



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Efecto de las principales biomoléculas naturalmente
presentes en alimentos líquidos sobre la efectividad
antimicrobiana de vainillina y eugenol

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Tortajada Martínez, Sara

Tutor/a: Pérez Esteve, Edgar

Cotutor/a: Barat Baviera, José Manuel

Director/a Experimental: GOMEZ LLORENTE, HECTOR

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

EFFECTO DE LA MATRIZ ALIMENTARIA SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE VAINILLINA Y EUGENOL

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

Autora: Tortajada Martínez, Sara

Tutor: Pérez Esteve, Édgar
Barat Baviera, José Manuel

Tutor experimental: Gómez Llorente, Héctor

VALENCIA, septiembre 2022

Curso académico: 2021/2022

RESUMEN

La seguridad alimentaria se ha convertido en un objetivo a nivel mundial debido a la gran importancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Para garantizar la seguridad alimentaria, la industria utiliza diversos tratamientos térmicos y conservantes de síntesis química. Sin embargo, ambos tienen diversos inconvenientes que suscitan la búsqueda de nuevas alternativas. En los últimos años se ha estudiado el uso de antimicrobianos naturales, concretamente los componentes de aceites esenciales (CAEs). Algunas de las tecnologías desarrolladas para este fin son la encapsulación e inmovilización de estos compuestos sobre distintos tipos de soportes. Sin embargo, se ha observado que la matriz alimentaria puede disminuir el efecto antimicrobiano de estos CAEs. En el presente estudio se ha analizado el efecto de la matriz alimentaria sobre el poder antimicrobiano de vainillina y eugenol en su forma libre frente a la bacteria *Escherichia coli*. Entre los compuestos del estudio encontramos: proteínas, carbohidratos simples, carbohidratos complejos, ácidos orgánicos, alcohol y lípidos. Los resultados indican una reducción del poder antimicrobiano de la vainillina al interactuar con proteínas, sacarosa, lactosa y almidón. Por el contrario, el alcohol etílico y el ácido cítrico tienen un efecto antimicrobiano sinérgico junto a la vainillina. En cambio, la pectina no produce ninguna interacción que resulte en un cambio relevante de la eficacia antimicrobiana. Por último, se ha estudiado la actividad antimicrobiana del eugenol sobre *E. coli* en presencia de proteínas, lactosa y lípidos. En este caso, los resultados obtenidos muestran una menor reducción del poder antimicrobiano de esta molécula en comparación con la vainillina, por lo cual sería un antimicrobiano más efectivo en matrices ricas en estos compuestos. Estos resultados ponen de manifiesto que la metodología propuesta puede servir para evaluar el posible impacto que la adición de un antimicrobiano tendrá en un determinado alimento en función de su composición.

Palabras clave: Componentes de aceites esenciales, *Escherichia coli*, efectividad antimicrobiana, análisis microbiológico

ABSTRACT

Food safety has become a global objective due to the high importance of foodborne diseases. To ensure food safety, the industry uses various heat treatments and chemically synthesized preservatives. However, both have several drawbacks, leading to the search for new alternatives. In recent years, the use of natural antimicrobials, specifically essential oil components (EOCs), has been studied. Some of the technologies developed for this purpose are the encapsulation and immobilization of these compounds on different types of supports. However, it has been observed that the food matrix may decrease the antimicrobial effect of these EOCs. In the present study, the effect of the food matrix on the antimicrobial power of vanillin and eugenol in their free form against *Escherichia coli* bacteria has been analyzed. Among the compounds of the study, we find: proteins, simple carbohydrates, complex carbohydrates, organic acids, alcohol and lipids. The results indicate a reduction in the antimicrobial power of vanillin by interacting with proteins, sucrose, lactose and starch. In contrast, ethyl alcohol and citric acid have a synergistic antimicrobial effect alongside vanillin. Instead, pectin does not produce any interaction that results in a significant change in antimicrobial efficacy. Finally, the antimicrobial activity of eugenol on *E. coli* in the presence of proteins, lactose and lipids has been studied. The results obtained show a lower reduction of the antimicrobial power of this molecule compared to vanillin, making it a better choice in matrixes richer in those compounds. These results show that the proposed methodology can be used to evaluate the possible impact that the addition of an antimicrobial will have on a given food according to its composition.

Keywords: Essential oil components, *Escherichia coli*, antimicrobial effectiveness, microbiological analysis

RESUM

La seguretat alimentària s'ha convertit en un objectiu a nivell mundial a causa de la gran importància de les malalties transmeses pels aliments. Per a garantir la seguretat alimentària, la indústria utilitza diversos tractaments tèrmics i conservants de síntesi química. No obstant això, tots dos tenen diversos inconvenients que susciten la recerca de noves alternatives. En els últims anys s'ha estudiat l'ús d'antimicrobians naturals, concretament els components d'olis essencials (COEs). Algunes de les tecnologies desenvolupades per a aquest fi són l'encapsulació i immobilització d'aquests compostos sobre diferents tipus de suports. No obstant això, s'ha observat que la matriu alimentària pot disminuir l'efecte antimicrobià d'aquests COEs. En el present estudi s'ha analitzat l'efecte de la matriu alimentària sobre el poder antimicrobià de vanillina i eugenol en la seua forma lliure enfront del bacteri *Escherichia coli*. Entre els compostos d'estudi trobem: proteïnes, carbohidrats simples, carbohidrats complexos, àcids orgànics, alcohol i lípids. Els resultats indiquen una reducció del poder antimicrobià de la vanillina a l'interactuar amb proteïnes, sacarosa, lactosa i midó. Al contrari, l'alcohol etílic i l'àcid cítric tenen un efecte antimicrobià sinèrgic junt amb la vanillina. En canvi, la pectina no produeix cap interacció que resulte en un canvi rellevant de l'eficàcia antimicrobiana. Finalment, s'ha estudiat l'activitat antimicrobiana de l'eugenol sobre *E. coli* en presència de proteïnes, lactosa i lípids. Els resultats obtinguts mostren una menor reducció del poder antimicrobià d'aquesta molècula en comparació amb la vanillina, per la qual cosa seria un antimicrobià més efectiu en matrius riques en aquests compostos. Aquests resultats posen de manifest que la metodologia proposta pot servir per a avaluar el possible impacte que l'addició d'un antimicrobià tindrà en un determinat aliment en funció de la seua composició.

Paraules clau: Components d'olis essencials, *Escherichia coli*, efectivitat antimicrobiana, anàlisi microbiològica

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Productos químicos.....	7
3.2 Preparación compuestos.....	8
3.3 Ensayos microbiológicos.....	8
3.3.1 Cultivo <i>E. coli</i>	8
3.3.2 Curvas de letalidad.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4.1 Estudio de las concentraciones de los componentes naturalmente presentes en alimentos complejos	9
4.2 Determinación de la curva de letalidad de vainillina y eugenol en agua.....	12
4.3 Efecto de los diferentes componentes en la actividad antimicrobiana de vainillina.. ..	13
4.3.1 Efecto de las proteínas sobre la actividad antimicrobiana de vainillina.....	13
4.3.2 Efecto de los carbohidratos simples sobre la actividad antimicrobiana de vainillina.....	15
4.3.3 Efecto de los carbohidratos complejos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina.....	17
4.3.4 Efecto de los ácidos orgánicos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina.....	19
4.3.5 Efecto del alcohol sobre la actividad antimicrobiana de vainillina	20
4.3.6 Efecto de los lípidos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina	22

4.4 Efecto de los diferentes componentes en la actividad antimicrobiana de eugenol.....	23
4.4.1 Efecto de las proteínas sobre la actividad antimicrobiana de eugenol.....	23
4.4.2 Efecto de los carbohidratos simples (lactosa) sobre la actividad antimicrobiana de eugenol.....	24
4.4.3 Efecto de los lípidos sobre la actividad antimicrobiana de eugenol	25
5. CONCLUSIONES.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de A) vainillina y B) eugenol..... 3

Figura 2. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de vainillina disuelta en agua. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de vainillina: amarillo 0 mg/mL, naranja 2 mg/mL, azul claro 4 mg/mL, azul oscuro 6 mg/mL, gris 8 mg/mL, negro 10 mg/mL 12

Figura 3. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de eugenol disuelto en agua. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de eugenol: amarillo 0 mg/mL, naranja 0,6 mg/mL, azul claro 0,8 mg/mL, azul oscuro 1 mg/mL, gris 1,2 mg/mL, negro 1,4 mg/mL..... 13

Figura 4. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA): amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1,5 g/100mL, negro 3 g/100mL. 13

Figura 5. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de sacarosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 5 g/100mL, azul 8 g/100mL, negro 12 g/100mL..... 15

Figura 6. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de lactosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 1,5 g/100mL, azul 3 g/100mL, negro 4,5 g/100mL..... 16

Figura 7. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de almidón: amarillo 0 g/100mL, naranja 0,1 g/100mL, azul 1 g/100mL, negro 2 g/100mL..... 17

Figura 8. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de pectina: amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1 g/100mL, negro 1,5 g/100mL..... 18

Figura 9. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de ácido cítrico: amarillo 0 g/L, naranja 1 g/L, azul 2 g/L, negro 3 g/L **19**

Figura 10. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de etanol: amarillo 0 g/100mL, naranja 2 g/100mL, azul 6 g/100mL, negro 12 g/100mL.....**21**

Figura 11. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de aceite de girasol: amarillo 0 g/100mL, naranja 1 g/100mL, azul 2 g/100mL, negro 4 g/100mL..... **22**

Figura 12. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA): amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1,5 g/100mL, negro 3 g/100mL **23**

Figura 13. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de lactosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 1,5 g/100mL, azul 3 g/100mL, negro 4,5 g/100mL..... **24**

Figura 14. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de aceite de girasol: amarillo 0 g/100mL, naranja 1 g/100mL, azul 2 g/100mL, negro 4 g/100mL..... **25**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración mínima legislada y concentraciones aproximadas de proteína, grasa, lactosa, sacarosa, pectina, almidón, ácido cítrico y alcohol para diferentes productos líquidos..... **10**

1. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria se ha convertido en un objetivo a nivel mundial debido a la gran importancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Según los datos ofrecidos por la Autoridad para la Seguridad Alimentaria Europea (CEFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (CDCP), en el año 2020 en Europa se produjeron 3086 brotes de origen alimentario, 20017 casos de enfermedad, 1675 hospitalizaciones y 34 muertes asociadas con el consumo de alimentos contaminados (EFSA, 2021). Por otro lado, se ha detectado en Estados Unidos un aumento en la incidencia de infecciones provocadas por algunos patógenos (*Campylobacter*, *Cyclospora*, *STEC*, *Vibrio*, *Yersinia*) en el año 2019 con respecto a los 3 años anteriores (Tack *et al.*, 2020).

Teniendo estas cifras en mente, garantizar la seguridad de los alimentos supone un gran reto para la industria alimentaria debido a la aparición de nuevos patógenos, el aumento de la resistencia bacteriana y normas cada vez más exigentes. Además, nos encontramos con otras condiciones adicionales como son el aumento del comercio internacional o la tendencia a consumir alimentos con tratamientos térmicos más suaves. Todo ello contribuye a un mayor riesgo de crecimiento de microorganismos y, por tanto, de contraer enfermedades alimentarias (Cheftel, 2011).

Por lo tanto, para garantizar la seguridad alimentaria, la industria utiliza diversos tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización) que eliminan la presencia de microorganismos patógenos. Sin embargo, estos tratamientos térmicos llevan consigo una serie de desventajas para la calidad del alimento, como pérdida de nutrientes y propiedades funcionales, así como alteración de las propiedades organolépticas (Choi & Nielsen, 2005). Asimismo, encontramos inconvenientes a nivel industrial y medioambiental como el gasto energético e hídrico, además de pérdidas de calor por los equipos industriales (Pereira & Vicente, 2010).

Otro medio utilizado para la eliminación de patógenos y toxinas son los conservantes de síntesis química, los cuáles en la actualidad se encuentran en entredicho por sus posibles efectos carcinogénicos y su toxicidad residual (Silva *et al.*, 2016). Encontramos entre ellos los nitratos y nitritos, muy utilizados en la conservación de carnes y pescados. En este sentido, su ingestión conlleva a un mayor riesgo de incidencia de cáncer o de problemas de oxigenación (Inetianbor *et al.*, 2015). Otro de los conservantes más utilizados es el ácido benzoico, que tiene una amplia gama de derivados y está presente en gran variedad de

productos como pescados, mariscos, carnes, salsas, refrescos y zumos entre otros. Por ello, la exposición a este aditivo suele ser alta y prolongada, produciendo diversas alteraciones especialmente problemáticas en grupos de población vulnerables (Del Olmo *et al.*, 2017).

Así pues, en la actualidad, la industria alimentaria busca tecnologías emergentes que sustituyan en parte los tratamientos convencionales, manteniendo al mismo tiempo el cumplimiento estricto de la seguridad alimentaria. Concretamente, entre las tecnologías térmicas novedosas encontramos la esterilización térmica de alta presión y el calentamiento óhmico. La esterilización térmica de alta presión es interesante debido a que se logra una distribución uniforme de la temperatura y tiempos de tratamiento más cortos hasta alcanzar el objetivo deseado (Holdsworth & Simpson, 2016). Así pues, existen estudios que han demostrado que esta tecnología disminuye el contenido de factores antinutricionales (temperatura y tiempo), y mejora la digestibilidad de las proteínas mediante su aplicación en productos como guisantes y frijoles (Linsberger-Martin *et al.*, 2013). Sin embargo, esta tecnología no se ha implementado a nivel industrial debido a que no asegura la inactivación de esporas. Por otro lado, el calentamiento óhmico se basa en hacer pasar una corriente eléctrica a través del alimento para inducir el calentamiento interno del mismo. Su potencial radica en el rápido aumento de la temperatura que evita el sobrecalentamiento de los alimentos, reduciendo por tanto las pérdidas nutricionales. Sin embargo, encontramos su principal desventaja en el alto coste de implantación (Holdsworth & Simpson, 2016).

Además de las anteriores, otras tecnologías que se están evaluando son las no térmicas, entre las que encontramos los campos de pulsos eléctricos, Altas Presiones Hidrostáticas (HPP), ultrasonidos, luz UV y luz pulsada. Estas tecnologías son efectivas a temperatura ambiente y permiten conservar los parámetros nutricionales y de calidad. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos va a depender en gran medida del producto alimentario al que se aplica, destacando como variable la composición de este (Cullen *et al.*, 2012).

A pesar de la aparición de nuevas tecnologías, la evidencia de que éstas presentan de igual forma desventajas hace que se sigan buscando continuamente alternativas que mejoren o complementen las actuales. Por ello, las últimas investigaciones se han centrado en el estudio de antimicrobianos de origen natural. Entre todos ellos, los compuestos de aceites esenciales (CAEs), sustancias volátiles generadas por las plantas como mecanismo de

defensa, han resultado eficaces contra bacterias (Nazzaro *et al.*, 2013), hongos (Gomez, & Diler, 2014) y virus (Schnitzler, 2019). Según su estructura química encontramos cuatro grupos: terpenos (limoneno, terpineno), terpenoides (timol, carvacrol), fenilpropanoides (eugenol, vainillina) y otros (alicina, allil isotiocynato) (Hyldgaard *et al.*, 2012). La actividad antimicrobiana de los CAEs se encuentra basada en la estructura molecular de cada compuesto, definida por la presencia de anillos fenólicos, de grupos funcionales como los grupos hidroxilo, o por la propia posición de estos grupos y su hidrofobicidad (Burt, 2004). En la **Figura 1** podemos observar la estructura química de vainillina y eugenol.

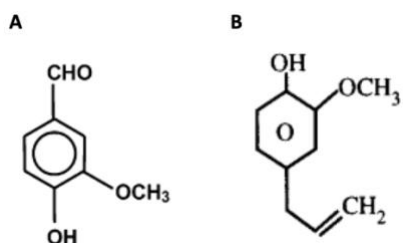


Figura 1. Estructura química de A) vainillina y B) eugenol

En el contexto antibacteriano, diversas investigaciones apuntan a que el mecanismo de acción de los CAEs se debe a la disrupción de la pared y la membrana plasmática de las células bacterianas, liberando así los componentes intracelulares y produciendo, por tanto, la muerte de la célula (Faleiro, 2011). Además, la literatura científica indica que generalmente los aceites esenciales son más efectivos frente a bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas. Esto se debe a que el exterior de las bacterias Gram negativas presenta una fuerte carga negativa, además de que los polisacáridos que constituyen la pared forman una barrera de permeabilidad hidrófila, impidiendo en gran medida la acción de estos compuestos (Trombetta *et al.*, 2005).

A pesar del descrito comportamiento antimicrobiano de los CAEs, su aplicación directa en forma libre a los alimentos está limitada por varias razones. En primer lugar, su presencia en los alimentos provoca la alteración de las características organolépticas por su fuerte aroma y sabor (Nostro & Papalia, 2011). En segundo lugar, el 90-95% de los CAEs tienen una alta volatilidad, por lo que su concentración disminuye a lo largo del tiempo. En tercer lugar, las propiedades hidrofóbicas y liposolubles de algunos aceites esenciales los hace insolubles en productos con una gran fase acuosa (Zhu *et al.*, 2020). En cuarto lugar, la estructura química de estos compuestos provoca que sean altamente susceptibles a la

degradación. Concretamente, las principales reacciones que pueden sufrir son: oxidaciones, isomerizaciones, deshidrogenaciones y polimerizaciones (Turek & Stintzing, 2013). Por último, el uso a nivel industrial de este tipo de compuestos puede suponer un alto gasto económico en función de la concentración necesaria para lograr un efecto significativo.

Para solucionar estos problemas, se han utilizado tecnologías de encapsulación e inmovilización (Weiss *et al.*, 2009) que protegen a los CAEs del estrés ambiental, enmascaran propiedades organolépticas indeseables y logran la liberación controlada del antimicrobiano (Ruiz-Rico *et al.*, 2017). La encapsulación es una técnica basada en la introducción de un compuesto bioactivo en estado líquido, sólido o gaseoso dentro de una matriz o material inerte para preservar la sustancia objetivo. Esta tecnología puede aplicarse directamente sobre el alimento o a través de la incorporación de películas o recubrimientos (Pateiro *et al.*, 2021). Por otro lado, encontramos la inmovilización, que consiste en anclar los compuestos bioactivos sobre un soporte, generalmente inorgánico. Los principales soportes para la inmovilización son: poliméricos, metálicos, cerámicos y silíceos (Cebrián-Cabo, 2020).

En cuanto a la aplicación de estas tecnologías sobre los CAEs, encontramos el estudio de Bravo-Cadena *et al.* (2018) el cual evaluó el efecto de 41 aceites esenciales encapsulados en nanopartículas de sílice, frente a *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas carotovorum*. Se determinó que la encapsulación aumentó 10 veces la actividad antimicrobiana de los CAEs frente a la forma libre. En cuanto a la inmovilización, Ruiz-Rico *et al.* (2017) desarrolló la ruta de anclaje de eugenol, vainillina, carvacrol y timol sobre nanopartículas mesoporosas de óxido de silicio tipo MCM-41 y sobre micropartículas de sílice comerciales. Además, se evaluó el efecto antimicrobiano de estos CAEs libres e inmovilizados, frente a *Listeria innocua* y *E. coli*. En este sentido, los resultados también indicaron un aumento de la actividad antimicrobiana con el uso de la inmovilización respecto a la forma libre. Así pues, a partir de este primer estudio, se anclaron partículas con mayores tamaños de partícula (50-110 micras) con el fin de desarrollar filtros activos. En este contexto, las investigaciones mostraron la eficaz eliminación de los microorganismos (*E. coli* y *Listeria monocytogenes*) al pasar por un lecho de partículas funcionalizadas con los CAEs anteriormente mencionados.

Dada la efectividad *in vitro* de dichos sistemas antimicrobianos, en los últimos años las líneas de investigación se han enfocado en ponerlos a prueba en diferentes alimentos. En este sentido, esta tecnología ha sido estudiada sobre matrices líquidas como agua, vino, cerveza, zumo de manzana, leche y horchata (Calabuig-Benavent, 2017; Cava-Roda *et al.*, 2010; García-Ríos *et al.*, 2018; Peña-Gómez; *et al.*, 2019a; Peña-Gómez; *et al.*, 2019b; Peña-Gómez *et al.*, 2020a). En primer lugar, se realizó un estudio para determinar la eficacia de estos soportes con cuatro tipos diferentes de CAEs (carvacrol, eugenol, timol y vainillina) en agua inoculada con *E. coli*. Las muestras, al entrar en contacto durante tan solo unos segundos con vainillina inmovilizada, lograron una reducción logarítmica de 10^4 UFC/mL, lo que implica una reducción porcentual del 99,99% de los microorganismos presentes en la matriz alimentaria (Peña-Gómez *et al.*, 2019a). Esto abre la puerta a aumentar la seguridad del suministro del agua, o más importante aún, el tratamiento del agua en áreas con problemas de escasez que contribuiría al objetivo 6 “Agua limpia y saneamiento” de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecidos por las Naciones Unidas (NU, 2015).

Otro estudio abordó la efectividad de los cuatro soportes utilizados en el estudio anterior, en la eliminación de microorganismos que producen la alteración organoléptica del vino (*Acetobacter aceti*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Lactobacillus plantarum*). Los resultados de este estudio muestran una reducción significativa de los microorganismos diana, además de la confirmación de la significativa disminución de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los CAEs inmovilizados respecto a su forma libre. De esta manera, esta nueva tecnología permite ofrecer a los consumidores vinos de alta calidad, con una elevada vida útil y libres de conservantes químicos como los sulfitos (García-Ríos *et al.*, 2018).

Otro producto en el que se confirmó el buen funcionamiento de estos mismos sistemas antimicrobianos fue la cerveza. Estos presentaron una notable capacidad de eliminación de *E. coli*, bacterias mesófilas, bacterias de ácido láctico, mohos y levaduras, además de lograr conservar las propiedades organolépticas del producto. Destaca por tanto su potencial para ser utilizado como método no térmico, que sustituya a la pasteurización convencional del producto y evite los efectos negativos del uso de los CAEs libres sobre las propiedades sensoriales (Peña-Gómez *et al.*, 2020a). Por último, se observó un comportamiento efectivo en zumos, como por ejemplo el zumo de manzana. El medio filtrante al pasar por el lecho

de partículas funcionalizadas con vainillina y eugenol eliminaron la flora nativa, mantuvieron la estabilidad microbiológica más de 120 días y permitieron clarificar el zumo para evitar la turbidez y sedimentación del producto final. (Peña-Gómez *et al.*, 2019b).

No obstante, encontramos productos líquidos en los que el sistema antimicrobiano basado en la inmovilización no fue efectivo en la eliminación de microorganismos, como puede ser la leche. La eficacia de este mismo sistema empleando eugenol contra *Bacillus subtilis* en leche desnatada fue estudiada por Garrido-Momparler (2021). Los resultados mostraron un crecimiento microbiano en todas las muestras, confirmando así el efecto negativo de la interacción entre los compuestos de la leche y el agente antimicrobiano en cuestión.

Además, por otro lado, encontramos en bibliografía estudios en los que se analizó la actividad antimicrobiana de CAEs en forma libre con productos como la leche y la horchata, en los cuales se obtuvieron resultados similares. El estudio de Cava-Roda *et al.* (2010) analizó el efecto de vainillina libre (desde 0,5 a 4 mg/mL) sobre diversos microorganismos patógenos presentes en leche entera y semidesnatada (*L. monocytogenes*, *E. coli*). Se indicó que la presencia de grasa redujo la actividad antimicrobiana de la vainillina, debido a la creación de una película alrededor de la bacteria que impedía el contacto de ésta con los grupos funcionales antimicrobianos de la vainillina (grupos aldehído e hidroxilo). Nos encontramos la misma situación en el caso de analizar el efecto de la vainillina libre en la horchata. En este contexto, la matriz del producto produjo una disminución de la actividad antimicrobiana de la vainillina contra *L. monocytogenes* y *E. coli* (Calabuig-Benavent, 2017). Por tanto, los resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de los CAEs depende de la matriz alimentaria en la que se añaden.

Con el fin de confirmar si las matrices alimentarias afectan a la actividad antimicrobiana de los CAEs inmovilizados sobre micropartículas de sílice, Karakas (2021) realizó un estudio donde evaluó el efecto matriz sobre la eficacia antimicrobiana de partículas de óxido de silicio funcionalizadas con vainillina. Así pues, se analizó el grado de eliminación de *E. coli* en diferentes matrices alimentarias naturalmente presentes en alimentos (proteínas, lípidos, lactosa, sacarosa, ácidos orgánicos y alcohol), y en aguas duras o mineralizadas basadas en la adición de componentes inorgánicos. Los resultados de este estudio señalaron que la adición de minerales al agua no afecta a la capacidad antimicrobiana del sistema. Por el contrario, algunos componentes orgánicos presentes en alimentos sí tuvieron un impacto

notable sobre la efectividad en la eliminación de microorganismos. Concretamente, las proteínas, lípidos y lactosa redujeron drásticamente la eficacia antimicrobiana a altas concentraciones. Por otro lado, en el caso de sacarosa, se observó una notable actividad antimicrobiana hasta una concentración de 5 g/100mL. Finalmente, la adición de ácido cítrico (ácido orgánico) y etanol (alcohol) al medio hizo aumentar la actividad antimicrobiana de vainillina inmovilizada.

En base a estos resultados, se considera interesante evaluar el efecto de la matriz alimentaria sobre la efectividad antimicrobiana de otras familias de compuestos antimicrobianos anclados a partículas de sílice. No obstante, para poder realizar estos estudios se necesita sintetizar una gran cantidad de sistema antimicrobiano, lo cual hace muy tediosa la investigación. Además, esta investigación sólo serviría para explicar la pérdida del poder antimicrobiano de este tipo de sistemas en diferentes matrices. No obstante, como ya se ha comentado, la pérdida de la actividad antimicrobiana también se ha observado en otras formas de aplicación (encapsulación, films...). Por tanto, se considera interesante proponer una metodología que permita evaluar de una manera más rápida el efecto de los componentes de la matriz sobre un abanico mayor de compuestos antimicrobianos y frente a un mayor número de bacterias. De esta manera, sólo en el caso de observar resultados positivos para un determinado compuesto antimicrobiano en presencia de un compuesto de la matriz que generalmente ejerce un efecto reductor sobre la actividad antimicrobiana, se procedería a evaluar si esta se mantiene tras su encapsulación y/o inmovilización.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo final de grado es determinar el efecto de la composición de la matriz alimentaria sobre la actividad antimicrobiana de la vainillina y el eugenol en su forma libre sobre la bacteria *E. coli*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Productos químicos

Vainillina, albúmina de suero bovino, pectina y almidón fueron comprados en Sigma-Aldrich (Madrid, España). La D-lactosa y D-sacarosa fueron adquiridas en LabKem (Barcelona, España). Eugenol, etanol, ácido cítrico, agua de peptona tamponada y Agar Trípico de Soja

(TSA) fueron obtenidos en Scharlab (Barcelona, España). Por último, el aceite de girasol fue comprado en un supermercado local.

3.2 Preparación compuestos

Con el fin de establecer qué concentraciones de los componentes naturalmente presentes en alimentos son seleccionadas para realizar el ensayo de eficacia antimicrobiana, primeramente, se realizó una revisión bibliográfica acerca de la concentración más habitual en diferentes alimentos para cada uno de ellos: proteínas (albúmina de suero bovino), lípidos (aceite de girasol), carbohidratos (D-lactosa, D-sacarosa, pectina y almidón), ácidos orgánicos (ácido cítrico) y alcohol (etanol).

Tras ello, los diferentes compuestos fueron disueltos en agua a las concentraciones habituales en los alimentos, determinadas a partir de la búsqueda bibliográfica anterior. Debido a la baja solubilidad de algunos compuestos, para su preparación fue necesario añadir un paso adicional. Concretamente, en el caso de la grasa, la disolución en agua estéril fue llevada a cabo aplicando 30 minutos en baño de ultrasonidos a 80°C. Por otro lado, la disolución de pectina y almidón se llevó a cabo calentando la mezcla hasta ebullición, manteniendo la misma durante 5 minutos. En todos los casos, las soluciones resultantes fueron introducidas en un baño a 37°C durante 1 hora, asegurando la igualdad térmica para cada una de las matrices estudiadas.

3.3 Ensayos microbiológicos

3.3.1 Cultivo *E. coli*

La cepa bacteriana utilizada para los ensayos microbiológicos fue *Escherichia coli* K12. La cepa bacteriana se reconstituyó siguiendo las instrucciones de Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En primer lugar, se inoculó la bacteria en placas petri de Plate Count Agar (PCA) (Scharlab, Barcelona, España). Posteriormente, una colonia se transfirió a 10 mL de medio nutritivo Caldo Trípico de Soja (TSB) (Scharlab, Barcelona, España), el cual se incubó a 37°C durante 24 horas. Con ello se obtuvo un inóculo con aproximadamente 10^9 UFC/mL. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en agua de peptona hasta una concentración final de 10^7 UFC/mL, mientras que la última dilución, 10^5 UFC/mL, se preparó en los modelos alimentarios.

3.3.2 Curvas de letalidad

Con el objetivo de seleccionar las concentraciones de trabajo de cada agente antimicrobiano, en primer lugar, se hizo una revisión bibliográfica. Posteriormente, las concentraciones encontradas fueron confirmadas mediante la realización de curvas de letalidad en agua, es decir, sin la adición de ninguna matriz alimentaria. Así pues, en primer lugar, se prepararon 30 mL de diferentes concentraciones de antimicrobiano disuelto en agua: 2-4-6-8-10 mg/mL para vainillina y 0,4-0,6-0,8-1-1,2-1,4 mg/mL para eugenol en tubos falcon estériles. Posteriormente, se preparó el inóculo de *E. coli* (10^7 UFC/mL) y se transfirieron 300 μ L a cada dilución con el fin de alcanzar una concentración final de 10^5 UFC/mL. Tras ello, para cada tiempo de incubación (0,1,4,8 y 24 h) 1 mL fue transferido por triplicado a placas Petri, añadiendo a continuación el TSA atemperado a 60°C. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Tras la determinación de la actividad antimicrobiana en agua estéril y siguiendo la metodología explicada anteriormente, se realizaron los ensayos de determinación de la eficacia antimicrobiana tras el mezclado de agua estéril con los diferentes componentes naturales presentes en alimentos (sección 3.2). Estas curvas de letalidad o curvas tiempo-respuesta nos proporcionan información esencial sobre la dinámica de la acción bactericida del antimicrobiano y la relación entre la concentración del antimicrobiano y su actividad bactericida (Cantón & Pemán,1999). Por último, para la ejecución del ensayo se realizaron las correspondientes diluciones y la siembra en medio TSA. El mismo procedimiento sin la presencia de agente antimicrobiano para cada una de las variables y concentraciones estudiadas (control positivo), fue también realizado.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio de las concentraciones de los componentes naturalmente presentes en alimentos complejos

Las **Tabla 1** muestra las concentraciones de los principales componentes alimentarios objeto de estudio en diferentes matrices alimentarias.

Tabla 1. Concentración mínima legislada y concentraciones aproximadas de proteína, grasa, lactosa, sacarosa, pectina, almidón, ácido cítrico y alcohol para diferentes productos líquidos.

Alimento	[Proteína]	[Grasa]	[Lactosa]	[Sacarosa]	[Pectina]	[Almidón]	[Ácido cítrico]	[Alcohol]	Referencia
Leche Entera Semidesnatada Desnatada	Mín 2,80 g/100mL Mín 2,85 g/100mL Mín 2,90 g/100mL	Mín 3,20 g/100mL 1,50-1,80 g/100mL Máx 0,30 g/100mL	Mín 4,20 g/100mL Mín 4,25 g/100mL Mín 4,30 g/100mL	-	-	-	-	-	BOE, 1987
Horchata	0,5 g/100mL	Mín 2 g/100mL	-	Mín 10 g/100mL	-	Mín 1,9 g/100mL	-	-	BOE, 1988; FoodData Central, 2019
Zumo naranja	0,7g/100mL	0,3 g/100mL	-	1-5 g/100mL	4,5 g/100mL	-	0,6-1,7 g/100mL	-	BOE, 2007; Klavons A., et al., 2006
Zumo manzana	0,1 g/100mL	0,3 g/100mL	-	0,5-3 g/100mL	4,5 g/100mL	-	0,005-0,0015 g/100mL	-	BOE, 2007; Klavons A., et al., 2006
Vino	0,1 g/100mL	-	-	-	-	-	-	10-15 g/100mL	FoodData Central, 2019; Missbach et al., 2017
Cerveza	0,5 g/100mL	-	-	-	-	-	-	3-6 g/100mL	FoodData Central, 2019; Missbach et al., 2017

Las celdillas coloreadas de azul indican qué componentes de la matriz son los principales del producto alimentario

Según la Norma General Española de Calidad para la Leche UHT, la concentración mínima de proteína para la leche entera es 2,8 g/100mL (BOE, 1987). Por este motivo, la eficacia antimicrobiana de los diferentes compuestos de aceite esencial (CAEs) se estudió tras la incorporación de 0,5, 1,5 y 3 g/100mL de proteína. En el caso de la grasa, en este estudio se emplearon las concentraciones de 1, 2 y 4 g/100mL. Estos valores están también relacionados con el contenido mínimo de materia grasa que deben tener algunos alimentos. Por ejemplo, en leche debe ser no inferior a 3,2 g/100mL para la denominación leche entera, entre 1,5 y 1,8 g/100mL para semidesnatada y no superior a 0,30 g/100mL en el caso de ser desnatada (BOE, 1987). De igual forma, en horchata, el Real Decreto 1338/1988 dicta que el contenido mínimo de grasa debe ser no inferior a 2 g/100mL (BOE, 1988). Respecto a la cuantificación antimicrobiana de los CAEs tras la adición de carbohidratos presentes naturalmente en alimentos, en este estudio se ensayan de forma individual la presencia de D-lactosa (disacárido), D-sacarosa (disacárido), pectina (polisacárido) y almidón (polisacárido). Para el estudio de D-lactosa las concentraciones empleadas fueron 1,5, 3 y 4,5 g/100mL, valores cercanos a los legislados en leche, mínimo 4,20 g/100mL en leche entera (BOE, 1987). Con respecto a la sacarosa, se estudiaron las concentraciones de 5, 8 y 12 g/100mL. A diferencia del anterior azúcar, la sacarosa se encuentra en gran diversidad de alimentos tales como horchata, cuya concentración mínima es de 10 g/100mL (BOE, 1988), zumo de manzana en concentraciones entre 0,5 y 3 g/100mL, y zumo de naranja entre 1 y 5 g/100mL (BOE, 2007). En cuanto a carbohidratos complejos encontramos las pectinas y almidones. La pectina se encuentra en productos como el zumo de naranja (Klavons *et al.*, 2006), en este caso, se estudiaron las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5 g/100mL. Por su parte, en el estudio del almidón se utilizaron concentraciones de 0,1, 1 y 2 g/100mL, estando presente éste en la horchata no tratada térmicamente, en concentraciones de 1,9 g/100mL (BOE, 1987). Por último, ensayos antimicrobianos tras la adición de otras biomoléculas tales como el ácido cítrico y etanol fueron llevados a cabo. En este contexto, diferentes concentraciones de ácido cítrico (1, 2 y 3 g/L) fueron empleadas para evaluar si un bajo pH, característico en zumos, trae consigo un efecto sinérgico en la reducción de población bacteriana. Por otro lado, la variable alcohol fue estudiada mediante la adición de 2, 6 y 12 g/100mL de etanol al medio con el fin de alcanzar graduaciones similares a las naturalmente presentes en cervezas (3-6 g/100mL) y vinos (10-15 g/100mL) (Missbach *et al.*, 2017).

4.2 Determinación de la curva de letalidad de vainillina y eugenol en agua

Con el objetivo de determinar el comportamiento de los dos agentes antimicrobianos a lo largo de las 24h de incubación se realizaron curvas de letalidad a diferentes concentraciones de compuesto basados en estudios previos (Cava-Roda *et al.*,2010; Pei *et al.*,2009).

Tal y como se muestra en la **Figura 2**, tras la adición de 2 mg/mL de vainillina en agua, e incubación durante 24 horas, el crecimiento de *E. coli* se inhibe completamente. Mayores concentraciones de vainillina (4 y 6 mg/mL) provocan el adelantamiento de la inhibición del crecimiento a 4 horas de incubación. Por último, la adición de 8 y 10 mg/mL, hace que tan solo con una hora de incubación se reduzca totalmente el crecimiento en placa.

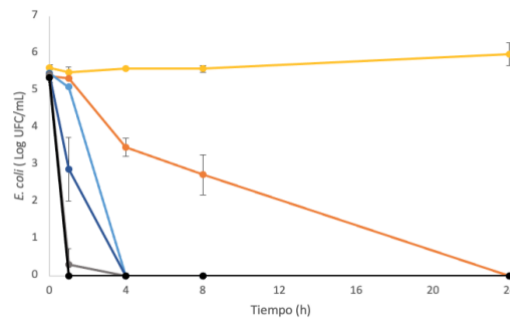


Figura 2. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de vainillina disuelta en agua. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de vainillina: amarillo 0 mg/mL, naranja 2 mg/mL, azul claro 4 mg/mL, azul oscuro 6 mg/mL, gris 8 mg/mL, negro 10 mg/mL.

Por otro lado, la **Figura 3** muestra las curvas de letalidad tras la incubación de *E. coli* con diferentes concentraciones de eugenol disuelto en agua. En este sentido, la adición de 0,6 mg/mL inhibe el crecimiento de *E. coli* tras 4 horas de incubación. Sin embargo, la sola puesta en contacto (tiempo de incubación: 0 h) de 0,8-1-1,2-1,4 mg/mL fue suficiente para reducir totalmente el crecimiento microbiano.

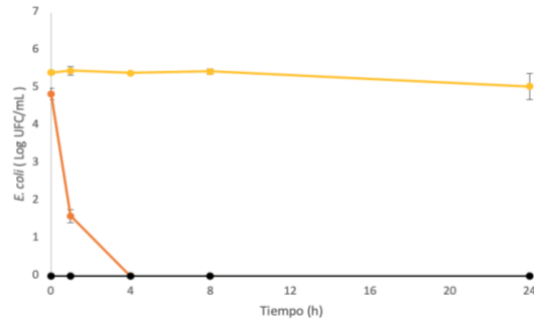


Figura 3. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de eugenol disuelto en agua. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de eugenol: amarillo 0 mg/mL, naranja 0,6 mg/mL, azul claro 0,8 mg/mL, azul oscuro 1 mg/mL, gris 1,2 mg/mL, negro 1,4 mg/mL.

En base a estos resultados se determinó que el efecto de la matriz sobre los diferentes antimicrobianos se realizaría utilizando 2 y 4 mg/mL de vainillina y 0,6 y 0,8 mg/mL de eugenol.

4.3 Efecto de los diferentes componentes en la actividad antimicrobiana de vainillina

4.3.1 Efecto de las proteínas sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 4** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y albúmina de suero bovino (BSA) tras la incubación durante 0, 1, 4, 8 y 24 horas.

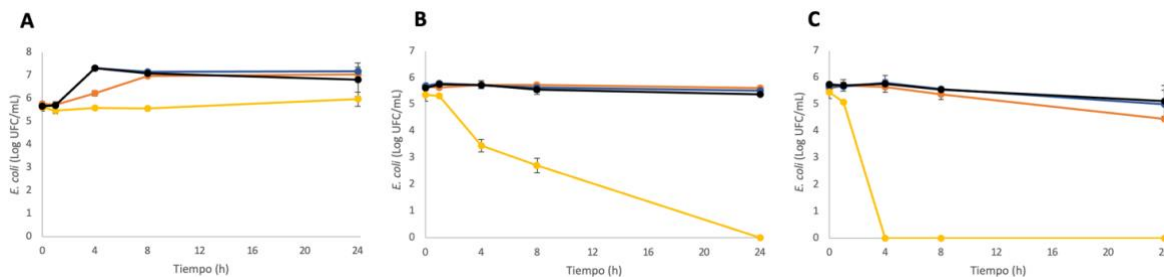


Figura 4. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA): amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1,5 g/100mL, negro 3 g/100mL.

Como podemos ver en la **Figura 4A**, en ausencia de vainillina se observa un ligero crecimiento del microorganismo debido a la existencia de una fuente nutritiva. En cuanto a la **Figura 4B**, una concentración de 2 mg/mL de vainillina en ausencia de proteína (línea amarilla) es capaz de inhibir totalmente la población bacteriana en 24 horas (aprox. <5 log

UFC/mL). Sin embargo, la adición de proteína bloquea claramente la actividad antimicrobiana de la vainillina. La **Figura 4C** muestra que, a pesar del incremento de la concentración de vainillina desde 2 mg/mL hasta 4 mg/mL, la actividad antimicrobiana sigue estando bloqueada en presencia de proteína. Por tanto, la adición al medio de tan solo 0,5 g/100mL de proteína, es suficiente para reducir totalmente la actividad antimicrobiana de vainillina alcanzándose, por tanto, recuentos similares a los que se obtuvieron en ausencia del agente antimicrobiano.

Teniendo en cuenta la Norma General de Calidad para la leche UHT (BOE, 1987), la adición de vainillina como agente antimicrobiano no ejercería tal acción en leche entera, desnatada ni semidesnatada. En este contexto, en el estudio realizado por Cava-Roda *et al.* (2010) ya se observó que el efecto de la vainillina en la leche fue bacteriostático en lugar de bactericida, siendo los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrofóbica entre las proteínas y la vainillina responsables de este efecto (Chobpattana *et al.*, 2002).

Encontramos otro ejemplo de cómo las proteínas bloquean la actividad antimicrobiana de los CAEs. En el estudio de Juven *et al.* (1994), en el cual se observó que la BSA también neutralizaba la acción antibacteriana del timol. Se dedujo que este bloqueo fue causado por la capacidad de unión de la proteína a los compuestos fenólicos, evitando así que éstos se unan a las proteínas de la membrana bacteriana, mecanismo principal de la acción antimicrobiana del timol.

Por último, en un estudio que evaluaba la actividad antimicrobiana de vainillina inmovilizada en partículas de óxido de silicio en presencia de proteínas (Karakas, 2021) se detectó que la actividad antimicrobiana se mantuvo hasta solamente una concentración de 0,01 g/100mL de proteína. Por tanto, podemos concluir que el efecto de las proteínas sobre la actividad antimicrobiana de la vainillina en su forma libre es similar a la acción de la vainillina inmovilizada.

En este sentido, puesto que la cantidad de proteína en otros alimentos como zumo (0,1-0,7 g/100mL), vino (0,07-0,1 g/100mL), cerveza (0-0,5 g/100mL) u horchata (0,5 g/100mL) (FoodData Central, 2019) es mucho menor a la necesaria para bloquear el efecto antimicrobiano de la vainillina, se confirma por qué en estas matrices los sistemas antimicrobianos sí que tienen efectividad.

4.3.2 Efecto de los carbohidratos simples sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 5** muestra la curva de letalidad de *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y sacarosa, siendo este un disacárido presente en horchata en concentraciones mayores a 10 g/100mL (BOE, 1988) o en zumos en concentraciones comprendidas entre 0,5 y 5 g/100mL (BOE, 2007).

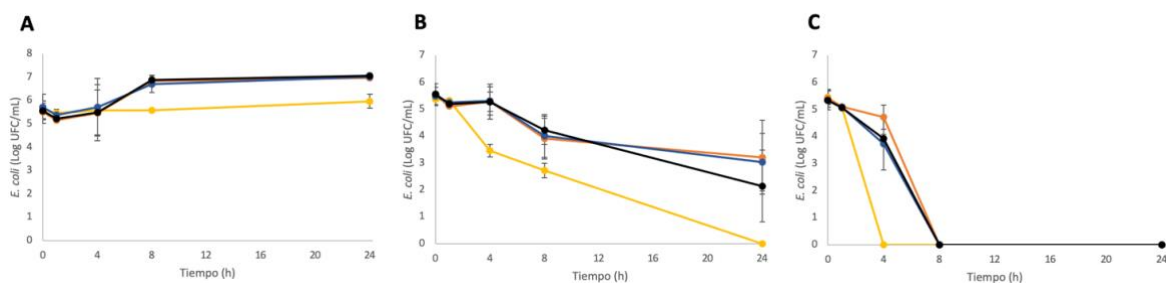


Figura 5. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de sacarosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 5 g/100mL, azul 8 g/100mL, negro 12 g/100mL.

Concretamente, observamos en la **Figura 5A** que al igual que ocurre en el caso de la proteína, en ausencia de vainillina se produce un ligero crecimiento de la bacteria debido a la existencia de una fuente nutritiva. En cambio, en la **Figura 5B**, la adición de 2 mg/mL de vainillina al medio produce una disminución de la población bacteriana. A pesar de lograr esta reducción de la carga microbiana, la adición de sacarosa disminuye el poder antimicrobiano del aceite esencial (línea amarilla). Sin embargo, tras 24 horas de incubación observamos una mayor eficacia de la vainillina para la concentración de sacarosa más alta (12 g/100mL). Esto puede ocurrir debido a que una menor actividad del agua puede ayudar a desactivar el microorganismo en cuestión. Concretamente, la bacteria *E. coli* prolifera en alimentos con una actividad del agua mínima de 0,95 (OMS, 2018). En la **Figura 5C** podemos observar un mayor poder antimicrobiano al aumentar la cantidad de vainillina de 2 a 4 mg/mL. En este caso, la total eliminación de *E. coli* se produce a las 8 horas de incubación para todas las concentraciones de sacarosa. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de sacarosa en el medio enlentece la acción antimicrobiana, ya que en ausencia de sacarosa la eliminación total de la bacteria se produce tras 4 horas de incubación (línea amarilla).

Por tanto, para su aplicación en la horchata y los zumos la concentración de antimicrobiano utilizada debería ser de 4 mg/mL para asegurar su acción.

En cuanto al efecto de la sacarosa sobre vainillina inmovilizada, se logró una notable actividad antimicrobiana hasta 5 g/100mL de sacarosa (Karakas, 2021). En el presente estudio, con la adición de 5 g/100mL de sacarosa al medio, solamente se logra un efecto antimicrobiano con el uso de 4 mg/mL de vainillina.

La **Figura 6** muestra los consiguientes recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y lactosa, siendo este compuesto el principal disacárido presente en la leche.

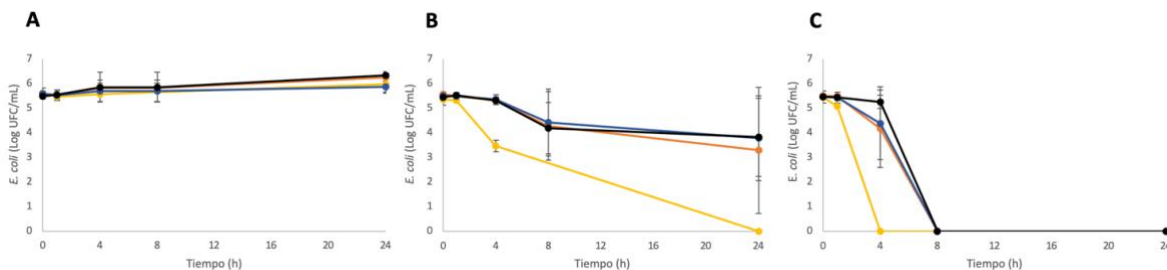


Figura 6. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de lactosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 1,5 g/100mL, azul 3 g/100mL, negro 4,5 g/100mL.

En la **Figura 6A** observamos que, a pesar de contar con una fuente nutritiva, no se produce un aumento de la población bacteriana. En cuanto a la **Figura 6B**, encontramos un resultado similar a los obtenidos por la sacarosa. En este sentido, tras la adición de 2 mg/mL de vainillina se produce una ligera disminución en el recuento de aproximadamente 2 órdenes logarítmicos. Sin embargo, en la **Figura 6C**, al aumentar la concentración de vainillina hasta 4 mg/mL, se logra reducir completamente la población de *E. coli* trascurridas 8 horas de incubación. De la misma forma que en el caso anterior, la presencia de lactosa en el medio entorpece la acción antimicrobiana de la vainillina (línea amarilla).

De igual forma, la vainillina inmovilizada solamente ejerció una acción antimicrobiana hasta 3 g/100mL de lactosa, a mayores concentraciones no se observó reducción bacteriana

(Karakas, 2021). En el presente estudio, con la adición de 3 g/100mL de lactosa al medio, solamente se logra un efecto antimicrobiano con el uso de 4 mg/mL de vainillina.

Por tanto, en referencia a la lactosa, la adición de 4 mg/mL de vainillina al medio sí ejercería una acción antimicrobiana sobre la leche entera, semidesnatada y desnatada (Mínimo 4,20 g/100mL, 4,25 g/100mL y 4,30 g/100mL de lactosa respectivamente) basándonos en la Norma General de Calidad para la leche UHT (BOE, 1987).

4.3.3 Efecto de los carbohidratos complejos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 7** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y almidón, un polisacárido con grandes aplicaciones en la industria alimentaria (Yazid *et al.*, 2018) (Egharevba, 2019).

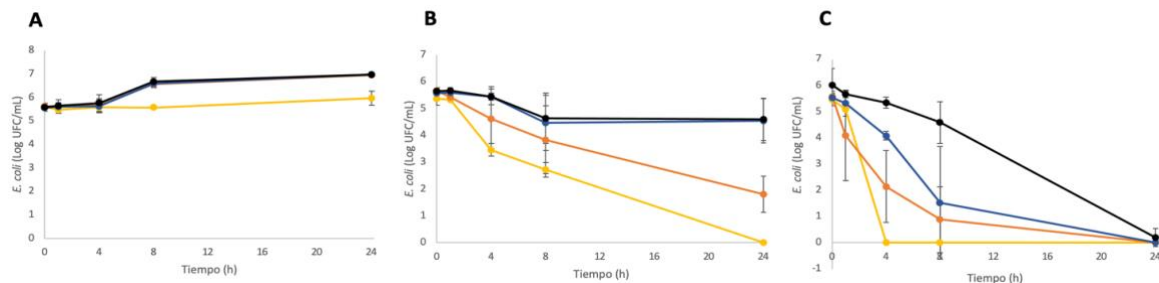


Figura 7. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de almidón: amarillo 0 g/100mL, naranja 0,1 g/100mL, azul 1 g/100mL, negro 2 g/100mL.

En la **Figura 7A** observamos que al igual que en el caso de la proteína y la sacarosa, el almidón actúa como fuente nutritiva para la bacteria, favoreciendo su crecimiento. En el caso de la **Figura 7B**, tras la incorporación del agente antimicrobiano (2 mg/mL de vainillina), podemos observar una disminución acusada de la población bacteriana para la concentración más baja (0,1 g/100mL) con respecto a las otras dos concentraciones testadas (1 g/100mL y 2 g/100mL). Concretamente, a dichas concentraciones se logra una disminución de apenas 1 orden logarítmico. Por el contrario, tal como se observa en la **Figura 7C**, al aumentar la concentración del antimicrobiano hasta 4 mg/mL, se logra una reducción total de la población bacteriana tras 24 horas de acción para todas las concentraciones. Por otro lado, al igual que los demás carbohidratos testados, el almidón también tiene un efecto retardante sobre la acción antimicrobiana de la vainillina.

Concretamente, son necesarios un total de 24 horas de acción en lugar de las 4 horas necesarias en ausencia de éste (línea amarilla) cuando 4 mg/mL de vainillina son añadidos al medio.

Hallamos en literatura estudios que ya determinaron que la presencia de almidón bloqueaba la eficacia de los soportes antimicrobianos (Tserennadmid *et al.*, 2010). Este polisacárido se encuentra en la horchata en concentraciones mínimas de 1,9 g/100mL (BOE, 1988). Por tanto, para su aplicación en este producto sería necesario utilizar una concentración de 4 mg/mL de vainillina, y se lograría una eliminación total únicamente tras 24 horas de acción.

Por último, la **Figura 8** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y pectina, polisacárido presente en frutas y vegetales que otorga propiedades gelatinizantes, espesantes y estabilizantes (Leroux *et al.*, 2003) (Cindio *et al.*, 2016).

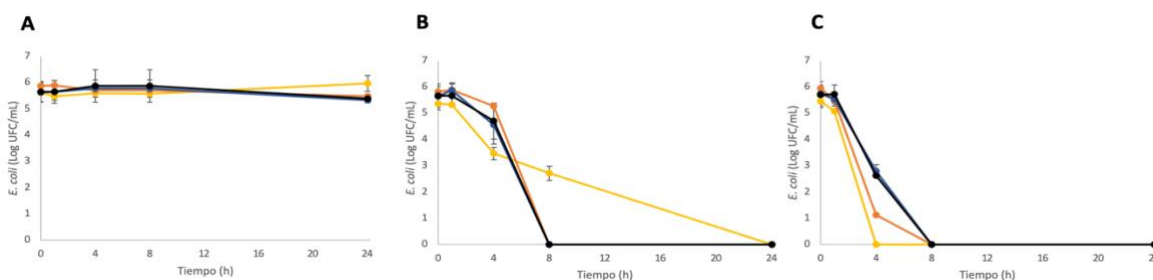


Figura 8. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de pectina: amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1 g/100mL, negro 1,5 g/100mL

En la **Figura 8A** observamos que la pectina no produce por sí misma ningún efecto notable sobre el crecimiento de la bacteria. Por otro lado, la **Figura 8B** advierte que durante las 4 primeras horas de incubación, tras la adición de 2 mg/mL de vainillina, solo se logra una ligera disminución en la población bacteriana. Sin embargo, a las 8 horas de incubación se produce una drástica reducción de *E. coli* para todas las concentraciones de pectina (0,5 g/100mL, 1 g/100mL y 1,5 g/100mL). Asimismo, en la **Figura 8C** se muestra que, tras la adición de 4 mg/mL de vainillina, se produce de nuevo la reducción total de la población bacteriana transcurridas 8 horas de incubación. Además, es notable una mayor reducción de la población bacteriana durante las primeras 4 horas en este caso. Podríamos decir por

tanto que la pectina no produce ninguna interacción que resulte en un cambio notable de eficacia antimicrobiana.

Estos resultados están en consonancia con los resultados obtenidos en el zumo de manzana por Peña-Gómez *et al.*, (2019b). El zumo de manzana contiene altas concentraciones de pectina 4,5 g/100mL y un pH ácido (Klavons *et al.*, 2006). Pese a este elevado contenido, en el citado estudio se observa que el proceso de filtración del zumo a través de una matriz formada por partículas de óxido de silicio funcionalizadas con diversos CAEs estabilizaba microbiológicamente la matriz alimentaria, alargando en gran medida su vida útil con respecto al uso de tratamientos térmicos.

4.3.4 Efecto de los ácidos orgánicos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 9** muestra la curva de letalidad de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y ácido cítrico. Este compuesto se encuentra presente en la mayoría de frutas y está ampliamente utilizado como conservante y antioxidante en la industria alimentaria (Frankel, 1996) (Nielsen & Arneborg, 2007).

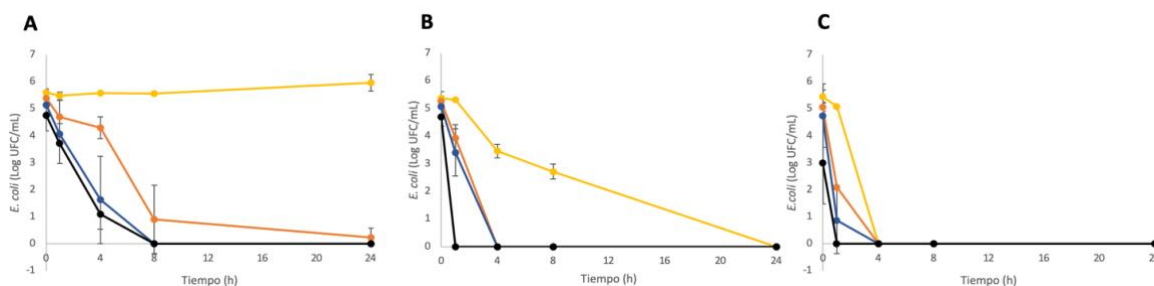


Figura 9. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de ácido cítrico: amarillo 0 g/L, naranja 1 g/L, azul 2 g/L, negro 3 g/L.

A diferencia de todos los casos anteriores, la **Figura 9A** muestra que el ácido cítrico posee por sí mismo un efecto bactericida sobre *E. coli*, ya que se obtuvieron recuentos mucho menores que en ausencia de ácido cítrico (línea amarilla). Concretamente, para las dos mayores concentraciones de ácido cítrico (2 g/L y 3 g/L) se redujo completamente la carga microbiana a las 8 horas de incubación. De igual forma, observamos tanto en la **Figura 9B** como en la **Figura 9C** que, con la adición de 2 y 4 mg/mL de vainillina, se ejerce un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana. En este sentido, para ambas concentraciones de

vainillina, una concentración de 3 g/L de ácido cítrico logra reducir completamente el microorganismo en tan solo 1 hora y a menores concentraciones (2 g/L y 1 g/L) trascurridas las 4 horas.

El efecto sinérgico bactericida de la vainillina y el ácido cítrico ya fue observado previamente en el estudio de [Negi \(2012\)](#). Concretamente, se dedujo que el incremento de la actividad antimicrobiana del sistema antimicrobiano se encontraba relacionada con la mejora de la hidrofobicidad y la tasa de difusión entre la membrana celular y los extractos de CAEs. Además, el ácido cítrico también interacciona con la bacteria *E. coli*, como se pudo determinar en el estudio de [Kang et al. \(2021\)](#), el cuál demostró el efecto antimicrobiano sinérgico del agua caliente y el ácido cítrico frente a biopelículas de *E. coli* mediante la destrucción de la membrana celular. De igual manera, en el estudio de [Karakas \(2021\)](#), la vainillina inmovilizada en partículas de sílice logró mantener su actividad antimicrobiana en presencia todas las concentraciones de ácido cítrico estudiadas (desde 0,5 g/L hasta 2 g/L).

En cuanto su contenido en alimentos, el ácido cítrico se encuentra presente en diferentes tipos de zumos. En referencia a este producto, encontramos un estudio sobre la conservación del zumo de manzana por filtración a través de micropartículas de sílice funcionalizadas con aceites esenciales ([Peña-Gómez et al., 2019b](#)). En éste se logró una reducción de 5,5 ciclos logarítmicos, al igual que podemos observar en el presente estudio, a pesar de la baja concentración de ácido cítrico en el producto (0,005-0,0015 g/100mL) ([BOE, 2007](#)). Sin embargo, cabe destacar que los buenos resultados obtenidos en éste pueden venir dados por el bajo pH del producto, concretamente 3,98 ([Wei et al., 2014](#)), siendo que el pH óptimo de crecimiento de la bacteria *E. coli* es 7,2 ([Álvarez-Blanco, 2019](#)). Es por ello que, podemos suponer que la utilización de estos sistemas antimicrobianos con otros zumos, como podría ser el zumo de naranja que posee mayor concentración de ácido cítrico (0,6-1,7g/100mL) ([BOE, 2007](#)) y un pH similar (3,6) ([Rodríguez-Arzave et al., 2020](#)) obtendría aún mejores resultados.

4.3.5 Efecto del alcohol sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 10** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y etanol a lo largo del tiempo.

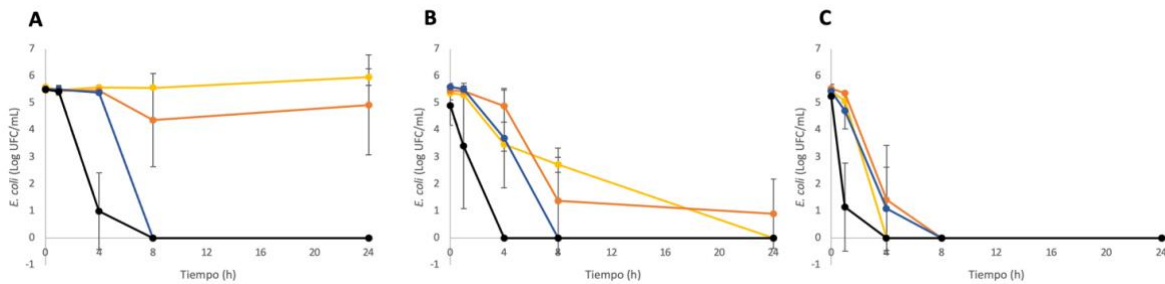


Figura 10. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de etanol: amarillo 0 g/100mL, naranja 2 g/100mL, azul 6 g/100mL, negro 12 g/100mL.

Como podemos observar en la **Figura 10A**, de igual forma que el ácido cítrico, el etanol tiene un efecto bactericida por sí mismo, lográndose de nuevo una reducción total del microorganismo a las 8 horas de acción para las dos mayores concentraciones de etanol (6 g/100mL y 12 g/100mL). Sin embargo, cabe destacar que, para la menor concentración de etanol (2 g/100mL) no se logra la reducción total en ningún caso. En la **Figura 10B y 10C**, tras la adición de 2 mg/mL y 4 mg/mL de vainillina respectivamente, para la mayor concentración de etanol estudiada (12 g/100mL) se reduce totalmente la bacteria (> 5 log UFC/mL) tras 4 horas de incubación. En el caso del empleo de menores concentraciones de alcohol (2 g/100mL y 6 g/100ml), la actividad antimicrobiana de la vainillina consigue de igual manera reducir completamente la bacteria *E. coli*, pero tras mayor tiempo de incubación (8 horas). Por lo tanto, al igual que el ácido cítrico, el alcohol tiene un efecto antimicrobiano sinérgico junto a la vainillina.

Este descenso en los recuentos de *E. coli* también puede ser debido en parte a una disminución de la actividad del agua producida por la adición de etanol. Además, se ha demostrado que el propio etanol tiene efecto bactericida sobre *E. coli*, ya que inhibe el ensamblaje del peptidoglicano reticulado e induce la lisis celular de la bacteria provocando su muerte (Ingram, 1981).

Respecto a bebidas con graduación alcohólica en los cuales se ha evaluado el efecto antimicrobiano de diferentes CAEs inmovilizados sobre partículas de óxido de silicio, diferentes estudios han confirmado que su uso logró una reducción de hasta 4 órdenes logarítmicos frente a la bacteria *E. coli* en cervezas (Peña-Gómez, 2020a) y una reducción total de los principales microorganismos responsables del deterioro en los vinos con el uso de vainillina funcionalizada (García-Ríos et al., 2018). Así pues, resultados encontrados en

literatura para cerveza y vino (3-6 g/100mL y 10-15 g/100mL de etanol) (Missbach *et al.*, 2017), en los que diversos agentes antimicrobianos basados en compuestos de aceite esencial obtuvieron resultados positivos (Peña-Gómez *et al.*, 2020a) (García-Ríos *et al.*, 2018), son explicados.

4.3.6 Efecto de los lípidos sobre la actividad antimicrobiana de vainillina

La **Figura 11** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de vainillina y aceite de girasol (grasa).

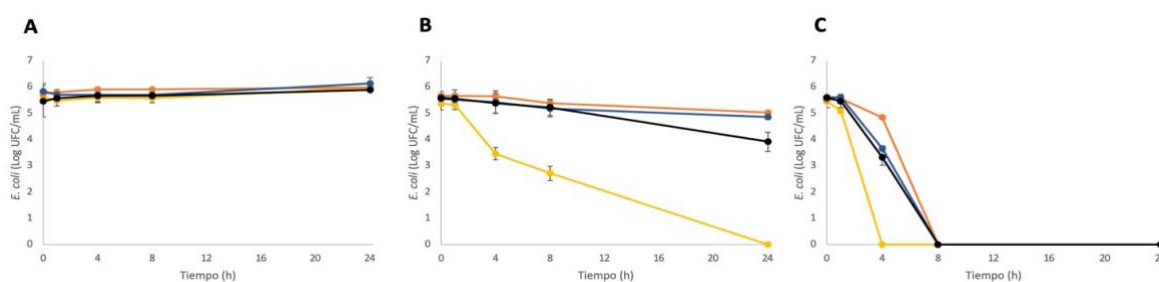


Figura 11. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL vainillina B) 2 mg/mL vainillina C) 4 mg/mL vainillina. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de aceite de girasol: amarillo 0 g/100mL, naranja 1 g/100mL, azul 2 g/100mL, negro 4 g/100mL.

En este caso, como podemos apreciar en la **Figura 11A**, el aceite de girasol no produce ningún tipo de efecto sobre el crecimiento de la bacteria. En el caso de la **Figura 11B**, observamos que la adición de 2 mg/mL de vainillina al medio no produce ningún efecto bactericida, por tanto, se bloquea la actividad antibacteriana. En cambio, al aumentar la concentración de vainillina de 2 a 4 mg/mL, **Figura 11C**, se logra una reducción completa del microorganismo para todas las concentraciones de grasa tras 8 horas de incubación.

En este sentido, Cava *et al.* (2010) mostraron que los aceites esenciales de corteza de canela y clavo ejercieron una mayor acción antimicrobiana en leche semidesnatada que en leche entera. Además, Cui *et al.* (2016) y Mejlholm & Dalgaard (2002) demostraron que la grasa crea una capa protectora que rodea la membrana bacteriana, impidiendo el contacto entre la bacteria y el grupo funcional del agente antimicrobiano. Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Karakas (2021), en el cual fue necesaria solamente una

concentración mayor de 0,5 g/100mL de aceite de girasol para bloquear la actividad antimicrobiana de vainillina inmovilizada sobre partículas de óxido de silicio.

Teniendo en cuenta la Norma General de Calidad para la leche UHT (BOE, 1987), con el objetivo de lograr una correcta acción antibacteriana de la vainillina en leche entera, semidesnatada y desnatada debe utilizarse una concentración del antimicrobiano de 4 mg/mL. Esta misma concentración debería utilizarse para su aplicación en horchata, que posee una concentración mínima de 2 g/100mL de grasa (BOE, 1988).

4.4 Efecto de los diferentes componentes en la actividad antimicrobiana de eugenol

Tras la obtención de los resultados, se seleccionaron los componentes que produjeron en la actividad antimicrobiana de vainillina un mayor bloqueo, con el objetivo de determinar si otro compuesto de aceite esencial, con estructura y grupos funcionales diferentes, como por ejemplo el eugenol, se comportaría de igual manera o de una manera diferente a la vainillina.

4.4.1 Efecto de las proteínas sobre la actividad antimicrobiana de eugenol

La **Figura 12** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de eugenol frente a la adición de 0,5 g/100mL, 1,5 g/100mL y 3 g/100mL de BSA.

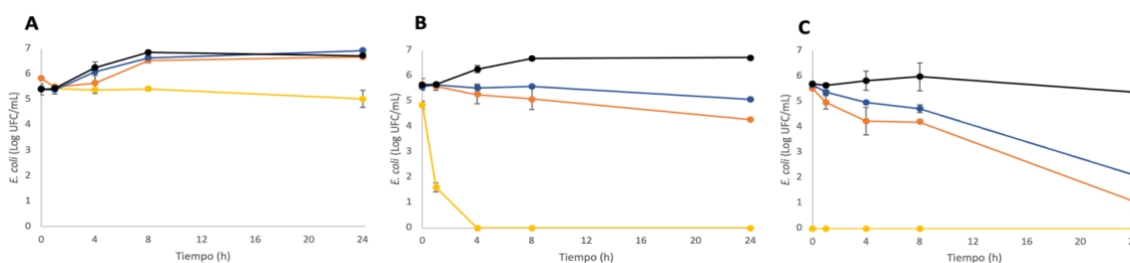


Figura 12. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA): amarillo 0 g/100mL, naranja 0,5 g/100mL, azul 1,5 g/100mL, negro 3 g/100mL.

En cuanto a la **Figura 12B**, una concentración de 0,6mg/mL de eugenol produce una ligera disminución de la población bacteriana (aproximadamente de 1 orden logarítmico) con la adición de 0,5 g/100mL y 1,5 g/100mL de BSA. En cambio, en el caso de la mayor

concentración del compuesto (3 g/100mL), se produce un aumento del recuento bacteriano de aproximadamente el mismo orden. Comparando estos resultados con los obtenidos anteriormente con 2 mg/mL de vainillina (**Figura 4B**) podemos advertir que el recuento de la población bacteriana es similar tanto en el caso de vainillina como eugenol, bloqueando la actividad antimicrobiana de ambos compuestos de aceite esencial. Por último, tal y como se muestra en la **Figura 12C**, con 0,8 mg/mL de eugenol, sí se detecta una disminución notable tras 24 horas de acción para las dos menores concentraciones del compuesto (0,5 g/100mL y 1,5 g/100mL), presentando mejores resultados que con el uso de 4 mg/mL de vainillina como agente antimicrobiano (**Figura 4C**).

A pesar de observar un mejor resultado con el uso de 0,8 mg/mL de eugenol para las concentraciones 0,5 g/100mL y 1,5 g/100mL del compuesto, el eugenol no ejercería una acción antimicrobiana en leche entera, semidesnatada y desnatada ya que éstas contienen aproximadamente un mínimo de 3 g/100mL (BOE, 1987), concentración a la cual la actividad antimicrobiana del eugenol también se encuentra bloqueada.

4.4.2 Efecto de los carbohidratos simples (lactosa) sobre la actividad antimicrobiana de eugenol

La **Figura 13** muestra los recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de eugenol frente a la adición de 1,5 g/100mL, 3 g/100mL y 4,5 g/100mL de lactosa.

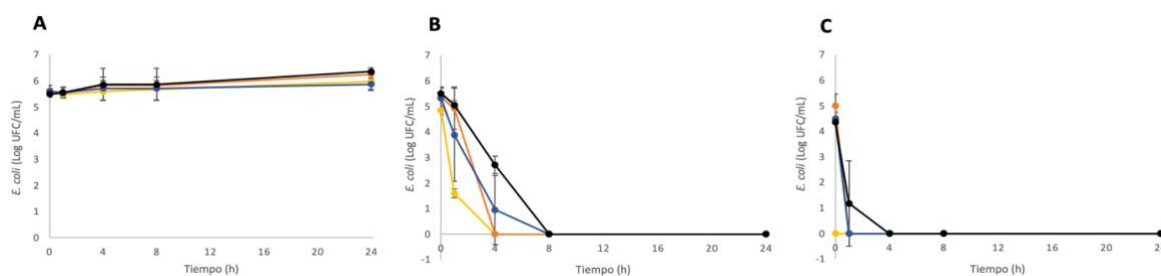


Figura 13. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de lactosa: amarillo 0 g/100mL, naranja 1,5 g/100mL, azul 3 g/100mL, negro 4,5 g/100mL.

Tal y como se observa en la **Figura 13B**, una concentración de 0,6 mg/mL de eugenol es capaz de inhibir totalmente la población bacteriana tras 4 horas de acción para el medio en el que se adiciona 1,5 g/100mL de lactosa, atrasándose hasta las 8 horas de incubación

para el resto de las concentraciones (3 g/100mL y 4,5 g/100mL). Comparando estos resultados con la **Figura 6B** se observa una mayor eficacia antimicrobiana con respecto al uso de vainillina. Asimismo, resultados similares fueron obtenidos tras aumentar la concentración de eugenol a 0,8 mg/mL, **Figura 13C**. En este caso, no sólo la acción antimicrobiana está acentuada, sino que se logra la reducción total de *E. coli* en tan solo 1 hora para las dos menores concentraciones del compuesto (1,5 g/100mL y 3 g/100mL). Por el contrario, la reducción total de *E. coli* se retrasa hasta las 4 horas de incubación para la mayor concentración de lactosa (4,5 g/100mL). Al igual que en el caso anterior, el eugenol tiene un mayor poder antimicrobiano que la vainillina (**Figura 6C**), logrando la inhibición total en un menor tiempo de acción.

Por ende, el eugenol ha mostrado mayor eficacia antimicrobiana en comparación con la vainillina cuando se adiciona lactosa al medio. La adición de eugenol al medio en presencia de lactosa solamente retrasa la reducción completa del microorganismo (línea amarilla).

Enfocándonos en el ámbito alimentario, podemos establecer que el eugenol tendría una mayor acción antimicrobiana sobre la leche entera, semidesnatada y desnatada que contienen mínimo alrededor de 4,5g/100mL de lactosa en su composición (línea negra) (BOE, 1987). En este contexto, con la adición de 0,6 mg/mL de eugenol lograríamos una reducción completa de la bacteria en 8 horas, y en tan solo 4 horas adicionando 0,8 mg/mL.

4.4.3 Efecto de los lípidos sobre la actividad antimicrobiana de eugenol

La **Figura 14** muestra los de recuentos de la bacteria *E. coli* en presencia de diferentes concentraciones de eugenol frente a la adición de 1 g/100mL, 2 g/100mL y 4 g/100mL de aceite de girasol (grasa).

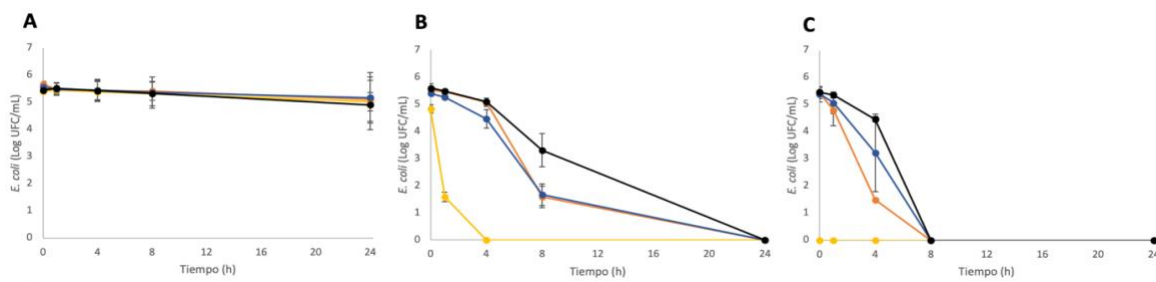


Figura 14. Curva de letalidad de *E. coli* en presencia de A) 0 mg/mL eugenol B) 0,6 mg/mL eugenol C) 0,8 mg/mL eugenol. Las rectas corresponden a las diferentes concentraciones de aceite de girasol: amarillo 0 g/100mL, naranja 1 g/100mL, azul 2 g/100mL, negro 4 g/100mL.

Tras la adición de 0,6 mg/mL de eugenol, **Figura 14B**, se observa una reducción completa del microorganismo a las 24 horas para todas las concentraciones de aceite de girasol, lo cual no ocurre en ningún caso con la adición de vainillina (**Figura 11B**). La adición de una mayor concentración de eugenol al medio, 0,8 mg/mL (**Figura 14C**), produce un adelantamiento de inhibición total de 24 a 8 horas con respecto a 0,6 mg/mL. Sin embargo, cabe destacar que con una concentración de 0,8 mg/mL de eugenol, se lograría la reducción del microorganismo tras el mismo tiempo de acción que 4 mg/mL de vainillina (8 horas) (**Figura 11C**).

Por tanto, podemos observar que se producen diferencias significativas en cuanto al uso de la vainillina y el eugenol, sin embargo, no se producen diferencias de actividad antimicrobiana entre las concentraciones mayores testadas.

Asimismo, podemos afirmar que el eugenol, al igual que la vainillina, ejercería una acción bacteriana notable sobre leche entera (mínimo 3,20g/100mL), semidesnatada (1,50-1,80 g/100mL) y desnatada (máximo 0,30 g/100mL) (BOE, 1987) y también sobre la horchata (mínimo 2 g/100mL) (BOE, 1988).

5.CONCLUSIONES

El presente estudio ha confirmado que la actividad antimicrobiana de los CAEs depende tanto de la estructura del compuesto, como de la composición del medio donde se encuentre. Compuestos como las proteínas; disacáridos como lactosa y sacarosa; polisacáridos como almidón; y grasa produjeron un bloqueo notable en la eficacia de vainillina. Un efecto contrario ocurre en el caso de la adición de ácido o alcohol, los cuales ejercieron un efecto sinérgico antimicrobiano. Por otro lado, la pectina (polisacárido) no produce ninguna interacción que resulte en un cambio notable de eficacia antimicrobiana. La concentración para la cual la incubación reduce el crecimiento microbiano en vainillina es de 2 mg/mL para pectina, ácido cítrico y alcohol, y 4 mg/mL para sacarosa, lactosa, almidón y grasa. En el caso del eugenol, la concentración es de 0,6 mg/mL tanto para lactosa como grasa. Ninguna concentración estudiada tanto de vainillina como eugenol ha sido capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria *E. coli* en presencia de proteína.

La diferencia de comportamiento entre la vainillina y el eugenol, para al menos dos de los componentes de la matriz alimentaria que suelen afectar negativamente a la actividad antimicrobiana de dichos compuestos, demuestra la importancia de ampliar este tipo de estudios al máximo número de moléculas con actividad antimicrobiana posible (otros compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, compuestos azufrados, ácidos grasos de cadena media). De esta manera se podría llegar a proponer el compuesto antimicrobiano con mayor efectividad en función de la composición del alimento donde se vaya a incorporar.

Por último, el hecho de que estos resultados concuerden con los obtenidos en trabajos previos, donde los agentes antimicrobianos estaban inmovilizados sobre partículas de óxido de silicio, pone de manifiesto que la metodología propuesta serviría como método de cribado de diferentes antimicrobianos para una determinada matriz alimentaria sin la necesidad de inmovilizarlos sobre partículas de óxido de silicio como paso previo al estudio. No obstante, puesto que un alimento es una matriz compleja de varios de estos componentes, cualquier estudio previo con componentes individuales de la matriz deberá de ser confirmado en la matriz real del alimento objetivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Blanco, C. (2019). Parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumo comercial de frutas del bosque. Universidad de Valladolid. <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36901>

BOE. Orden de 11 de febrero de 1987 por la que se modifica la Norma General de Calidad para la Leche UHT. BOE núm. 44, de 20 de febrero de 1987. [Consultado el 20 de julio de 2022] [https://www.boe.es/eli/es/o/1987/02/11/\(8\)](https://www.boe.es/eli/es/o/1987/02/11/(8))

BOE. Real Decreto 1338/1988, de 28 de octubre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración y Venta de Horchata de Chufa. BOE de 10 de noviembre de 1988, núm. 270, páginas 32069 a 32073. [Consultado el 23 de julio de 2022] <https://www.boe.es/eli/es/rd/1988/10/28/1338>

BOE. Real Decreto 1518/2007, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. BOE núm. 294, de 8 de diciembre de 2007. [Consultado el 20 de julio de 2022] <https://www.boe.es/eli/es/rd/2007/11/16/1518>

BOE. Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. BOE de 17 de diciembre de 2016, núm. 304, páginas 88520 a 88524. [Consultado el 20 de julio de 2022] <https://www.boe.es/eli/es/rd/2016/12/16/678>

Bravo-Cadena, M., Preston, G., Hoorn, R.A.L., Townley, H., Thompson, I., (2018). Species-specific antimicrobial activity of essential oils and enhancement by encapsulation in mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*. 122. 582-590. 10.1016/j.indcrop.2018.05.081. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.081>

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.03.022>.

Calabuig-Benavent, I. (2017). Nuevas estrategias para garantizar la estabilidad microbiológica de horchata de chufa fresca. Universitat Politècnica de València. Tesis de máster. <http://hdl.handle.net/10251/89632>

Cantón, E., & Pemán, J. (1999). Curvas de letalidad en antifúngicos. *Revista Iberoamericana De Micología*, 16, 82-85.

Cava-Roda, Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M. T., & Marín-Iniesta, F. (2010). Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2120–2131. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0484-4>

Cebrián-Cabo, S. (2020). Métodos y soportes para la inmovilización de componentes de aceites esenciales y su efecto sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/157873>

Cheftel J.C. (2011) Emerging Risks Related to Food Technology. In: Hefnawy M. (eds) *Advances in Food Protection*. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1100-6_13

Chobpattana, W., Jeon, I. J., Smith, J. S., & Loughin, T. M. (2002). Mechanisms of Interaction Between Vanillin and Milk Proteins in Model Systems. *Journal of Food Science*, 67(3), 973–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09438.x>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00002.x>

Cindio, B.D., Gabriele, D., & Lupi, F.R. (2016). Pectin: Properties Determination and Uses. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00531-6>

Cui, H.Y., Zhou, H., Lin, L., Zhao, C.T., Zhang, X.J., Xiao, Z., & Li, C.Z. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil and its application in milk. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26, 532-541.

Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & Valdramidis, V. (Eds.). (2011). *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*. Academic Press.

Del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2017). Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 3084–3103. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087964>

Egharevba, H. O. (2019). Chemical Properties of Starch and Its Application in the Food Industry. In (Ed.), *Chemical Properties of Starch*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87777>

European Food Safety Authority. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* /, 19(12). [Consultado el 15 de febrero de 2022] <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>

Faleiro, M.L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Mendez-Villas (ed) pp: 1143-1157.

FoodData Central (2019). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). [Consultado el 4 de julio de 2022] <https://fdc.nal.usda.gov/index.html>.

Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food chemistry*, 57(1), 51-55. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(96\)00067-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(96)00067-2)

García-Ríos, Ruiz Rico, M., Guillamón Navarro, J. M., Pérez-Esteve, É., & Barat Baviera, J. M. (2018). Improved antimicrobial activity of immobilised essential oil components against representative spoilage wine microorganisms. Elsevier. <http://hdl.handle.net/10251/120295>

Garrido-Momparler G.M. (2021). Inactivación de microorganismos esporulados en productos lácteos mediante antimicrobianos naturales inmovilizados en sistemas filtrantes. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/171290>

Gomez, & Diler, O. (2014). In vitro Antifungal activity of essential oils from Tymbra, Origanum, Satureja species and some pure compounds on the fish pathogenic fungus, Saprolegnia parasitica. *Aquaculture Research*, 45(7), 1196–1201. <https://doi.org/10.1111/are.12060>

Holdsworth, & Simpson, R. (2016). *Thermal Processing of Packaged Foods [electronic resource]* (3rd ed. 2016.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24904-9>

Hyltdgaard, 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

Inetianbor, Jonathan & Yakubu, Juliet & STEPHEN, EZEONU. (2015). EFFECTS OF FOOD ADDITIVES AND PRESERVATIVES ON MAN-A REVIEW. *Asian Journal of Science and Technology*. 6. 18.

Ingram L. O. (1981). Mechanism of lysis of Escherichia coli by ethanol and other chaotropic agents. *Journal of bacteriology*, 146(1), 331–336. <https://doi.org/10.1128/jb.146.1.331-336.1981>

Juven, B., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. (1994), Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x>

- Kang, J. W., Lee, H. Y., & Kang, D. H. (2021). Synergistic bactericidal effect of hot water with citric acid against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formed on stainless steel. *Food microbiology*, 95, 103676. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103676>
- Karakas, E.M. (2021). Matrix effect on the efficacy of vanillin coated supports for the microbial stabilization of drinks. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/174059>
- Klavons, A., Bennett D., Sadie H. (2006). Physical/Chemical Nature of Pectin Associated with Commercial Orange Juice Cloud. *Journal of Food Science*. 59. 399 – 401. 10.1111/j.1365-2621.1994.tb06976.x. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06976.x>
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food hydrocolloids*, 17(4), 455-462. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00027-4)
- Linsberger-Martin, G., Weiglhofer, K., Thi Phuong Thao, P., Berghofer, E., (2013). High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and in vitro protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT – Food Science and Technology*. 51. 331–336. 10.1016/j.lwt.2012.11.008. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.008>
- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in applied microbiology*, 34(1), 27–31. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01033.x>
- Missbach, B., Majchrzak, D., Sulzner, R., Wansink, B., Reichel, M., & Koenig, J. (2017). Exploring the flavor life cycle of beers with varying alcohol content. *Food Science & Nutrition*, 5(4), 889–895. <https://doi.org/10.1002/fsn3.472>
- Naciones Unidas (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible [Consultado el 1 de septiembre de 2022] <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International journal of food microbiology*, 156(1), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006>
- Nielsen, M. K., & Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food microbiology*, 24(1), 101-105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.005>
- Nostro, A., & Papalia, T. (2011). Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 7. 28-35. 10.2174/157489112799829684. <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>
- Organización Mundial de la Salud (2018). *E. coli* [Consultado el 1 de septiembre de 2022]. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

- Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., y Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulación de compuestos bioactivos prometedores para mejorar su absorción, estabilidad, funcionalidad y apariencia de los productos alimenticios finales. *Moléculas (Basilea, Suiza)*, 26(6), 1547. <https://doi.org/10.3390/molecules26061547>
- Pei, R., Zhou, F., Ji, B., & Xu, J. (2009). Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method. *Journal of Food Science*, 74(7), M379–M383. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01287.x>
- Peña-Gomez, N., Ruiz Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fernández Segovia, I., & Barat Baviera, J. M. (2019^a). Novel antimicrobial filtering materials based on carvacrol, eugenol, thymol and vanillin immobilized on silica microparticles for water treatment. Elsevier. <http://hdl.handle.net/10251/147618>
- Peña-Gómez, N., Ruiz-Rico, M., Fernández-Segovia, I., & Barat, J. M. (2019b). Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalized with essential oil component. *Food Control*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106749>
- Peña-Gómez N., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fernández-Segovia, I., & Barat, J. M. (2020a). Microbial stabilization of craft beer by filtration through silica supports functionalized with essential oil components. *Food Science & Technology*, 117, 108626–. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108626>
- Pereira, R. N., & Vicente, A. A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936–1943. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.013>
- Rodríguez-Arzave, J.A., Florido-Aguilar, A.L., Hernández-Torres, M.A. (2020). Determinación de parámetros fisicoquímicos en jugos de frutas cítricas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos Bau, A., Sancenón Galarza, F., Martínez-Mañez, R., Marcos Martínez, M. D., & Barat Baviera, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. <http://hdl.handle.net/10251/103615>
- Schnitzler, P. (2019). Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. *Chemotherapy (Basel)*, 64(1), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000501062>
- Silva, M. M., & Lidon, F. C. (2016). Food preservatives - an overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(6), 366-373. doi: <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>
- Tack, Ray, L., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Rissman, T., Jervis, R., Lathrop, S., Muse, A., Duwell, M., Smith, K., Tobin-D'Angelo, M., Vugia, D. J., Kufel, J. Z., Wolpert, B. J., Tauxe, R., & Payne, D. C. (2020). Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(17), 509–514. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>

- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474–2478. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005>
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Vágvölgyi, C., Gerő, L. & Krisch, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils and interaction with food components. *Open Life Sciences*, 5(5), 641-648. <https://doi.org/10.2478/s11535-010-0058-5>
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., & McClements, D.J. (2009). Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. *Global issues in Food Science and Technology*, 1, 425-479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374124-0.00024-7>
- Wei, L., Cheng, J., Meng, Y., Ren, Y., Deng, H., & Guo, Y. (2014). A novel formulation of thiamine dilaurylsulphate and its preservative effect on apple juice and sterilised milk. *Food chemistry*, 152, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.159>
- Yazid, N. S. M., Abdullah, N., Muhammad, N., & Matias-Peralta, H. M. (2018). Application of starch and starch-based products in food industry. *Journal of Science and Technology*, 10(2). <https://doi.org/10.30880/JST.2018.10.02.023>
- Zhu, Y., Li, C., Cui, H., Lin, L., (2021). Encapsulation strategies to enhance the antibacterial properties of essential oils in food system. *Food Control*, 123 (2021), p. 107856. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107856>