



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ESTERILIZACIÓN DE AGUA MEDIANTE FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS DE SÍLICE AMORFA FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS ACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES

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

ALUMNO/A: NIEVES ALLUÉ LOSADA

TUTOR ACADEMICO: José Manuel Barat Baviera

COTUTORA: Isabel Fernández Segovia

DIRECTORAS EXPERIMENTALES: María Ruiz Rico

Nataly Peña Gómez

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, septiembre 2017

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ESTERILIZACIÓN DE AGUA MEDIANTE FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS DE SÍLICE AMORFA FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS ACTIVOS DE ACEITES ESENCIALES

Nieves Allué, Nataly Peña-Gómez, María Ruiz-Rico, Isabel Fernández-Segovia, José M. Barat¹

Resumen: El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un sistema de filtración en lecho profundo a partir de partículas de sílice amorfa de distinto tamaño (5, 10, 25 y 50 μm) funcionalizadas con distintos compuestos bioactivos de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, timol y vainillina). La correcta inmovilización de los compuestos antimicrobianos sobre la superficie de las partículas de sílice se confirmó mediante la caracterización de las partículas por microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM), potencial zeta y determinación del grado de funcionalización. Una vez caracterizados los materiales se procedió a estudiar la actividad antimicrobiana del sistema de filtración basado en el paso del agua a través de una capa de las partículas funcionalizadas. Para ello, se realizaron ensayos de filtración con agua contaminada con *Escherichia coli* K12 en una densidad de inóculo de 10^5 UFC/100 mL. Así mismo, se evaluó el efecto inhibitorio de los soportes tras el filtrado sucesivo de varias muestras y tras el lavado previo con gran volumen de agua estéril. Los resultados mostraron una clara reducción de la carga microbiana del agua, logrando en algunos casos la inhibición total del microorganismo. Además, se comprobó que las partículas mantienen su eficacia tras filtrados sucesivos de diferentes muestras de agua contaminada. Así mismo, el lavado previo del lecho de partículas con agua estéril no afectó a la actividad antimicrobiana, lo que sugiere la conservación de los compuestos bioactivos fijados sobre la superficie de las partículas de sílice. Por tanto, la inmovilización de estos compuestos permite obtener partículas con propiedades antimicrobianas que pueden ser usadas como alternativa a los tratamientos convencionales de potabilización de aguas.

Palabras clave: partículas funcionalizadas, compuestos antimicrobianos, *Escherichia coli*, inmovilización.

Resum: L'objectiu d'este treball va ser el desenvolupament d'un sistema de filtració en llit profund a partir de partícules de sílice amorfa de distinta grandària (5, 10, 25 i 50 μm) funcionalitzades amb distints compostos bioactius d'olis essencials (carvacrol, eugenol, timol i vanil·lina). La correcta immobilització dels compostos antimicrobians sobre la superfície de les partícules de sílice es va confirmar per mitjà de la caracterització de les

¹ Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain, maallo7@etsiamn.upv.es

partícules per microscòpia electrònica d'emissió de camp (FESEM) potencial zeta i determinació del grau de funcionalització. Una vegada caracteritzats els materials, es va procedir a estudiar l'activitat antimicrobiana del sistema de filtració basat en el pas de l'aigua a través d'una capa de les partícules funcionalitzades. Per a això, es van realitzar assajos de filtració amb aigua contaminada amb *Escherichia coli* K12 en una densitat d'inòcul de 10^5 UFC/100 mL. Així mateix, es va avaluar l'efecte inhibitori dels suports després del filtrat successiu de diverses mostres i després del llavat previ amb gran volum d'aigua estèril. Els resultats van mostrar una clara reducció de la càrrega microbiana de l'aigua, aconseguint en alguns casos la inhibició total del microorganisme. A més, es va comprovar que les partícules van mantenir la seua eficàcia després de filtrats successius de diferents mostres d'aigua contaminada. Així mateix, el llavat previ del llit de partícules amb aigua estèril no va afectar a l'activitat antimicrobiana, la qual cosa suggereix la conservació dels compostos bioactius fixats sobre la superfície de les partícules de sílice. Per tant, la immobilització d'estos compostos permet obtenir partícules amb propietats antimicrobianes que poden ser usades com a alternativa als tractaments convencionals d'esterilització d'aigües.

Paraules clau: partícules funcionalitzades, compostos bioactius, *Escherichia coli*, immobilització.

Summary: The objective of this work was the development of a deep bed filtration system using amorphous silica particles of different sizes (5, 10, 25 and 50 μm) functionalized with different bioactive compounds of essential oils (carvacrol, eugenol, thymol and vanillin). The correct immobilization of the antimicrobial compounds on the surface of the silica particles was confirmed by the characterization of the particles by field emission electron microscopy (FESEM), zeta potential and determination of degree of functionalization. Once the materials were characterized, the antimicrobial activity of the filtration system based on the pass of water through the functionalized particles was studied. For this purpose, filtration tests were carried out with water contaminated with *Escherichia coli* K12 at an inoculum density of 10^5 CFU/100 mL. Likewise, the inhibitory effect of the supports was evaluated after the successive filtration of several samples and after the previous washing with high volume of sterile water. Results showed a clear reduction of the microbial load of the water, achieving in some cases the total inhibition of the microorganism. Moreover, it was verified that particles maintained their efficacy after successive filtration of different water samples. In addition, the previous washing of the bed of particles with sterile water did not affect the antimicrobial activity, which suggests the preservation of the bioactive compounds attached onto the surface of silica particles. Thus, the immobilization of these compounds allows to obtain particles with antimicrobial properties that can be used as an alternative to the conventional treatments of water sterilization.

Keywords: Functionalized particles, bioactive compounds, *Escherichia coli*, immobilization.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es imprescindible en la vida y necesaria para gozar de buena salud. Disponer de ella es un derecho fundamental de todo ser humano. Tal y como establecen las Naciones Unidas todas las personas deben tener agua suficiente, asequible, accesible, segura y aceptable para usos personales y domésticos (Comité de Derechos Económicos, Culturales y Sociales, de las Naciones Unidas, 2002). Aunque en países que cuentan con una buena infraestructura en sanidad y tratamiento de aguas son muy esporádicos los casos de brotes infecciosos por consumo de agua; en los países en vías de desarrollo, las tasas de morbilidad y mortandad por aguas contaminadas con microorganismos patógenos son aún muy altas y causan millones de víctimas cada año (Del Barrio, 2015).

Los principales contaminantes del agua se clasifican en contaminantes físicos, químicos y biológicos. Los sedimentos, las sustancias radioactivas y el calor son los principales contaminantes de tipo físico. Entre los contaminantes químicos destacan los residuos de pesticidas y fertilizantes. Por último, se consideran contaminantes biológicos los restos vegetales, parásitos y microorganismos (Pulido et al., 2005).

Las medidas dirigidas a eliminar el riesgo de transmisión de enfermedades a través del agua han sido aplicadas tras el descubrimiento de los agentes patógenos y sus posibles vías de transmisión (Córdoba et al., 2010). Los agentes patógenos implicados en la transmisión hídrica de enfermedades son los protozoos, helmintos, bacterias y virus. Los microorganismos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea (Pulido et al., 2005).

El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana en agua, ya que éstos son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal, tanto del hombre como de los animales de sangre caliente. Cabe destacar, dentro de coliformes fecales, a *Escherichia coli*, principal responsable bacteriana de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). La EDA es una de las principales responsables de la mortalidad en países en vía de desarrollo de África y del Sudeste Asiático (Hernández, 2000), además de ser una de las causas más importantes de morbilidad, tanto en estos países como en los países industrializados (Huilan et al., 1991). Por ello el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, establece como valor paramétrico de *E. coli* 0 UFC en 100 mL de agua (RD 140/2003).

La desinfección con cloro ha sido reconocida como uno de los mayores logros en el campo de la salud pública del siglo XX (CDC, 1999). Sin embargo, la presencia de subproductos derivados con una posible conexión carcinogénica ha sido la causa de las modificaciones de las normas de calidad del agua potable, concretamente, en lo que respecta a la concentración máxima aceptable de trihalometanos (THMs) (Camenforte, 2014). La utilización de desinfectantes alternativos al cloro, como la cloramina, el bióxido de cloro u ozono, también genera subproductos de

desinfección nocivos (Rodríguez et al., 2007). El uso de cloramina está asociado, no solo a la formación de THMs y de ácidos haloacéticos, sino también a la formación de nitritos, nitratos, haloacetonas y *N*-Nitrosodimetilamina. Así mismo, el dióxido de cloro genera cloritos y cloratos; mientras que la utilización de ozono genera bromatos, aldehídos, carbono orgánico biodegradable, ácidos cetoaldehídicos, bromoformos, peróxidos y epóxidos (Vinette, 2001). Por lo tanto, es necesario buscar métodos alternativos a los métodos convencionales de desinfección que mejoren la fiabilidad de la desinfección, evitando la formación de subproductos de desinfección nocivos.

Entre los nuevos sistemas de tratamiento de aguas se están desarrollando sistemas *in situ* basados en el uso de superficies funcionalizadas con compuestos bioactivos inorgánicos u orgánicos (Li et al., 2008). Este tipo de superficies con compuestos activos pueden usarse para desarrollar membranas filtrantes que permiten la retención de las células bacterianas patógenas, obteniendo así agua libre tanto de microorganismos como de subproductos de desinfección nocivos (Kroll et al., 2012).

La inmovilización de compuestos bioactivos naturales con reconocida actividad antimicrobiana, como los componentes de aceites esenciales (EOCs) puede ser una metodología innovadora para el desarrollo de sistemas de filtración de agua. La actividad antimicrobiana de los componentes de aceites esenciales, como el carvacrol y timol del orégano, el eugenol presente en la canela o la vainillina procedente de la vainilla, ha sido ampliamente estudiada (Gómez et al., 2009). La acción antimicrobiana se atribuye al deterioro de la membrana celular de los microorganismos, afectando a su permeabilidad, favoreciendo el flujo de protones, y alterando los sistemas enzimáticos y la producción de energía (Denyer y Hugo, 1991; Helander et al., 1998; Ultee et al., 1999; Tassou et al., 2000).

La inmovilización de los componentes de aceites esenciales en la superficie de partículas de sílice ha sido recientemente desarrollada por el grupo de investigación que ha desarrollado este trabajo, obteniéndose partículas funcionalizadas con gran actividad bactericida y fungicida, que pueden ser incorporadas en diferentes tipos de alimentos como sistema de conservación de los mismos (Ribes et al., 2017; Ruiz-Rico et al., 2017). Como un nuevo avance en esa línea de investigación, en este trabajo se propone la aplicación de micropartículas de sílice amorfa funcionalizadas con componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, timol y vainillina), para el desarrollo de un sistema de filtración de agua basado en el paso de agua contaminada con *Escherichia coli* por una capa de las partículas de sílice funcionalizadas, con el fin de obtener agua libre de microorganismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 1 se muestra el esquema de la metodología seguida en el estudio. En primer lugar, se realizó la funcionalización de las partículas de sílice mediante la inmovilización de componentes de aceites esenciales

(carvacrol, eugenol, timol y vainillina) sobre la superficie de micropartículas de óxido de silicio amorfo de diferente tamaño. Tras esto, se llevó a cabo la caracterización de los materiales sintetizados a través de diversas técnicas estándar, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana de los materiales mediante ensayos de filtración de agua contaminada. El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó mediante tres tipos de ensayos con el fin de establecer la capacidad inhibitoria del sistema de filtración, determinar la capacidad de reutilización de las partículas en filtrados sucesivos, así como estudiar la influencia que tiene el lavado previo sobre la actividad antimicrobiana.



FIGURA 1. Esquema de la metodología de trabajo aplicada.

2.1. Materiales y reactivos

Los compuestos 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), trimetilamina, paraformaldehído, dietil éter, cloroformo, n-butanona, carvacrol, eugenol y timol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). El acetonitrilo, ácido clorhídrico, sulfato de magnesio, hidróxido de potasio, ácido sulfúrico y los medios para los ensayos microbiológicos fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España). La vainillina fue adquirida en Ventós (Barcelona, España). Las micropartículas de óxido de silicio de distinto tamaño de partícula fueron proporcionadas por Silysiamont (Milán, Italia) y Sigma-Aldrich (Madrid, España).

2.2. Preparación de los sólidos de sílice funcionalizados

La funcionalización de las partículas de sílice se llevó a cabo mediante una síntesis en tres etapas. En la primera de ellas, los compuestos bioactivos (carvacrol, eugenol y timol) fueron transformados en sus derivados aldehídos. En segundo lugar, se formaron los correspondientes derivados alcoxisilano, mediante la reacción de los aldehídos de carvacrol, eugenol y timol, así como la vainillina pura, con 3-aminopropiltriétoxissilano. Por último, se llevó a cabo la inmovilización de los derivados alcoxisilano

sobre la superficie de partículas de sílice amorfa de diferentes tamaños de partícula (5, 10, 25 y 50 μm).

2.2.1. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS ALDEHÍDO DE EUGENOL, CARVACROL Y TIMOL

La síntesis del aldehído de carvacrol, eugenol y timol se realizó con el objetivo de mantener libre el grupo hidroxilo del anillo aromático, que es responsable de la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012), mediante la adición de un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con el grupo amino del alcoxisilano. La presencia de un grupo aldehído propio en la estructura de la vainillina evitó esta etapa de síntesis para este compuesto bioactivo.

Síntesis del derivado aldehído de timol y carvacrol. Estos compuestos fueron sintetizados mediante la formilación directa con paraformaldehído. Para la síntesis, 40 mmol de carvacrol o timol, 150 mL de acetonitrilo, 150 mmol de trietilamina y 40 mmol de MgSO_4 anhidro fueron introducidos en un balón de fondo redondo. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 15 min bajo atmósfera inerte. Posteriormente, se adicionaron 270 mmol de paraformaldehído y la reacción permaneció en reflujo durante 3,5 h a 83 °C. Seguidamente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó con HCl al 5%, seguido de agitación durante 30 min en atmósfera inerte. La extracción del derivado sintetizado se llevó a cabo con dietil éter y concentración mediante rotaevaporación.

Síntesis del derivado aldehído de eugenol. Para la síntesis de este compuesto se utilizó una reacción general de Reimer-Tiemann, tal y como fue descrito por Chen et al. (2009). Para ello, se disolvieron 22 mmol de eugenol en 150 mL de agua destilada a 80 °C en un balón de fondo redondo. Tras enfriar la mezcla a 60 °C, se adicionaron 400 mmol de KOH y 88 mmol de cloroformo (a razón de 1 mL/h durante 7 h, por razones de seguridad, ya que la reacción es altamente exotérmica). La mezcla obtenida se dejó en reposo a 60 °C durante 8 h y posteriormente se acidificó con H_2SO_4 al 10%. Finalmente, la extracción de la fase orgánica se llevó a cabo con n-butanona.

2.2.2. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS ALCOXISILANOS

Los correspondientes derivados alcoxisilanos de los cuatro componentes de aceites esenciales fueron sintetizados con la finalidad de inmovilizar covalentemente los compuestos bioactivos a los soportes de sílice. Para ello, los aldehídos de carvacrol, timol, eugenol y la vainillina no modificada reaccionaron con APTES en presencia de diclorometano. La mezcla se mantuvo en reflujo con agitación durante 1 h. A continuación, el exceso de disolvente fue evaporado bajo presión reducida obteniendo un líquido transparente.

2.2.3. INMOVILIZACIÓN DE LOS DERIVADOS ALCOXISILANOS SOBRE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICE

El anclado de los derivados alcoxisilanos a las micropartículas de sílice amorfa se llevó a cabo mediante la suspensión de 10 g de partículas de sílice en acetonitrilo, en atmósfera inerte, y adición de un exceso del derivado alcoxisilano. La mezcla resultante se mantuvo en agitación durante 5,5 h a temperatura ambiente. Finalmente, los sólidos resultantes se lavaron con acetonitrilo y agua destilada mediante centrifugación, y se secaron durante 12 h a vacío.

2.3. Caracterización de los materiales

Los materiales de sílice de partida y los materiales funcionalizados con los compuestos bioactivos fueron caracterizados mediante técnicas instrumentales estándar: microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), potencial zeta, análisis termogravimétrico (TGA) y análisis elemental. Las imágenes de FESEM se tomaron con un microscopio Zeiss Ultra 55 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) en el modo de electrón secundario. Para la determinación del potencial zeta se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Los sólidos se dispersaron en agua destilada, en una concentración de 1 mg/mL, y se les aplicó ultrasonidos (2 min) para evitar la agregación de las partículas. El potencial zeta se calculó a partir de los valores de movilidad de partícula mediante la aplicación del modelo de Smoluchowski. La obtención del valor de potencial zeta se estimó a partir de 3 repeticiones.

2.4. Ensayos de filtración de agua

En primer lugar, se realizó un estudio previo para establecer la velocidad de paso de 100 mL de agua a través del lecho de partículas con los sólidos no funcionalizados de los distintos tamaños de partícula. Para ello, se evaluaron tres capas de partículas con un espesor de 0,5, 1 y 1,5 cm y se estableció la cantidad de sólido correspondiente a cada una de las capas, así como el tiempo de filtrado del agua para los diferentes sólidos de sílice.

El estudio de la actividad antimicrobiana de las partículas funcionalizadas mediante filtración se llevó a cabo con agua inoculada con *Escherichia coli* K12 (CECT 433), ya que es un indicador de contaminación fecal en agua potable. Esta cepa bacteriana fue obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España). Para el crecimiento de la bacteria se usó agar Plate Count (PCA) y caldo de tripticasa soja (TSB). Así mismo, se usó agua de peptona y agua destilada estéril para preparar las diluciones y las muestras de agua que debían ser filtradas. Además, se usó el medio selectivo Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) para la siembra en placa de las muestras de agua tras el tratamiento.

Para la preparación del inóculo se tomó una colonia de *E. coli* K12 en PCA con un asa de siembra y se introdujo en un tubo de 10 mL TSB, el cual fue incubado durante 24 h a 37 °C con el objetivo de obtener un inóculo con

una densidad de 1×10^9 células/mL. A partir de este inóculo, se prepararon las muestras de agua contaminada con *E. coli* K12, mediante la disposición de diluciones seriadas del inóculo en agua de peptona y la preparación de la dilución 10^5 UFC/mL de agua a la que se adicionaban 90 mL de agua estéril, para obtener así 100 mL de agua contaminada con una concentración de la bacteria de 10^3 UFC/mL.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de filtración usado en los ensayos de actividad antimicrobiana, donde las muestras de agua destilada inoculadas con *E. coli* K12 se forzaron a pasar a través de un lecho de partículas de sílice. Tras su paso por el sistema de filtración, el agua se recogió en matraces estériles y se llevó a cabo la siembra en placa con medio selectivo TBX. Tras 24 h de incubación de las placas a 37 °C se realizó el recuento de colonias, se calculó el log UFC/mL de agua y se determinó la capacidad inhibitoria de las partículas funcionalizadas sobre el microorganismo de estudio, tomando como referencia el recuento de las muestras control (muestra filtrada a través de un lecho de partículas no funcionalizadas).



FIGURA 2. Esquema del proceso de filtración de agua a través del lecho de partículas funcionalizadas con componentes activos de aceites esenciales.

El estudio de la actividad antimicrobiana de los materiales de sílice funcionalizados se llevó a cabo mediante tres ensayos de filtración, detallados a continuación.

Ensayo 1. Estudio de la capacidad inhibitoria del sistema de filtración del lecho de partículas funcionalizadas. Para ello, se dispuso la capa de partículas de estudio (sin funcionalizar o funcionalizadas) sobre el papel de filtro ajustado sobre el sistema de filtración manteniendo condiciones estériles de trabajo para evitar contaminaciones. Una vez dispuesto el montaje, se procedió a filtrar 100 mL de agua inoculada con *E. coli* K12 (10^3 UFC/mL) y una alícuota de 0,1 mL del filtrado (recogido en un matraz estéril) se sembró en las placas de TBX. En primer lugar, se llevaron a cabo los ensayos con la capa I (grosor de 0,5 cm) de los distintos sólidos, y una vez analizados los resultados de estos ensayos se procedió a realizar este ensayo con las capas II (1 cm de grosor) y III (1,5 cm) del sólido de mayor

tamaño (50 μm), para evaluar si el incremento del tiempo de contacto con los compuestos bioactivos mejoraba la capacidad bactericida.

Ensayo 2. Evaluación de la capacidad de reutilización de las partículas funcionalizadas mediante la filtración de muestras sucesivas. Para determinar la capacidad de reutilización del lecho de partículas se filtraron 3 muestras consecutivas de 100 mL de agua inoculada, siguiendo la misma metodología que en el ensayo 1, sobre la capa I de los distintos sólidos funcionalizados y la capa II del sólido de 50 μm .

Ensayo 3. Estudio de la influencia del lavado previo de las partículas con agua estéril. Con la finalidad de conocer si el lavado con un gran volumen de agua producía la pérdida o lixiviado de los compuestos bioactivos, así como, si la compactación de las partículas tras el paso del líquido (con el consiguiente incremento del tiempo de filtrado) afectaba a la eficacia de las partículas para potabilizar el agua, se llevó a cabo el filtrado de 1 L de agua estéril antes de pasar la muestra de agua contaminada con *E. coli* K12. De la misma forma que en el ensayo 2, este experimento se realizó con la capa I de todos los sólidos funcionalizados y la capa II del material de 50 μm

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. En todos los ensayos se incluyeron muestras control del agua inoculada y no filtrada y muestras control del agua inoculada y filtrada a través de las partículas de sílice no funcionalizadas.

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 factores (tipo de partícula, tipo de compuesto inmovilizado y nº de muestra filtrada) sobre el recuento de *E. coli* se analizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA multifactor). 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 las partículas

En primer lugar, se utilizó la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) para llevar a cabo la caracterización morfológica de las partículas desnudas y de las partículas funcionalizadas con carvacrol, eugenol, timol y vainillina. En la Figura 3 se muestra la forma y tamaño de las partículas de sílice amorfa de partida (columna izquierda), así como la morfología de las partículas funcionalizadas con carvacrol (columna derecha), usadas como soporte de referencia en la caracterización morfológica. Como se puede observar, las partículas de sílice de 5 μm no funcionalizadas presentan una forma cuasi esférica y morfología rugosa. Por su parte, las partículas de sílice de tamaño 10, 25 y 50 μm desnudas exhiben una morfología que se asemeja más a la de un prisma irregular y

superficie lisa. Es importante destacar también que el proceso de funcionalización con los componentes de aceites esenciales no afectó a la morfología y tamaño de las distintas partículas de sílice.

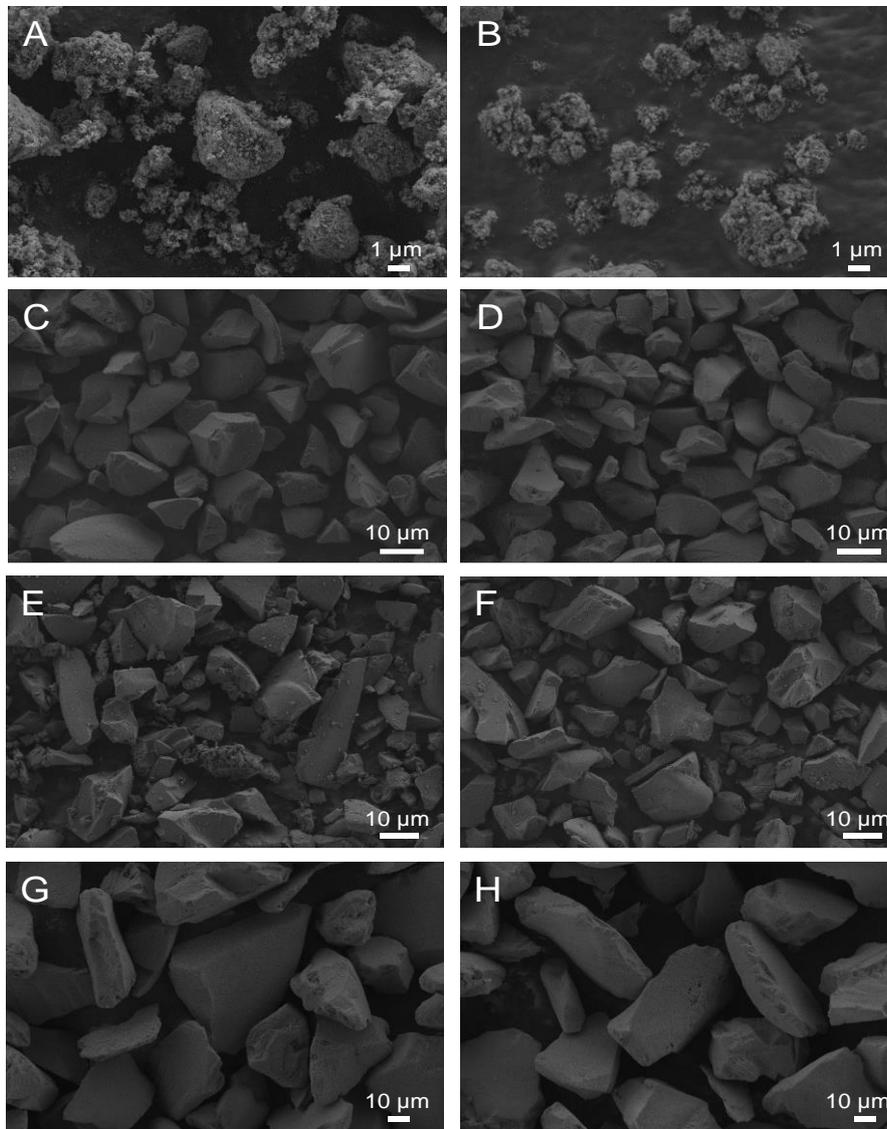


FIGURA 3. Imágenes de FESEM de las partículas de sílice desnudas (izquierda) y funcionalizadas con carvacrol (derecha) de los distintos sólidos de tamaño de partícula 5 μm (A; B), 10 μm (C, D), 25 μm (E, F) y 50 μm (G, H).

Además de la caracterización morfológica se llevó a cabo el estudio de la carga superficial, tanto de las partículas desnudas como funcionalizadas, para determinar la estabilidad de las partículas en suspensión mediante la determinación del potencial zeta. La Tabla 1 muestra los valores de potencial zeta de las partículas desnudas y funcionalizadas suspendidas en agua destilada. Generalmente, la estabilidad de las partículas en suspensión es mayor cuando el potencial zeta se encuentra fuera del rango comprendido entre los valores -30 y +30 mV, ya que cuando los valores se sitúan dentro

de dicho rango se favorece la agregación entre las partículas y pueden verse afectadas las propiedades y funciones de las partículas funcionalizadas. Las partículas desnudas exhibieron valores de potencial zeta negativos para todos los tamaños de partícula, debido a la presencia de grupos silanoles en la superficie de los sólidos de sílice. Por otro lado, las partículas funcionalizadas con los componentes de aceites esenciales mostraron valores de potencial zeta positivos, situados dentro de un amplio rango desde valores de inestabilidad a valores dentro del nivel de estabilidad. En cualquier caso, el cambio de potencial zeta de los materiales, desde valores negativos de la sílice desnuda a valores positivos de las partículas funcionalizadas confirma la eficiencia del método de funcionalización.

TABLA 1. Potencial zeta (mV) de las partículas de sílice amorfa no funcionalizadas y funcionalizadas con carvacrol, eugenol, timol y vainillina. (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

Partícula	Potencial zeta (mV)			
	5 μm	10 μm	25 μm	50 μm
Desnuda	-29,4 \pm 1,2	-24,4 \pm 3,0	-33,3 \pm 1,0	-17,7 \pm 4,9
Carvacrol	30,0 \pm 0,6	8,0 \pm 2,4	2,3 \pm 0,8	6,6 \pm 2,3
Eugenol	11,7 \pm 0,7	12,5 \pm 5,8	41,9 \pm 2,1	30,9 \pm 5,6
Timol	25,0 \pm 1,9	13,9 \pm 1,6	12,5 \pm 3,0	19,7 \pm 2,3
Vainillina	29,2 \pm 0,7	23,1 \pm 1,5	23,4 \pm 1,1	28,6 \pm 1,0

3.2. Estimación del tiempo de filtrado en función del tamaño de partícula

Como estudio previo a la evaluación de la actividad antimicrobiana de las partículas sintetizadas, se llevó a cabo el estudio del tiempo necesario para filtrar 100 mL de agua a través de una capa de partículas de diferente grosor, como parámetro que podría afectar a la eficacia del sistema de filtración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar, el flujo de agua a través de las diferentes capas de partículas resultó ser muy rápido para el sólido de mayor tamaño de partícula (50 μm), con tiempos de filtrado del agua entre 0,1 y 0,5 min para las capas I y III, respectivamente. Para los sólidos de tamaño intermedio (10 y 25 μm) fue necesario entre 2 y 30 min, en función de la capa de partículas, mostrando así la influencia del tamaño de partícula sobre el flujo del líquido a través del lecho. En el caso de las partículas de diámetro inferior (5 μm), el tiempo de filtrado se demoró hasta los 54 min para la capa de espesor de 1,5 cm, lo cual favorece el contacto de las partículas con las células bacterianas, siendo una ventaja desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, pero una desventaja a nivel funcional, ya que los dilatados tiempos dificultan la aplicación del sistema a nivel industrial.

TABLA 2. Cantidad de sólido necesario y tiempo de filtración del agua a través de los diferentes espesores de capas de partículas.

<i>Espesor de capa de partículas</i>	<i>Tipo de sólido (µm)</i>	<i>Cantidad de sólido (g)</i>	<i>Tiempo de filtración (min)</i>
Capa I (0,5 cm)	5	0,6	5
	10	2	3
	25	2	1
	50	2,5	0,1
Capa II (1 cm)	5	1,1	25
	10	4,4	18
	25	4	2
	50	6,7	0,2
Capa III (1,5 cm)	5	2,5	54
	10	7	27
	25	6,5	3
	50	12	0,5

Una vez estudiadas las condiciones de filtración para los diferentes sólidos, se procedió a evaluar la actividad antimicrobiana de las partículas a través del filtrado de agua inoculada por una capa de los materiales de sílice no funcionalizados y por los funcionalizados con los componentes de aceites esenciales.

3.3. Estudio de la actividad antimicrobiana de las partículas de sílice funcionalizadas

Entre los diversos compuestos fenólicos de los aceites esenciales de plantas destacan el carvacrol, eugenol, timol y vainillina, entre otros, los cuales han sido usados en diversos sectores por sus propiedades antivirales, antifúngicas, insecticidas, y principalmente por su actividad antimicrobiana (Belda-Galbis et al., 2014; Cava-Roda et al., 2012; Guarda et al., 2011). Estos compuestos bioactivos presentan un efecto letal sobre los microorganismos debido a la interacción con la membrana celular, afectando a su permeabilidad, favoreciendo el flujo de protones, y alterando los sistemas enzimáticos y la producción de energía, lo que conlleva la muerte celular (Burt, 2004).

Aunque la actividad antimicrobiana de los componentes de aceites esenciales es de sobra conocida, su aplicación a nivel industrial se ve limitada debido a: la alta volatilidad, la baja solubilidad en agua y, fundamentalmente, a sus fuertes propiedades sensoriales, entre las que destacan el intenso aroma picante, medicinal y/o dulce (Burt, 2004; Nostro y Papalia, 2012). Como alternativa a su aplicación en forma libre en los últimos años se han propuesto diversas metodologías, como la encapsulación o la

inmovilización en soportes, para enmascarar las propiedades sensoriales de estos compuestos bioactivos manteniendo su actividad antimicrobiana (Weiss et al., 2009). El grupo de investigación que ha desarrollado este trabajo desarrolló recientemente soportes de sílice funcionalizados con componentes de aceites esenciales, obteniendo así partículas antimicrobianas con compuestos bioactivos inmovilizados en su superficie (Ribes et al., 2017; Ruiz-Rico et al., 2017). Como un nuevo avance en esa línea de investigación, en este trabajo se llevó a cabo el estudio de la actividad antimicrobiana de partículas de sílice usadas como lecho de filtración de agua.

En primer lugar, a través del Ensayo 1 se estudió la capacidad inhibitoria del sistema de filtración tras el filtrado de 100 mL de agua inoculada con *E. coli* a una concentración de 10^3 UFC/ mL, como se ha comentado anteriormente. En la Figura 4 se presenta el porcentaje de reducción del microorganismo tras el filtrado a través de la capa I de los sólidos funcionalizados con los compuestos bioactivos.

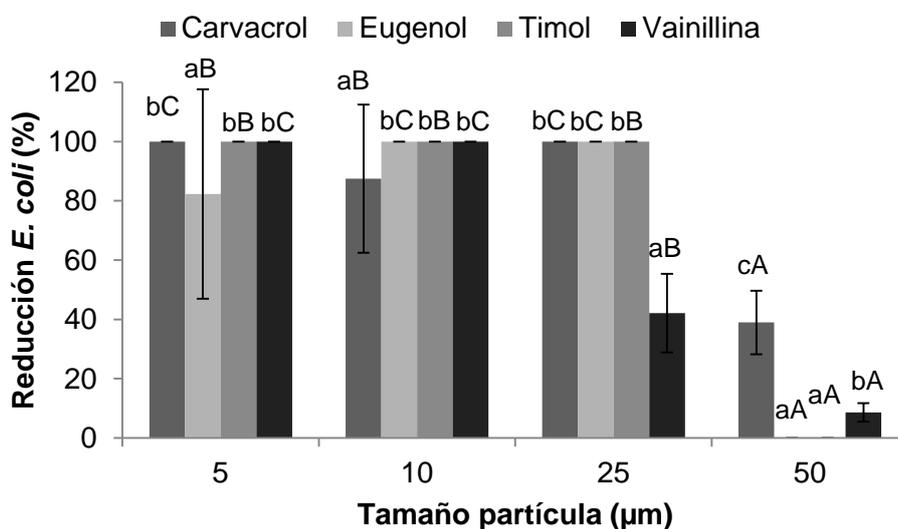


FIGURA 4. Porcentaje de reducción de *E. coli* tras la filtración de 100 mL de agua contaminada (10^3 UFC/ mL) a través de un lecho (capa I, espesor de 0,5 cm) de partículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales. Diferentes letras indican diferencias significativas entre el tamaño de partícula (letras minúsculas) y diferencias significativas entre el compuesto inmovilizado (letras mayúsculas) ($p < 0,001$) (Valores promedio y desviación estándar, $n=3$).

Tal y como se observa, las partículas de sílice funcionalizadas de tamaño 5, 10 y 25 μm mostraron una gran actividad antimicrobiana obteniendo una inhibición total del microorganismo tras la filtración del agua inoculada, para la mayoría de los compuestos bioactivos inmovilizados. Sin embargo, las partículas de sílice funcionalizadas de mayor tamaño (50 μm) presentaron una reducida actividad antimicrobiana con una máxima reducción cercana al 40% para las partículas funcionalizadas con carvacrol. El escaso tiempo de contacto de los microorganismos en suspensión con los compuestos

antimicrobianos anclados a estas partículas (0,1 min con la capa I) puede explicar la diferencia significativa con el resto de resultados. Por ello, teniendo en cuenta la escasa capacidad antimicrobiana de la capa I del sólido de sílice de 50 μm , se procedió a estudiar la actividad inhibitoria de este material usando las capas II y III (datos no mostrados). Los ensayos de inhibición con dichos espesores de partícula permitieron obtener resultados excelentes, consiguiéndose una reducción de *E.coli* del 100% con la capa III para todos los compuestos. En el caso de la capa II, las partículas funcionalizadas con carvacrol, timol y vainillina también permitieron la inhibición total del microorganismo, mientras que con la filtración a través de las partículas funcionalizadas con eugenol tan solo se obtuvo una reducción aproximada del 73 %. Tanto el tipo de partícula como el compuesto bioactivo inmovilizado resultaron factores que influyeron significativamente el recuento de *E. coli* tras el filtrado de 100 mL de agua contaminada según los resultados del ANOVA multifactor, que se reflejan en la Figura 4 (diferencias significativas para los dos factores).

Tras la evaluación de la capacidad inhibitoria de las partículas de sílice funcionalizadas se llevó a cabo el estudio de la capacidad de reutilización de las partículas funcionalizadas mediante la filtración sucesiva de diferentes muestras (Ensayo 2). La Figura 5 muestra la reducción de *E. coli* tras el filtrado sucesivo de 100 mL de agua inoculada a través de la misma capa de partículas.

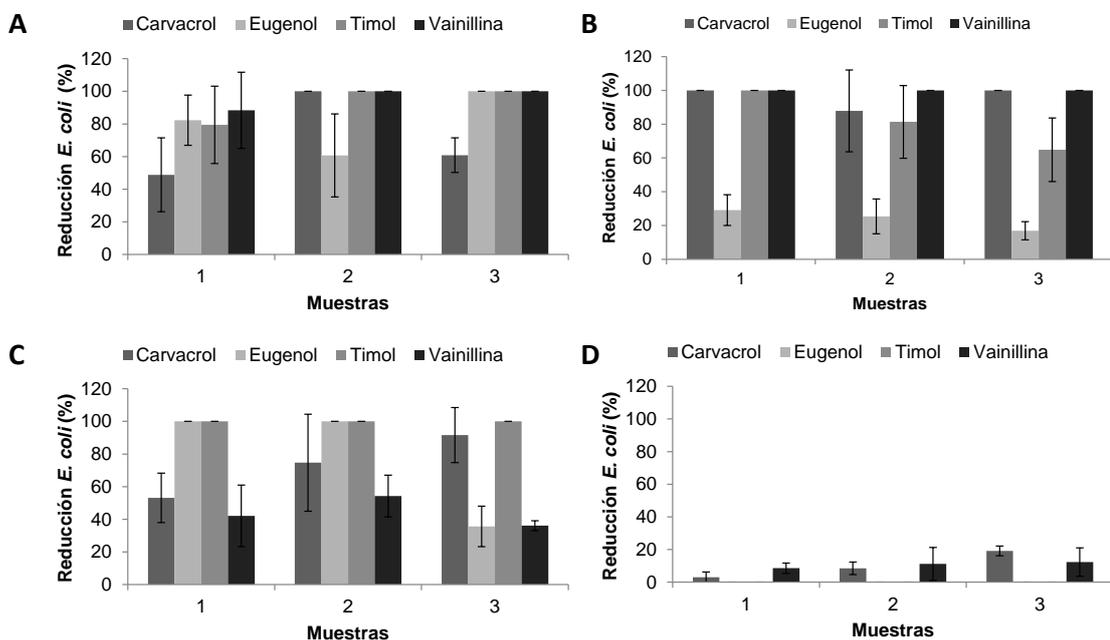


FIGURA 5. Porcentaje de reducción de *E. coli* tras la filtración de tres muestras consecutivas de 100 mL de agua inoculada (10^3 UFC/ mL) a través de un lecho (capa I, espesor de 0,5 cm) de partículas de sílice funcionalizadas de tamaño de 5 μm (A), 10 μm (B), 25 μm (C) y 50 μm (D) (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

Con las partículas de sílice de 5 µm se observa un incremento progresivo de la capacidad inhibitoria tras el filtrado sucesivo de las muestras de agua, alcanzando una inhibición completa del microorganismo para la tercera muestra filtrada, excepto en el caso del sólido funcionalizado con carvacrol. Para las partículas de tamaño medio de 10 y 25 µm se obtuvieron resultados con mayor dispersión, los cuales difieren de los resultados obtenidos en el Ensayo 1 (Figura 4).

Las partículas de 50 µm, de la misma forma que en el Ensayo 1, son las que reportaron peores resultados, consiguiéndose para el sólido funcionalizado con carvacol, una reducción máxima del 20% tras el filtrado de la tercera muestra. Sin embargo, tras el filtrado de las muestras de agua a través de las capas II y III de las partículas de 50 µm se logró la inhibición total de *E. coli* con carvacrol, eugenol y timol; mientras que con las partículas de vainillina se consiguió reducir un 60 % con la capa II y un 71 % con la capa III (datos no mostrados).

Con el objetivo de explicar la influencia de los diferentes factores sobre el recuento de *E. coli* tras la filtración de 3 muestras a través de las partículas funcionalizadas, se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico (Tabla 3) indican que el número de muestra filtrada no influyó sobre la reducción del microorganismo, mientras que tanto el tipo de partícula de sílice como el compuesto inmovilizado afectaron significativamente al recuento de la bacteria, de la misma forma que en los ensayos 1 y 3.

TABLA 3. Valores de F-ratio y niveles de significación obtenidos en el ANOVA multifactor para los distintos factores y su interacción, en la inhibición de *E. coli*.

Factor	F-ratio	α
Partícula	216,08	***
Compuesto bioactivo	12,77	***
Nº de muestra filtrada	1,19	ns
Partícula x Compuesto	16,5	***
Partícula x Nº muestra	2,93	*
Compuesto x Nº muestra	1,60	ns
Partícula x Compuesto x Nº muestra	3,46	***

Niveles de significación (α): ns: no existen diferencias significativas, * p<0,05, ***p<0,001

En vista de los resultados, se puede afirmar que las partículas mantienen sus propiedades antimicrobianas tras filtraciones sucesivas e incluso se mejora la capacidad inhibitoria, como en el caso de las partículas funcionalizadas con vainillina para las cuales se consigue una inhibición mayor a lo largo de las filtraciones, para todos los tamaños de partícula. Esto se debe probablemente a que la filtración de muestras sucesivas implica la compactación de las partículas, que repercute en un incremento del tiempo de filtración y, por ende, en un mayor tiempo de contacto del microorganismo

con el agente antimicrobiano. Aunque los resultados son prometedores sería necesario estudiar la capacidad de reutilización del lecho de partículas, empleando un número de muestras mucho mayor con el fin de establecer la durabilidad del sistema de filtrado.

Por último, se llevó a cabo el estudio de la influencia del lavado previo de las partículas con agua estéril (Ensayo 3). La Figura 6 muestra la reducción de *E. coli* tras el filtrado de 100 mL de agua a través del lecho de partículas, teniendo en cuenta que se procede al lavado previo de dicho lecho con 1 L de agua estéril. Tal y como puede observarse, el lavado previo con agua estéril mantiene e incluso mejora la capacidad inhibitoria del sistema. Esta mejora del efecto inhibitorio puede ser debida, de la misma forma que se comentaba anteriormente, a la compactación del lecho de partículas y el consiguiente incremento del tiempo de filtración que favorece el contacto microorganismo-agente antimicrobiano. Sin embargo, para las partículas de sílice de 5 y 10 μm funcionalizadas con carvacrol no se observa esta mejora, obteniéndose un nivel de reducción del microorganismo inferior a los resultados obtenidos en el Ensayo 1 (Figura 4). De la misma forma que en los casos anteriores, las partículas de tamaño 50 μm , mostraron resultados mucho más favorables tras el uso de un lecho de mayor espesor (datos no mostrados), obteniéndose una inhibición total del microorganismo tras el filtrado de las muestras con las capas II y III del sólido, para todos los compuestos bioactivos inmovilizados. De la misma manera que en los ensayos anteriores, se estudió la influencia de los factores sobre la variable del porcentaje de reducción de *E. coli* mediante ANOVA multifactor, confirmando la influencia significativa, tanto del tipo de partícula como del compuesto inmovilizado.

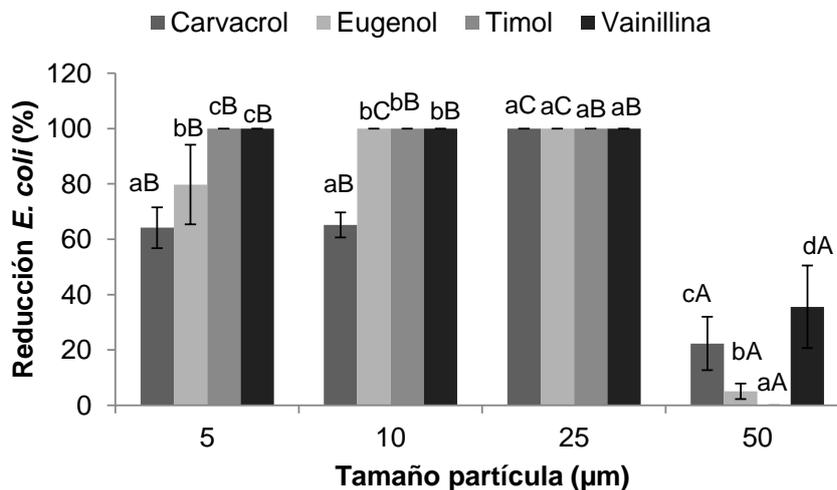


FIGURA 6. Porcentaje de reducción de *E. coli* tras la filtración de 100 mL de agua inoculada (10^3 UFC/ mL) a través de un lecho (capa I) de partículas de sílice funcionalizadas tras el lavado previo con 1 L de agua estéril. Diferentes letras indican diferencias significativas entre el tamaño de partícula (letras minúsculas) y diferencias significativas entre el compuesto inmovilizado (letras mayúsculas) ($p < 0,001$) (Valores promedio y desviación estándar, $n=3$).

Tras determinar la actividad antimicrobiana del lecho de partículas desarrolladas (Ensayo 1), comprobar la capacidad de reutilización del mismo (Ensayo 2) y evaluar la influencia que tiene el lavado previo (Ensayo 3), sería interesante, para futuros estudios, analizar la posible existencia de relaciones sinérgicas entre los distintos componentes de aceites esenciales, tal y como apuntan algunos autores (Rupika et al., 2005; Sivropoulou et al., 1996), ya que podría potenciarse la actividad inhibitoria observada en este trabajo.

4. CONCLUSIONES

Los filtros, formados por partículas de sílice funcionalizadas con carvacrol, eugenol, timol y vainillina, desarrollados en este estudio consiguen reducir los niveles de *E. coli* K12 del agua filtrada a través de ellos hasta en un 100%. La eficacia de inhibición es similar en los cuatro compuestos evaluados.

El porcentaje de inhibición del microorganismo varía principalmente dependiendo del tamaño de la partícula de sílice y del espesor de la capa de filtración. En general, para los cuatro compuestos evaluados, las partículas de tamaño de 5, 10 y 25 μm presentan un alto efecto inhibitorio, mientras que las de 50 μm necesitan espesores de lecho superiores para alcanzar una eficacia similar. De los cuatro tamaños de partícula evaluados, las partículas de 25 μm serían las más adecuadas ya que se requiere un menor tiempo de filtración para alcanzar la inhibición total del microorganismo.

Ni la reutilización de los filtros hasta 3 veces, ni el lavado previo de los mismos con agua estéril, suponen una pérdida de eficacia del sistema de filtración.

Este estudio demuestra que el sistema de esterilización desarrollado tiene un amplio potencial en el tratamiento de aguas potables, el cual podría ser también aplicado a alimentos líquidos, como zumos, cerveza o vino. Este sistema presenta diversas ventajas, entre las que destacan la posibilidad de efectuar un tratamiento de aguas *in situ*, al ser barato, portátil y de bajas necesidades energéticas. Sin embargo, antes de su aplicación en un entorno real es necesario optimizar la metodología, evaluar el posible efecto sinérgico de la combinación de partículas funcionalizadas con distintos compuestos bioactivos, estudiar la eficacia de inhibición frente a otros microorganismos y determinar si hay niveles residuales de los compuestos bioactivos en el agua filtrada.

5. REFERENCIAS

- Belda-Galbis, C.M.; Leufven, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2014. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *Journal of Food Engineering*, **141**:37–43.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in food – A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**:223–253.
- Camenforte, M. 2014. *Alternativa a la desinfección del agua con cloro: ozonización* (Trabajo Final de Grado). Facultad de ciencias Universidad de Granada.

- Cava-Roda, R.M.; Taboada-Rodríguez, A.; Valverde-Franco, M.T.; Marín-Iniesta, F. 2012. 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.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 1999. Achievements in Public Health, 1900-1999: Control of Infectious Diseases. CDC, Atlanta, EE.UU. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 30 de julio, 1999.
- Chen, F.; Shi, Z.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, **104(1)**:30-39.
- Córdoba, M.A.; Del Coco, V.F.; Basualdo, J.A. 2010. Agua y salud humana. *Química Viva*, **9(3)**.
- de Derechos Económicos, C. (2002). Sociales y Culturales: Cuestiones Sustantivas que se Plantean en la Aplicación del Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales, Observación General N 15, El Derecho al Agua, artículos 11 y 12 del Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales, Naciones Unidas (NU), Consejo Económico y Social. *E/C. 12/2002*, 11, 2.
- Del Barrio, M. 2015. *Cloración frente a ozonización en el tratamiento de agua potable. Ventajas y desventajas de ambos procesos* (Trabajo Final de Grado). Facultad de farmacia Universidad Complutense.
- Denyer, S.P.; Hugo, W.B. 1991. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *Society for Applied Bacteriology. Technical Series*, **27**:171-187.
- Farag, R.S.; Daw, Z.Y.; Hewedi, F.M.; El-Baroty, G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of food protection*, **52(9)**:665-667.
- Gómez-Duarte, O.G. 2014. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Revista chilena de infectología*, **31(5)**:577-586.
- Guarda, A.; Rubilar, J.F.; Miltz, J.; Galotto, M.J. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, **146(2)**:144-150.
- Helander, I.M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Von-Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, **46(9)**:3590-3595.
- Hernández-Cisneros, F.; Rodríguez-Salceda, Z.; Ferrer Herrera, I.; Trufero-Cánovas, N. 2000. Enfermedades diarreicas agudas en el niño: comportamiento de algunos factores de riesgo. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, **16(2)**:129-133.
- Huilan, S.; Zhen, L.G.; Mathan, M.M.; Mathew M.M.; Olarte, J.; Espejo, R. 1991. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull World Health Organ*, **69 (5)**:549-55.
- 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)**:1–24.
- Kroll, S.; Brandes, C.; Wehling, J.; Treccani, L.; Grathwohl, G.; Rezwani, K. 2012. Highly efficient enzyme-functionalized porous zirconia microtubes for bacteria filtration. *Environmental science & technology*, **46(16)**:8739-8747.
- Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J.; Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, **91(3)**:453-462.
- Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D.; Alvarez, P.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research*, **42(18)**:4591-4602.
- 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.
- Moleyar, V.; Narasimham, P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, **16(4)**:337-342.
- Nostro, A.; Papalia, T. 2012. Antimicrobial activity of carvacrol: Current progress and future perspectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **7(1)**:28–35.
- Pulido, M. D. P. A.; de Navia, S. L. Á.; Torres, S. M. E.; Prieto, A. C. G. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, **3(4)**.

- Pulido, M.D.P.A.; de Navia, S.L.Á.; Torres, S.M.E.; Prieto, A.C.G. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, **3(4)**.
- Real Decreto por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, R.D. Nº 140/2003, de 7 de febrero, 2003.
- Ribes, S.; Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Fuentes, A.; Talens, P.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J.M. 2017. Eugenol and thymol immobilized on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: application in strawberry jam. *Food Control*, **81**:181–188.
- Rodríguez, M.J.; Rodríguez, G.; Serodes, J.; Sadiq, R. 2007. Subproductos de la desinfección del agua potable: formación, aspectos sanitarios y reglamentación. *Interciencia*, **32(11)**.
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Bernardos, A.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M.D.; Barat, J.M. 2017. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, **233**:228–236.
- Rupika, L.A.S.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S.W. 2005. Development and evaluation of low-density polyethylene-based antimicrobial food packaging polymers containing thymol and carvacrol. In *22nd IAPRI Symposium, Campinas, Brazil*.
- Shah, B.; Davidson, P.M.; Zhong, Q. 2012. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. *Applied and Environment Microbiology*, **78(23)**:8448–8453.
- Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **44(5)**:1202-1205.
- Tassou, C.; Koutsoumanis, K.; Nychas, G.J. 2000. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, **33(3)**:273-280.
- Tsao, R.; Zhou, T. 2000. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*, **12(1)**:113-121.
- Turek, C.; Stintzing, F.C. 2013. Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12(1)**:40–53.
- Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Smid, E. J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and environmental microbiology*, **65(10)**:4606-4610.
- Vinette, Y. 2001. Évolution spatio-temporelle et modélisation des trihalométhanes dans les réseaux de distribution d'eau potable de la région de Québec. Tesis Doctoral. Universidad de Laval
- 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.