



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *Evaluación de la actividad antimicrobiana de componentes bioactivos de aceites esenciales inmovilizados sobre micropartículas de sílice.*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA  
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: CARLA MEDINA VENTURA

TUTORA ACADEMICA: Ana Isabel Jiménez Belenguer

DIRECTORA EXPERIMENTAL: María Ruiz Rico

*Curso Académico: 2016-2017*

**VALENCIA, Septiembre 2017**

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES INMOVILIZADOS SOBRE MICROPARTÍCULAS DE SÍLICE

Carla Medina Ventura, María Ruiz Rico, Ana Isabel Jiménez Belenguer<sup>1</sup>

## Resumen:

Los aceites esenciales y sus bioactivos presentan reconocida actividad antimicrobiana por lo que se ha propuesto su uso en alimentación como conservantes naturales. Sin embargo, su aplicación está limitada por sus intensas propiedades sensoriales. Como alternativa del uso libre de estos compuestos se propone la encapsulación o inmovilización en soportes inertes. Siguiendo esta aproximación en este trabajo se propone la inmovilización de componentes de aceites esenciales (timol, carvacrol y eugenol) sobre micropartículas de sílice amorfa. Así como la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a ciertos microorganismos patógenos responsables del deterioro de alimentos. La caracterización de los materiales confirma la correcta inmovilización de los compuestos bioactivos en la superficie del soporte de sílice. Por su parte los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana mostraron un efecto inhibitorio heterogéneo. En general, las bacterias gram-positivas fueron más sensibles al tratamiento con los compuestos inmovilizados. Mientras que las gram-negativas no se vieron apenas afectadas por estas partículas. *Z.bailii* resultó ser el microorganismo más sensible al tratamiento antimicrobiano. Este trabajo muestra el potencial de los soportes antimicrobianos desarrollados para su aplicación en alimentos.

**Palabras clave:** actividad antimicrobiana, carvacrol, eugenol, inmovilización, timol.

## Resum:

Els olis essencials i els seus bioactius presenten reconeguda activitat antimicrobiana pel que s'ha proposat el seu ús en alimentació com a conservants naturals. No obstant això, la seua aplicació està limitada per les seues intenses propietats sensorials. Com a alternativa de l'ús lliure d'estos compostos es proposa l'encapsulació o immobilització en suports inerts. Seguint esta aproximació en este treball es proposa la immobilització de components d'olis essencials (timol, carvacrol i eugenol) sobre micropartícules de sílice amorfa. Així com l'avaluació de l'activitat antimicrobiana enfront de certs microorganismes patògens responsables del deteriorament d'aliments. La caracterització dels materials confirma la correcta immobilització dels compostos bioactius en la superfície del suport de sílice. Per la seua banda els assajos de susceptibilitat antimicrobiana van mostrar un efecte inhibitori heterogeni. En general, els bacteris gram-positives van ser més sensibles al tractament amb els compostos immobilitzats. Mentre que les gram-negatives

---

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

no es van veure a penes afectades per estes partícules. *Z.bailii* va resultar ser el microorganisme més sensible al tractament antimicrobià. Este treball mostra el potencial dels suports antimicrobians desenvolupats per a la seua aplicació en aliments.

**Paraules clau:** activitat antimicrobiana, carvacrol, eugenol, immobilització, timol.

**Abstract:**

Essential oils and their bioactives have recognized antimicrobial activity and it has been proposed to use them as natural preservatives. However, its application is limited by its intense sensory properties. As an alternative to the free use of these compounds, encapsulation or immobilization is proposed in inherent substrates. Following this approach, the immobilization of essential oil components (thymol, carvacrol and eugenol) on amorphous silica microparticles is proposed. As well as the evaluation of the antimicrobial activity against certain pathogenic microorganisms responsible for the deterioration of food. The characterization of the materials confirms the correct immobilization of the bioactive compounds on the surface of the silica carrier. On the other hand the antimicrobial susceptibility tests showed a heterogenous inhibitory effect. In general, gram-positive bacteria were more sensitive to treatment with the immobilized compounds. While the gram-negatives were not affected by these particles. *Z.bailii* proved to be the most sensitive microorganism to antimicrobial treatment. This work shows the potential of antimicrobial supports developed for food application.

**Keywords:** antimicrobial activity, carvacrol, eugenol, immobilization, thymol.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana de los alimentos continúa siendo uno de los principales problemas de salud asociados al consumo de éstos, ya que los alimentos pueden ser el vehículo de transmisión de diversos microorganismos patógenos o responsables de su deterioro.

Entre los microorganismos patógenos que se pueden encontrar en alimentos destacan, entre otros, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. *S. enterica* es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, que se presenta en forma de bacilos. Se encuentra en el tracto digestivo de animales y el hombre, por lo que es indicativo de contaminación fecal. Se puede transmitir a los alimentos a través de la contaminación cruzada durante su elaboración y/o preparación (Moretro et al., 2012). La dosis infectiva es muy baja siendo suficiente el consumo de una única célula presente en un alimento para causar enfermedad (D'Aoust y Maurer, 2007). *E. coli* es también una bacteria Gram-negativa, en forma de bacilo, mesófila y anaerobia facultativa. La mayoría de las cepas de *E. coli* son capaces de colonizar la mucosa intestinal del huésped (Caprioli et al., 2004), por lo que puede transmitirse de persona-persona, animal-persona o a través de agua y alimentos contaminados (Ochoa et al, 2011). Algunas de las cepas de esta bacteria producen enterotoxinas y/o otros factores de virulencia que pueden producir trastornos gastrointestinales como diarreas, infecciones urinarias, meningitis en neonatos y, en casos más excepcionales, graves bacteriemias (Granados y Villaverde, 2002).

En cuanto a las bacterias Gram-positivas *S. aureus* es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo, presente en forma de cocos formando racimos irregulares. Esta especie está muy distribuida en el ambiente, encontrándose presente en aire, suelo, agua, aguas residuales, superficies, así como en la piel y mucosas del hombre y animales y algunos alimentos (leche, carne, huevos). Es resistente a la desecación y congelación, y tolera altas concentraciones de sal. Las principales fuentes de contaminación de los alimentos son los seres humanos, por contacto manual o a través de las vías respiratorias (Le Loir et al., 2003). La proliferación de esta bacteria en alimentos puede generar la intoxicación estafilocócica, un síndrome gastrointestinal leve, por ingestión de un alimento contaminado con enterotoxinas producidas por algunas cepas de *S. aureus*. Por su parte, las bacterias pertenecientes a la especie *L. monocytogenes* son bacilos con metabolismo aerobio y/o anaerobio facultativo. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida, por lo que se puede encontrar en animales, el suelo, agua, vegetales, piensos animales y alimentos frescos, procesados y congelados (Brock et al., 2004). Es una bacteria que resiste temperaturas de refrigeración y congelación, la desecación y el calentamiento (Farbera y Peterkin, 1991; Ferreira et al., 2014), lo que supone un gran problema en la industria alimentaria (Ahamad, et al., 2014). La infección con este microorganismo produce listeriosis, que aunque es una enfermedad relativamente atípica, la severidad de la infección y su frecuente relación con alimentos elaborados, la señalan como una de las enfermedades alimentarias

que mayor impacto social y económico provoca, siendo reconocida como un importante problema de salud pública (Little et al., 2007).

Por otra parte, es de gran importancia para la industria alimentaria controlar el crecimiento de microorganismos que producen el deterioro de los alimentos como algunos mohos y levaduras. En particular, *Zygosaccharomyces bailii* es una levadura ampliamente distribuida en la naturaleza que es responsable de la contaminación microbiológica de numerosos alimentos refrigerados y mantenidos a temperatura ambiente. Entre los posibles alimentos contaminados destacan el vino, leche, queso, productos de panadería y confituras o mermeladas. Esta contaminación produce crecimiento visible en superficie, fermentación, aromas no deseados, aparición de burbujas y deformación del empaquetado (Smith et al., 2004). Además, es relevante destacar que esta especie es tolerante a muchos métodos de conservación de alimentos.

Por todo ello, los métodos de conservación son imprescindibles para aumentar la vida útil de los alimentos (Ospina et al., 2018). Los métodos tradicionales para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos se basan en tratamientos físicos, principalmente el tratamiento térmico, y métodos químicos como los conservantes alimentarios. Sin embargo, estos métodos presentan diversos problemas como la pérdida de nutrientes, alteración de las características organolépticas de los alimentos, así como posibles problemas sobre la salud asociados a algunos conservantes químicos.

En los últimos años la sociedad demanda alimentos más naturales con adición de menos aditivos sintéticos así como el uso de compuestos con un menor impacto sobre el medio ambiente. Teniendo en cuenta la importancia de la conservación de los alimentos ha surgido como alternativa a los conservantes químicos convencionales el uso de compuestos antimicrobianos naturales, entre los que destacan los aceites esenciales (Bakkali et al., 2008).

Los aceites esenciales se obtienen de hojas, semillas, corteza, tallo, raíces, flores y frutas de diferentes plantas. Según la International Standard Organization (ISO), un aceite esencial se define como un conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o por corriente de vapor o, si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de expresión en frío, con un proceso posterior de separación de la fase acuosa (Baser, 1995). Este conjunto de compuestos volátiles son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como estrategia de protección frente a bacterias, virus, hongos e insectos. Por tanto, los aceites esenciales, así como diversos de sus componentes activos, han sido usados durante años como antimicrobianos, antivirales y antiinflamatorios, además de ser usados por sus propiedades organolépticas en fragancias y en la industria alimentaria (Burt, 2004). A pesar de estas propiedades, el uso de aceites esenciales y sus componentes está limitado por su alta volatilidad (Majeed et al., 2015), baja solubilidad en agua (Burt, 2004), fuertes propiedades sensoriales (Nostro & Papalia, 2012), potencial toxicidad (Smith et al., 2005) y fácil degradación (Turek & Stintzing, 2013).

Dada la problemática del uso de los componentes de aceites esenciales (EOC) libres, se han propuesto en los últimos años formas de administración alternativas como la encapsulación o inmovilización de los compuestos

bioactivos en partículas orgánicas o inorgánicas (Weiss et al., 2009). Entre los soportes inorgánicos usados destacan las micropartículas, porosas o amorfas, de sílice donde se puede llevar a cabo la encapsulación y/o inmovilización de antimicrobianos naturales obteniendo así partículas con la actividad antimicrobiana preservada e incluso mejorada (Bernardos et al., 2015; Li & Wang, 2013; Pędziwiatr-Werbicka et al., 2014; Ruiz-Rico et al., 2015). Siguiendo esta línea de investigación, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de partículas de sílice amorfa funcionalizadas con componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol y timol) sobre diversos microorganismos patógenos o responsables del deterioro de alimentos usando una metodología rápida.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales y reactivos**

Para la preparación de los sólidos funcionalizados se usaron 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), trimetilamina, paraformaldehído, dietil éter, cloroformo, n-butanona, carvacrol, eugenol y timol (obtenidos en Sigma-Aldrich, Madrid, España); acetonitrilo, ácido clorhídrico, sulfato de magnesio, hidróxido de potasio y ácido sulfúrico (proporcionados por Scharlab, Barcelona, España); y micropartículas de óxido de silicio amorfo (obtenidas en Silysiamont, Milán, Italia).

### **2.2. Preparación de los sólidos funcionalizados**

La preparación de los materiales con actividad antimicrobiana se llevó a cabo en tres etapas de síntesis: (a) síntesis de los derivados aldehído de carvacrol, eugenol y timol, (b) síntesis de los derivados alcoxisilano a partir de los derivados aldehído de los compuestos bioactivos y (c) inmovilización de los derivados alcoxisilano sobre la superficie de las micropartículas de sílice amorfa.

La primera etapa de síntesis se llevó a cabo con el objetivo de mantener libre el grupo hidroxilo de los compuestos bioactivos, el cual es esencial para la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Regnault-Roger y Hamroui, 1995). La síntesis del aldehído de carvacrol y timol se realizó mediante formilación directa de ambos isómeros. Para ello, se mezclaron en un balón de fondo redondo 150 mL de acetonitrilo, 40 mmol de carvacrol o timol, 150 mmol de trimetilamina y 40 mmol de MgSO<sub>4</sub> anhidro. Dicha mezcla se mantuvo en agitación durante 15 min a temperatura ambiente y en atmósfera de inerte. A continuación, se adicionaron 270 mmol de paraformaldehído y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 3.5 h. Tras enfriar la reacción temperatura ambiente se llevó a cabo la acidificación de la solución con HCl al 5%. Tras esto, la fase orgánica fue extraída con dietil éter y se obtuvieron los derivados aldehído tras la rotaevaporación de volátiles. Para la síntesis del aldehído de eugenol se usó la reacción general Reimer-Tiemann. El eugenol (22 mmol) se disolvió en agua destilada a 80 °C en un balón de fondo redondo. Tras enfriar la solución a 60 °C se adicionaron 400 mmol de KOH y 88 mmol de cloroformo

(por razones de seguridad al tratarse de una reacción exotérmica el cloroformo se añadió en un ratio de 1 mL/h) y la mezcla se mantuvo durante 8 h a 60 °C. A continuación se acidificó la disolución con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% y la fase orgánica fue extraída con n-butanona. Los volátiles se evaporaron bajo presión reducida, obteniendo así el derivado aldehído de eugenol.

Para la síntesis de los derivados alcoxisilanos, los derivados aldehído de carvacrol, timol y eugenol se hicieron reaccionar con 3-aminopropiltrietoxilano (relación molar 1:1) en presencia de diclorometano (20 mL) y MgSO<sub>4</sub>. La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h, tras lo cual se llevó a cabo el filtrado y rotaevaporado de la mezcla para obtener un líquido transparente.

La última etapa de síntesis consistió en el anclado de los derivados alcoxisilano sobre las micropartículas de sílice amorfa. Para ello, se introdujo 1 g de las partículas de sílice en un balón de fondo redondo y bajo atmósfera inerte se adicionaron 40 mL de acetonitrilo. Tras la suspensión del sólido se adicionó un exceso del derivado alcoxisilano y la mezcla se mantuvo en agitación durante 5,5 h a temperatura ambiente. Para obtener los sólidos funcionalizados, la mezcla se filtró, el sólido se lavó con acetonitrilo y agua destilada y se secó a vacío durante 12-24 h.

### **2.3. Caracterización de los materiales**

La caracterización del material de partida y los sólidos sintetizados se llevó a cabo mediante técnicas instrumentales tales como: la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), distribución del tamaño de partícula, potencial zeta, análisis termogravimétrico (TGA) y análisis elemental. Las imágenes del (FESEM) se llevaron a cabo empleando el modo de electrón secundario del microscopio Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania). Las medidas de potencial zeta de los sólidos se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C. Los sólidos se dispersaron en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL y la suspensión fue sometida a un ciclo de ultrasonidos durante 2 min para evitar la agregación de las partículas. La determinación del tamaño de partícula de los sólidos se llevó a cabo usando un analizador de tamaño de partícula por difracción láser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Para las medidas se prepararon suspensiones de las partículas muy diluidas en agua destilada, las cuales fueron sometidas a ultrasonidos antes de llevar a cabo la medida. Se realizaron 3 determinaciones para cada muestra a partir de las cuales se calcularon los valores promedio. El potencial zeta se calculó a través de los valores de movilidad de partícula mediante la aplicación del modelo de Smoluchowski. El valor promedio se calculó a partir de 3 medidas de cada muestra. Los análisis termogravimétrico y elemental se determinaron para estimar la cantidad de compuesto bioactivo inmovilizado sobre la superficie de las partículas de sílice. Para el TGA se usó un equipo TGA/SDTA 851e Mettler Toledo (Mettler Toledo Inc., Schwarzenbach, Suecia) con un programa de calentamiento que consistió en una rampa de 10°C/min desde 25 °C hasta 100 °C, una etapa de calentamiento isotérmico a 100°C en atmósfera de nitrógeno (800mL/min) durante 60 min, un calentamiento dinámico desde 100

°C hasta 1000 °C usando una atmósfera oxidante (aire, 80mL/min), y por último, una etapa de calentamiento isotérmico a 1000 °C durante 30 min.

## **2.4. Análisis microbiológicos**

### **2.4.1. CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO**

*Salmonella enterica* (CECT 915), *Escherichia coli* K12 (CECT 433), *Staphylococcus aureus* (CECT 240), *Listeria monocytogenes*. (CECT 936) y *Zygosaccharomyces bailii*. (CECT 12001) fueron las cepas microbianas usadas en este trabajo. Los diferentes microorganismos empleados fueron obtenidos de la colección española de cultivos tipo (CECT, Valencia, España). Las cepas fueron reconstituidas según las instrucciones del proveedor. La activación de los microorganismos se realizó mediante la siembra en placa en masa e incubación para obtener cultivos en fase exponencial. Los cultivos fueron conservados en congelación a -80 °C en crioviales con medio nutritivo y glicerol al 20%.

Para el cultivo de las cepas se usaron medios de cultivo generales como el agar Plate Count (PCA) y agar Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPDA) para las bacterias y levaduras, respectivamente. Así mismo, para la preparación de los inóculos se usó caldo de tripticasa soja (TSB) para el crecimiento de las bacterias y caldo Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPDB) para el crecimiento de la levadura. Todos los medios de microbiología fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España).

La preparación de los inóculos se realizó mediante la suspensión directa de una colonia aislada tomada de una placa de un cultivo puro. La colonia se transfirió a un tubo con 10 mL de caldo de cultivo, el cual se incubó a 37 °C durante 24 h, en el caso de las bacterias, o a 25 °C durante 48 h para la preparación del inóculo de la levadura.

### **2.4.2. ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA**

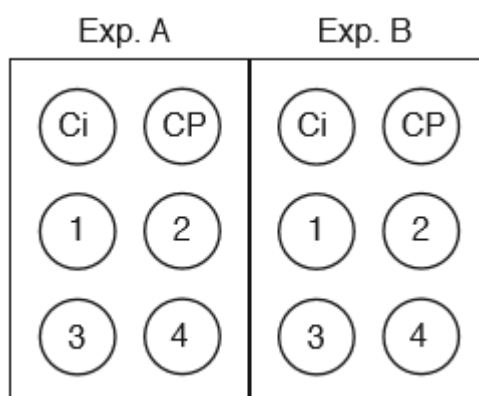
La evaluación de la influencia de las partículas de sílice funcionalizadas sobre la viabilidad de los microorganismos se llevó a cabo mediante el método de microdilución UNE-EN ISO20776-1: sistemas de ensayo de laboratorios clínicos y de diagnóstico in vitro: ensayos de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de susceptibilidad antimicrobiana. Método de referencia para ensayo de la actividad in vitro de agentes antimicrobianos frente a bacterias aeróbicas de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas: (ISO 20776-1:2006, Parte 1. con ligeras modificaciones. Los ensayos in vitro se realizaron con un amplio rango de concentraciones de los compuestos bioactivos. Teniendo en cuenta la cantidad de compuesto bioactivo inmovilizado sobre la superficie de las partículas de sílice (en función de los resultados de TGA y análisis elemental) se calculó la concentración de partícula equivalente y la cantidad de partícula necesaria, tal y como aparecen establecidas en la Tabla 1.



**TABLA 1.** Concentraciones de compuesto bioactivo usadas en el estudio, concentración de partícula equivalente y cantidad de partículas correspondiente para 5 mL de caldo de cultivo.

<i>Concentración de EOC (mg/mL)</i>	<i>Concentración de partícula (mg/mL)</i>	<i>Cantidad de partícula (mg)</i>
0,0375	0,75	3,75
0,0625	1,25	6,25
0,125	2,5	12,5
0,25	5	25

Para llevar a cabo los ensayos se usaron placas multipocillos de 12 pocillos estériles con el fin de reducir el volumen de caldo de cultivo (capacidad de 6 mL), y por tanto, la cantidad de partículas necesaria. Para ello, se adicionaron 5 mL de caldo de cultivo (TSB/YPDB) en cada uno de los pocillos, y sobre éstos se adicionó de la cantidad de partícula establecida en función de la concentración de estudio (Tabla 1). A continuación, se inocularon los pocillos con 20  $\mu$ L para Gram-positivos y 2  $\mu$ L para Gram-negativos del inóculo del microorganismo correspondiente. Se incluyeron un control positivo (caldo de cultivo inoculado sin partículas) para establecer el crecimiento del microorganismo en ausencia de tratamiento, y un control de partículas desnudas (caldo de cultivo inoculado en presencia de partículas de sílice no funcionalizadas) para evaluar la influencia del soporte de sílice sobre el crecimiento del microorganismo. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. El Esquema 1 muestra la disposición de las distintas condiciones estudiadas en la placa multipocillos.



**ESQUEMA 1.** Disposición de las distintas condiciones del estudio.

Las placas fueron incubadas en agitación a 37 °C durante 24 h, en el caso de las bacterias, e incubadas a 25 °C durante 48 h, en el caso de la levadura. Tras la incubación, se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos con 9 mL de agua destilada estéril y se llevó a cabo la siembra en superficie de 0.1 mL de las diluciones en placas Petri de PCA o YPDA, según el microorganismo de estudio. Tras la incubación de las placas Petri se llevó a

cabo el recuento y los resultados se expresaron como UFC/mL. Los valores obtenidos fueron transformados logarítmicamente y expresados como log UFC/mL. Los resultados obtenidos del recuento de los controles positivos fueron utilizados para cuantificar el porcentaje de inhibición del microorganismo en las distintas condiciones de estudio.

## **2.5 Análisis estadístico**

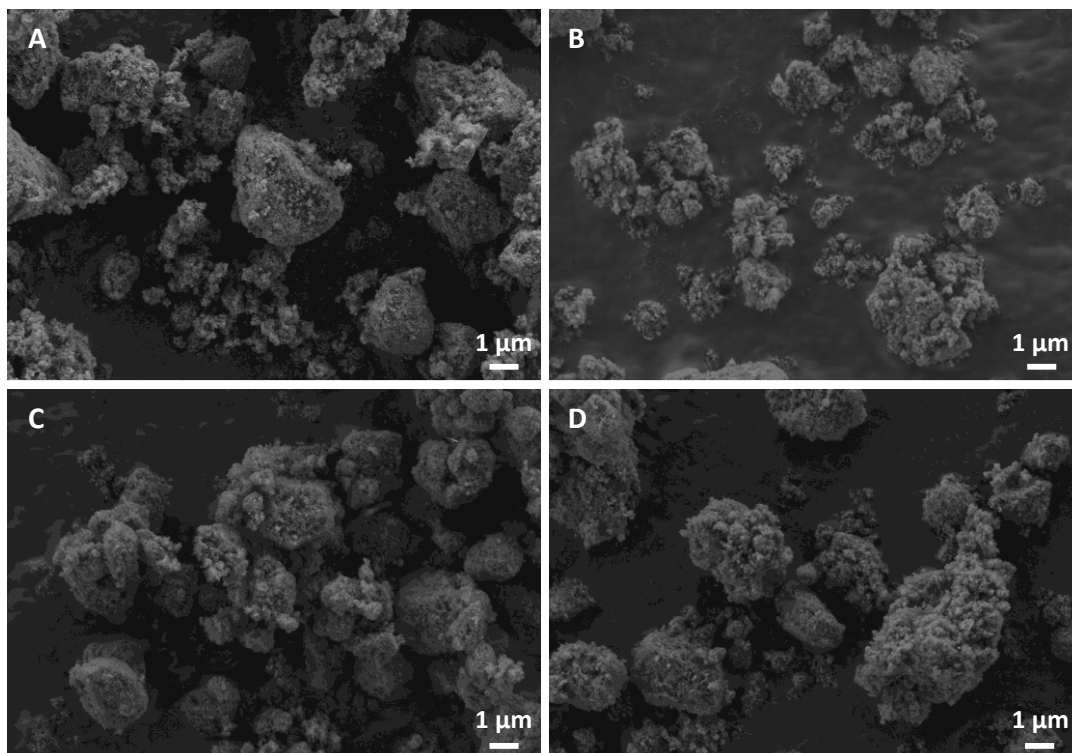
El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos fue procesado utilizando Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA). La influencia de los EOC sobre el recuento de los microorganismos se analizó usando el análisis de la varianza (ANOVA multifactorial) teniendo en cuenta como factores el tipo de compuesto bioactivo y la concentración ensayada. El procedimiento LSD (least significant difference) se usó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Caracterización de los materiales antimicrobianos**

En este estudio se usaron tres componentes bioactivos de aceites esenciales (carvacrol, eugenol y timol) seleccionados por su reconocida actividad antimicrobiana (García et al., 2008). A pesar de sus propiedades el uso de estos compuestos bioactivos en la industria alimentaria se ve limitado por su intenso sabor y aroma (Burt, 2004; Abouhosseini et al., 2015), y por tanto, ha surgido la necesidad de desarrollar sistemas de encapsulación y/o inmovilización para mantener la actividad antimicrobiana limitando la influencia de estos compuestos sobre las propiedades organolépticas de los alimentos. En este trabajo se han desarrollado materiales antimicrobianos basados en materiales híbridos orgánico-inorgánico. Para ello, se ha usado como soporte inorgánico micropartículas de sílice amorfa, las cuales son ampliamente usadas en cosmética, odontología, pinturas y como aditivo alimentario estabilizante (E-551) (Uboldi et al., 2012). Los compuestos bioactivos han sido inmovilizados covalentemente sobre la superficie de las partículas de sílice mediante la síntesis de derivados alcoxisilano obteniendo así las micropartículas antimicrobianas.

Tras la preparación de los materiales de sílice funcionalizados se procedió a su caracterización mediante diversas técnicas instrumentales. La Figura 1 muestra la morfología de tanto de las partículas de sílice desnudas como de las partículas funcionalizadas con carvacrol, eugenol y timol. En las imágenes obtenidas a través de FESEM se puede observar que las partículas de sílice amorfa desnudas tienen una estructura similar a una esfera con forma rugosa y un tamaño de partícula primario de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ . Así mismo, tras la inmovilización de los EOC, las partículas mostraron una apariencia similar, confirmando así que la funcionalización de la superficie de las partículas no afecta a su morfología.



**FIGURA 1.** Imágenes de FESEM de las partículas de óxido de silicio desnudas (A), funcionalizadas con carvacrol (B), eugenol (C) y timol (D).

Tras el estudio de la morfología de las partículas se determinó la carga superficial así como la distribución de tamaño de las partículas en agua destilada. La Tabla 2 muestra los valores de tamaño de partículas ( $d_{0,5}$ ) y potencial zeta ( $\zeta$ ) de las partículas desnudas y funcionalizadas. La distribución de tamaño de partícula del sólido no funcionalizado presentó un valor similar al tamaño primario del material según las imágenes de FESEM. Sin embargo, tras la funcionalización se observó un aumento de la distribución del tamaño de partícula debido a la agregación de las partículas. Con el fin de determinar la estabilidad de las partículas en suspensión se llevó a cabo la determinación del potencial zeta. Las partículas desnudas mostraron valores de potencial zeta negativos, debido a los grupos silanol de su superficie. Por el contrario, para las partículas funcionalizadas con los compuestos bioactivos se obtuvieron valores de potencial zeta positivos como consecuencia de la inmovilización del derivado alcoxisilano sobre la superficie de las partículas. La estabilidad de las partículas en suspensión es mayor cuando el potencial zeta se sitúa fuera del rango comprendido entre los valores  $-30$  y  $+30$  mV. En este rango las suspensiones tienden a agregarse, afectando a sus propiedades en suspensión. Por ello, se observa un incremento de la distribución de tamaño de partícula tras el proceso de funcionalización. Por último, se determinó la cantidad de compuestos bioactivos anclados al soporte de óxido de silicio mediante análisis termogravimétrico y análisis elemental de los diferentes sólidos. Tal y como se puede ver en la Tabla 2 el contenido de componente de aceite esencial inmovilizado sobre la superficie de las partículas fue similar para los diferentes de sólidos sintetizados. Los valores

obtenidos fueron empleados para determinar la cantidad necesaria de sólido en función de las concentraciones de compuesto bioactivo objeto de este estudio.

**TABLA 2.** Parámetros de caracterización de las partículas de sílice amorfa no funcionalizadas y funcionalizadas con carvacrol, eugenol y timol.

Sólido	Potencial zeta (mV)	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	$\alpha_{\text{comp bioactivo}}$ (g/g sólido)
Sílice amorfa desnuda	$-29,4 \pm 1,2$	$4,3 \pm 0,8$	-
Carvacrol-sílice amorfa	$30,0 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,9$	0,047
Eugenol-sílice amorfa	$11,7 \pm 0,7$	$5,9 \pm 1,2$	0,048
Timol-sílice amorfa	$25,0 \pm 1,9$	$6,7 \pm 1,0$	0,042

### 3.2 Estudio de actividad antimicrobiana de los componentes de aceites esenciales libres

Las propiedades antimicrobianas de los compuestos bioactivos inmovilizados fueron evaluadas frente a diversos microorganismos. Los microorganismos estudiados fueron seleccionados por su patogenicidad que puede producir problemas de salud por la contaminación microbiana de los alimentos, así como su papel en el deterioro de los alimentos. A continuación, se muestra el efecto de las partículas de sílice amorfa funcionalizadas con timol, carvacrol y eugenol frente a *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Z. bailii* mediante el recuento en placa, tal y como se describe en el apartado 2.4.

En la Tabla 3 se muestra el recuento de *E. coli* tras la incubación durante 24 h con las partículas funcionalizadas con los EOC. Tras el período de incubación se obtuvo un recuento para el control positivo de  $8,96 \pm 0,12$  log UFC/mL. En el caso de las muestras tratadas con el sólido funcionalizado con timol no se observaron diferencias significativas para el rango de concentración 0,0375-0,125 mg/mL, excepto para la concentración de 0,25 mg/mL donde se observó una reducción aproximada de un orden logarítmico. Respecto al carvacrol inmovilizado, se obtuvieron resultados similares al eugenol, con ausencia de efecto inhibitorio para las concentraciones más bajas y una reducción de 0,62 log UFC/mL para la concentración de 0,25 mg/mL. Por otra parte, el eugenol inmovilizado produjo una reducción significativa del microorganismo tras el tratamiento con 0,125 y 0,25 mg/mL. En concreto, la concentración de eugenol inmovilizado de 0,25 mg/mL produjo una reducción de 2,64 órdenes logarítmicos. Además, como se puede ver en la Tabla 4, el tratamiento de *E. coli* con las partículas funcionalizadas afectó de forma significativa ( $p < 0,001$ ) tanto al factor del compuesto bioactivo, al factor concentración, así como a la interacción entre ambos factores.

**TABLA 3.** Recuentos (log UFC/mL) de *E. coli* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los EOC inmovilizados sobre sílice amorfa (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

	Concentración de EOC (mg/mL)			
	0,0375	0,0625	0,125	0,25
<i>Timol</i>	8,93 ± 0,03	8,93 ± 0,004	8,95 ± 0,01	8,04 ± 0,056
<i>Carvacrol</i>	8,81 ± 0,04	8,83 ± 0,09	8,79 ± 0,08	8,34 ± 4,73
<i>Eugenol</i>	9,24 ± 0,026	9,19 ± 0,15	7,36 ± 0,02	6,32 ± 0,06

**TABLA 4.** Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial para la viabilidad de *E. coli* tras el tratamiento con partículas funcionalizadas con compuestos bioactivos.

Factor	F-ratio	$\alpha$
Compuesto	300,47	***
Concentración	669,74	***
Compuesto x Concentración	233,23	***

Niveles de significación ( $\alpha$ ): p<0,001 (\*\*\*)

Respecto a *S. enterica*, la Tabla 5 muestra los valores del recuento de dicha bacteria tras el tratamiento con los diferentes compuestos inmovilizados. Si se compara el recuento del control positivo (9.39 ± 0,09 log UFC/mL) con el recuento de la bacteria tras el tratamiento con los sólidos funcionalizados se puede ver que no se observa inhibición significativa para los sólidos, excepto para el timol inmovilizado a la concentración de 0,25 mg/mL donde se produjo una reducción de 0,6 órdenes logarítmicos. En cuanto a los niveles de significación como se puede ver en la Tabla 6 tanto los factores compuesto como concentración, de forma individual, como la interacción de ambos fueron significativos (p<0,001) frente al recuento microbiano.

**TABLA 5.** Recuentos (log UFC/mL) de *S. enterica* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los EOC inmovilizados sobre sílice amorfa. (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

	Concentración de EOC (mg/mL)			
	0,0375	0,0625	0,125	0,25
<i>Timol</i>	9,33 ± 0,04	9,31 ± 0,02	9,53 ± 0,04	8,82 ± 0,36
<i>Carvacrol</i>	9,31 ± 0,03	9,30 ± 0,14	9,48 ± 0,06	9,39 ± 0,06
<i>Eugenol</i>	9,37 ± 0,01	9,28 ± 0,03	9,39 ± 0,08	9,51 ± 0,24

**TABLA 6.** Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial para la viabilidad de *S. enterica* tras el tratamiento con partículas funcionalizadas con compuestos bioactivos.

<b>Factor</b>	<b>F-ratio</b>	<b><math>\alpha</math></b>
Compuesto	981,00	***
Concentración	1064,00	***
Compuesto x Concentración	1565,00	***

Niveles de significación ( $\alpha$ ):  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Como se puede ver en los resultados las bacterias Gram-negativas estudiadas en este trabajo mostraron gran resistencia frente a los diferentes compuestos inmovilizados, obteniéndose una baja reducción de dichos microorganismos tras el uso de la concentración más alta ensayada.

En cuanto a la bacteria Gram-positiva *L. monocytogenes* se observan en la Tabla 7 los recuentos obtenidos con el tratamiento con las tres partículas funcionalizadas. Respecto al sólido funcionalizado con timol se observó como a partir de la concentración de 0,0625 mg/mL se produjo una inhibición del 100% del microorganismo, siendo el recuento del control positivo de  $8,32 \pm 0,23$  log UFC/mL. En el caso del carvacrol inmovilizado se observó una gran reducción de 7,4 órdenes logarítmicos para la concentración de 0,25 mg/mL, mientras que las concentraciones más bajas no resultaron efectivas. Por su parte, el sólido funcionalizado con eugenol no inhibió el microorganismo a las concentraciones bajas y tan solo produjo una reducción de 1,3 órdenes logarítmicos para la concentración de 0,25 mg/mL. De la misma forma que en los casos anteriores tanto los factores como la interacción de éstos afectó de forma significativa ( $p < 0,001$ ) el recuento de este microorganismo (Tabla 8).

**TABLA 7.** Recuentos (log UFC/mL) de *L. monocytogenes* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los EOC inmovilizados sobre sílice amorfa. (Valores promedio y desviación estándar,  $n=3$ ).

	<b>Concentración de EOC (mg/mL)</b>			
	<b>0,0375</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>
<i>Timol</i>	$3,25 \pm 0,32$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
<i>Carvacrol</i>	$8,20 \pm 0,13$	$8,24 \pm 0,03$	$8,40 \pm 0,15$	$0,95 \pm 1,35$
<i>Eugenol</i>	$8,30 \pm 0,41$	$8,30 \pm 0,13$	$8,47 \pm 0,23$	$6,98 \pm 0,01$

**TABLA 8.** Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial para la viabilidad de *L. monocytogenes* tras el tratamiento con partículas funcionalizadas con compuestos bioactivos.

<b>Factor</b>	<b>F-ratio</b>	<b><math>\alpha</math></b>
Compuesto	13661,03	***
Concentración	2073,62	***
Compuesto x Concentración	938,22	***

Niveles de significación ( $\alpha$ ):  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos en un estudio previo. Ruiz-Rico et al. (2017) realizaron un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de EOC, en forma libre e inmovilizados sobre distintas partículas de sílice, frente a *L. innocua* y *E. coli*. En dicho estudio la sílice amorfa funcionalizada, tanto con timol como con carvacrol, consiguió inhibir *L. innocua* en un rango de concentración similar a los resultados obtenidos en este trabajo, observándose además una mejora del efecto inhibitorio para timol, en comparación con el compuesto libre.

Respecto a la otra bacteria Gram-positiva estudiada, la Tabla 9 muestra los recuentos obtenidos de *S. aureus* tras la incubación de la bacteria con las partículas funcionalizadas. En este caso se observa que el sólido funcionalizado con eugenol no produjo inhibición para ninguna de las concentraciones, en comparación con el valor del recuento del control positivo ( $9,02 \pm 0,08$  log UFC/mL). Para el carvacrol inmovilizado se produjo una reducción de la carga microbiana de 5 órdenes logarítmicos, para la concentración de 0,25 mg/mL. Por otro lado, las partículas funcionalizadas con timol presentaron un efecto inhibitorio mayor que los otros sólidos, ya que se observó una reducción entre 5,5 y 6 órdenes logarítmicos para todo el rango de concentraciones. Esta influencia significativa ( $p < 0,001$ ) de los factores sobre la variable dependiente se confirmó mediante el análisis estadístico, tal y como se muestra en la Tabla 10.

**TABLA 9.** Recuentos (log UFC/mL) de *S. aureus* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los EOC inmovilizados sobre sílice amorfa. (Valores promedio y desviación estándar,  $n=3$ ).

	<b>Concentración de EOC (mg/mL)</b>			
	<b>0,0375</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>
<i>Timol</i>	$3,47 \pm 0,01$	$2,83 \pm 0,11$	$2,61 \pm 0,62$	$2,41 \pm 0,29$
<i>Carvacrol</i>	$9,22 \pm 0,08$	$9,19 \pm 0,09$	$9,17 \pm 0,08$	$3,33 \pm 0,17$
<i>Eugenol</i>	$8,96 \pm 0,08$	$8,88 \pm 0,07$	$8,98 \pm 0,09$	$8,95 \pm 0,08$

**TABLA 10.** Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial para la viabilidad de *S. aureus* tras el tratamiento con partículas funcionalizadas con compuestos bioactivos.

<b>Factor</b>	<b>F-ratio</b>	<b><math>\alpha</math></b>
Compuesto	1976,64	***
Concentración	163,42	***
Compuesto x Concentración	126,29	***

Niveles de significación ( $\alpha$ ):  $p < 0,001$  (\*\*\*)

La actividad antimicrobiana de los EOC se atribuye a su interacción con las membranas celulares, que causan la salida de iones y de su contenido citoplasmático y puede llegar a causar la muerte celular (Burt, 2004; Sustres et al., 2015). En general, se puede observar que el tratamiento con los EOC inmovilizados ha sido más efectivo frente a las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores, en los que se ha establecido que las bacterias Gram-positivas tienen una mayor sensibilidad que las Gram-negativas frente a compuestos bioactivos de aceites esenciales (Ait-Ouazzou et al., 2012; Klančnik et al., 2009). Esta diferente sensibilidad se debe principalmente a las diferencias en la estructura y permeabilidad de la membrana entre ambos tipos de bacterias, principalmente debido a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (Guarda et al., 2011).

Por último, se llevó a cabo el estudio de la influencia de las partículas funcionalizadas con los compuestos bioactivos frente a una levadura típica del deterioro de ciertos alimentos. La Tabla 11 muestra los recuentos de *Z. bailii* tras el tratamiento con los EOC inmovilizados.

**TABLA 11.** Recuentos (log UFC/mL) de *Z. bailii* tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los EOC inmovilizados sobre sílice amorfa. (Valores promedio y desviación estándar,  $n=3$ ).

	<b>Concentración de EOC (mg/mL)</b>			
	<b>0,0375</b>	<b>0,0625</b>	<b>0,125</b>	<b>0,25</b>
<i>Timol</i>	7,71 $\pm$ 0,1	7,69 $\pm$ 0,12	7,73 $\pm$ 0,1	5,28 $\pm$ 0,01
<i>Carvacrol</i>	7,65 $\pm$ 0,09	7,79 $\pm$ 0,11	7,58 $\pm$ 0,16	5,68 $\pm$ 0,17
<i>Eugenol</i>	6,1 $\pm$ 0,11	4,45 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Tras 48 h de incubación, se obtuvo un recuento para el control positivo de 7,65  $\pm$  0,11 log UFC/mL. Tanto el tratamiento con el sólido funcionalizado con timol como el sólido funcionalizado con carvacrol, no produjo la inhibición del microorganismo, excepto para la concentración más alta (0,25 mg/mL) donde se observó una reducción de 2,4 y 2 órdenes logarítmicos para timol y carvacrol, respectivamente. En cuanto al eugenol inmovilizado, todas las concentraciones ensayadas fueron efectivas, alcanzándose la inhibición total del microorganismo con la concentración de 0,125 mg/mL. De la misma forma



que en los casos anteriores el análisis estadístico permitió determinar la influencia significativa ( $p < 0,001$ ) de todos los factores sobre el recuento de la levadura (Tabla 12).

**TABLA 12.** Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactorial para la viabilidad de *Z. baillii* tras el tratamiento con partículas funcionalizadas con compuestos bioactivos.

<b>Factor</b>	<b>F-ratio</b>	<b><math>\alpha</math></b>
Compuesto	13637,26	***
Concentración	3883,93	***
Compuesto x Concentración	1140,28	***

Niveles de significación ( $\alpha$ ):  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con el estudio realizado por Ribes et al. (2017), el efecto inhibitorio del timol inmovilizado fue mayor. Estos autores evaluaron la actividad antimicrobiana de partículas de sílice mesoporosa funcionalizadas con eugenol y timol frente al desarrollo de diversos mohos y levaduras. Para *Z. baillii*, se obtuvo una inhibición total de la levadura con una concentración de 0,4 mg/mL de eugenol y timol inmovilizados, mientras que en este trabajo el eugenol inmovilizado inhibió el 100% del microorganismo con una concentración de 0,125 mg/mL. Esta diferencia podría ser debida al tipo de soporte usado así como el tipo de ensayo empleado para establecer la susceptibilidad microbiana.

#### 4. CONCLUSIONES

Se ha conseguido la correcta inmovilización covalente de los componentes de aceites esenciales empleados (timol, carvacrol y eugenol). Los resultados obtenidos al estudiar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a diversos patógenos presentes en alimentos como *E. coli*, *S. entérica*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, y frente a otros microorganismos que pueden disminuir la vida útil de los alimentos han sido variables, destacando los valores más altos de inhibición obtenidos para las bacterias Gram positivas en el caso del carvacrol y timol, mientras que en el caso del eugenol los mejores resultados se obtuvieron con la levadura *Z. baillii*, produciéndose un 100% de inhibición a concentraciones intermedias. Si se quisiera inhibir un microorganismo en concreto, habría que estudiar el tipo de aceite esencial a utilizar y cuál sería su soporte más efectivo. Por lo demás, los resultados obtenidos aun siendo prometedores sería conveniente realizarlos en una matriz alimentaria para ver su comportamiento, así como estudiar la estabilidad de las partículas y su reutilización.

## REFERENCIAS

Abouhosseini, M.; Reza, M.; Barimani, A.; Araghi, A. 2015. Carvacrol as a potent natural acaricide against *Dermapyssus gallinae*. *Parasitology Research*, 114(10):3801-3806.

Ahamad, N.; Marth, E.H 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 °C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic-acid. *Journal of food protection*, 52 (1989): 688-695.

Ait-Ouazzou, A.; Espina, L.; Gelaw, T. K.; Lamo-Castellví, S.; Pagán, R.; García, G. 2013. New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (1): 173-185.

BAKKALI, F., & al, e. 2008. Biological effects of essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Baser K.H.C.; Kürkçüoğlu M.; Tarımcılar G.; Kaynak G. 1999. Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 11(5), 579-588.

Bernardos, A.; Marina, T.; Zacek, P.; Pérez-Esteve, É.; Martínez-Mañez, R.; Lhotka, M.; et al. 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.

Brock, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos*. Englewood Cliffs: Prentice Hall International, pp: 909.

BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

Caprioli, A.; Morabito, E.; Brugère, H.; Oswald, E.; 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research*, 36:289-311.

D'Aoust, J.; Maurer, J. 2007. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 187-236.

Farber, J.M.; Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiologic review*, 55:476-511.

García, R. M.; Palou, E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Ingeniería de alimentos* 2 (2): 41-51.

Guarda, A.; Rubilar, J. F.; Miltz, J.; Galotto, M. J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 3(12): 1-24.

Granados P. y Villaverde P. 2002, *Microbiología*, (2):365.

Klancnik, A.; Guzej, B.; Kolar, M. H.; Abramovic, H. Y. Mozina S S. 2009. In vitro, Antimicrobial and Antioxidant Activity of commercial Rosemary Extract Formulations. *Journal of food protection*, 72(8): 1744-1752.

Le Loir, Y. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular research*, 2 (1): 63-76.

Li, L. L. y Wang, H. 2013. Enzyme-coated mesoporous silica nanoparticles as efficient antibacterial agents in vivo. *Advanced Healthcare Materials*, 2(10): 1351-1360.

Little, C. L.; Taylor, F. C.; Sagoo, S. K.; Gillespie, I. A.; Grant, K.; McLauchlin, J. 2007. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiology*, 24 (7-8): 711-717.

Majeed, H.; Bian, Y. Y.; Ali, B.; Jamil, A.; Majeed, U.; Khan, Q. F., et al. 2015. Essential oil encapsulations: Uses, procedures, and trends. *RSC Advances*, 5(72): 58449-58463.

Morotto, T.; Heir, E.; Nesse, L. L.; Vestby, L.K.; Langsrud, S. 2012, Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International* 45(2): 532-544.

Nostro, A. y Papalia, Y. 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future perspectives. *Recent Patents on anti-infective drug discovery*, 7(1):28-35.

Pędziwiatr-Werbicka, E.; Molowska, K; Podlas, M. ; Marcinkowska, M.; Ferenc, M.; Brahmi, Y. et al. 2014. Oleochemical-tethered SBA-15-type silicates with tunable

nanoscopic order, carboxylic surface, and hydrophobic framework: cellular toxicity, hemolysis, and antibacterial activity. *Chemistry-A European Journal*, 20(31): 9596-9606.

Ribes, S.; Fuentes, A.; Talens, P.; Barat, J. M. 2016. Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams. *Food Chemistry*, 211:92-99.

Ruiz-Rico, M.; Fuentes, C.; Pérez-Esteve, É.; Jiménez-Belenguer, A. I.; Quiles, A.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J. M. 2015. Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control*, 56:77-85.

Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Lerma-García, M.J.; Marcos, M. D.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J. M. 2017. Protection of folic acid through encapsulation in mesoporous silica particles included in fruit juices. *Food Chemistry*, 218: 471-478.

Smith, J.P.; Daifas, D. P.; El-Khoury, W.; Koukoutsis, J. 2004. Shelf life and safety concerns of Bakery products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 19e55.

Smith, R. I.; Cohen, S. M.; Doull, J.; Feron, V. J.; Goodman, J.I.; Marnett, L.J. et al. 2005. A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: Essential oils. *Food and chemical toxicology*, 43 (3):343-363.

Turek, C. y Stinzing, F. C. 2013. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1): 40-53.

Ochoa, J. T.; Mercado, E.H; Durand, D; Rivera,F.P.; Mosquito, S.; Contreras, C.; Riveros, M.; Lluque, A.; Barletta, F.; Prada, A.; Ruiz,J. 2011. Frecuencia y patotipos de escherichia coli diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Scientific electronic library online*, 28(1):13-20.

Ospina, S. M.; Cartagena, J. R. 2008. La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Revista Lasallista de investigación* 5(2).

Uboldi, C.; Giudetti, G.; Broggi, F.; Gilliland, D.; Ponti, J.; Rossi, F. 2012. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1):11-20.

Weiss, J.; Gaysinsky, S.; Davidson, M.; MacClements, D. J. 2009. Nanostructured encapsulation systems: Food antimicrobials. *Global issues in Food Science and Technology*, 1:425-479.