



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

### Inmovilización de antimicrobianos de origen natural y su aplicación en la industria alimentaria

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Alumna: Lía Martínez Ruiz

Tutor académico: José Manuel Barat Baviera

Cotutora: María Ruiz Rico

Curso académico: 2019-2020

Valencia, julio de 2020

Tipo Licencia: Licencia Creative Commons "Reconocimiento-No Comercial-Sin Obras Derivadas"



# INMOVILIZACIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Lía Martínez Ruiz, José M. Barat Baviera, María Ruiz Rico

**Título:** Inmovilización de antimicrobianos de origen natural y su aplicación en la industria alimentaria

## **Resumen:**

Los compuestos antimicrobianos de origen natural presentan reconocida actividad antimicrobiana y antifúngica, pero su aplicación en alimentos se ve limitada por sus propiedades fisicoquímicas, así como por la posible interacción con componentes del alimento. Con el fin de evitar estos inconvenientes se han propuesto diversos sistemas de encapsulación y/o inmovilización de los compuestos bioactivos. La inmovilización de los antimicrobianos en diversos soportes y superficies permite mantener la efectividad antimicrobiana del compuesto anclado frente a microorganismos patógenos y alterantes, y posibilita su aplicación en diferentes etapas del procesado de alimentos. Este trabajo se centra en la descripción de los antimicrobianos de origen natural usados en la industria alimentaria para prevenir el crecimiento o inhibir diversos microorganismos, las diferentes metodologías de inmovilización posibles, los distintos materiales que pueden ser usados como soporte de anclaje, así como ejemplos de sistemas de inmovilización de antimicrobianos naturales para su aplicación en la industria alimentaria. Tras realizar la revisión bibliográfica se puede destacar que la inmovilización covalente de antimicrobianos naturales permite que el compuesto activo mantenga o incluso mejore su efectividad sin liberarlo al medio, demostrando así que es una técnica prometedora para la conservación de alimentos y que suple las limitaciones de las metodologías convencionales no afectando a las características organolépticas del alimento y dando lugar a productos mínimamente procesados. Por tanto, esta revisión proporciona información valiosa para el desarrollo de nuevos sistemas antimicrobianos para el control de la contaminación microbiana en los alimentos.

**Palabras clave:** antimicrobiano, inmovilización, microorganismos patógenos, industria alimentaria

**Títol:** Immobilització d'antimicrobians d'origen natural i la seua aplicació en la indústria alimentària

## **Resum:**

Els compostos antimicrobians d'origen natural presenten reconeguda activitat antimicrobiana i antifúngica, però la seua aplicació en aliments es veu limitada per les seues propietats fisicoquímiques, així com per la possible interacció amb components de l'aliment. Per tal d'evitar aquests inconvenients s'han proposat diversos sistemes d'encapsulació i/o immobilització dels compostos bioactius. La immobilització dels antimicrobians en diversos suports i superfícies permet mantenir l'efectivitat antimicrobiana del compost ancorat enfront de microorganismes patògens i alterants, i possibilita la seua aplicació en diferents etapes del processat d'aliments. Aquest treball

es centra en la descripció dels antimicrobians d'origen natural usats en la indústria alimentària per prevenir el creixement o inhibir diversos microorganismes, les diferents metodologies d'immobilització possibles, els diferents materials que poden ser usats com a suport d'ancoratge, així com exemples de sistemes d'immobilització d'antimicrobians naturals per a la seua aplicació en la indústria alimentària. Després de realitzar la revisió bibliogràfica es pot destacar que la immobilització covalent d'antimicrobians naturals permet que el compost actiu mantinga o inclús millore la seua efectivitat sense alliberar-lo al mig, demostrant així que és una tècnica prometedora per a la conservació d'aliments i que suplix les limitacions de les metodologies convencionals no afectant les característiques organolèptiques de l'aliment i donant lloc a productes mínimament processats. Per tant, esta revisió proporciona informació valuosa per al desenrotllament de nous sistemes antimicrobians per al control de la contaminació microbiana en els aliments. Per tant, aquesta revisió proporciona informació valuosa per al desenvolupament de nous sistemes antimicrobians per al control de la contaminació microbiana en els aliments.

**Paraules clau:** antimicrobià, immobilització, microorganismes patògens, indústria alimentària

**Title:** Naturally-occurring antimicrobials immobilization and their application in the food industry

**Abstract:**

Antimicrobial compounds of natural origin show recognized antimicrobial and antifungal activity, but their application in food is limited by their physicochemical properties, as well as by their potential interaction with food components. In order to avoid these drawbacks, different encapsulation and/or immobilization systems for bioactive compounds have been proposed. The immobilization of antimicrobials on diverse supports and surfaces allows preserving the antimicrobial effectiveness of the anchored compound against pathogenic and spoilage microorganisms, and enables its application at different food processing stages. This work focuses on the description of naturally-occurring antimicrobials used in the food industry to prevent growth or inhibit microorganisms, established immobilization methodologies, different materials that can be used as grafting support, as well as examples of natural antimicrobials immobilization systems for application in the food industry. After the literature review it can be noted that the covalent immobilization of natural-occurring antimicrobials allows the active compound to maintain or even improve its effectiveness without releasing it into the medium, demonstrating that it is a promising technique for food preservation and that it overcomes the limitations of conventional methodologies without affecting the organoleptic characteristics of the food and resulting in minimally processed products. Therefore, this review provides valuable information for the development of new antimicrobial systems for the control of microbial contamination in food.

**Keywords:** antimicrobial, immobilization, pathogenic microorganisms, food industry

## **Agradecimientos**

A María, por todo su apoyo y dedicación, por estar ahí y ayudarme en todo momento. Sin ti no hubiera sido posible, gracias por todo lo que me has enseñado.

A mi tutor, José Manuel Barat, por su amabilidad y confianza desde el primer día.

A mi familia, por apoyarme durante esta etapa y hacer posible que haya llegado hasta aquí.

A Carolina y Elena, por haberme dado los mejores momentos de estos años. Por la paciencia y los consejos.

A todas las personas que han formado parte de estos cuatro años y me han hecho crecer como persona, gracias.

## ÍNDICE:

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Metodología</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>10</b>
<b>4.1 Antimicrobianos naturales</b> .....	<b>10</b>
4.1.1 Aceites esenciales .....	11
4.1.2 Compuestos fenólicos hidrófilos .....	12
4.1.3 Ácidos grasos libres .....	13
4.1.4 Polímeros de origen animal .....	13
4.1.5 Bacteriocinas .....	15
<b>4.2 Metodologías de inmovilización de compuestos activos</b> .....	<b>15</b>
4.2.1 Materiales de soporte .....	16
4.2.2 Técnicas de funcionalización de superficies .....	17
4.2.3 Técnicas de inmovilización de compuestos activos .....	18
<b>4.3 Compuestos bioactivos inmovilizados que pueden ser aplicados en la industria alimentaria</b> .....	<b>19</b>
4.3.1 Compuestos inmovilizados mediante técnicas de inmovilización no covalente .....	19
4.3.2 Compuestos inmovilizados mediante técnicas de inmovilización covalente .....	20
4.3.2.1 Componentes de aceites esenciales .....	20
4.3.2.2 Compuestos fenólicos hidrófilos .....	23
4.3.2.3 Ácidos grasos libres .....	23
4.3.2.4 Enzimas y péptidos de origen animal .....	24
4.3.2.5 Bacteriocinas .....	26
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>30</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos pueden estar contaminados por microorganismos alterantes que afectan a las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas produciendo su deterioro, así como por microorganismos patógenos que pueden producir enfermedades al ser humano. Los métodos de conservación de alimentos previenen el deterioro de los mismos y aumentan la calidad de los productos impidiendo el desarrollo o eliminando microorganismos, tanto alterantes como posibles patógenos, y reduciendo la velocidad de las reacciones que ocurren en las matrices alimentarias.

A lo largo de los años se han utilizado diferentes métodos para asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos siendo el tratamiento térmico y el uso de aditivos conservantes sintéticos las metodologías más relevantes. Los tratamientos por calor se llevan utilizando desde hace años y juegan un papel muy importante en la industria alimentaria, sobre todo en la industria de bebidas, debido a su papel en el aumento de la vida útil de los productos. En la industria alimentaria se aplican comúnmente la pasteurización, la esterilización, el secado y la evaporación, mediante los cuales se somete al alimento a una determinada temperatura eliminando así posibles microorganismos que estén presentes en él (Pereira *et al.*, 2009; Deak, 2014). Son metodologías muy efectivas para conservar los alimentos y garantizar su seguridad, pero presentan limitaciones, ya que tienen un gran impacto en el alimento y alteran las propiedades nutricionales y organolépticas, provocando cambios de color, de textura, y pérdida vitamínica y proteica, además de presentar un elevado coste (Choi y Nielsen, 2005; Jiao *et al.*, 2004).

Aparte de los tratamientos térmicos, los métodos de conservación convencionales incluyen el uso de aditivos conservantes sintéticos. Los conservantes sintéticos se han ido convirtiendo en una práctica cada vez más importante en la industria alimentaria debido al aumento de la producción de alimentos procesados (Saad *et al.*, 2005), ya que se añaden para detener o retrasar las pérdidas nutricionales debidos a cambios microbiológicos, enzimáticos o químicos, y para prolongar la vida útil de los alimentos.

En la industria alimentaria son comúnmente utilizados el benzoato de sodio, el ácido benzoico, el sorbato de sodio, el sorbato de potasio, el nitrito de sodio y los sulfitos. Son agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento de microorganismos, pero su aplicación se ve limitada porque han sido relacionados con diversos efectos sobre la salud humana (Sharma, 2014). El benzoato de sodio y el benzoato de potasio provocan urticaria o asma y además están directamente relacionados con la hiperactividad infantil. Los sulfitos pueden tener efectos secundarios en forma de dolores de cabeza, palpitaciones e incluso cáncer, y los nitratos y nitritos se sospecha que causan cáncer de estómago. Las reacciones producidas por los sorbatos son menos frecuentes, pero hay informes que indican que han producido urticarias y dermatitis. En general estos conservantes se han utilizado como antioxidantes y agentes preventivos del pardeamiento, pero se ha restringido su uso en alimentos y bebidas debido a los efectos sobre la salud. Todo ello ha generado que los conservantes sintéticos tengan una percepción negativa por parte de los consumidores.

Debido a las limitaciones y a los efectos negativos de estas técnicas de conservación, además de la demanda de los consumidores de productos mínimamente procesados, con una mayor calidad y un sabor fresco, se están desarrollando nuevos métodos de conservación de alimentos. Estas nuevas metodologías tienen que seguir asegurando la inocuidad del producto, alargando su vida útil, y además asegurar un mínimo impacto sobre las propiedades nutricionales y organolépticas que los métodos actuales descritos anteriormente no cumplían (Li *et al.*, 2016).

Para superar las limitaciones de los tratamientos convencionales, se han desarrollado tecnologías de conservación no térmicas. El uso de estas tecnologías novedosas requiere en algunos casos el uso combinado con el tratamiento térmico para asegurar la eficacia del tratamiento de conservación. Además, recientemente tecnologías magnéticas como el calentamiento óhmico o microondas, han adquirido interés en procesos alimentarios y podrían reemplazar, al menos parcialmente, los procesos

de conservación tradicionales (Vicente y Castro, 2007). Estas técnicas producen calor directamente dentro del alimento y permiten evitar los tiempos de cocción excesivos y sus correspondientes inconvenientes comentados anteriormente (Pereira *et al.*, 2009).

Entre las metodologías de conservación no térmicas destacan los tratamientos de radiación ultravioleta, los ultrasonidos, los tratamientos por altas presiones, los pulsos eléctricos, el dióxido de carbono presurizado, la ozonización, la filtración o el uso de conservantes naturales. Hay numerosos estudios desarrollados sobre estas técnicas alternativas donde se define su aplicación y uso en la industria alimentaria (Escajeda *et al.*, 2017), destacando la capacidad de inactivación de microorganismos a temperaturas cercanas a la del ambiente, lo cual por lo general preserva la calidad sensorial y nutricional de los alimentos (Pereira *et al.*, 2009).

La irradiación UV es una técnica de conservación no térmica basada en la aplicación de irradiación capaz de eliminar microorganismos alterantes y patógenos de aire, superficies, agua y alimentos líquidos (Choi y Nielsen, 2005). El producto debe ser expuesto a 400 J/m<sup>2</sup> en todas las partes para lograr la inactivación microbiológica (Morris *et al.*, 2007) y la efectividad se producirá en función de la transmisividad del producto, la potencia, la longitud de onda o el tipo de fuente entre otros. Daña los enlaces entre las bases nitrogenadas de timina y citosina del ADN en el rango de 250-260 nm, lo cual conduce a la muerte celular. Mediante esta actuación daña el ADN bacteriano y destruye funciones esenciales de las células microbianas como la reproducción (Tiwari *et al.*, 2009).

Los tratamientos por radiación UV son eficaces para el tratamiento de alimentos líquidos, superficies y envases. Los cambios en el color u olor de los alimentos tratados son menores que aplicando tratamientos térmicos (Pereira *et al.*, 2009). Se usa comúnmente para desinfección del agua potable en Europa y su uso en el tratamiento de otros alimentos líquidos tiene un alto potencial y es probablemente una de las técnicas más versátiles. También reacciona sinérgicamente con oxidantes como el ozono y se pueden utilizar conjuntamente, aunque el ozono puede oxidar sustancias deseables (Morris *et al.*, 2007), como también se comenta posteriormente.

Sin embargo, su efecto se ve limitado en alimentos líquidos que presentan turbidez, opacidad y presencia de partículas por falta de penetrabilidad (Choi y Nielsen, 2005). Las partículas y el material orgánico presente causan una menor transmisión de la luz ultravioleta. Además, la radiación UV puede provocar cambios en la estructura terciaria de las proteínas y formación de productos de oxidación y con susceptibilidad a la proteólisis, entre otros (Huppertz *et al.*, 2019). También su desarrollo y comercialización se han visto obstaculizados en el pasado por percepciones públicas desfavorables ya que la exposición directa de luz UV a los humanos puede dañar la vista o de manera prolongada podría provocar quemaduras (Bintsis *et al.*, 2000).

Los ultrasonidos son una técnica de conservación no térmica prometedora frente al tratamiento térmico para el procesado de alimentos, simple y versátil. Utiliza la energía producida por las ondas sonoras, con al menos 20000 vibraciones por segundo, para lograr un efecto bactericida en los microorganismos y la inactivación de enzimas mediante la lisis celular (Morris *et al.*, 2007). Su propagación a través de alimentos líquidos induce la formación de burbujas de cavitación que genera una alta temperatura localizada y alta presión produciendo la desintegración de las células microbianas e inactivación de enzimas, lo cual causa un efecto similar al de pasteurización sin producirse un aumento significativo de la temperatura (Tiwari *et al.*, 2009). La efectividad dependerá de la amplitud de la longitud de onda, del tipo de exposición, del tiempo de contacto con los microorganismos y de la composición y el volumen de los productos a tratar (Morris *et al.*, 2007).

Los ultrasonidos dan lugar a alimentos con una mínima pérdida de propiedades organolépticas, y en el caso de aplicarse a frutas como ciruelas o uvas, afectan a la permeabilidad de la membrana celular y pueden mejorar la estabilidad de la dispersión en zumos, reduciendo a su vez la sedimentación. También se puede utilizar en procesos de emulsión, dispersión, homogeneización y cristalización (Morris *et al.*, 2007).

El tratamiento por ultrasonidos es más efectivo si se utiliza en combinación con calor y presión, aunque se puede utilizar en solitario para zumos de frutas, salsas, purés y productos lácteos (Morris *et al.*, 2007). Se deben usar en presencia de calor y/o presión para asegurar la inhibición microbiana (esterilización), siendo así capaz de destruir bacterias como *Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes*, aparte de inactivar enzimas responsables del deterioro (Chemat *et al.*, 2011).

Los tratamientos por altas presiones son una técnica de conservación no térmica basado en la aplicación de alta presión (normalmente entre 100-1000 MPa) en alimentos para la inactivación de células vegetativas de microorganismos y enzimas (Tiwari *et al.*, 2009). La presión induce un daño en la membrana de los microorganismos y desnaturaliza las proteínas. Bajo la presión ejercida, las biomoléculas obedecen el principio de Le Chatelier-Braun y se promueven reacciones en un volumen reducido que afectan a la estructura terciaria de moléculas con importancia para la funcionalidad celular como son las proteínas, se rompen los enlaces no covalentes debido a la presión y se desencadena su desnaturalización. También se altera la estructura de polisacáridos (Marcos *et al.*, 2005).

Además de para la conservación de alimentos, también se puede utilizar para dar lugar a productos con textura novedosa y, por lo tanto, para desarrollar nuevos productos (Rastogi *et al.*, 2007). Los tratamientos por altas presiones mantienen una calidad nutricional y sensorial óptima (Nielsen *et al.*, 2009). Tiene efectos reducidos en los parámetros nutricionales y de calidad en comparación con el tratamiento térmico y las moléculas como aminoácidos, vitaminas y componentes que contribuyen al aroma y al sabor no se ven afectadas (Tiwari *et al.*, 2009). Otra ventaja es la homogeneidad del tratamiento, ya que la presión se aplica uniformemente alrededor de todo el producto (Tewari, 2007).

Sin embargo, aunque esta tecnología es capaz de inactivar las formas vegetativas de los microorganismos alterantes y patógenos, la inactivación de esporas mediante presión no es posible, por lo que es necesaria su combinación con el tratamiento térmico (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Además, afecta a la reología del producto (Ahmed *et al.*, 2003), y se necesita una gran inversión para poder llevar a cabo el proceso.

Los tratamientos de pulsos eléctricos de alta intensidad son una técnica de conservación no térmica en la que se aplican pulsos de alto voltaje (20-80 kV/cm) durante periodos cortos de tiempo (<1s) a alimentos fluidos (Tiwari *et al.*, 2009) como pueden ser leche, yogurt, zumos, sopas y otros que puedan soportar campos de alta electricidad (Morris *et al.*, 2007). Pueden ocurrir varios procesos que derivan en la inactivación de los microorganismos, el calentamiento por resistencia, electrólisis o disrupción de las membranas celulares, para la cual hay varias teorías, pero comúnmente se describe el daño por electroporación, que afecta a su funcionamiento y puede conducir a la muerte celular (Deeth *et al.*, 2007). Los alimentos tienen conductividad eléctrica debido a la presencia de sustancias iónicas en sus nutrientes como ácidos o sales. Al someterse a los pulsos eléctricos se produce una polarización molecular que da como resultado el aumento del movimiento de las sustancias iónicas que provocan a su vez un aumento de la temperatura (Sakr y Liu, 2014) y que inactivan los microorganismos mediante el mecanismo de electroporación o electropermeabilización donde la membrana celular se rompe debido a la cantidad de poros generados por ese aumento de la temperatura dentro del material (Evrendilek *et al.*, 2012). Los poros de la membrana se agrandan, afectan a la permeabilidad, permiten la salida del contenido celular y, por lo tanto, se produce la muerte de la célula. Con este tratamiento se puede lograr una reducción de 5 órdenes logarítmicos en la mayoría de bacterias patógenas al romper las membranas celulares (Morris *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que es eficaz contra diversos microorganismos patógenos sin una pérdida apreciable de sabor o color y tiene efectos mínimos sobre las características nutricionales, de sabor y funcionales (Elez-Martínez *et al.*, 2006). Se puede utilizar en combinación con la filtración, ya que la favorece debido a que afecta a la retención de agua (Morris *et al.*, 2007).

Sin embargo, esta técnica debe ser aplicada a alimentos fluidos que puedan ser bombeados, no puede ser aplicado en alimentos con burbujas de aire, tiene un efecto limitado contra esporas, y

tampoco puede utilizarse en alimentos que tengan una conductividad eléctrica más alta o variable, por lo que su aplicación se ve limitada (Escajeda *et al.*, 2017). El tratamiento de pulsos eléctricos no es capaz de inactivar la actividad enzimática, por lo que los alimentos tratados deben ser refrigerados o aplicar en combinación con el tratamiento térmico (Barba *et al.*, 2015). Además, la implantación de esta técnica requiere elevados costes y se puede producir la migración de metales como consecuencia de la corrosión de los materiales eléctricos (Yang *et al.*, 2016).

Otro método alternativo de conservación no térmica es la ozonización. Tiene efecto bactericida gracias a sus propiedades oxidantes y a la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares. En el momento en el que atraviesa la membrana celular causa la ruptura de las células y hace que se disperse el citoplasma. Además, es capaz de dañar proteínas y ADN. Es eficaz contra bacterias, hongos, virus, protozoos y esporas bacterianas y fúngicas (Tiwari *et al.*, 2009). El ozono ha sido reconocido seguro como desinfectante de agua y alimentos y actualmente está siendo utilizado (Pandiselvam *et al.*, 2019).

A pesar de estas ventajas, el uso de ozono como técnica de conservación también presenta inconvenientes. Tiene una naturaleza corrosiva, causa fitotoxicidad y puede afectar a la salud del trabajador. Además, genera subproductos, entre los cuales los más preocupantes son el formaldehído y el acetaldehído, ya que son mutagénicos (Ikehata, 2019). Otro inconveniente es que, dependiendo del alimento, el ozono tendrá una efectividad diferente y que puede afectar al olor, sabor y color del alimento. Además, puede oxidar compuestos deseables (Morris *et al.*, 2007) como antocianos en zumos de frutas (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017).

El uso de dióxido de carbono presurizado es otra técnica de conservación no térmica donde se someten los alimentos a CO<sub>2</sub> presurizado por debajo de 50 MPa. Este tratamiento afecta a las enzimas y a los microorganismos por varios mecanismos como la eliminación de oxígeno, disminución del pH, y la modificación y penetración de las membranas celulares, entre otras. Esta técnica no expone a los alimentos a los efectos adversos del calor y se ha demostrado que elimina formas vegetativas de bacterias patógenas, mohos, levaduras y puede inactivar algunas enzimas como la polifenoloxidasas a temperaturas que no son efectivas si se utiliza el tratamiento térmico. No obstante, esta técnica no se utiliza a gran escala debido al elevado coste de sus instalaciones (Morris *et al.*, 2007).

La filtración es una metodología de conservación no térmica que está en continuo avance, y que debido a la demanda de productos con mayor valor nutricional y a ventajas como el bajo consumo de energía, la reducción de pasos durante el procesamiento y la mayor eficiencia de separación está ganando gran importancia en la industria alimentaria (Salehi, 2014), en la que se utiliza para la clarificación, concentración y estabilización microbiana de bebidas (Gialleli *et al.*, 2016). Las más utilizadas son la filtración en lecho y la filtración por membranas (Salehi, 2014).

La filtración en lecho usando materiales filtrantes como arena u otros soportes silíceos o celulósicos se utiliza para eliminar materia orgánica y microorganismos, pero no tiene una adecuada eficiencia como consecuencia del gran tamaño medio de los soportes y porque presenta problemas de regeneración (Devi *et al.*, 2008).

La filtración mediante membranas ofrece un filtrado selectivo que reduce sin necesidad de tratamiento térmico la contaminación microbiana (Lipnizki, 2010). La naturaleza de la membrana controla qué componentes penetrarán y cuáles se retendrán en función del tamaño de poro, y el rendimiento está influenciado por su composición química, la temperatura, presión, flujo de alimentación e interacciones entre los componentes de la membrana y el flujo de alimentación (Salehi, 2014).

Los distintos tipos de filtración se clasifican en función del tamaño del poro de la membrana y recientemente se están diseñando membranas con un tamaño de poro más reducido para que la disponibilidad de la superficie sea mayor y las velocidades de flujo más altas, reduciendo así el tiempo

de filtración (Lemma *et al.*, 2015). Los principales tipos son la filtración estándar, la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa (Salehi, 2014).

La filtración estándar presenta un tamaño de poro entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$  y se utiliza para separar partículas sólidas de gran tamaño suspendidas en el líquido con eliminación parcial de bacterias y levaduras. Se usa principalmente para la clarificación de bebidas o como pretratamiento para otros tipos de filtrado posteriores. Los principales materiales utilizados son arena, carbón activo, soportes de celulosa, bentonita, tierra de diatomeas y partículas de sílice (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

La microfiltración es un tipo de filtración en el que se utiliza un poro de 0,2-2  $\mu\text{m}$  y separa selectivamente partículas de más de 200 KDa. Utiliza presiones menores a 0,2 MPa y se utiliza principalmente para separar partículas y bacterias de otros solutos (Salehi, 2014). En la industria de bebidas tiene el objetivo de clarificar eliminando sólidos en suspensión, grasas o proteínas de alto peso molecular (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

La ultrafiltración es un tipo de filtración en el que se utilizan membranas con un poro de 0.01-1  $\mu\text{m}$ , que separa partículas entre 1 y 300 KDa y que utiliza una presión mayor de 1 MPa. Se utiliza para separar proteínas de moléculas más pequeñas como son las sales (Salehi, 2014). Tiene la capacidad de retener proteínas y se ha utilizado en ejemplos como la leche para desarrollar nuevas formulaciones para niños con proteínas más estables al calor (Crowley *et al.*, 2015), entre otras.

Ambas, microfiltración y ultrafiltración, además son efectivas contra bacterias y se pueden utilizar como un pretratamiento anterior a la nanofiltración o la ósmosis inversa para evitar que se vayan acumulando restos indeseables (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

La nanofiltración presenta gran eficiencia de separación, y podría ser usada como método de conservación ya que se realiza a bajas temperaturas y hace que el procesamiento sea más rentable; conduce a un menor consumo de energía y a una mejor calidad del producto (Salehi, 2014). La nanofiltración usa membranas con tamaño del poro es entre 0,0005 y 0,001  $\mu\text{m}$ , y lo que hace es concentrar, fraccionar o purificar soluciones utilizando una presión entre 1 y 4 MPa (Baker, 2004; Salehi *et al.*, 2011). Su uso en bebidas como el zumo hace que se puedan llevar a cabo procesos de concentración sin los inconvenientes de cambio de color y sabor que presenta realizarla mediante evaporación (Jiao *et al.*, 2004; Madaeni *et al.*, 2011) y además de clarificación, estabilización microbiana y despectinización mediante la eliminación de sólidos en suspensión (Girard y Fukumoto, 2000). También se está estudiando su uso en bebidas fermentadas como el vino y la cerveza, en las que tradicionalmente la filtración se utilizaba solamente para clarificar, pero puede que se amplíe su uso, lo cual se predice que conllevará grandes cambios en la industria de bebidas (Salehi, 2014). Esta técnica ya se ha utilizado para eliminar total o parcialmente microorganismos y se han conseguido altos niveles de calidad y seguridad alimentaria (Lipnizki, 2010).

La ósmosis inversa es un tipo de filtración caracterizado por utilizar membranas con un poro menor a 0,001  $\mu\text{m}$  y presiones 5 o 10 veces más altas que las utilizadas en ultrafiltración (4-10 MPa) para separar casi todos los solutos. Se utiliza para desalinizar el agua (Salehi, 2014) y concentrar, purificar y recuperar componentes de interés, sobre todo en el caso de zumos de frutas (Rastogi, 2018).

El mayor inconveniente de la filtración es la colmatación de las membranas por retención de los microorganismos y componentes alimentarios, lo que genera problemas de flujo y dificultad para la limpieza de sus membranas (Fuenmayor *et al.*, 2014).

A pesar de que hay un amplio número de tecnologías alternativas no térmicas que son eficaces, presentan limitaciones como altos costes, pérdida de propiedades organolépticas y cambios en la composición nutricional de los alimentos. (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

Por último, otro de los métodos de conservación que se están aplicando en los últimos años, consiste en el uso de antimicrobianos naturales. Los consumidores están preocupados cada vez más por su salud y, por lo tanto, por la seguridad de los alimentos (Burt, 2004). Los alimentos que contienen conservantes sintéticos están siendo rechazados (Menon y Garg, 2001) y los consumidores han exigido

su reducción. Por ello, ha crecido el interés en la aplicación de compuestos antimicrobianos de origen natural, no tóxicos para el ser humano y seguros para el medio ambiente, desde principios de los años 90, a raíz de la tendencia conocida como consumismo verde (Burt, 2004). Esto ha llevado a los fabricantes a comenzar a reemplazar los conservantes tradicionales por este tipo de conservantes naturales (Weiss *et al.*, 2009). La adición de los antimicrobianos naturales puede ayudar en el desarrollo de productos alimenticios mínimamente procesados, que es otra de las exigencias actuales del consumidor (Davidson *et al.*, 2013).

Los antimicrobianos naturales pueden obtenerse de fuentes animales (ciertas enzimas y polímeros animales, ácidos grasos libres), vegetales (aceites esenciales extraídos de plantas y otros compuestos bioactivos) y microbianas (péptidos generados por microorganismos con actividad antimicrobiana frente a otras cepas) (Weiss *et al.*, 2009).

Los antimicrobianos naturales se están convirtiendo en una alternativa viable para disminuir los riesgos para la salud y las pérdidas económicas ocasionadas debido a la contaminación por microorganismos (Pisoschi *et al.*, 2018). Existe el desafío en la industria alimentaria, a la hora de adicionar los antimicrobianos naturales, para que no produzcan cambios negativos en las características sensoriales, pero sean útiles para la conservación (Stopforth *et al.*, 2005). Lo más adecuado sería poder usar un antimicrobiano natural o una combinación de ellos que sea efectivo a bajas concentraciones, sea económico, no cause cambios sensoriales en el producto, inhiba un amplio conjunto de organismos alterantes y patógenos y que no sea tóxico (Davidson *et al.*, 2013).

A pesar de que hay estudios que demuestran su eficacia, en la aplicación o incorporación de los antimicrobianos naturales en los alimentos con frecuencia se ha observado que estos tienen menos eficacia en las matrices alimentarias que en los sistemas modelo y, por tanto, es necesario incrementar la concentración requerida para inhibir el crecimiento microbiano (Weiss *et al.*, 2009). Además, presentan problemas de solubilidad e inestabilidad en la matriz alimentaria, volatilidad (Prakash *et al.*, 2018) así como un marcado impacto en las propiedades sensoriales del alimento si se utilizan en altas cantidades (Perdones *et al.*, 2012). Por tanto, en los últimos años se han investigado diferentes estrategias para poder paliar estas limitaciones, entre las que destacan la encapsulación o inmovilización de los antimicrobianos naturales (Bernardos *et al.*, 2015). Además, aunque los antimicrobianos naturales se presentan como una alternativa atractiva hay muy pocos compuestos permitidos por la legislación para su uso en alimentos, por lo que hay que mejorar el uso y la efectividad de esos compuestos aprobados mediante estas nuevas estrategias (Weiss *et al.*, 2009).

La encapsulación se define como el proceso en el que compuestos bioactivos quedan atrapados dentro de materiales de recubrimiento para formar cápsulas (Pérez-Esteve *et al.*, 2016). La encapsulación puede ser usada en la industria alimentaria para estabilizar los ingredientes y/o aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes, mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos mediante el enmascaramiento de componentes con sabor u olor desagradable, así como proteger compuestos bioactivos como los antimicrobianos naturales. En este caso, distintos nano y micromateriales podrían servir como recubrimiento o agente portador de los compuestos bioactivos. La reducción del tamaño de la partícula proporciona un aumento de la relación superficie volumen y, por lo tanto, mejora la reactividad (Prakash *et al.*, 2018), la biodisponibilidad y el efecto inhibitor de las moléculas antimicrobianas (Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

Se deben cumplir ciertos requisitos para que el sistema de encapsulación sea adecuado: debe atrapar el compuesto de manera eficiente y hacer que se libere en un lugar concreto a una velocidad controlada (puede ser en respuesta a un estímulo externo), proteger al compuesto de la degradación y de otros ingredientes que puedan afectarle y no debe modificar las propiedades de los alimentos (McClements *et al.*, 2009; Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

La encapsulación permite reducir las interacciones de los compuestos encapsulados con agentes externos o componentes de los alimentos y permite tener un mayor control sobre las reacciones químicas y sobre la liberación de los compuestos en los lugares de acción. Además, permite aumentar

la eficacia de los compuestos encapsulados debido a que estos consiguen una mayor estabilidad física y química y alcanzan una mayor compatibilidad con las matrices alimentarias, permitiendo por ejemplo que compuestos lipofílicos como son los aceites esenciales se dispersen uniformemente en fases acuosas (Weiss *et al.*, 2009). De esta manera las sustancias antimicrobianas se protegen de la degradación, se mejora la retención durante el procesamiento y los costes son más bajos en comparación con los agentes antimicrobianos convencionales (Ruiz-Rico *et al.*, 2018). También mejora las propiedades físicas de los compuestos y permite incorporarlos a diferentes sistemas alimentarios (Khare y Vasisht, 2014).

Las nanoemulsiones, microemulsiones, liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos o nanofibras son diversos soportes orgánicos que pueden ser usados para la encapsulación de compuestos bioactivos en el procesamiento de alimentos (Weiss *et al.*, 2009; Prakash *et al.*, 2018). Además, se pueden usar distintos soportes inorgánicos como las arcillas, zeolitas o partículas mesoporosas de sílice (Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles total o parcialmente, con una fase dispersa. Las nanoemulsiones son un tipo de emulsiones con un tamaño de partícula entre 50 y 500 nm aproximadamente que permiten la encapsulación de compuestos bioactivos lipofílicos. El tamaño de la gota depende del tipo de homogeneización y de la composición del sistema. La reducción del tamaño de partícula hace que mejore la dispersabilidad de los compuestos lipofílicos en el agua y también la biodisponibilidad gastrointestinal (Ruiz-Rico *et al.*, 2018). Estudios realizados afirman que las nanoemulsiones de aceites esenciales presentan un mayor efecto que los aplicados libremente a las mismas concentraciones, ya que al aplicarlos libremente se disminuye su eficacia debido a las interacciones con otros componentes (Jo *et al.*, 2015) y a la dificultad que tienen para dispersarse en la fase acuosa de los alimentos (Weiss *et al.*, 2009). Además, la mejora de la solubilidad en las nanoemulsiones provoca que aumenten los sitios de unión capaces de interactuar con las membranas de los microorganismos (Ruiz-Rico *et al.*, 2018). Sin embargo, son termodinámicamente inestables y tenderán a descomponerse con el tiempo (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las microemulsiones son otro tipo de emulsiones y a diferencia de las nanoemulsiones, son termodinámicamente estables. Son transparentes, de baja viscosidad y el diámetro de las partículas se sitúa entre 5 y 100 nm. Este sistema de encapsulación permite proteger compuestos bioactivos lipofílicos como aceites esenciales o ácidos grasos (Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

Los liposomas son vesículas esféricas delimitadas por una membrana de fosfolípidos naturales o sintéticos que contienen un volumen acuoso (Rawat *et al.*, 2008). El tamaño varía entre decenas de nanómetros y decenas de micrómetros (Weiss *et al.*, 2009). Sirven como vehículo para moléculas tanto lipofílicas como hidrofílicas. Para los compuestos lipofílicos la bicapa será el entorno, se solubilizarán dentro de ella, y para los hidrofílicos, la bicapa actuará de barrera, estarán encapsulados dentro y después se difundirán (Weiss *et al.*, 2009). Presentan un carácter anfifílico, biocompatibilidad, baja toxicidad y facilidad de modificación de la superficie (Rawat *et al.*, 2008).

Las nanopartículas de lípidos sólidos son portadores coloidales con un diámetro entre 50 y 1000 nm. El interior es hidrófobo y los rodea una membrana fosfolipídica (Rawat *et al.*, 2008). Tienen las ventajas de las nanoemulsiones y de los liposomas con son la buena disolución y la buena permeabilidad del compuesto a través de la membrana, evitándose las desventajas de desestabilidad y toxicidad.

Las nanofibras son fibras con un diámetro entre 10 y 100 nm. Tienen un rendimiento mecánico superior, alta porosidad y gran relación superficie-masa. Pueden utilizarse como ingredientes, como materiales de envasado de alimentos o como portadores de compuestos antimicrobianos (Kriegel *et al.*, 2010).

Los sistemas inorgánicos de encapsulación se caracterizan por estar organizados mediante canales o poros que atrapan las sustancias bioactivas y posteriormente las liberan. Las arcillas y las zeolitas son sólidos de aluminosilicato tridimensionales que son de fácil fabricación, bajo coste y biocompatibles

para transportar compuestos bioactivos. Las partículas mesoporosas de sílice son materiales de óxido de silicio con diámetros de poro entre 2 y 50 nm, que pueden ser sintetizados con distintos tamaños y morfologías de partícula y, además, presentan una superficie fácilmente funcionalizable, lo que las convierte en los portadores más importantes para atrapar y liberar compuestos de forma controlada (Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

A diferencia de los sistemas de encapsulación orgánica, estos son más rígidos, lo cual conlleva mayor estabilidad térmica y química, y mayor resistencia a agentes externos como el pH o la presión, lo que permite proteger mejor las moléculas bioactivas atrapadas en su interior. Además, presentan buena compatibilidad.

A pesar de que los sistemas de encapsulación mejoran el efecto antimicrobiano y presentan múltiples beneficios como la mejora de la estabilidad y la biodisponibilidad, la liberación controlada y el enmascaramiento de propiedades desagradables que puedan aportar los compuestos bioactivos, también tienen limitaciones, y es que hay pocos antimicrobianos nanoestructurados en el mercado porque antes de incorporar un nanomaterial al mercado hay que considerar la estabilidad de los soportes, la biocompatibilidad con las matrices alimentarias y su posible toxicidad (Ruiz-Rico *et al.*, 2018).

La encapsulación, ya sea mediante el uso de soportes orgánicos como inorgánicos, puede ser una técnica adecuada para la protección de diversas moléculas bioactivas como los antimicrobianos naturales, pero es necesaria la liberación al medio de dichas moléculas para que estas puedan ejercer su efecto antimicrobiano. La liberación permitirá inhibir el crecimiento microbiano, pero no se evitarán ciertas limitaciones de los antimicrobianos naturales usados en forma libre como son la modificación de las propiedades sensoriales del alimento o la absorción en el sistema digestivo tras la ingestión.

Otra metodología desarrollada en los últimos años para mejorar la aplicabilidad de los antimicrobianos naturales es la inmovilización de estos en un material o soporte inerte. La inmovilización se puede definir como el anclaje de moléculas bioactivas sobre la superficie de un material de soporte preservando las propiedades de los compuestos anclados y aportando nuevas propiedades a los materiales de partida (Gupta *et al.*, 2016).

La inmovilización de moléculas bioactivas puede ser más o menos estable en función de la metodología de funcionalización (Goddard y Hotchkiss, 2007). El objetivo de la inmovilización covalente es que los compuestos inmovilizados mantengan sus propiedades bioactivas tras su anclaje en el material no siendo necesaria la liberación al medio para que ejerza su acción (Källrot *et al.*, 2006).

Esta técnica de aplicación de compuestos antimicrobianos naturales donde se lleva a cabo la inmovilización en un soporte es novedosa. En diversos estudios se ha demostrado que su eficacia contra bacterias, levaduras, mohos y virus es alta, disminuyéndose las dosis necesarias en comparación con los compuestos usados en forma libre. Además, la inmovilización puede permitir la reutilización sin perder la actividad y no provoca lixiviaciones en la matriz alimentaria (Ruiz-Rico *et al.*, 2017).

La inmovilización de antimicrobianos permite obtener nuevos agentes biocidas con características muy diversas en función del material usado, la morfología y el tamaño del soporte, las características de su superficie, las propiedades del compuesto inmovilizado y la biocompatibilidad tanto del soporte como de la molécula anclada (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

Dadas todas las ventajas y posibles aplicaciones de los antimicrobianos naturales, así como la novedad respecto a la aproximación de la inmovilización de estos compuestos para el desarrollo de nuevos sistemas antimicrobianos se considera necesaria realizar una revisión bibliográfica para poder evaluar de forma crítica las propiedades de estos nuevos materiales antimicrobianos y los posibles usos de los antimicrobianos inmovilizados en la industria alimentaria.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue recopilar, revisar y analizar estudios sobre la inmovilización de diferentes compuestos antimicrobianos y su aplicación en la industria alimentaria.

Para llevar a cabo dicho objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Describir las características generales de los antimicrobianos naturales.
- Distinguir las limitaciones de los antimicrobianos naturales al usarlos de forma libre.
- Describir las principales metodologías de inmovilización de antimicrobianos sobre diferentes soportes.
- Analizar el efecto inhibitorio de los antimicrobianos inmovilizados sobre diferentes microorganismos.
- Recopilar ejemplos de aplicación de antimicrobianos inmovilizados aplicados en la industria alimentaria.
- Definir las ventajas y limitaciones de antimicrobianos naturales inmovilizados desarrollados.
- Proponer potenciales aplicaciones de los antimicrobianos inmovilizados en la industria alimentaria.

## 3. METODOLOGÍA

La búsqueda bibliográfica de artículos científicos publicados fue llevada a cabo en inglés y en español durante los días 23 de marzo de 2020 y 23 de junio de 2020 para trabajos divulgados entre los años 2003 y 2020. Las bases de datos consultadas fueron Science direct, chemijournal.com, Wiley Online Library, liebertpub.com, ACS publications, MDPI, SpringerLink, PORTICO, PubMed, F1000Research, Google Scholar, Semantic scholar, frontiers in microbiology, Royal Society of Chemistry, society for applied microbiology, RiuNet, currentscience.ac.in, annual reviews, hindawi, Canadian Science Publishing, ResearchGate y Cambridge Core. Las palabras clave para la búsqueda fueron: *natural antimicrobials, immobilised antimicrobials, antimicrobials in food, immobilised essential oil, non thermal treatments, surface modification, functionalization, covalent immobilization*.

Los criterios de inclusión de los estudios fueron (i) artículos en los que se utilizaron compuestos antimicrobianos naturales inmovilizados y (ii) artículos donde se evaluó el potencial antimicrobiano del compuesto inmovilizado en una matriz alimentaria, mientras que los criterios de exclusión de los estudios fueron (i) artículos en los que el texto completo no pudo ser descargado y (ii) artículos en los que se inmovilizaron compuestos antimicrobianos no naturales.

Los antimicrobianos, métodos de inmovilización o ejemplos de aplicación que solamente fueron mencionados y hacían referencia a un estudio anterior necesitaron una búsqueda adicional.

Una vez extraídos los datos, la información ha sido clasificada en diferentes secciones:

- Características, propiedades y usos de los antimicrobianos naturales
  - +Origen vegetal:
    - Aceites esenciales
    - Compuestos fenólicos hidrófilos
  - +Origen animal:
    - Ácidos grasos libres
    - Polímeros de origen animal
  - +Origen microbiano
    - Bacteriocinas
- Limitaciones de los antimicrobianos naturales al usarlos de forma libre

- Metodologías de inmovilización sobre diferentes soportes
  - +Materiales de soporte
  - +Técnicas de funcionalización
  - +Técnicas de inmovilización
- Ejemplos de antimicrobianos inmovilizados aplicados en la industria alimentaria
  - +Inmovilización no covalente
  - +Inmovilización covalente

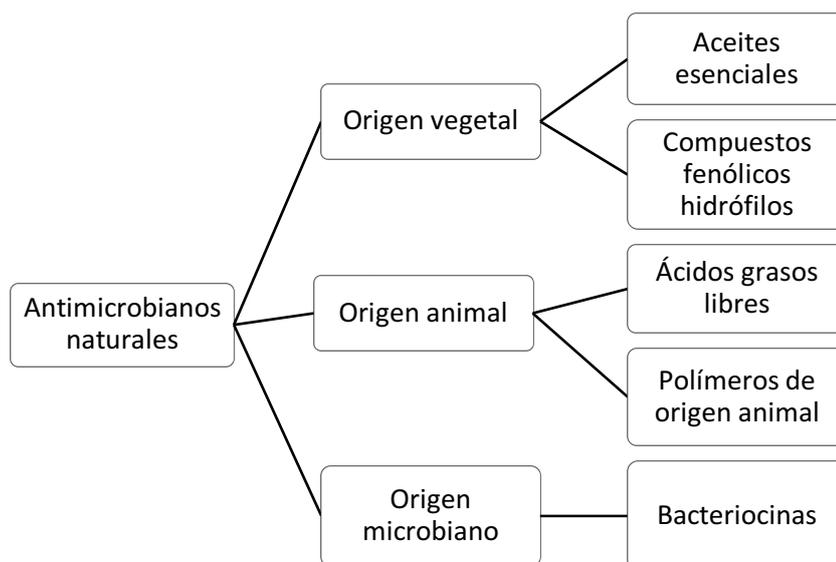
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ANTIMICROBIANOS NATURALES

La percepción que presentan hoy en día los consumidores hacia los conservantes sintéticos y la preferencia por productos mínimamente procesados, ha llevado a la industria alimentaria a buscar alternativas naturales (Hyldgaard *et al.*, 2012). Además, la resistencia a fármacos es un problema que está suponiendo un gran desafío en el campo médico y encontrar nuevos antimicrobianos podría solucionarlo (Chouhan *et al.*, 2017). El continuo uso de antimicrobianos sintéticos puede provocar la aparición de cepas resistentes (Capeletti *et al.*, 2014) y problemas de toxicidad (Zengin *et al.*, 2011). Por lo tanto, son necesarios antimicrobianos alternativos naturales o nuevas formas de administración que hagan que las dosis necesarias sean menores (Gyawali e Ibrahim, 2014).

Los antimicrobianos naturales se definen como compuestos bioactivos con actividad inhibitoria frente a diversos microorganismos y que se pueden obtener de diversas fuentes de la naturaleza. Pueden ser de origen vegetal, como son los aceites esenciales y otros compuestos bioactivos extraídos de plantas; de origen animal, entre los que podemos encontrar ciertas enzimas y polímeros animales, así como ácidos grasos libres; y de origen microbiano, como las bacteriocinas, que son péptidos de origen microbiano que presentan actividad antimicrobiana frente a otras cepas (Weiss *et al.*, 2009). Tanto las propiedades antimicrobianas de estas alternativas naturales como sus usos y limitaciones han sido documentadas ampliamente y serán descritas a continuación.

Los compuestos antimicrobianos de origen vegetal obtenidos de plantas son generados por ellas como estrategias de protección (Borges *et al.*, 2013; Burt, 2004). Los más activos se pueden encontrar en especias, hierbas o aceites esenciales, que incluyen compuestos fenólicos y subclases como terpenos, cumarinas o flavonoides (Gaysinsky y Weiss, 2007). Los antimicrobianos procedentes de plantas han recibido gran interés debido a su baja toxicidad, a su actividad farmacológica y a su viabilidad económica, además de tener también propiedades para la eliminación de radicales, a los cuales está asociado el deterioro de la calidad organoléptica de los alimentos y enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, promueven la conservación de alimentos y son una alternativa para tratar distintas enfermedades (Chouhan *et al.*, 2017).



**Figura 1.** Esquema resumen de la clasificación de los antimicrobianos naturales.

#### 4.1.1. Aceites esenciales

Los antimicrobianos naturales de origen vegetal más destacables y estudiados son los aceites esenciales, que son líquidos aromáticos y volátiles (Hyldgaard *et al.*, 2012) procedentes de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, maderas, frutas o raíces) y que se pueden obtener mediante fermentación, extracción o más comúnmente destilación (Burt, 2004).

Los aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram – y Gram +, mohos y levaduras (Burt, 2004). Hay estudios que demuestran que la aplicación directa de los aceites esenciales a los alimentos ejerce un efecto antimicrobiano y antioxidante (Chouhan *et al.*, 2017). También son antivirales (Astani *et al.*, 2011), antiparásitos (George *et al.*, 2009), e insecticidas (Kim *et al.*, 2003). Además, la posibilidad del desarrollo de resistencia es insignificante al presentar varios compuestos que actúan a la vez (Prakash *et al.*, 2015); los microorganismos tendrían que presentar mutaciones simultáneas para conferir la resistencia y es muy improbable (Huh y Kwon, 2011).

Los estudios *in vitro* han demostrado la actividad de los aceites esenciales frente a bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* a bajas concentraciones. Las bacterias Gram- son ligeramente menos susceptibles que las bacterias Gram+, lo cual es esperable porque los microorganismos Gram- presentan una envoltura externa que rodea y protege la pared celular (Burt, 2004).

Los aceites esenciales contienen compuestos bioactivos (terpenos, terpenoides, carotenoides, cumarinas) con actividad inhibitoria que pueden ser también usados como agentes antimicrobianos (Pandey *et al.*, 2017). El mecanismo de acción de estos componentes no está totalmente esclarecido pero la acción principal se cree que es la interacción de estos compuestos bioactivos hidrofóbicos con los lípidos de las membranas celulares microbianas, aumentando su permeabilidad y provocando la fuga de iones y del contenido citoplasmático, lo que conduce a la muerte celular (Burt, 2004). También pueden actuar como inhibidores de la transferencia de protones (Weiss *et al.*, 2009) y pueden afectar el mecanismo de enzimas y otros componentes celulares (Pisoschi *et al.*, 2018).

Los factores que favorecen su acción son bajo pH, baja temperatura y bajos niveles de oxígeno (Burt, 2004). La matriz alimentaria junto a estos factores extrínsecos podría reducir su actividad antimicrobiana (Prakash *et al.*, 2018). Se requiere un conocimiento detallado de las propiedades de los aceites esenciales para utilizarlos como conservantes, siendo necesario establecer, para cada uno de

ellos, la dosis mínima inhibitoria, el modo de acción, el efecto en los diferentes microorganismos y el efecto de los componentes de la matriz alimentaria en sus propiedades (Hyltdgaard *et al.*, 2012).

Entre los componentes de los aceites esenciales más efectivos destacan moléculas como el carvacrol, timol, eugenol, ácido cinámico, cinamaldehído y perillaldehído (Burt, 2004), los cuales son capaces de inhibir el crecimiento microbiano en un rango de concentraciones entre 0,05 y 5  $\mu\text{L/mL}$  en ensayos *in vitro*, pero necesitando concentraciones más altas en alimentos. La disminución de la eficacia en alimentos se debe a las interacciones con otros componentes (Jo *et al.*, 2015) y a la dificultad que tienen para dispersarse en la fase acuosa de los alimentos (Weiss *et al.*, 2009). En el caso de aplicarlos directamente sobre los alimentos, se necesitarían concentraciones altas para asegurar el efecto inhibitorio y tendrían impacto en las propiedades organolépticas, ya que presentan un fuerte olor y sabor además de una elevada volatilidad y baja solubilidad en agua (Tyagi *et al.*, 2014). Incluso a dosis más bajas podrían influir negativamente en las propiedades organolépticas como el color, el sabor o la textura de los alimentos a los que se les aplique, y conllevaría a una disminución de la aceptación del consumidor (Prakash *et al.*, 2018). Los efectos organolépticos se podrían limitar eligiendo los aceites esenciales en función del tipo de alimento en los que se utilicen (Burt, 2004) o usando combinaciones de varios compuestos, aunque se conoce poco sobre qué interacciones producen estos efectos (Hyltdgaard *et al.*, 2012). Por último, otras desventajas son que su producción se puede ver limitada por escasez de materias primas, así como por la pérdida de biodiversidad (Prakash y Kiran, 2016).

#### **4.1.2. Compuestos fenólicos hidrófilos**

Otros compuestos antimicrobianos de origen vegetal son los compuestos fenólicos hidrófilos obtenidos de extractos acuosos de plantas, que tienen reconocida actividad antimicrobiana y antioxidante (Borges *et al.*, 2013; Burt, 2004). Las plantas los producen como agentes protectores, y les permiten además superar los desafíos ambientales (Boudet, 2007).

Son metabolitos secundarios producidos por las plantas y dentro de la amplia variedad de moléculas con la estructura de los polifenoles, generalmente se dividen en flavonoides y no flavonoides. Dentro de los flavonoides se encuentran los flavonoles, flavonas, antocianidinas, flavanoles e isoflavonas. Dentro de los no flavonoides están los ácidos fenólicos, que pueden ser derivados del ácido benzoico como el ácido gálico o derivados del ácido cinámico, como el ácido ferúlico (Daglia, 2012).

Muchos de estos compuestos presentan actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Daglia, 2012). Además de ser antimicrobianos y antioxidantes, presentan actividad antimutagénica, antiinflamatoria, anticancerígena, antialérgica y antihipertensiva (Silva *et al.*, 2018).

Su uso como conservante natural ha ganado interés (Schieber, 2017), ya que han demostrado efecto inhibitorio frente a bacterias, causando un daño estructural o funcional en la membrana celular y provocando así su muerte. La permeabilidad de pared y de la membrana celular se ve afectada por estos compuestos, lo cual lleva a la liberación del contenido intracelular fuera de la célula. Además, puede ir acompañado de la interrupción de la función de la membrana, ya sea mediante la interrupción de la transferencia de electrones, la interrupción de la actividad enzimática o la interrupción de la absorción de nutrientes (Aleksic y Knezevic, 2014).

Sin embargo, aunque estos compuestos fenólicos hidrófilos tienen actividad antimicrobiana, las concentraciones efectivas son demasiado altas para aplicar estos compuestos per se como conservantes de alimentos o agentes biocidas (Borges *et al.*, 2013). Además, son compuestos poco estables frente a diversos agentes externos, perdiendo sus propiedades bioactivas (Panagiota *et al.*, 2009).

### 4.1.3. Ácidos grasos libres

Entre los antimicrobianos naturales de origen animal destacan los ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres de cadena media son una familia de ésteres de glicerol de ácidos saturados, entre los que destacan el ácido caprílico, el cáprico y el láurico, que están naturalmente presentes en alimentos como el aceite de coco (Zentek *et al.*, 2011). Son lípidos, como los que forman parte de la membrana plasmática y tienen actividades biológicas diversas y potentes (Desbois y Smith, 2010).

Son agentes biocidas potentes contra virus, bacterias y hongos (Chang *et al.*, 2010) y han ganado interés para diversas aplicaciones como la conservación de alimentos porque además evitarán el problema de resistencia (Desbois y Smith, 2010). Tienen propiedades antimicrobianas contra patógenos transmitidos por alimentos como *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *L. monocytogenes* o *S. aureus* (Kim y Rhee, 2016).

La diana principal de estos compuestos es la membrana celular produciendo su lisis, interrumpiendo el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, y perjudicando la absorción de nutrientes (Desbois y Smith, 2010).

Los inconvenientes que presentan, en general, los ácidos grasos libres, son el sabor y olor desagradable capaz de alterar las propiedades sensoriales de los alimentos, su inestabilidad y su tendencia a unirse de manera no específica a las proteínas perdiendo sus propiedades (Desbois y Smith, 2010).

La aplicación de varios componentes combinados puede hacer que la pérdida de calidad nutritiva y organoléptica de los alimentos se minimice utilizando cantidades reducidas de antimicrobianos. El uso combinado de ácidos grasos libre y aceites esenciales ha sido reportado que presenta efectos bactericidas sinérgicos, con lo que podrían reducirse las concentraciones de ambos compuestos necesarias con el fin de minimizar el efecto sobre las propiedades sensoriales del alimento (Kim y Rhee, 2016).

Otra alternativa al uso de los ácidos grasos libres propuesta recientemente ha sido la encapsulación de estos compuestos en nanopartículas mesoporosas de sílice, manteniendo la eficacia del compuesto a través de una liberación del compuesto de manera controlada. Esta encapsulación fue capaz de enmascarar parcialmente las propiedades desagradables del ácido graso y disminuyó las interacciones con otros componentes que pueden alterar su funcionalidad (Ruiz-Rico *et al.*, 2015).

### 4.1.4. Polímeros de origen animal

Ciertas enzimas, péptidos y polímeros de origen animal son otro tipo de antimicrobianos naturales.

El quitosano es un polímero con propiedades antimicrobianas, biodegradable y no tóxico, por lo que se utiliza en diferentes industrias, incluida la industria alimentaria. Se puede aplicar tanto como aditivo como componente del material de envase. Retrasa el crecimiento de microorganismos y mejora la calidad y la vida útil de los alimentos. Se ha demostrado que es eficaz contra bacterias Gram+ y Gram-, levaduras y hongos filamentosos. Su efectividad puede variar en función de factores intrínsecos o ambientales principalmente (Kong *et al.*, 2010).

Sin embargo, es complicado utilizarlo en disolución ya que es poco soluble en agua y se necesita disolver en una disolución de ácido acético o láctico que puede afectar negativamente al quitosano, adoptando además una estructura más inestable (Kong *et al.*, 2010).

Otro ejemplo son los péptidos bioactivos que provienen de las proteínas de la leche. Presentan propiedades antimicrobianas, antitrombóticas, inmunomoduladoras, antihipertensivas o portadoras de minerales cuando se liberan tras la hidrólisis de las proteínas. Además, tienen la ventaja de provenir de una fuente económica y segura, lo cual aumenta su potencial para su uso tanto en medicina como en la industria alimentaria. Inhiben tanto microorganismos que causan deterioro como

microorganismos patógenos. Los péptidos derivados de las caseínas actúan contra una amplia gama de bacterias Gram+ como *Bacillus subtilis* o *Streptococcus pyogenes*. En concreto péptidos como la isracidina, es activa contra bacterias Gram+ y Gram- y protege contra *S. aureus*, *S. pyogenes* y *L. monocytogenes* u otros provenientes de las k-caseínas que también son activos contra levaduras. Sin embargo, necesitan cantidades significativamente altas para poder inhibirlos lo que limita en gran medida su aplicación en alimentos (Benkerroum, 2010).

Los péptidos antimicrobianos presentan limitaciones, ya que tienen una vida media corta y toxicidad asociada a concentraciones más altas que se añaden para compensar esa corta vida media. Para solucionar estas limitaciones se estudió la inmovilización de estos péptidos en la superficie de diversos materiales. La inmovilización covalente de estos antimicrobianos en diversas superficies sugiere que los péptidos antimicrobianos inmovilizados pueden ser efectivos en la prevención de la formación de biopelículas mediante la inhibición de los microorganismos después del contacto con el biomaterial recubierto. La inmovilización covalente provocó un aumento en la estabilidad y una disminución de la toxicidad comparado con la adición de los péptidos libres y con otras tecnologías de lixiviación, siendo además capaz de conseguir una alta efectividad contra bacterias y contra la formación de biopelículas (Costa *et al.*, 2011).

Las enzimas son también una estrategia para luchar contra los microorganismos. Son capaces de degradar el ADN microbiano, los polisacáridos y las proteínas, además de interferir en la formación de biopelículas. Están extendidas en la naturaleza y defienden a los organismos del ataque bacteriano (Thallinger *et al.*, 2013).

La lisozima procedente de la clara de huevo, plantas, bacterias y secreciones animales (Lopes *et al.*, 2019), presenta actividad inhibitoria frente a bacterias Gram+ y algunas Gram- al hidrolizar enlaces de las paredes celulares. La lisozima tiene la capacidad de actuar contra el peptidoglicano de las bacterias; hidroliza los enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1-4) entre el ácido N-acetil-murámico y la N-acetil-glucosamina, por lo que las bacterias Gram+ se ven más afectadas que las Gram-. Es capaz de actuar contra las bacterias Gram- si hay presencia de agentes de desestabilizadores de la membrana como detergentes o utilizándola asociada con lactoferrina (Barbiroli *et al.*, 2012). Se utiliza para aumentar la vida útil de productos frescos como frutas, verduras, carne y queso. También ha habido un creciente interés en utilizarla en envases bioactivos (Thallinger *et al.*, 2013). Además, también se puede generar a partir de proteínas lácteas, al igual que la lactoferrina (Benkerroum, 2010).

La lactoferrina es una glicoproteína de unión al hierro que proviene de la leche o de otras secreciones como la saliva o las lágrimas y que presenta actividad antitumoral, antioxidante, inmunomoduladora y antimicrobiana (Yen *et al.*, 2011). La lactoferrina presenta actividad inhibitoria frente a un amplio rango de bacterias, hongos, protozoos y virus (Orsi, 2004). La lactoferrina tiene efecto bacteriostático y bactericida. Como agente bacteriostático tiene dos mecanismos de acción contra bacterias, la producción de sideróforos, que son quelantes, y que unen el ion férrico con alta afinidad y lo transportan a las células o la expresión de receptores específicos capaces de eliminar el hierro de la lactoferrina en la superficie bacteriana. Además, como agente bactericida se puede unir a lípidos de la envoltura celular incrementando la permeabilidad de la membrana (Orsi, 2004).

Este efecto bactericida se suele asociar a la lactoferricina, que es un péptido procedente de la degradación de la lactoferrina y con propiedades antimicrobianas más potentes que ella (Yen *et al.*, 2011) eficaz contra un amplio rango de bacterias (Tomita *et al.*, 2002). El uso de la lactoferrina de forma individual se puede ver, en ocasiones limitado, y puede ser usado en combinación con otros compuestos biocidas como la lisozima.

Sin embargo, son compuestos frágiles e incluso pequeños cambios conformacionales pueden reducir su actividad (Peña-Gómez *et al.*, 2019c). Las enzimas son sensibles al proceso de producción y almacenamiento y pueden interactuar de manera indeseable con los componentes de los alimentos, perdiendo así eficacia antimicrobiana y necesitándose grandes concentraciones para ser eficaz, lo cual

es un problema (Lopes *et al.*, 2019). Además, tienen baja estabilidad química y térmica y tienden a inhibirse si hay altas concentraciones de componentes de reacción (Bashir *et al.*, 2020).

#### 4.1.5. Bacteriocinas

Por último, las bacteriocinas son péptidos o proteínas sintetizadas por los ribosomas de diferentes grupos de bacterias (Gálvez *et al.*, 2007). Muchas están producidas por bacterias ácido lácticas, tienen actividad antimicrobiana y son adecuadas para controlar el deterioro de los alimentos. Son muy diversas, varían en tamaño, estructura y especificidad, siendo capaces de actuar contra varios géneros o especies particulares de bacterias patógenas (O'Connor *et al.*, 2015). A modo de ejemplo, hay bacteriocinas capaces de inhibir selectivamente bacterias como *L. monocytogenes* sin afectar a la microbiota (Gálvez *et al.*, 2007).

Su uso en la industria alimentaria puede ser muy beneficioso, ya que alargan la vida útil de los alimentos, disminuyen el riesgo de transmisión de patógenos, y contribuyen a la reducción de los conservantes sintéticos y de la intensidad de los tratamientos térmicos. Son sustancias seguras, activas, no tóxicas y tienen un espectro antimicrobiano amplio (Gálvez *et al.*, 2007). Tienen bajos niveles de resistencia, lo cual es una gran ventaja, y además no afectan a las características sensoriales de los alimentos.

Se dividen en dos grupos, clase I (que contiene péptidos modificados) y clase II (con péptidos sin modificar), y su modo de acción se basa en la permeabilización de la membrana citoplasmática de los microorganismos (O'Connor *et al.*, 2015).

Se pueden introducir directamente en alimentos, pero actualmente solo se utilizan dos bacteriocinas como conservantes de alimentos (O'Connor *et al.*, 2015). Son más efectivas si actúan sinérgicamente con otros compuestos como son los compuestos fenólicos u otras proteínas antimicrobianas, y también si se combinan con tratamientos como los pulsos eléctricos (Gálvez *et al.*, 2007).

Sin embargo, su efectividad está condicionada por factores externos como el pH, la temperatura, la composición, la estructura y la microbiota de los alimentos (Gálvez *et al.*, 2007). Se producen interacciones con componentes de la matriz alimentaria que pueden reducir la actividad antimicrobiana (Da Silva *et al.*, 2010). Los problemas de estabilidad y la interacción de estos péptidos con los componentes de los alimentos se pueden corregir mediante su encapsulación (Da Silva *et al.*, 2010) o su inmovilización (Gálvez *et al.*, 2007) obteniendo resultados muy prometedores.

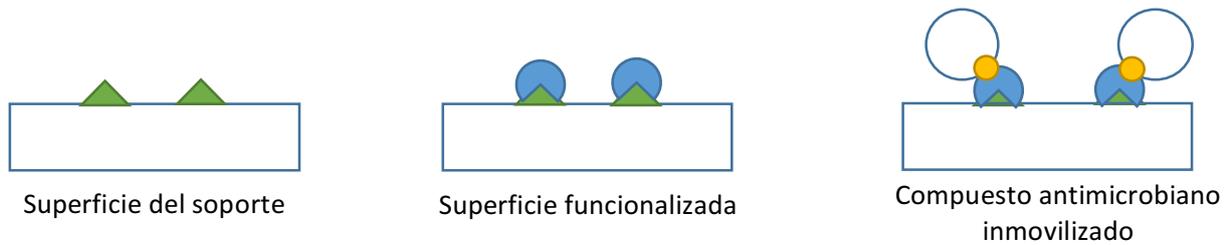
## 4.2. METODOLOGÍAS DE INMOVILIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Tal y como se ha comentado anteriormente, a pesar de las múltiples ventajas que presentan los antimicrobianos naturales, para mejorar su aplicabilidad, su efectividad y evitar las limitaciones que presenta su adición en forma libre, una de las soluciones más prometedoras es el desarrollo y la utilización de técnicas de inmovilización de estos compuestos.

La inmovilización consiste en anclar las moléculas bioactivas sobre un soporte preservando las propiedades bioactivas de las moléculas fijadas y aportando nuevas propiedades al material de soporte.

La inmovilización se puede hacer mediante varias metodologías de funcionalización que se detallarán a continuación. Las propiedades de los materiales funcionalizados variarán en función de las propiedades del compuesto bioactivo fijado, las características del soporte, la metodología de inmovilización y la biocompatibilidad tanto del soporte como del compuesto bioactivo.

Las características de los compuestos bioactivos a fijar, es decir, las propiedades y particularidades de los antimicrobianos naturales han sido descritas en la Sección 4.1, por lo que se describirán a continuación las características de los principales materiales que han sido usados como soporte para la inmovilización de los antimicrobianos naturales y las metodologías de funcionalización más importantes. En la Figura 2 se puede observar de manera simplificada el mecanismo de inmovilización de los compuestos antimicrobianos que se detallará a continuación en los siguientes apartados. Para la inmovilización de antimicrobianos es necesaria un material de soporte que presente grupos funcionales en su superficie que al activarse (superficie funcionalizada) permitan el anclaje con los grupos funcionales del compuesto antimicrobiano.



**Figura 2.** Mecanismo de inmovilización de los compuestos antimicrobianos.

#### 4.2.1 Materiales de soporte

Los principales tipos de materiales de soporte se clasifican en materiales poliméricos (celulosa, quitosano, plásticos sintéticos...), cerámicos (cristal, membranas cerámicas, partículas de sílice, arcillas, arena...) y metálicos.

La celulosa posee la estructura más simple entre los polisacáridos ya que está compuesta de glucosa como único monómero. La celulosa es un polímero lineal donde las moléculas de glucosa están unidas covalentemente a través de funciones acetales entre los grupos hidroxilo ecuatoriales de C4 y los átomos de carbono C1. Según la estructura molecular de la celulosa, los grupos hidroxilo en las unidades de glucosa son responsables de su actividad química (Credou y Berthelot, 2014). La celulosa es el polímero natural más abundante y se puede utilizar de diversas formas. Es un material poroso capaz de retener moléculas contaminantes y en la industria alimentaria se ha estudiado su uso sobre todo en la clarificación de bebidas debido a su alta superficie, alta resistencia, humectabilidad, facilidad de funcionalización química y bajo impacto ambiental (Peña-Gómez *et al.*, 2019c). La inmovilización química de grupos activos puede obtenerse a través de la reacción con la superficie de celulosa rica en grupos hidroxilo.

Dentro de los materiales poliméricos se ha demostrado que la quitina, el quitosano y sus derivados son excelentes y seguros para la inmovilización de compuestos bioactivos como enzimas alimentarias, principalmente debido a sus propiedades no tóxicas, biocompatibles y biodegradables. La quitina es el aminocarbhidrato más abundante en la tierra y se encuentra en los caparazones de crustáceos como el cangrejo (Jiang *et al.*, 2017). El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas al azar distribuidas mediante enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  con diversos grupos funcionales que permiten la funcionalización del material. Además, estos materiales poliméricos presentan propiedades antimicrobianas *per se* (Liburdi *et al.*, 2016).

Del mismo modo, los polímeros orgánicos sintéticos presentan extremos de cadena reactivos en la superficie que pueden activarse y permiten que se anclen las sustancias antimicrobianas (Hao *et al.*, 2011).

Los materiales cerámicos son materiales constituidos por sólidos inorgánicos como el óxido de silicio. Los materiales a base de óxido de silicio se encuentran entre los materiales inorgánicos conocidos por su estabilidad térmica y mecánica, su no toxicidad y su alta resistencia a los ataques

microbianos y solventes orgánicos. La superficie de los materiales silíceos presenta defectos estructurales en forma de grupos silanol (Si-OH) que pueden reaccionar fácilmente con organosilanos mediante sustitución nucleofílica alifática, lo que resulta en la incorporación de restos orgánicos en la superficie de los materiales.

La arcilla y la arena al ser materiales silíceos presentan grupos silanol en su superficie permitiendo así el anclaje de los compuestos antimicrobianos (Jiang *et al.*, 2016) y características adecuadas como son la fabricación simple, el bajo coste y la biocompatibilidad (Ruiz-Rico *et al.*, 2016).

Las partículas de sílice amorfa también se utilizan en la industria alimentaria y están consideradas como sustancias GRAS (Contado *et al.*, 2013). Por último, las partículas de sílice mesoporosas han generado interés porque presentan una gran superficie, un tamaño de poro variable, estabilidad térmica, buena biocompatibilidad, durabilidad y facilidad de modificación de su superficie (Botequim *et al.*, 2012). En concreto, destaca la familia de las partículas MCM-41 (Mobil Composition of Matter), estructuras porosas de dióxido de silicio, que permiten el anclaje de moléculas bioactivas en su superficie y elevada capacidad de carga (Ros-Lis *et al.*, 2018).

Los materiales metálicos destacan por sus excelentes propiedades estructurales, ópticas, fisicoquímicas, térmicas, y mecánicas como la alta tenacidad y la resistencia a la corrosión, además de su buena durabilidad y alta conductividad (Kango *et al.*, 2013). Son materiales inertes y biocompatibles. Presentan propiedades antiincrustantes para evitar la formación de películas (Bekmurzayeva *et al.*, 2018). Algunas superficies metálicas inertes necesitan preactivarse para poder modificar su superficie y llevar a cabo la inmovilización de biomoléculas (Shalev *et al.*, 2012).

#### **4.2.2. Técnicas de funcionalización de superficies**

El primer paso para el desarrollo de materiales con compuestos inmovilizados consiste en la selección de un sustrato que presente las propiedades necesarias para su uso posterior. Sin embargo, antes de producirse la inmovilización de la molécula bioactiva puede que sea necesario activar la superficie de los materiales debido a su naturaleza inerte, lo cual se denomina como funcionalización.

La funcionalización del soporte consiste en modificar la superficie del material para mejorar sus propiedades como la humectación y la adhesión mediante la introducción de grupos polares, y adaptándose a los grupos funcionales que se quieran unir en la inmovilización. Además de mejorar las propiedades del soporte mejoran la afinidad de la unión, tienen alta estabilidad, baja toxicidad y maximizan la cantidad inmovilizada por unidad de área al insertarse un agente polifuncional en la superficie del soporte, ya que se aumenta el número de grupos funcionales disponibles por unidad de superficie. Los organosilanos se han utilizado ampliamente para realizar esta función (Hu *et al.*, 2017) aportando puntos de unión con distintos grupos funcionales comunes de unión como tioles, aldehídos, ácidos carboxílicos, grupos hidroxilos y aminas (Goddard y Hotchkiss, 2007).

Hay diferentes técnicas para realizar la funcionalización como químicos húmedos, monocapas de silano, tratamientos de gas ionizado e irradiación UV entre otras (Goddard y Hotchkiss, 2007). También la técnica de intercambio de ligandos (Kango *et al.*, 2013).

En la modificación de la superficie mediante químicos húmedos, se trata con agentes líquidos que generan grupos funcionales reactivos sobre ella. No necesita un equipamiento especializado y se puede realizar en laboratorios. Tiene más capacidad de penetración que otras técnicas. Sin embargo, son inespecíficos, generan grupos funcionales que contienen oxígeno, pueden producir una funcionalización irregular y generan residuos peligrosos. Son útiles a nivel de laboratorio, pero a gran escala (Goddard y Hotchkiss, 2007).

Los organosilanos tal y como se ha comentado, se han utilizado ampliamente. Inicialmente se desarrollaron para acoplar un polímero orgánico a un sustrato inorgánico, pero se ha estudiado su aplicación en la funcionalización de distintos materiales aplicando monocapas de silano. Presentan una

estructura muy ordenada, casi cristalina y ofrecen de esta manera el potencial para una funcionalización de superficie más definida (Goddard y Hotchkiss, 2007).

Dentro de los tratamientos de gas ionizado se encuentra el plasma, la descarga de corona y el tratamiento por llama. El plasma es un estado de alta energía en el que un gas está parcialmente ionizado en partículas cargadas y partículas neutras. Modifica la superficie sin generar desechos y con menor degradación del material que los métodos húmedos. La funcionalización varía en función del gas de plasma. La descarga de corona es un proceso continuo, simple y de bajo coste en el que una corriente de aire inducida eléctricamente bombardea la superficie del soporte. Mejora su capacidad de adhesión e impresión, pero genera grupos oxigenados, no presenta alta estabilidad y no es tan útil para generar uniones específicas. El tratamiento por llama, al igual que el anterior, no es un tratamiento de funcionalización específico ya que se bombardea la superficie del soporte con aire ionizado y se genera un espectro de productos de oxidación, pero proporciona grupos útiles para muchas reacciones como el aldehído, el hidroxilo o el ácido carboxílico. Es importante controlar parámetros como la temperatura y el tiempo de contacto para mantener un tratamiento constante (Goddard y Hotchkiss, 2007).

Por último, al exponer el soporte a la irradiación UV, se generan sitios reactivos que se pueden convertir en grupos funcionales si se exponen a gas o que se pueden utilizar para anclar las partículas directamente. Como ventaja adapta la reactividad de la superficie dependiendo de la longitud de onda aplicada y ha sido utilizada para iniciar la polimerización por injerto de radical de los compuestos bioactivos. Sin embargo, la luz UV puede ser bloqueada por las partículas y afectar al coeficiente (Goddard y Hotchkiss, 2007).

En ocasiones también conviene bloquear ciertos grupos funcionales para que no se unan compuestos no específicos o producir un cambio en el pH óptimo del compuesto bioactivo al ser grupos funcionales cargados (Goddard y Hotchkiss, 2007).

#### **4.2.3. Técnicas de inmovilización de moléculas bioactivas**

Una vez elegidos la molécula bioactiva y el soporte, y activada la superficie del material de soporte, se puede proceder a la inmovilización de la molécula bioactiva en la superficie del material. Durante la inmovilización, ocurren procesos de adhesión o recubrimiento mediante interacción química entre la superficie del soporte y la molécula bioactiva. Las metodologías de inmovilización se pueden dividir entre técnicas de inmovilización no covalente donde las más destacadas son el enlace electrostático y el emparejamiento ligando-receptor y técnicas de inmovilización covalente, en la que destaca el enlace covalente.

En la inmovilización mediante enlace electrostático se aprovechan las interacciones electrostáticas entre la molécula bioactiva y la superficie del sustrato produciéndose el anclaje espontáneo de la molécula por atracción de cargas electrostáticas. Esta técnica es muy sencilla, pero presenta la limitación de que la unión es inestable térmicamente porque los compuestos están anclados mediante fuerzas de van de Waals o puentes de hidrógeno, que son fuerzas débiles (Peña-Gómez *et al.*, 2019c).

El emparejamiento ligando-receptor, como en el caso de la biotina-avidina, es el enlace no covalente más fuerte y es atractivo porque hay gran cantidad de reactivos biotinilados y biotilantes disponibles (Goddard y Hotchkiss, 2007).

La inmovilización mediante enlace covalente se produce por la reacción química entre los grupos funcionales de la molécula bioactiva que se va a inmovilizar y los grupos funcionales del sustrato funcionalizado. Este tipo de inmovilización aporta grandes ventajas como son mayor estabilidad, extensión de la vida media del compuesto bioactivo anclado, prevención del metabolismo de la molécula fijada y no permitir que la molécula se libere y se pierda (Goddard y Hotchkiss, 2007).

Tras inmovilizar los compuestos bioactivos en la superficie del soporte se lleva a cabo la caracterización de los materiales mediante análisis de la superficie para determinar la cantidad y la actividad del compuesto que ha quedado inmovilizado y además controlar y verificar la superficie del soporte tras cada modificación para validar la inmovilización. Se puede hacer mediante diversas técnicas instrumentales como la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, espectrofotometría de rayos infrarrojos o potencial zeta, entre otros (Goddard y Hotchkiss, 2007).

### **4.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS INMOVILIZADOS QUE PUEDEN SER APLICADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

#### **4.3.1 Compuestos inmovilizados mediante técnicas de inmovilización no covalente**

Tal y como se ha comentado, en las técnicas de inmovilización no covalente se produce una unión sencilla y espontánea entre el soporte y el compuesto que se desea inmovilizar que mejora la efectividad de este, pero con la limitación de que las uniones presentan baja estabilidad y con ello provocan la liberación del compuesto inmovilizado.

En los estudios realizados por Barbiroli *et al.* (2012), Huang *et al.* (2013) y Li y Wang (2013) se demuestra la mayor efectividad que presenta la lisozima inmovilizada mediante interacción electrostática en comparación con su forma libre. Debido a la interacción entre la carga positiva de la lisozima y la carga negativa de los soportes se produjo la inmovilización del antimicrobiano mediante fuerzas de atracción electrostáticas. Barbiroli *et al.* (2012) desarrollaron un papel de carbometilcelulosa con lisozima y lactoferrina inmovilizadas no covalentemente que posteriormente se liberaron conservando sus características funcionales y estructurales, presentando actividad antimicrobiana *in vitro* contra contaminantes alimentarios comunes como *Listeria innocua* y *E. coli*. La mayor efectividad se obtuvo al combinar ambas proteínas aumentando la fase lag de crecimiento de los microorganismos, pero con una reducción final de tan solo 1-2 órdenes logarítmicos. Además, se evaluó la aplicación del papel con las proteínas inmovilizadas como material absorbente en un envase de poliestireno de un carpaccio de carne, llevando a cabo la determinación de los microorganismos aerobios mesófilos tras el almacenamiento de la carne en refrigeración. Al igual que en los ensayos *in vitro*, los mejores resultados se obtuvieron al combinar ambas proteínas, pero la reducción de los microorganismos presentes en la carne fue de aproximadamente 1 orden logarítmico. Por otro lado, Huang *et al.* (2013) evaluaron la actividad antibacteriana de nanofibras de acetato de celulosa funcionalizadas con lisozima, alginato de sodio y quitosano clorado mediante la modificación con grupos de sales de amonio cuaternario preparados con la técnica de inmovilización electrostática de ensamblaje capa por capa mediante ensayos *in vitro* frente a *E. coli* y *S. aureus*. Para ello, pequeños discos de las fibras se introdujeron en suspensiones con las bacterias, se incubaron, y se midió la densidad óptica. Las fibras no recubiertas no mostraron apenas efecto inhibitorio contra las bacterias, mientras que las modificadas mostraron una actividad inhibitoria significativa, que aumentó conforme aumentaba a su vez el número de capas inmovilizadas, ya que la presencia de los agentes antimicrobianos de esta manera es mayor. La inhibición de las fibras recubiertas con un mayor número de capas fue de un 89,9% para *E. coli* y un 93,9% para *S. aureus*. En el estudio de Li y Wang (2013) se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosas recubiertas con lisozima mediante interacción electrostática. Para ello, las partículas de sílice se funcionalizaron previamente para incluir grupos cargados negativamente en su superficie mediante la carboxilación de las partículas por acoplamiento de 3-aminopropiltriétoxissilano con anhídrido succínico. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* frente a *E. coli*. Los ensayos *in vitro* se realizaron mediante el método de microdilución para establecer la concentración mínima inhibitoria, así como ensayos de microscopia para determinar la viabilidad de las bacterias tratadas. Para determinar la actividad antimicrobiana de las partículas *in vivo*, se usó un modelo de ratón con intestino infectado. Los

resultados mostraron una concentración mínima bactericida de las partículas funcionalizadas cinco veces menor que la lisozima libre. La actividad antimicrobiana se produce por una interacción multivalente de la lisozima con las paredes bacterianas que aumenta la concentración local de lisozima en la superficie de las células. La corona de lisozima hidroliza el peptidoglicano de la envoltura bacteriana y aumenta la permeabilidad de la membrana dando lugar a la fuga del contenido intracelular y, por lo tanto, a la muerte celular. Los resultados mostraron que estas partículas presentaban eficacia antibacteriana frente a *E. coli* tanto *in vitro* como *in vivo*, baja citotoxicidad y una mayor estabilidad que la lisozima libre.

Otros ejemplos de inmovilización no covalente son descritos en los estudios de Jiang *et al.* (2017) y Nielsen *et al.* (2018) en los cuales se llevó a cabo la inmovilización no covalente de compuestos antimicrobianos naturales mediante adsorción física, y que demuestran al igual que los ejemplos anteriores, la mejora de la efectividad del antimicrobiano tras su inmovilización. Jiang *et al.* (2017) desarrollaron nanocristales de quitina funcionalizados con lisozima mientras que en el estudio de Nielsen *et al.* (2018) se prepararon superficies de acero inoxidable y polietileno funcionalizadas con isoeugenol. Para evaluar la actividad antimicrobiana de los nanocristales de quitina funcionalizados se realizaron ensayos frente a *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis* mediante el método de microdilución. Se obtuvo que la actividad de la lisozima aumentaba conforme aumentaba la cantidad de nanocristales de quitina debido a la combinación de ambos y que al presentar mayor carga positiva que la lisozima libre, la actividad contra las bacterias era mayor (Jiang *et al.*, 2017). En el segundo caso, el objetivo fue prevenir biopelículas bacterianas y para ello, la actividad anti-biopelícula de las superficies funcionalizadas fue estudiada frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens* colocando los soportes funcionalizados en suspensiones de bacterias y cuantificando posteriormente mediante recuento en placa y observación mediante microscopía confocal. Los resultados mostraron que las superficies recubiertas con isoeugenol fueron eficaces para prevenir la formación de biopelículas debido a las propiedades antimicrobianas del isoeugenol adsorbido con efecto antibacteriano y anti-adhesivo. Además, se determinó la liberación del recubrimiento mediante inmersión de las superficies en agua y medida de la absorbancia. El recubrimiento resultó tener una estabilidad inferior a 10 días debido a la alta volatilidad del componente de aceite esencial observándose una liberación aproximada del 93% tras 24 h de inmersión en agua (Nielsen *et al.*, 2018).

#### **4.3.2 Compuestos inmovilizados mediante técnicas de inmovilización covalente**

Para superar las limitaciones de las técnicas anteriores, la inmovilización mediante enlace covalente entre los grupos funcionales de los compuestos antimicrobianos y de los soportes funcionalizados permite que la molécula bioactiva no se libere, aportándole mayor estabilidad y mayor vida media, previniendo así las desventajas que presentan al liberarse. A continuación, se expondrán diversos ejemplos de inmovilización covalente de antimicrobianos naturales sobre diferentes soportes clasificados en función del compuesto antimicrobiano inmovilizado, que demuestran la eficacia de esta técnica. Además de estos ejemplos, en la Tabla 1 se presentan de forma resumida otros estudios en los que se han desarrollado soportes con antimicrobianos naturales inmovilizados en su superficie.

##### **4.3.2.1 Componentes de aceites esenciales**

En el estudio realizado por Chen *et al.* (2009) se demostró la eficacia del carvacrol y el eugenol inmovilizados en soportes de quitosano frente a su aplicación en forma libre. La inmovilización se produjo sobre la superficie de nanopartículas de quitosano mediante la reacción base de Schiff vía enlace imina entre los grupos amino presentes de forma natural en el quitosano y el grupo aldehído de los compuestos antimicrobianos. Para ello se llevó a cabo previamente la derivatización de ambos componentes mediante adición de un grupo aldehído en la posición orto para añadir un grupo funcional secundario que pudiese usarse para el anclaje y que los compuestos siguieran manteniendo

el grupo hidroxilo libre que es el que presenta la actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de los materiales fue evaluada mediante ensayos *in vitro* estableciendo tanto la concentración mínima inhibitoria como la concentración mínima bactericida frente a *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados mostraron que las nanopartículas de quitosano no modificadas presentaron actividad antimicrobiana, ya que las interacciones entre la amina protonada del quitosano y las membranas cargadas negativamente de las bacterias interrumpen las funciones de la membrana y provocan la fuga de los componentes celulares. Por otra parte, la eficacia antibacteriana de los soportes se vio mejorada al utilizar las nanopartículas con los componentes inmovilizados, principalmente en el caso de las nanopartículas funcionalizadas con eugenol. Por tanto, en este estudio se desarrollaron nanopartículas de quitosano que además de presentar actividad antibacteriana mostraron actividad antioxidante al inmovilizar en su superficie carvacrol y eugenol. Además, estos materiales también presentaron la ventaja de reducir la toxicidad de los componentes de los aceites esenciales al evitar su liberación mediante anclaje covalente. Hay otros ejemplos descritos en la literatura en los que se ha llevado a cabo la inmovilización de vainillina (ver Tabla 1).

Siguiendo una aproximación similar se han descrito recientemente estudios en los que los componentes de aceites esenciales fueron inmovilizados sobre soportes de sílice a través del uso de organosilanos. Ruiz-Rico *et al.* (2017) desarrollaron partículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales para mejorar su actividad antimicrobiana y superar las limitaciones que presenta su adición en forma libre. Se utilizaron tres tipos de partículas de sílice (pirógena, amorfa y MCM-41) que presentan diferentes propiedades texturales, morfología y reactividad química, y cuatro antimicrobianos naturales (carvacrol, eugenol, timol y vainillina). Para la inmovilización se realizó previamente la derivatización del timol, carvacrol y eugenol para añadir un grupo aldehído que funcionase de anclaje, al igual que en el estudio anterior, y se utilizó la vainillina sin modificar, ya que contiene un grupo aldehído en su estructura. Una vez derivatizados los antimicrobianos, se llevó a cabo la preparación de derivados alcoxisilanos mediante reacción de los derivados aldehído y la vainillina con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) donde se produce la unión covalente entre el grupo amino del organosilano y el grupo aldehído de los antimicrobianos. Finalmente, esos compuestos derivados del silano se unieron a los grupos silanol de la superficie de los tres soportes de sílice. La actividad antimicrobiana del carvacrol, eugenol, timol y vainillina libres e inmovilizados se estudió frente a *L. innocua* y *E. coli* mediante el método de macrodilución y recuento en placa. Los resultados mostraron que los componentes de aceites esenciales preservaron las propiedades antimicrobianas tras la inmovilización e incluso, en algunos casos, se observó una mejora del efecto inhibitorio. Además, se estudió la actividad antimicrobiana de las partículas funcionalizadas más efectivas en leche pasteurizada inoculada con *L. innocua*, observándose que la vainillina inmovilizada mostró un efecto antimicrobiano mayor que el compuesto libre. También se evaluó si la inmovilización enmascaraba el impacto sensorial de los componentes de aceites esenciales utilizados sobre la matriz alimentaria utilizando un panel de catadores entrenados y se estimó que el porcentaje de reducción de la percepción del olor tras inmovilizar el compuesto fue del  $88,5 \pm 1,7\%$ , por lo que se confirmó que la percepción sensorial de los componentes de aceites esenciales disminuyó significativamente al inmovilizarlos. El mantenimiento y mejora de las propiedades antimicrobianas junto al enmascaramiento de las propiedades sensoriales de los componentes de aceites esenciales confirmó el potencial uso de los soportes desarrollados como aditivos alimentarios conservantes.

El mismo grupo de investigación realizó un estudio donde se evaluó la potencial aplicación de los componentes de aceites esenciales como conservantes antifúngicos en mermelada de fresa (Ribes *et al.*, 2017). Se evaluó la actividad antimicrobiana del eugenol y del timol inmovilizados frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* mediante ensayos *in vitro* en medio líquido y recuento en placa. Para evaluar la actividad antifúngica *in situ*, se usó mermelada de fresa inoculada con *A. niger* y *Z. bailii* y se llevó a cabo el recuento en placa a lo largo de un periodo de almacenamiento de 28 días. Tanto el estudio *in vitro* como el estudio *in situ* mostraron que el eugenol y el timol inmovilizados en partículas MCM-41 redujeron significativamente

el crecimiento fúngico. Se realizó también una evaluación sensorial del impacto de los compuestos inmovilizados sobre la matriz alimentaria confirmándose la reducción del impacto en las propiedades sensoriales en más del 92% (eugenol) y 96% (timol). Posteriormente, se evaluó también su efecto sobre zumos de frutas utilizando en este caso los antimicrobianos inmovilizados en combinaciones binarias con la finalidad de observar el posible efecto aditivo o sinérgico antimicrobiano frente a *E. coli* y *Z. rouxii* (Ribes *et al.*, 2019). Se realizaron ensayos *in vitro* e *in situ*, con zumos de manzana y uva comerciales inoculados con los microorganismos objetivo, mediante el método de macrodilución de los compuestos individuales y combinados. Los resultados mostraron que la efectividad de los compuestos individuales varió en función de la concentración de partícula funcionalizada y se observó el efecto aditivo del uso combinado de las partículas para la combinación de eugenol y carvacrol frente a *Z. rouxii* en ambos zumos. Además, se llevó a cabo un análisis sensorial de los zumos con las partículas incorporadas y se cuantificó la reducción del aroma mediante microextracción en fase sólida del espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS) confirmándose de nuevo el enmascaramiento prácticamente total de los componentes de aceites esenciales incorporados.

Además del uso de las partículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales como aditivos alimentarios, se planteó el posible uso de estos soportes como materiales filtrantes para la estabilización microbiológica de diferentes bebidas. Peña-Gómez *et al.* (2019b) describen el uso de micropartículas de sílice funcionalizadas con eugenol y vainillina como materiales filtrantes para la pasteurización en frío de zumo de manzana. En primer lugar, se evaluó la capacidad de reducción microbiana de un lecho de 1 cm de las partículas funcionalizadas frente a *E. coli* inoculada en zumo de manzana comercial mediante filtrado y recuento en placa obteniendo una reducción de 5,5 órdenes logarítmicos, por lo que se confirmó que el método era adecuado para realizar la pasteurización en frío, tal y como indica la FDA. Una vez establecida la capacidad de reducción microbiana del lecho, se realizaron ensayos de filtrado de zumo de manzana fresco y se evaluó la influencia del tratamiento sobre parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales del zumo durante su almacenamiento en refrigeración. Los resultados mostraron que la flora nativa del zumo se inhibió por completo tras el filtrado a través de las partículas funcionalizadas, manteniéndose en valores casi nulos durante 120 días de almacenamiento. Otras tecnologías de conservación térmicas y no térmicas aseguraron como máximo una vida útil de hasta 60 días a 4 °C, por lo que la filtración con partículas funcionalizadas superó los resultados obtenidos hasta el momento. Los parámetros fisicoquímicos evaluados (pH, acidez, °Brix y color) se mantuvieron estables en el caso del zumo filtrado a través de las partículas funcionalizadas con eugenol. Los resultados de lixiviado mostraron que para el eugenol no hubo lixiviación mientras que para la vainillina hubo una liberación de un 0.6%, que podría afectar a las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del zumo. En la prueba sensorial para determinar la aceptabilidad del zumo por parte del consumidor, los resultados mostraron una aceptación excelente para el zumo tratado con el eugenol inmovilizado. En otro estudio, se llevó a cabo la aplicación de los materiales filtrantes para la estabilización microbiológica de agua (Peña-Gómez *et al.*, 2019a). La capacidad de reducción microbiana de un lecho de partículas funcionalizadas con los componentes de aceites esenciales fue evaluada frente a *E. coli* inoculada en agua usando diversos espesores de lecho y diferentes tamaños de partícula. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de filtrado simple, filtrado de varias muestras y filtrado tras el pre-acondicionado del lecho (lavado con agua). Además, para comprobar el mecanismo de acción de los materiales filtrantes se realizaron ensayos con microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido de emisión en campo (FESEM). Los resultados de filtrado evidenciaron la eficacia de las partículas funcionalizadas usadas como materiales filtrantes para eliminar por completo la carga microbiana del agua, manteniéndose esta capacidad de reducción tras el filtrado de múltiples muestras y el pre-acondicionamiento. Mediante los ensayos de microscopía se pudo establecer que durante la filtración se produjo un proceso combinado de adsorción física e inactivación tras el contacto con las moléculas antimicrobianas inmovilizadas. De forma similar, se estudió la capacidad de reducción microbiana de los materiales filtrantes para la estabilización microbiana de cerveza artesana (Peña-Gómez *et al.*, 2020). El filtrado de cerveza a través

de los materiales filtrantes desarrollados mostró que los soportes funcionalizados fueron capaces de reducir o eliminar por completo tanto una bacteria patógena modelo (*E. coli*) como bacterias mesófilas, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras típicos de la microbiota de la cerveza artesana, y que la eficacia continuó tras filtrar múltiples muestras y realizar lavados previos. De la misma manera que en los estudios anteriores se determinó la posible lixiviación de los antimicrobianos inmovilizados, obteniendo liberación cero. Por lo tanto, estos estudios han demostrado el potencial de las partículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales como materiales filtrantes para su aplicación como método de pasteurización en frío obteniendo bebidas estables microbiológicamente con larga vida útil de forma similar que otras tecnologías de conservación térmicas y no térmicas, sin afectar de forma importante a las propiedades del producto final.

#### 4.3.2.2 Compuestos fenólicos hidrófilos

Entre los compuestos fenólicos hidrófilos destaca el ácido gálico, y Deligiannakis *et al.* (2012) y Lee y Je (2013) estudiaron su inmovilización sobre diferentes soportes demostrando su eficacia con respecto a su aplicación en forma libre. Deligiannakis *et al.* (2012) desarrollaron nanomateriales antioxidantes funcionalizando nanopartículas de sílice de diferentes tamaños con ácido gálico mediante enlace covalente. Para ello, las nanopartículas de sílice fueron funcionalizadas con APTES y en una segunda etapa se llevó a cabo la inmovilización del ácido gálico mediante formación de enlace amida entre los grupos amino de las partículas funcionalizadas con el organosilano y el grupo carboxilo del ácido gálico activado por el agente acoplante *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto (EDC). Se evaluó la capacidad antioxidante del ácido gálico puro y de las partículas con el ácido gálico inmovilizado mediante el método estandarizado de radicales DPPH y los resultados mostraron que las nanopartículas funcionalizadas fueron capaces de eliminar los radicales DPPH a través de reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno de una manera más rápida que el ácido gálico puro. Además, estas partículas podían ser reutilizadas tras aplicarles un lavado sin perder su efectividad. En el caso de Lee y Je (2013), desarrollaron partículas de quitosano con ácido gálico inmovilizado mediante una reacción de anclaje inducida por radicales libres. La actividad antimicrobiana de las partículas funcionalizadas se evaluó frente a bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, tanto Gram+ (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, y *L. monocytogenes*) como Gram- (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium* y *Shigella flexneri*), mediante ensayos *in vitro* en medio líquido. Además, para determinar el modo de acción de las partículas desarrolladas se determinó la integridad de membrana y se utilizó microscopía electrónica de transmisión en *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados mostraron que el quitosano modificado mostró actividades antimicrobianas más altas y concentraciones mínimas inhibitorias más bajas que el no modificado. El tratamiento de los microorganismos con las partículas funcionalizadas produjo la alteración de la membrana bacteriana incrementando la permeabilidad de la envoltura celular, así como la liberación de los componentes intracelulares.

#### 4.3.2.3 Ácidos grasos libres

Dentro de los ácidos grasos libres, en los estudios de inmovilización destacan principalmente los ácidos linoleico, oleico y palmítico. En el estudio de Calce *et al.* (2014) se demostró la eficacia de estos ácidos grasos naturales inmovilizados. Desarrollaron materiales poliméricos biodegradables a base de pectinas funcionalizadas con ácidos grasos naturales (ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico) utilizando como sustrato para realizar envases el polietileno (PE). Para la síntesis de estos derivados de pectina, primero se sintetizaron los anhídridos de los ácidos grasos y, a continuación, se llevó a cabo la inmovilización de los ácidos grasos mediante acilación de las funciones alcohólicas del polisacárido con los anhídridos de los ácidos grasos mediante molienda mecánica en presencia del catalizador  $K_2CO_3$  y unas gotas de etanol e irradiación con microondas. La actividad antimicrobiana de estos derivados fue estudiada frente a *S. aureus* y *E. coli* mediante el método de microdilución en medio

líquido. Los resultados mostraron que las muestras de pectina-oleato y pectina-linoleato inhibieron el 50-70% de los microorganismos y se obtuvieron mejores resultados para *S. aureus*. Además, se hicieron ensayos para demostrar que los compuestos no ejercían efectos citotóxicos sobre células eucarióticas. Sobre la base de estos resultados, para explorar la aplicabilidad de los materiales desarrollados como sistemas de envasado activo se prepararon recubrimientos de los derivados de pectina sobre películas de polietileno mediante evaporación del agua procedente de las disoluciones de los derivados de pectina. Aparte de la actividad antimicrobiana, se evaluaron las propiedades barrera de las películas frente al oxígeno, y se observó que los dobles enlaces del ácido oleico y linoleico capturaban las moléculas de oxígeno, reduciendo así la permeabilidad de las películas de polietileno, por lo que se podrían utilizar para su uso en envases activos.

#### 4.3.2.4 Enzimas y péptidos de origen animal

En los estudios realizados por Liburdi *et al.* (2016) y Cappannella *et al.* (2016) se demostró la eficacia de la lisozima inmovilizada mediante la reacción base de Schiff entre el grupo aldehído de la superficie de soportes de quitosano y el grupo amino de la lisozima utilizando un agente acoplante, frente a su aplicación en forma libre. Liburdi *et al.* (2016) aplicaron partículas de quitosano funcionalizadas con lisozima para el tratamiento de vinos blancos con diferente contenido en compuestos fenólicos y sulfuroso. Se estudió la actividad antimicrobiana de la lisozima libre e inmovilizada frente a *Oenococcus oeni* inoculada en vino blanco mediante determinación del descenso de absorbancia de la disolución por lisis bacteriana. Los resultados mostraron que la inmovilización covalente redujo la eficacia antimicrobiana de la lisozima. Sin embargo, la estabilidad de la enzima se vio mejorada tras la inmovilización, ya que la lisozima inmovilizada no se vio afectada por la presencia de polifenoles ni sulfuroso libre, a diferencia de la lisozima en forma libre. Por tanto, la inmovilización disminuyó la sensibilidad de la enzima y además esto permitiría prevenir problemas de alergias asociados a la lisozima en forma libre, por lo que podría ser usado para el control de bacterias ácido lácticas en el proceso de elaboración del vino. Otro estudio que demuestra su efecto sobre vino fue el de Cappannella *et al.* (2016), en el que se usaron soportes esféricos de quitosano funcionalizados con lisozima para desarrollar un sistema de lecho fluidizado eficaz frente a las bacterias lácticas en vinos blancos y tintos pudiendo así disminuir la dosis de sulfuroso. La actividad antimicrobiana de los soportes funcionalizados fue determinada al igual que en el estudio anterior mediante descenso de la absorbancia por lisis continua de *O. oeni* inoculada en vinos blancos y tintos en un reactor de lecho fluidizado. Además, se evaluó la estabilidad de la lisozima libre e inmovilizada mediante determinación de la actividad residual. Los resultados mostraron que la inmovilización covalente redujo significativamente la actividad antimicrobiana de la lisozima, pero se vio aumentada la estabilidad de la enzima tras la inmovilización incrementando la vida útil para su uso industrial. La aplicación de las partículas de quitosano funcionalizadas con lisozima en un reactor de lecho fluidizado fue capaz de lisar las bacterias inoculadas en el vino de forma más eficaz que la lisozima libre, lo que confirma su potencial uso en la elaboración de vino.

Por otra parte, y en este caso para estudiar el efecto sobre alimentos sólidos, Niu *et al.* (2020) desarrollaron partículas de N-succinil quitosano funcionalizadas con lisozima (LSZ-NSC) para su aplicación en la conservación de fresas. El quitosano presenta diversos grupos amino e hidroxilo activos y la introducción de un grupo carboxilo en el N terminal utilizando anhídrido succínico dio lugar al N-succinil quitosano, que es soluble en agua, a diferencia del quitosano puro. La inmovilización de la lisozima se realizó utilizando el agente de acoplamiento EDC/ *N*-hidroxisuccinimida (NHS), para, a diferencia de los anteriores estudios, formar un enlace amida covalente entre el grupo carboxilo del quitosano y el grupo amina de la lisozima. La actividad bacteriostática de la lisozima libre e inmovilizada fue determinada mediante el método de difusión en disco frente a *S. aureus*, *Listeria*, *Salmonella* y *E. coli*. Para observar el efecto antimicrobiano en las fresas, se prepararon muestras de la fruta recubiertas con una película de LSZ-NSC y se evaluó el efecto del almacenamiento mediante análisis sensorial y determinación de parámetros físico-químicos. Los resultados mostraron que la actividad

antimicrobiana *in vitro* de la lisozima al inmovilizarla aumentó en un 256%. Las fresas tratadas con LSZ-NSC mantuvieron su apariencia intacta durante 5 días de almacenamiento, mientras que las no tratadas se descompusieron y perdieron su valor alimenticio al cabo de 3 días. Los parámetros físico-químicos evaluados presentaron mejores resultados al utilizar el recubrimiento de LSZ-NSC, lo que indica que la película que recubre a la fresa actúa de barrera y permite mantener la fresa fresca con una vida útil mayor. Por lo tanto, se consiguió obtener un material seguro para el almacenamiento de alimentos y que prolongaba su vida útil.

Además de en quitosano, la lisozima ha sido inmovilizada en superficies de acero inoxidable (Yuan *et al.*, 2013) y en películas de plásticos sintéticos como el etilen-vinil-alcohol (EVOH) (Muriel-Galet *et al.*, 2013) destinados a estar en contacto con alimentos. Yuan *et al.* (2013) desarrollaron superficies de acero inoxidable funcionalizadas con quitosano y lisozima inmovilizada. En primer lugar, se trató el acero inoxidable con disolución pirafña para generar grupos hidroxilo en la superficie y se activó la superficie de acero inoxidable mediante un anclaje biomimético de dopamina para generar grupos amino activos. Posteriormente, se unió covalentemente el quitosano utilizando glutaraldehído como agente de acoplamiento. En último lugar, se unió la lisozima al quitosano a través de 1,1'-carbonildimidiazol como conector bifuncional a través de un enlace estable de carbamato para potenciar la actividad antimicrobiana de la superficie desarrollada. La actividad antibacteriana de las superficies funcionalizadas fue estudiada mediante incubación de las superficies con *S. aureus* y determinación de la capacidad de adhesión bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido e inhibición de la bacteria tras el contacto con la superficie mediante microscopía de fluorescencia y recuento en placa. Tanto la adhesión como la viabilidad del microorganismo se vio muy disminuida en las superficies de acero inoxidable funcionalizadas debido a la actividad antibacteriana del quitosano y la lisozima. Los resultados mostraron que se preservaron las propiedades tanto del quitosano como de la lisozima tras la inmovilización y que se produjo una mejora sustancial en la eficacia contra *S. aureus* en los sustratos inmovilizados con lisozima en relación con los que presentaban únicamente el quitosano. Además, se evaluó la estabilidad de los antimicrobianos inmovilizados mediante inmersión del material en una solución tampón durante 10 días y determinación de la posible lisozima liberada y evaluación de la actividad antimicrobiana. Los resultados no mostraron liberación de la lisozima y las propiedades biocidas se mantuvieron intactas.

Muriel-Galet *et al.* (2013) desarrollaron películas de EVOH con lisozima inmovilizada para el desarrollo de material para un envase activo. La lisozima fue inmovilizada mediante enlace covalente a los copolímeros de EVOH utilizando carbodiimida como agente acoplante. Como paso previo a la inmovilización, fue necesaria la modificación de la superficie de EVOH mediante irradiación UV para generar grupos de ácido carboxílico. Tras el tratamiento UV, los grupos de ácido carboxílico fueron activados mediante reacción con EDC y NHS y, a continuación, se llevó a cabo el anclaje covalente de la lisozima mediante enlace amida entre los grupos caboxilato de la película de EVOH y los grupos amino de la lisozima. La actividad antimicrobiana de la lisozima libre e inmovilizada fue estudiada frente a *L. monocytogenes* mediante ensayos *in vitro* en medio líquido. El tratamiento con lisozima libre produjo una reducción de 1,34 órdenes logarítmicos tras 24 h de incubación y la lisozima inmovilizada en las mismas condiciones produjo una reducción de 0,95-1,08 órdenes logarítmicos. Estos resultados confirmaron la posible aplicación de estas películas funcionalizadas con lisozima para reducir el crecimiento de bacterias Gram+ sin migración de la lisozima desde el material. Además, se realizó un test de migración y los resultados mostraron que la lisozima no migraba. Por tanto, el estudio confirmó el éxito de utilizar lisozima inmovilizada sobre la superficie del polímero para el desarrollo de envases antimicrobianos, ya que estos materiales podrían ser parte de la superficie interna de un envase en contacto directo con los alimentos reduciendo el crecimiento de bacterias Gram+, sin migración del compuesto antimicrobiano al alimento y mejorando la estabilidad de los productos envasados.

De entre los numerosos péptidos antimicrobianos naturales de origen animal existentes, Rapsch *et al.* (2014) investigaron sobre el desarrollo de superficies planas con buforin II, LL-37, BMAP-27, melittin

y protamine covalentemente inmovilizados sobre su superficie. La inmovilización se realizó mediante enlace covalente entre los grupos amino de los péptidos no modificados y la superficie del material de soporte (PolyAn) previamente funcionalizado con diferentes grupos funcionales entre los que se encuentran los grupos aldehído, epoxi, NHS y PDITC, que son adecuados para inmovilizar moléculas con grupos amina. Para conocer las propiedades antimicrobianas de los péptidos en estado inmovilizado, las superficies modificadas fueron incubadas en presencia de una suspensión del microorganismo, tras lo cual se llevó a cabo el recuento en placa y tinción para determinar la adhesión bacteriana a la superficie. Además, se llevó a cabo un ensayo de liberación para evaluar el posible lixiviado del péptido desde la superficie del soporte. El péptido BMAP-27 fue el que mejores propiedades presentó en estado inmovilizado, ya que redujo en 3 órdenes logarítmicos las bacterias vivas. El mantenimiento de la actividad antimicrobiana tras la inmovilización se vio muy relacionado con el mecanismo de acción de la molécula antimicrobiana. Los péptidos cuyo mecanismo de acción es la alteración de la membrana bacteriana, fueron capaces de inhibir *E. coli* en estado inmovilizado mientras que los péptidos que actúan a nivel metabólico requieren acceder al interior de la célula bacteriana y, por tanto, perdieron su efecto inhibitorio tras el anclaje covalente al soporte. Con el fin de establecer la biocompatibilidad de los materiales desarrollados, se evaluó la citotoxicidad del péptido BMAP-27 libre e inmovilizado. Mientras que el péptido libre mostró citotoxicidad a concentraciones similares a la MIC, el péptido inmovilizado no mostró ningún efecto adverso. Con este estudio se evidenció la influencia de la química de la reacción de acoplamiento en la cantidad del péptido inmovilizado, así como en su actividad antimicrobiana para el desarrollo de superficies funcionalizadas con péptidos antimicrobianos.

#### 4.3.2.5 Bacteriocinas

Saini *et al.* (2016) desarrollaron películas de nanofibras de celulosa funcionalizadas con nisina. Para la inmovilización, en primer lugar, se realizó un pretratamiento a las fibras de celulosa con 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo para activar la superficie formando grupos carboxilo. Para el anclaje de la nisina, los grupos carboxilo de las nanofibras de celulosa se activaron mediante reacción con EDC y NHS para la formación de un enlace amida entre el grupo amina del péptido y el grupo carboxilo de la superficie del soporte. La actividad antimicrobiana de las películas fue estudiada frente a *B. subtilis* y *S. aureus* mediante el método de difusión en disco e incubación de las películas en presencia de una suspensión bacteriana y recuento en placa. Los resultados del ensayo de zona de inhibición mostraron reducción del crecimiento muy significativa sugiriendo la presencia de nisina no anclada covalentemente en las películas de celulosa. Los resultados del ensayo antimicrobiano cuantitativo mostraron que el efecto antibacteriano se debía a un efecto combinado del contacto activo con la nisina inmovilizada y la liberación de la nisina no anclada. Sin embargo, el lavado de los materiales permitió mantener las propiedades antimicrobianas de las películas desarrolladas confirmando así la efectividad de la inmovilización.

**Tabla 1.** Resumen de ejemplos de antimicrobianos naturales inmovilizados en la superficie de diferentes soportes.

Soporte	Compuesto inmovilizado	Técnica de inmovilización	Antimicrobial studies	Referencia
Biopolímeros de quitosano	Vainillina	Reacción base de Schiff	La actividad antimicrobiana y antifúngica de los biopolímeros fue evaluada frente a <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i> mediante ensayos	Marin <i>et al.</i> (2013)

			<i>in vitro</i> en medio sólido determinando el halo de inhibición.	
Superficies de acero inoxidable	Mezcla de aceite de canela y quitosano	Revestimiento mediante adsorción física	La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a <i>S. epidermis</i> mediante ensayos <i>in vitro</i> en medio líquido.	Magetsari <i>et al.</i> (2014)
Superficies de metacrilato de polimetilo y poliestireno	Extracto de <i>Ocimum sanctum</i> , que contiene principalmente eugenol, y otros componentes como el $\beta$ -cariofileno y el $\alpha$ -humuleno	Revestimiento mediante adsorción física	La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> mediante el método de difusión en disco.	Rajaraman <i>et al.</i> (2015)
Películas de quitosano	Vainillina	Reacción base de Schiff entre el grupo aldehído de la vainillina y los grupos amino del quitosano formándose un enlace imina	La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a <i>E. coli</i> mediante el método de difusión en disco. Además, se estudió la liberación de la vainillina no anclada mediante un ensayo de inmersión total.	Stroescu <i>et al.</i> (2015)
Películas de PET	Timol	Enlace no covalente entre el grupo hidroxilo del timol y el monómero metacrílico formando un enlace éster para generar el metacrilato de timilo. Polimerización del metacrilato de timilo sobre la película de PET mediante inmovilización de un iniciador radical de transferencia de átomos con los	La actividad antimicrobiana fue estudiada frente a <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. aureus</i> mediante ensayos de adhesión bacteriana por sedimentación y recuento en placa, y visualización de formación de biopelículas de las bacterias con microscopía confocal.	Bedel <i>et al.</i> (2015)

		grupos amino del PET previamente tratado con plasma NH <sub>3</sub> .		
Micropartículas y bloques de fosfato de calcio	Vainillina	Derivatización previa de la vainillina mediante reacción con 1,5-pentanodiamina y borohidruro de sodio dando lugar al derivado 4-[[[3-aminopentil) amino] metil]-2-metoxifenol. Inmovilización mediante enlace fosforamida entre la superficie de los soportes de CaP previamente activados con EDC y el derivado 4-[[[3-aminopentil) amino] metil]-2-metoxifenol.	La actividad antimicrobiana de los soportes fue estudiada frente a <i>E. coli</i> mediante ensayos <i>in vitro</i> en medio líquido y recuento en placa y microscopía FESEM. Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad y de bioactividad <i>in vitro</i> con una línea celular de osteoblastos.	Polo <i>et al.</i> (2018)
Partículas de sílice, partículas de celulosa y membranas de celulosa	Carvacrol, eugenol, timol y vainillina	Enlace covalente entre el grupo amino del aminopropiltriectoxisilano (APTES) anclado sobre las partículas de sílice y el grupo aldehído de los componentes de aceites esenciales no modificados o previamente derivatizados	La actividad antimicrobiana de los soportes fue estudiada frente a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Acetobacter aceti</i> mediante ensayos <i>in vitro</i> en medio líquido y recuento en placa. Además, se utilizó un kit de fluorescencia con los colorantes SYTO 9 y yoduro de propidio para determinar la viabilidad de las células.	García-Ríos <i>et al.</i> (2018)

Micropartículas de sílice	Carvacrol, eugenol, timol y vainillina	Enlace covalente entre el grupo amino del APTES anclado sobre las partículas de sílice y el grupo aldehído de los componentes de aceites esenciales no modificados o previamente derivatizados	Se evaluó la eficacia de los compuestos inmovilizados frente a <i>H. pylori</i> mediante el método de macrodilución y recuento en placa. Además, se estudió el mecanismo de acción de las partículas funcionalizadas mediante tinción con microscopía de fluorescencia y recuento directo de células viables combinada con hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (DVC-FISH).	Ruiz-Rico <i>et al.</i> (2020)
Fibras de lana	Lisozima	Enlace covalente usando tris (hidroximetil) fosfina (THP) como agente acoplante. Los grupos hidroximetil del THP reaccionaron con los grupos amina de la lana a través de la reacción de Mannich generando un enlace P-CH <sub>2</sub> -N y los grupos amino de la lisozima reaccionaron con los grupos hidroximetil libres del THP unido a la fibra de lana.	La actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> fue evaluada mediante la prueba de zona de inhibición y el método de recuento celular.	Yang <i>et al.</i> (2020)

## 5. CONCLUSIONES

Los antimicrobianos naturales son una alternativa a los métodos de conservación convencionales y dentro de las nuevas metodologías de conservación no térmicas son una opción sostenible y económica. La inmovilización de estos compuestos sobre diferentes soportes supone una nueva forma de administración que permite aumentar su efectividad y estabilidad reduciendo su toxicidad y el efecto sobre la matriz alimentaria. Entre las metodologías de inmovilización, la inmovilización covalente permite que las propiedades bioactivas se mantengan sin liberar el compuesto al medio, ya

que se produce una fuerte unión entre los grupos funcionales de la molécula bioactiva y los grupos funcionales del sustrato previamente funcionalizado. En los estudios descritos en este trabajo se ha demostrado el mantenimiento e incluso la mejora de la eficacia de los compuestos inmovilizados frente a microorganismos patógenos y no patógenos que pueden estar presentes en alimentos con respecto a su adición en forma libre.

Son múltiples las ventajas que aporta la inmovilización de los agentes antimicrobianos naturales para su utilización como técnica de conservación en la industria alimentaria. La inmovilización de antimicrobianos naturales en la superficie de partículas usadas como aditivos alimentarios o auxiliares tecnológicos ha demostrado su potencial uso para la estabilización y eliminación de microorganismos de alimentos líquidos y semisólidos. Por otra parte, otros de los estudios muestran su aplicación como recubrimiento de un alimento que necesite protección, además de conseguir aumentar su vida útil. Por último, dentro de este sector también es prometedor el desarrollo de envases activos que puedan inhibir el crecimiento de microorganismos presentes en los alimentos sin necesidad de liberar los antimicrobianos al medio y pudiendo sustituir y reducir los excesivos envases actuales. También existe la posibilidad de aplicar esta técnica en superficies en contacto con los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria (superficies donde se manipulen alimentos, equipamiento, conducciones, etc.) para evitar su contaminación.

Sin embargo, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, todavía presentan limitaciones que necesitan suplirse realizando un mayor número de estudios. En los estudios de inmovilización no covalente, tal y como se ha comentado, los compuestos están anclados mediante uniones libres y su liberación puede provocar los mismos inconvenientes que su aplicación en forma libre. Al utilizar la inmovilización mediante covalente, las limitaciones que pueden presentar son la disminución de la efectividad tras el anclaje y la liberación parcial por desestabilización del enlace responsable de la inmovilización. Estas limitaciones necesitan ser investigadas en profundidad para que la efectividad sea la máxima y la lixiviación cero antes de que puedan ser ampliamente aplicadas en el sector agroalimentario.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, J.; RAMASWAMY, H.S.; ALLI, I.; NGADI, M. (2003). Effect of high-pressure on rheological characteristics of liquid egg. *Food Science and Technology*, 36: 517–524.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. (2014). Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4): 240–254.
- ASTANI, A.; ANDREICHLING, J.; SCHNITZLER, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*.
- BAKER, R.W. (2004). Membrane technology and applications. In: *John Wiley and Sons*, Second ed.
- BARBA, F. J.; PARNIAKOV, O.; PEREIRA, S. A.; WIKTOR, A.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; SARAIVA J.A.; RASO J.; MARTIN-BELLOSO O.; WITROWA-RAJCHERT D.; LEOVKA N.; VOROBIEV, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77: 773–798.
- BARBIROLI, A.; BONOMI, F.; CAPRETTI, G.; IAMETTI, S.; MANZONI, M.; PIERGIOVANNI, L.; ROLLINI, M. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26(2): 387–392.
- BASHIR, N.; SOOD, M.; BANDRAL, J. D. (2020). Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2): 254–261.
- BEDDEL, S.; LEPOITTEVIN, B.; COSTA, L.; LEROY, O.; DRAGOE, D.; BRUZAUD, J.; HERRY J.M.; GUILBAUD M.; BELLON-FONTAINE M.N.; ROGER, P. (2015). Antibacterial poly (ethylene terephthalate) surfaces obtained from thymyl methacrylate polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 53(17): 1975-1985.

- BEKMURZAYEVA, A.; DUNCANSON, W.J.; AZEVEDO H.S.; KANAYEVA D. (2018). Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. *Materials Science & Engineering C*, 93: 1073-1089.
- BENKERROUM, N. (2010). Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3): 320-338.
- BERNARDOS, A.; MARINA, T.; ŽÁČEK, P.; PÉREZ-ESTEVE, E., MARTÍNEZ-MAÑEZ R.; LHOTKAG, M.; KOUŘIMSKÁB, L.; PULKRÁBEKA J.; KLOUČEK, P. (2015). Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95:2824–2831.
- BINTSIS, T.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; ROBINSON, R. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 637–645.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4): 256–265.
- BOTEQUIM, D.; MAIA, J.; LINO, M. M. F.; LOPES, L. M. F.; SIMÕES, P. N.; ILHARCO, L. M.; FERREIRA, L. (2012). Nanoparticles and surfaces presenting antifungal, antibacterial and antiviral properties. *Langmuir*, 28(20): 7646–7656.
- BOUDET, A. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68: 2722–2735.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223–253.
- CALCE, E.; MIGNOGNA, E.; BUGATTI, V.; GALDIERO, M.; VITTORIA, V.; DE LUCA, S. (2014). Pectin functionalized with natural fatty acids as antimicrobial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68: 28–32.
- CAPELETTI, L. B.; DE OLIVEIRA, L. F.; GONÇALVES, K. D. A.; DE OLIVEIRA, J. F. A.; SAITO, Â.; KOBARG, J.; ZIMNOCH DOS SANTOS, J. H.; BORBA CARDOSO, M. (2014). Tailored silica-antibiotic nanoparticles: Overcoming bacterial resistance with low cytotoxicity. *Langmuir*, 30: 7456–7464.
- CAPPANNELLA, E.; BENUCCI, I.; LOMBARDELLI, C.; LIBURDI, K.; BAVARO, T.; ESTI, M. (2016). Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. *Food Chemistry*, 210: 49–55.
- CHANG, S.; REDONDO-SOLANO, M.; THIPPAREDDI, H. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 141-146.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4): 813–835.
- 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.
- CHOI, L. H.; NIELSEN, S. S. (2005). The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*, 28(1): 13–29.
- CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3).
- CONTADO, C.; RAVANI, L.; PASSARELLA, M. (2013). Size characterization by sedimentation field flow fractionation of silica particles used as food additives. *Analytica Chimica Acta*, 788: 183–192.
- COSTA, F.; CARVALHO, I. F.; MONTELARO, R. C.; GOMES, P.; MARTINS, M. C. L. (2011). Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(4): 1431–1440.
- CREDOU; BERTHELOT (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30): 4767-4788.

- CROWLEY, S. V.; O'CALLAGHAN, T. F.; KELLY, A. L.; FENELON, M. A.; O'MAHONY, J. A. (2015). Use of ultrafiltration to prepare a novel permeate for application in the functionality testing of infant formula ingredients. *Separation and Purification Technology*, 141: 294–300.
- DA SILVA MALHEIROS, P.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6): 284–292.
- DAGLIA, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2): 174–181.
- DAVIDSON, P. M.; CRITZER, F. J.; TAYLOR, T. M. (2013). Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. 4:163-190.
- DEAK, T. (2014). Food technology: sterilization. In: *Encyclopedia of Food Safety*, 3: 245-252.
- DEETH, H.; DATTA, N.; ROSS, A.; DAM, X. (2007). Pulsed electric field technology: Effect on milk and fruit juices. In: *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. G. Tewari & V. Juneja (Eds.), Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- DELIGIANNAKIS, Y.; SOTIRIOU, G. A.; PRATSINIS, S. E. (2012). Antioxidant and Antiradical SiO<sub>2</sub> Nanoparticles Covalently Functionalized with Gallic Acid. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(12): 6609–6617.
- DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6): 1629–1642.
- DEVI, R.; ALEMAYEHU, E.; SINGH, V.; KUMAR, A.; MENGISTIE, E. (2008). Removal of fluoride, arsenic and coliform bacteria by modified homemade filter media from drinking water. *Bioresource Technology*, 99(7): 2269–2274.
- ELEZ-MARTÍNEZ, P.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high- intensity pulsed electric fields or heat treatment. *European Food Research and Technology*, 222: 321-329.
- EVRENDILEK, G. A.; BAYSAL, T.; ICIER, F.; YILDIZ, H.; DEMIRDOVEN, A.; BOZKURT, H. (2012). Processing of fruits and fruit juices by novel electrotechnologies. *Food Engineering Reviews*, 4(1): 68–87.
- FUENMAYOR, C. A.; LEMMA, S. M.; MANNINO, S.; MIMMO, T.; SCAMPICCHIO, M. (2014). Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, 122: 110–116.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2): 51–70.
- GARCÍA-RÍOS, E.; RUIZ-RICO, M.; GUILLAMÓN, J. M.; PÉREZ-ESTEVE, É.; BARAT, J. M. (2018). Improved antimicrobial activity of immobilised essential oil components against representative spoilage wine microorganisms. *Food Control*, 94: 177–186.
- GAYSINSKY S.; WEISS J. (2007). Aromatic and spice plants: Uses in food safety. *Stewart Postharvest Solutions*, 4: 9–16.
- GEORGE, D. R.; SMITH, T. J.; SHIEL, R. S.; SPARAGANO, O. A. E.; GUY, J. H. (2009). Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the Poultry Red Mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4): 276–282.
- GIALLELI, A.I.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A.A. (2016). Apple juice preservation through microbial adsorption by nano/micro-tubular cellulose. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33:416–421.
- GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. (2000). Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(2): 91–157.
- GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7): 698-725.
- GUPTA, A.; LANDIS, R. F.; ROTELLO, V. M. (2016). Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Research*, 5.
- GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; AND NOLLA, J. (2008). Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13:245–251.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. (2014), Natural products as antimicrobial agents, *Food Control*, 46: 412-429.

- HAO, L.; WANG, Z.; QI, J.; WANG, S.; HOU, L.; WU, J.; YANG, J. (2011). Preparation of immobilized  $\epsilon$ -polylysine PET nonwoven fabrics and antibacterial activity evaluation. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 26(4): 675–680.
- HU, Y.; WANG, Y.; LI, F.; MA, C.; WANG, J. (2017). Design and expeditious synthesis of organosilanes as potent antivirals targeting multidrug-resistant influenza A viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 135: 70–76.
- HUANG, W.; LI, X.; XUE, Y.; HUANG, R.; DENG, H.; MA, Z. (2013). Antibacterial multilayer films fabricated by LBL immobilizing lysozyme and HTCC on nanofibrous mats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53: 26–31.
- HUH, A. J.; KWON, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release* 156(2):128–145.
- HUPPERTZ, T.; VASILJEVIC, T.; ZISU, B.; DEETH, H. (2019). Novel Processing Technologies: Effects on Whey Protein Structure and Functionality. In: *Whey Proteins* (pp. 281-334). Academic Press.
- 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).
- IKEHATA, K. (2019). Recent research on ozonation by-products in water and wastewater treatment: formation, control, mitigation, and other relevant topics. In: *Water and Wastewater Treatment Technologies* (pp. 117-144). Springer, Singapore.
- JIANG, S.; QIN, Y.; YANG, J.; LI, M.; XIONG, L.; SUN, Q. (2017). Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers. *Food chemistry*, 221: 1507-1513.
- JIANG, Z., DEMIR, B., BROUGHTON, R. M., REN, X., HUANG, T. S., & WORLEY, S. D. (2016). Antimicrobial silica and sand particles functionalized with an *N*-halamine acrylamidesiloxane copolymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(19).
- JIAO, B.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of Food Engineering*, 63: 303–324.
- JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. (2017). Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3): 637–652.
- JO, Y. J.; CHUN, J. Y.; KWON, Y. J.; MIN, S. G.; HONG, G. P.; CHOI, M. J. (2015). Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT—Food Science and Technology*, 60: 444–451.
- KÄLLROT, M.; EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. C. (2006). Surface functionalization of degradable polymers by covalent grafting. *Biomaterials*, 27 (9): 1788-1796.
- KANGO, S.; KALIA, S.; CELLI, A.; NJUGUNA, J.; HABIBI, Y.; KUMAR, R. (2013). Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Progress in Polymer Science*, 38(8): 1232–1261.
- KHARE, A. R.; VASISHT, N. (2014). Nanoencapsulation in the food industry: Technology of the future. *Microencapsulation in the Food Industry*, ed. A.G.Gaonkar, N.Vasisht, and A.R.Khare, R.Sobel, 151–155
- KIM, S. A.; RHEE, M. S. (2016). Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol,  $\beta$ -resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, 60: 447–454.
- KIM, S. I.; ROH, J. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. S.; AHN, Y. J. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*, 39(3): 293–303.
- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1): 51–63.
- KRIEGL, C.; KIT, K. M.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. (2010). Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. II. Release characteristics and antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 118:2859–2868.

- LEE, D.S.; JE, J.Y. (2013). Gallic Acid- Grafted -Chitosan Inhibits Foodborne Pathogens by a Membrane Damage Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26): 6574–6579.
- LEMMA, S. M.; ESPOSITO, A.; MASON, M.; BRUSETTI, L.; CESCO, S.; SCAMPICCHIO, M. (2015). Removal of bacteria and yeast in water and beer by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, 157: 1–6.
- LI, L.; WANG, H. (2013). Enzyme-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles as Efficient Antibacterial Agents *in Vivo*. *Advanced Healthcare Materials*, 2(10): 1351–1360.
- LI, X.; FARID, M. (2016). A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182: 33–45.
- LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; PALUMBO, F.; ESTI, M. (2016). Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. *Food Control*, 63: 46–52.
- LIPNIZKI, F. (2010). Cross-flow membrane applications in the food industry. *Membrane technology: membranes for food applications*, 3: 1–24.
- LOPES, N. A.; PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. (2019). Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. *Food hydrocolloids*, 93: 1-9.
- MADAENI, S.S.; YASEMI, M.; DELPISHEH, A. (2011). Milk sterilization using membranes. *Journal of Food Process Engineering*, 34: 1071–1085.
- MAGETSARI, D.R.; DEWO, D.P.; SAPUTRO, B.K.; LANODIYU, Z. (2014) Cinnamon oil and chitosan coating on orthopaedic implant surface for prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Malays Orthop J*, 8: 11– 14.
- MARCOS B.; AYMERICH T.; GARRIGA M. (2005). Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages. *Journal of Food Science.*, 70(7): 339–344.
- MARIN, L.; STOICA, I.; MARES, M.; DINU, V.; SIMIONESCU, B. C.; BARBOIU, M. (2013). Antifungal vanillin-imino-chitosan biodynamic films. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(27): 3353-3358.
- MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Food Science and Nutrition*, 49(6):577–606.
- MENON, K. V.; GARG, S. R. (2001). Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology.*, 18: 647–650.
- MORRIS, C.; BRODY, A. L.; WICKER, L. (2007). Non-thermal food processing/preservation technologies: a review with packaging implications. *Packaging Technology and Science*, 20(4): 275–286.
- MÚJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; SAMSON, C. T.; WELTI-CHANES, J.; TORRES, A. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969–985.
- MURIEL-GALET, V.; TALBERT, J. N.; HERNANDEZ-MUNOZ, P.; GAVARA, R.; GODDARD, J. M. (2013). Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(27): 6720–6727.
- NIELSEN, C. K.; SUBBIAHDOS, G.; ZENG, G.; SALMI, Z.; KJEMS, J.; MYGIND, T.; SNABE, T.; MEYER, R. L. (2018). Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth. *Journal of Applied Microbiology*, 124(1): 179–187.
- NIELSEN, H.B.; SONNE, A.; GRUNERT, K.G.; BANATI, D.; POLLÀK-TÓTH, A.; LAKNER, Z.; OLSEN, N.V.; ZONTAR, T.P.; PETERMAN, M. (2009). Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production. *Appetite*, 52(1):115– 126.
- NIU, X.; ZHU, L.; XI, L.; GUO, L.; WANG, H. (2020). An antimicrobial agent prepared by N-succinyl chitosan immobilized lysozyme and its application in strawberry preservation. *Food Control*, 108: 106829.
- O’CONNOR, P. M.; ROSS, R. P.; HILL, C.; COTTER, P. D. (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*, 2: 51–57.
- ORSI, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *BioMetals*, 17: 189–196.

- PANAGIOTA, S.; LOULOU DI, M.; DELIGIANNAKIS, Y. (2009). EPR study of phenolic radical stabilization by grafting on SiO<sub>2</sub>. *Chemical Physics Letters*, 472(1-3): 85-89.
- PANDEY, A. K.; KUMAR, P.; SINGH, P.; TRIPATHI, N. N.; BAJPAI, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in microbiology*, 7: 2161.
- PANDISELVAM, R.; SUBHASHINI, S.; BANUU PRIYA, E. P.; KOTHAKOTA, A.; RAMESH, S. V.; SHAHIR, S. (2019). Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone: Science & Engineering*, 41(1): 17-34.
- PEÑA-GÓMEZ, N., BARAT, J.M., FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I., RUIZ-RICO, M. (2019c). Development of polymeric and silica filtering materials functionalized with antimicrobial compounds for the elimination of microorganisms in liquid foods. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.
- PEÑA-GÓMEZ, N.; RUIZ-RICO, M.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; BARAT, J. M. (2019b). Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalised with essential oil components. *Food Control*, 106: 106749.
- PEÑA-GÓMEZ, N.; RUIZ-RICO, M.; PÉREZ-ESTEVE, É.; FERNANDEZ-SEGOVIA, I.; BARAT, J. M. (2020). Microbial stabilization of craft beer by filtration through silica supports functionalized with essential oil components. *LWT*, 117: 108626.
- PEÑA-GÓMEZ, N.; RUIZ-RICO, M.; PÉREZ-ESTEVE, É.; FERNÁNDEZ-SEGOVIA, I.; BARAT, J. M. (2019a). Novel antimicrobial filtering materials based on carvacrol, eugenol, thymol and vanillin immobilized on silica microparticles for water treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58: 102228.
- PERDONES, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHIRALT, A.; VARGAS, M. (2012). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage- keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70: 32-41.
- PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A. (2009). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7): 1936-1943.
- PÉREZ-ESTEVE, É.; RUIZ-RICO, M.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; BARAT, J. M. (2016). Mesoporous silica particles as encapsulation and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals. In: *Nanotechnology in Nutraceuticals* (pp. 419-460). CRC Press.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUŞ, V.; OLAH, N. K.; MATHE, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143: 922-935.
- POLO, L.; DE GREÑU, B. D.; DELLA BELLA, E.; PAGANI, S.; TORRICELLI, P.; VIVANCOS, J. L.; RUIZ-RICO, M.; BARAT, J.M., AZNAR, E.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; FINI, M. (2018). Antimicrobial activity of commercial calcium phosphate based materials functionalized with vanillin. *Acta biomaterialia*, 81: 293-303.
- PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities- Potentials and challenges. *Food Control*, 47: 381-391.
- PRAKASH, B.; KIRAN, S. (2016). Essential oils: A traditionally realized natural resource for food preservation. *Current Science*, 110: 1890-1892.
- PRAKASH, B.; KUJUR, A.; YADAV A.; KUMAR A.; PRATAP SINGH, P.; DUBEY N.K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89: 1-11
- RAJARAMAN, S.; SUBBIAHDOSS, G.; DHAKSHINAMOORTHY, G.; RAJAKANNU, S. (2015). *Ocimum Sanctum* extract coating on biomaterial surfaces to prevent bacterial adhesion and biofilm growth. *Asian J Pharm Clin Res* 8: 229- 233.
- RAPSCH, K.; BIER, F. F.; TADROS, M.; VON NICKISCH-ROSENEGK, M. (2014). Identification of antimicrobial peptides and immobilization strategy suitable for a covalent surface coating with biocompatible properties. *Bioconjugate Chemistry*, 25(2): 308-319.
- RASCON ESCAJEDA, L. F.; CRUZ HERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ JASSO, R. M.; CHARLES RODRIGUEZ, A. V.; ROBLEDO OLIVO, A.; CONTRERAS ESQUIVEL, J. C.; BELMARES CERDA, R. (2017). Discussion between alternative processing and preservation technologies and their application in beverages: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1): 13322.

- RASTOGI, N. K. (2018). Reverse osmosis and forward osmosis for the concentration of fruit juices. *Fruit Juices*, 241–259.
- RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1): 69-112.
- RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF S. (2008). Lipid carriers: A versatile delivery for proteins and peptides. *Yakugaku Zasshi* 128(2):269–280.
- RIBES, S., RUIZ-RICO, M., PÉREZ-ESTEVE, É., FUENTES, A., TALENS, P., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., & BARAT, J. M. (2017). Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. *Food Control*, 81.
- RIBES, S.; RUIZ-RICO, M.; PÉREZ-ESTEVE, É.; FUENTES, A.; BARAT, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT*, 113: 108326.
- ROS-LIS, J.V.; BERNARDOS, A.; PÉREZ, E.; BARAT, J.M.; MÁRTINEZ-MÁÑEZ, R. (2018). Functionalized silica nanomaterials as a new tool for new industrial applications. *Impact of Nanoscience in the Food Industry*, 12: 165–196.
- RUIZ-RICO, M.; BARAT, J.M.; MARCOS, M.D.; PÉREZ-ESTEVE E. (2016). Use of silica supports for enhancing the stability of folates and developing antimicrobial agents. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.
- RUIZ-RICO, M.; FUENTES, C., PÉREZ-ESTEVE, É.; JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I.; QUILES, A.; MARCOS, M. D.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R; BARAT, J. M. (2015). Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control*, 56: 77-85.
- RUIZ-RICO, M.; MORENO, Y.; BARAT, J. M. (2020). In vitro antimicrobial activity of immobilised essential oil components against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1): 1–9.
- RUIZ-RICO, M.; PÉREZ-ESTEVE, E.; BARAT, J.M. (2018). Use of nanotechnology as an antimicrobial tool in the food sector. In: *Nanobiotechnology: Human Health and the Environment* (pp. 413-453). CRC Press.
- 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.
- SAAD, B.; BARI, M.F.; SALEH, M.I.; AHMAD, K.; TALIB, M.K.M. (2005). Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1073: 393–397.
- SAINI, S.; SILLARD, C.; NACEUR BELGACEM, M.; BRAS, J. (2016). Nisin anchored cellulose nanofibers for long term antimicrobial active food packaging. *RSC Advances*, 6(15): 12422–12430.
- SAKR, M.; LIU, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39: 262–269.
- SALEHI, F. (2014). Current and future applications for nanofiltration technology in the food processing. *Food and Bioproducts Processing*, 92(2): 161–177.
- SALEHI, F.; RAZAVI, S.M.A.; ELAHI, M. (2011). Purifying anion exchange resin regeneration effluent using polyamide nanofiltration membrane. *Desalination*, 278: 31–35.
- SCHIEBER, A. (2017). Side streams of plant food processing as a source of valuable Compounds: Selected examples. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1): 97–112.
- SHALEV, T.; GOPIN, A.; BAUER, M.; STARK, R. W.; RAHIMIPOUR, S. (2012). Non-leaching antimicrobial surfaces through polydopamine bio-inspired coating of quaternary ammonium salts or an ultrashort antimicrobial lipopeptide. *Journal of Material Chemistry*, 22(5): 2026–2032.
- SHARMA, S. (2014). Food Preservatives and their harmful effects. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(1): 2250–3153.

- SILVA, V.; IGREJAS, G.; FALCO, V.; SANTOS, T. P.; TORRES, C.; OLIVEIRA, A. M. P.; PEREIRA J.E.; AMARAL J.A.; POETA, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92: 516–522.
- STOPFORTH J.D.; SKANDAMIS P.N.; DAVIDSON P.M.; SOFOS J.N. (2005). Naturally occurring compounds - animal sources. In *Antimicrobials in Foods* (pp. 453–505). Taylor & Francis.
- STROESCU, M.; STOICA-GUZUN, A.; ISOPENCU, G.; JINGA, S. I.; PARVULESCU, O.; DOBRE, T.; VASILESCU, M. (2015). Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 48: 62–71.
- TEWARI, G. (2007). High-pressure processing of foods. In: *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. G. Tewari & V. Juneja (Eds.)
- THALLINGER, B.; PRASETYO, E. N.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. (2013). Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnology Journal*, 8(1): 97-109.
- TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. (2009). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, 20(3–4): 137–145.
- TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; TERAGUCHI, S.; HAYASAWA, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, 80: 109–112.
- TYAGI, A. K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. (2014). Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2): 731–737.
- VICENTE, A.; CASTRO, I. (2007). Novel thermal processing technologies. In: *Advances in thermal and non-thermal food preservation*. G. Tewari & V. Juneja (Eds.).
- WEISS, J.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, M.; MCCLEMENTS, J. (2009). Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. In *Global Issues in Food Science and Technology*, 24: 425-479.
- YANG, N.; HUANG, K.; LYU, C., & WANG, J. (2016). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, 61: 28–38.
- YANG, W.; ZHANG, N.; WANG, Q.; WANG, P.; YU, Y. (2020). Development of an eco-friendly antibacterial textile: lysozyme immobilization on wool fabric. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- YEN, C. C.; SHEN, C. J.; HSU, W. H.; CHANG, Y. H.; LIN, H. T.; CHEN, H. L.; CHEN, C. M. (2011). Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. *Biometals*, 24(4): 585-594.
- YUAN, S.; YIN, J.; JIANG, W.; LIANG, B.; PEHKONEN, S. O.; CHOONG, C. (2013). Enhancing antibacterial activity of surface-grafted chitosan with immobilized lysozyme on bioinspired stainless steel substrates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106: 11–21.
- ZENGİN, N.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4): 763–769.
- ZENTEK, J.; BUCHHEIT-RENKO, S.; FERRARA, F.; VAHJEN, W.; VAN KESSEL, A.; PIEPER, R. (2011). Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Animal Health Research Reviews*, 12: 83-93.