- DÍAZ YUBERO, M. Á. (2015). *Leche y seguridad alimentaria*. *Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 31, 33–37. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup2.8680>
- DORMAN, H. D., & DEANS, S. G. (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- ELEGBELEYE, J. A., GERVILLA, R., ROIG-SAGUES, A. X., & BUYS, E. M. (2021). *Ultraviolet-C inactivation and hydrophobicity of Bacillus subtilis and Bacillus velezensis spores isolated from extended shelf-life milk*. *International Journal of Food Microbiology*, 349, 109231.
- ELLNER, R. (2000). *Preguntas y respuestas sobre la microbiología de la leche y los productos lácteos*. Ediciones Díaz de Santos.
- FAO (2021). *Producción y productos lácteos: Portal lácteo*. Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/es>. Fecha de acceso: 30 de junio de 2021
- FERNÁNDEZ GARCÍA, L. (2012). *Producción de leche de larga duración (ESL) mediante membranas cerámicas de microfiltración*.
- GILL, A. O., & HOLLEY, R. A. (2006). *Inhibition of membrane bound ATPases of Escherichia coli and Listeria monocytogenes by plant oil aromatics*. *International journal of food microbiology*, 111(2), 170-174.
- GUNES, G., & TEKIN, M. D. (2006). *Consumer awareness and acceptance of irradiated foods: Results of a survey conducted on Turkish consumers*. *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 444-448.
- GURTLER, J. B., DOYLE, M. P., & KORNACKI, J. L. (Eds.). (2014). *The microbiological safety of low water activity foods and spices* (pp. 3-13). New York, NY, USA:: Springer.
- HYLDGAARD, M., MYGIND, T., & MEYER, R. L. (2012). *Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components*. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
- JEYAKUMAR, G. E., & LAWRENCE, R. (2021). *Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*, 26, 100406.
- JIANG, S. L., & GUO, M. R. (2021). *Processing technology for infant formula*. In *Human milk biochemistry and infant formula manufacturing technology* (pp. 223-240). Woodhead Publishing.
- KIM, J., MARSHALL, M. R., & WEI, C. I. (1995). *Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(11), 2839-2845.
- MAPA (2021). *Estadística láctea anual*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/estadistica-industrias-lacteas/estadistica-lactea-anual/>. Fecha de acceso: 3 de julio de 2021.
- OECD/FAO (2019), *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2019-2028*, OECD Publishing, Paris/FAO, Rome
- PENA-GOMEZ, N., RUIZ-RICO, M., FERNANDEZ-SEGOVIA, I., & BARAT, J. M. (2019). *Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalised with essential oil components*. *Food Control*, 106, 106749.

- PFLUG, I. J., & ODLAUG, T. E. (1986). *Biological indicators in the pharmaceutical and medical device industry*. Journal of Parenteral Science and Technology, 40, 242-248.
- PORCELLATO, D., SKEIE, S. B., MELLEGÅRD, H., MONSHAUGEN, M., AANRUD, S. G., LINDSTEDT, B. A., & ASPHOLM, M. (2021). *Characterization of Bacillus cereus sensu lato isolates from milk for consumption; phylogenetic identity, potential for spoilage and disease*. Food Microbiology, 93, 103604.
- Real Decreto 2484/1967 de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.
- RÚA, J., DEL VALLE, P., DE ARRIAGA, D., FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, L., & GARCÍA-ARMESTO, M. R. (2019). *Combination of carvacrol and thymol: Antimicrobial activity against Staphylococcus aureus and antioxidant activity*. Foodborne pathogens and disease, 16(9), 622-629.
- RUIZ-RICO, M., PÉREZ-ESTEVE, É., BERNARDOS, A., SANCENÓN, F., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., MARCOS, M. D., & BARAT, J. M. (2017). *Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles*. Food chemistry, 233, 228-236.
- RUIZ-RICO, M., GARCÍA-RÍOS, E., BARAT, J. M., & GUILLAMÓN, J. M. (2021). *Microbial stabilisation of white wine by filtration through silica microparticles functionalised with natural antimicrobials*. LWT, 111783.
- STUMBO, C. R. (1965). *Thermobacteriology in food processing*. Academic press: Londres
- TRUNET, C., NGO, H., & COROLLER, L. (2019). *Quantifying permeabilization and activity recovery of Bacillus spores in adverse conditions for growth*. Food microbiology, 81, 115-120.
- VÁZQUEZ OJEDA, E., PÉREZ, E., AYALA, L., & ALCÁNTARA, L. (2014). *Evaluación de la calidad microbiológica de la leche*. Revista Iberoamericana de Ciencias, 1(3).
- WAITZ, J. A. (1990). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A. C., JELLEMA, A. C., & VAN BOEKEL, M. A. J. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos* (No. 637.1 W169c Ej. 1 019044). Editorial Acribia,.
- YANG, X., WANG, Z., ZHANG, C., WANG, L., PANG, L., ZHANG, D., MAN, C. & JIANG, Y. (2021). *Assessment of the production of Bacillus cereus protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk*. Journal of Dairy Science, 104(6), 6577-6587.