



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## EFECTO DE LA FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE ZUMO DE MANZANA

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

ALUMNO/A: Clara Llorens Guillem

TUTORA ACADEMICO: Isabel Fernández-Segovia

COTUTOR: José M. Barat

DIRECTORAS EXPERIMENTALES: María Ruiz-Rico

Nataly Peña-Gómez

*Curso Académico:2017-18*

VALENCIA, septiembre 2018

# EFECTO DE LA FILTRACIÓN A TRAVÉS DE PARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS SOBRE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE ZUMO DE MANZANA

Clara Llorens, Nataly Peña-Gómez, María Ruiz-Rico, Isabel Fernández-Segovia, José M. Barat<sup>1</sup>

**Resumen:** El objetivo de este trabajo fue la aplicación de un sistema de filtración basado en micropartículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, timol o vainillina), como método alternativo al tratamiento térmico convencional de zumo de manzana. Tras la confirmación de la inmovilización de los compuestos antimicrobianos sobre las partículas, se validó la capacidad del proceso de filtración para reducir al menos en 5 órdenes logarítmicos las colonias de *Escherichia coli* K12. Además, se evaluó la influencia del filtrado sobre los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, sólidos solubles y color) y microbiológicos (crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras) del zumo a lo largo de su almacenamiento en refrigeración, así como el potencial lixiviado de los compuestos bioactivos inmovilizados. Los resultados mostraron la capacidad de las partículas funcionalizadas para eliminar la microflora típica del zumo de manzana fresco y mantener la estabilidad microbiológica del producto a lo largo de su vida útil. La filtración a través de las partículas no funcionalizadas y funcionalizadas con eugenol preservó las propiedades fisicoquímicas del zumo. Por su parte, la filtración a través de carvacrol, timol y vainillina inmovilizados afectó de forma significativa a algunas de las características del producto, probablemente por la liberación parcial de dichos compuestos a la matriz alimentaria. La optimización de la metodología de inmovilización es esencial como paso previo para la aplicación de la tecnología desarrollada en la industria. No obstante, se puede concluir que la inmovilización de estos compuestos bioactivos sobre la superficie de micropartículas de sílice presenta un alto potencial como tecnología de filtración para la pasteurización en frío de zumo de manzana.

**Palabras clave:** aceites esenciales, inmovilización, filtración, micropartículas de sílice, zumo.

**Resum:** L'objectiu d'aquest treball va ser l'aplicació d'un sistema de filtració basat en micropartícules de sílice funcionalitzades amb components d'olis essencials (carvacrol, eugenol, timol i vanil·lina), com a mètode d'alternatiu al tractament tèrmic convencional de suc de poma. Després de la confirmació de la immobilització dels compostos antimicrobians sobre les partícules, es va validar la capacitat del procés de filtració per reduir almenys 5 ordres logarítmics de *Escherichia coli* K12. A més, es va procedir a avaluar la

---

<sup>1</sup> Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria. Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain, clallogu@alumni.upv.es

influència del filtrat sobre els paràmetres fisicoquímics (pH, acidesa, sòlids solubles i color) i microbiològics (creixement de microorganismes aerobis mesòfils, psicròfils i floridures i llevats) del suc al llarg del seu emmagatzematge en refrigeració, així com el potencial lixiviat dels compostos bioactius immobilitzats. Els resultats van mostrar la capacitat de les partícules funcionalitzades per eliminar la microflora típica del suc de poma fresc i mantenir l'estabilitat microbiològica del producte al llarg de la seua vida útil. La filtració a través de les partícules no funcionalitzades i funcionalitzades amb eugenol va preservar les propietats fisicoquímiques del suc. Per la seua banda l'ús de carvacrol, timol i vainillina immobilitzats va afectar de forma significativa a algunes de les característiques de l'aliment, probablement per l'alliberament parcial d'aquests compostos a la matriu alimentària. L'optimització de la metodologia d'immobilització és essencial com a pas previ per a l'aplicació de la tecnologia desenvolupada a la indústria. No obstant això, la immobilització d'aquests compostos bioactius sobre la superfície de micropartícules de sílice permet desenvolupar una tecnologia de filtració per a la pasteurització en fred de suc de poma que pot ser usada com a alternativa al tractament tèrmic convencional.

**Paraules clau:** olis essencials, immobilització, filtració, micropartícules de sílice, suc.

**Abstract:** The objective of this work was the application of a filtration system based on silica microparticles functionalized with essential oil components (carvacrol, eugenol, thymol and vanillin), as an alternative method to the conventional thermal treatment of apple juice. After confirming the immobilization of the antimicrobial compounds on the particles, the capacity of the filtration process to reduce at least 5 logarithmic orders of *Escherichia coli* K12 was validated. In addition, the influence of the filtration on the juice physicochemical (pH, acidity, soluble solids and color) and microbiological (growth of mesophilic aerobic microorganisms, psychrophiles and molds and yeasts) parameters was evaluated throughout its storage in refrigeration, as well as the potential leaching of the immobilized bioactive compounds. The results showed the capability of the functionalized particles to eliminate the typical microflora of the fresh apple juice and to preserve the microbiological stability of the product throughout its shelf life. Filtration through non-functionalized and eugenol-functionalized particles preserved the physicochemical properties of the juice. On the other hand, the use of immobilized carvacrol, thymol and vanillin affected significantly some of the characteristics of the food, probably due to the partial release of the compounds to the food matrix. The optimization of the immobilization methodology is essential as a previous step for the application of the developed technology in the industry. Nevertheless, the immobilization of these bioactive compounds on the surface of silica microparticles allows the development of a filtration technology for the cold pasteurization of apple juice that can be used as an alternative to conventional thermal treatment.

**Keywords:** essential oils, immobilization, filtration, silica microparticles, juice.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

La fruta es un alimento fundamental en cualquier dieta saludable y, en consecuencia, cualquier producto derivado de ella, como los zumos, son percibidos como bebidas nutritivas, naturales y saludables, dada su composición fenólica, capacidad antioxidante y la fibra soluble que aportan (Massini et al., 2017).

Los zumos de frutas se han considerado bebidas seguras dado su pH ácido (normalmente entre 3 y 4) y alto contenido en azúcares, que lo convierten en un producto desfavorable al crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, el consumo de zumo de manzana fresco se ha relacionado con diversos brotes de diarrea y síndrome urémico hemolítico, derivados de la contaminación del zumo con patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* o *Cryptosporidium parvum*, debido a la habilidad de estos microorganismos para adaptarse a temperaturas de refrigeración y pH bajo. Por tanto, este producto debe ser pasteurizado, asegurando una reducción de al menos 5 órdenes logarítmicos de *E. coli* O157:H7, y refrigerado adecuadamente tras el tratamiento para garantizar su seguridad (Kiskó y Roller, 2005). Además de microorganismos patógenos, el zumo también puede contener microorganismos alterantes como levaduras, principalmente *Saccharomyces* spp., mohos como los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* y bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp. (Choi y Nielsen, 2005; Ferrario y Guerrero, 2016).

Hasta el momento actual, la pasteurización térmica ha sido el tratamiento de conservación de los zumos por excelencia, ya que garantizaba un producto aséptico y seguro. Pero como todo tratamiento térmico, tiene un gran impacto en el alimento provocando un deterioro de las propiedades nutricionales y organolépticas, como cambio en el color, textura, pérdida vitamínica y proteica, además del elevado coste de sus instalaciones (Choi y Nielsen, 2005; Jiao et al., 2004).

Debido al efecto negativo de la pasteurización térmica en parámetros clave del zumo y la creciente demanda de los consumidores por alimentos mínimamente procesados, se están desarrollando en los últimos años métodos alternativos de conservación. Estos métodos deben asegurar la ausencia de microorganismos patógenos, prevenir el desarrollo de microorganismos alterantes para alargar la vida útil del producto y asegurar un mínimo impacto sobre las propiedades nutricionales y sensoriales. Entre las tecnologías emergentes destacan el uso de la radiación ultravioleta, ultrasonidos, altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos, dióxido de carbono presurizados y conservantes naturales. Sin embargo, estas metodologías presentan diversas limitaciones que impiden su aplicación industrial.

La radiación ultravioleta, es una alternativa que ofrece resultados positivos y costes competitivos, pero presenta una baja eficacia antimicrobiana en matrices complejas por la falta de penetrabilidad (Choi y Nielsen, 2005). Respecto a los ultrasonidos, se obtienen alimentos con mínima pérdida de sabor, pero deben ser usados en combinación con calor y/o presión para asegurar la inhibición microbiana (Chemat et al., 2011). Las altas presiones

hidrostáticas mantienen la calidad nutricional y sensorial óptima (Nielsen et al., 2009), pero puede afectar a las propiedades reológicas del producto (Ahmed y Ramaswamy, 2003), además de requerir una alta inversión. Otros dos métodos que no se utilizan a gran escala debido al elevado coste de sus instalaciones, son los pulsos eléctricos y el dióxido de carbono presurizado. Además, los pulsos eléctricos provocan alteraciones enzimáticas que reducen los niveles de pectina de los zumos (Morris et al., 2007). Por último, otro tratamiento alternativo sería el uso de antimicrobianos naturales como los aceites esenciales, que presentan reconocida actividad antimicrobiana y antifúngica (Burt, 2004; Suntres et al., 2015). Sin embargo, su aplicación directa sobre los alimentos se ve limitada por la necesidad de emplear concentraciones mayores en los productos alimentarios para asegurar el mismo efecto inhibitorio obtenido en ensayos *in vitro*, lo que implica un gran impacto sobre las propiedades organolépticas de los alimentos, debido a su fuerte olor y sabor, elevada volatilidad y baja solubilidad en agua (Kumar Tyagi et al., 2014).

La filtración es un proceso de gran importancia en la industria alimentaria para la clarificación, concentración y estabilización microbiana de las bebidas (Gialleli et al., 2016). La filtración en lecho profundo mediante arena o tierras diatomeas es usada para la eliminación de materia orgánica y microorganismos, pero no tiene una adecuada eficiencia y presenta problemas de regeneración (Devi et al., 2008). Por otro lado, el filtrado por membranas ofrece un filtrado selectivo que reduce, sin necesidad de tratamiento térmico, la contaminación microbiana (Lipnizki, 2010; Papafotopoulou-Patrinou et al., 2016). Sin embargo, el mayor inconveniente de esta técnica es la colmatación de las membranas por retención de los microorganismos y componentes alimentarios, lo que genera problemas de flujo y dificultad para la limpieza de sus membranas (Fuenmayor et al., 2014).

La filtración es una metodología que sigue en continuo avance, como el desarrollo de nuevas partículas tubulares de celulosa con gran actividad antimicrobiana, que sólo requieren de agua caliente tras su uso para regenerarse. Los estudios realizados en zumo han dado resultados positivos (Papafotopoulou-Patrinou et al., 2016), pero la filtración de zumo de manzana a través de estos soportes conllevó un descenso de los niveles de polifenoles y compuestos volátiles, por adsorción de dichos componentes en los poros de las partículas (Gialleli et al., 2016).

Otra alternativa a la filtración tradicional puede ser el uso de nuevos materiales inertes funcionalizados con moléculas bioactivas. Las partículas de sílice son una posibilidad de soporte muy prometedora debido a su estabilidad química y térmica y a su biocompatibilidad (Janatova et al., 2015; Ros-Lis et al., 2018). Por su parte, los componentes de aceites esenciales como antimicrobianos naturales, pueden ser inmovilizados sobre los soportes de sílice para crear nuevas partículas antimicrobianas, previniendo los efectos negativos comentados anteriormente. El efecto inhibitorio de los componentes de los aceites esenciales inmovilizados sobre soportes de sílice ha sido recientemente estudiado en ensayos *in vitro* y en alimentos. En mermelada de fresa se estudió la efectividad del eugenol y timol inmovilizados en partículas mesoporosas de sílice, obteniéndose una mejora de las

propiedades antifúngicas y un menor impacto en el aroma del alimento (Ribes et al., 2017). Otro estudio se centró en la síntesis y aplicación de tres soportes de sílice diferentes funcionalizados con carvacrol, eugenol, vainillina y timol, para evaluar su potencial antimicrobiano. En este caso el trabajo se llevó a cabo en leche, mostrando resultados muy prometedores, ya que las partículas de sílice funcionalizadas mejoraron su actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* y *E. coli* respecto a los compuestos libres, además de no aportar olor al alimento (Ruiz-Rico et al., 2017). Estos dos últimos estudios son los que han dado impulso y base al trabajo expuesto a continuación, cuyo objetivo es el estudio de la aplicación de los soportes antimicrobianos desarrollados con carvacrol, eugenol, timol o vainillina, como elementos de filtración para la pasteurización en frío de zumo de manzana fresco, así como evaluar la influencia del tratamiento de filtración sobre la vida útil y las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del zumo.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

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

Los compuestos trimetilamina, paraformaldehído, dietil éter, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), cloroformo, n-butanona, borohidruro sódico, carvacrol, eugenol, timol, y las micropartículas de óxido de silicio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España). La vainillina se obtuvo de Ventós (Barcelona, España). El acetonitrilo, hexano, metanol, diclorometano, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, hidróxido potásico, hidróxido sódico, sulfato de magnesio, la fase sólida dispersiva Extrabond® QuEChERS y los medios para los ensayos microbiológicos fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España).

### **2.2. Síntesis de las partículas de sílice funcionalizadas**

La preparación de los soportes antimicrobianos se basó en la inmovilización covalente de cuatro componentes de aceites esenciales sobre la superficie de micropartículas de sílice comerciales de tamaño de partícula aproximado de 50  $\mu\text{m}$ .

La preparación de las partículas de sílice funcionalizadas se llevó a cabo mediante un proceso en cuatro etapas (Ruiz-Rico et al., 2017). En la primera fase, el carvacrol, eugenol y timol fueron transformados en derivados aldehídos, mientras que la vainillina al poseer un grupo aldehído en su estructura no requirió esta etapa. Los aldehídos de los terpenoides (carvacrol y timol) fueron sintetizados por formilación directa mediante paraformaldehído. Para la síntesis del aldehído de eugenol se siguió una reacción de Reimer–Tiemann. La síntesis de los derivados aldehídos tuvo lugar con el fin de mantener las propiedades antimicrobianas de las moléculas, añadiendo un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con el grupo amino del alcóxido, y manteniendo el grupo hidroxilo libre,

responsable de la actividad antimicrobiana (Dorman y Deans, 2008; Hyldgaard et al., 2012).

Tras la obtención de los derivados aldehídos, en la segunda etapa estos compuestos y la vainillina no modificada, se hicieron reaccionar con APTES para formar los derivados alcoxisilanos con la finalidad de inmovilizar covalentemente los componentes de los aceites esenciales sobre las micropartículas de sílice. Tras esto, se realizó el anclado de los derivados alcoxisilanos sobre la superficie de las partículas de sílice amorfa. Por último, se llevó a cabo la estabilización de los compuestos inmovilizados mediante la reducción del enlace imina formado entre el grupo aldehído de los compuestos bioactivos y el grupo amino del APTES.

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

Los soportes de sílice, tanto las partículas comerciales como los materiales funcionalizados con los componentes de aceites esenciales, fueron caracterizados mediante técnicas estándar como: potencial zeta, análisis termogravimétrico (TGA) y análisis elemental. 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 durante 2 min para evitar la agregación de las partículas. La obtención del valor de potencial zeta se estimó a partir de 3 repeticiones. El grado de funcionalización de las diferentes partículas se calculó mediante análisis elemental y termogravimétrico. El análisis elemental (C, H, O y N) se realizó mediante un análisis de combustión en un analizador CHNOS Vario EL III (Elemental Analyses System GMHB, Langensfeld, Alemania). 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 (800 mL/min) durante 60 min, un calentamiento dinámico desde 100 °C hasta 1000 °C usando una atmósfera oxidante (aire, 80 mL/min), y por último, una etapa de calentamiento isotérmico a 1000 °C durante 30 min.

### **2.4. Evaluación del efecto antimicrobiano de los soportes funcionalizados usados como elementos de filtración**

El estudio de las propiedades antimicrobianas de los compuestos bioactivos inmovilizados se realizó sobre zumo de manzana comercial pasteurizado, adquirido en un supermercado local. Dicho zumo fue inoculado con *Escherichia coli* con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria del sistema de filtración, el cual debe ser capaz de reducir al menos 5 órdenes logarítmicos de dicho microorganismo para garantizar la seguridad del producto tratado (Kiskó and Roller, 2005).

El estudio se llevó a cabo con la cepa de referencia *E. coli* K12 (CECT 433), como cepa no patógena sustituta de *E. coli* O157:H7 (Kim y Harrison, 2009). Esta bacteria 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). Para la preparación del inóculo se tomó una colonia de *E. coli* K12 con un asa de siembra y se introdujo en un tubo de 10 mL de TSB, el cual fue incubado durante 24 h a 37 °C con el objetivo de obtener un inóculo con una densidad de  $10^9$  células/mL. Tras la incubación, se procedió a la centrifugación del inóculo (4000 rpm/10 min), se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de zumo. El zumo de manzana (1 L) fue inoculado con el inóculo de *E. coli* con el fin de tener una densidad celular en el producto final de  $10^6$  células/mL.

El sistema de filtrado utilizado consistió en una rampa de filtración manifold (sistema de filtración Microfil®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), conectada a una bomba de vacío, sobre la cual se sitúa un papel de celulosa en la base, un embudo y el lecho de partículas (2 g de partículas de 50 µm, para obtener un espesor de lecho de 0,5 cm).

Tras la inoculación del zumo de manzana, se procedió a filtrarlo a través del lecho de partículas de los diferentes soportes funcionalizados y las partículas sin funcionalizar (control). Tras su paso por el sistema de filtración, el zumo se recogió en matraces estériles y se llevó a cabo la siembra en placa con el medio selectivo TBX (Tripton-Bilis-X-glucuronido). Tras la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C, se procedió al recuento de colonias y se calculó el log UFC/mL.

Los ensayos de filtración se llevaron a cabo por triplicado, incluyendo muestras control del zumo inoculado no filtrado y muestras control del zumo inoculado y filtrado a través de las partículas de sílice no funcionalizadas.

## **2.5. Influencia del proceso de filtración sobre la vida útil de zumo de manzana fresco**

Una vez establecido el potencial del filtrado a través de las partículas de sílice funcionalizadas, para controlar la carga microbiana del zumo de manzana, se procedió a evaluar la influencia del proceso de filtración sobre diversos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del zumo a lo largo del almacenamiento. Esta parte del estudio se realizó sobre zumo de manzana fresco.

### **2.5.1. PREPARACIÓN DEL ZUMO DE MANZANA FRESCO**

Para la elaboración del zumo fresco se usaron manzanas de la variedad Braeburn, que presenta una proporción equilibrada entre azúcar y ácido, adquiridas en un supermercado local. La preparación del zumo se llevó a cabo mediante el triturado en una Thermomix TM31 (Vorwerk España MSL, Madrid, España), donde fueron introducidas las manzanas previamente lavadas, peladas y troceadas, y agua destilada (1 L de agua para 1 kg de manzanas). La mezcla triturada se filtró a través de un colador, sin ejercer presión, para evitar el paso de la pulpa obteniendo así el zumo fresco.

Tras la preparación del zumo de manzana, se llevó a cabo el filtrado, en condiciones estériles, de 150 mL de zumo a través del lecho (0,5 cm de espesor) de partículas funcionalizadas con los componentes de aceites esenciales. El zumo filtrado se recogió en un matraz Erlenmeyer estéril y a

continuación la muestra se dividió en tubos Falcon estériles con 20 mL de zumo para su almacenamiento en refrigeración (4 °C) y análisis a diferentes tiempos (día 0, 3, 6, 9 y 12).

Los ensayos de filtración se llevaron a cabo por triplicado. Además, se incluyeron muestras control del zumo fresco no filtrado y muestras control del zumo fresco filtrado a través de las partículas de sílice no funcionalizadas.

## 2.5.2. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Las determinaciones analíticas se realizaron tanto en zumo fresco recién elaborado como en el zumo filtrado y refrigerado, a lo largo del almacenamiento. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo para determinar el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos, enterobacterias, mohos y levaduras. Los parámetros fisicoquímicos que se determinaron fueron: sólidos solubles, acidez, pH y color, ya que todos ellos son factores primarios de calidad del zumo. Además, se llevó a cabo la evaluación del posible lixiviado de los compuestos bioactivos inmovilizados en los soportes de sílice mediante cromatografía de gases. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

En los **análisis microbiológicos** se determinó el crecimiento de microorganismos mesófilos, psicrófilos, enterobacterias, mohos y levaduras, a lo largo del almacenamiento del zumo. Para ello, se tomó una alícuota de la muestra, se prepararon diluciones decimales seriadas y se llevó a cabo la siembra en placa. Para la enumeración de microorganismos mesófilos se realizó la siembra en profundidad en PCA (Plate Count Agar) y se incubaron las placas a 30 °C durante 72 h. Para evaluar el crecimiento de microorganismos psicrófilos se llevó a cabo la siembra en PCA e incubación a 4 °C durante 10 días. El recuento de enterobacterias se llevó a cabo mediante siembra en profundidad en doble capa en VRBD (Violet Red Bile Glucose) e incubación a 37 °C durante 24 h. Para la enumeración de mohos y levaduras se realizó la siembra del zumo en superficie en el medio PDA (Potato Dextrose Agar) y las placas fueron incubadas a 25 °C durante 72 h.

Para la **determinación de los sólidos solubles** se utilizó un refractómetro (RFM300, Bellingham & Stanley Ltd, Kent, Reino Unido), donde se leen los °Brix. Tras el calibrado del refractómetro con agua destilada, se depositó una pequeña cantidad de la muestra en el prisma con una pipeta Pasteur, y se procedió a realizar la medida.

La **determinación de la acidez** del zumo se llevó a cabo mediante una valoración ácido-base con NaOH 0,1 N, previamente valorado, usando fenolftaleína como indicador. En un matraz Erlenmeyer se introdujeron 10 mL del zumo a determinar junto con 40 mL de agua destilada y 3 gotas del indicador. Se valoró con NaOH hasta un viraje a color rosado. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de ácido málico.

La **determinación del pH** se realizó con un pH-metro Crison micropH 2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) con electrodo de punción acoplado.

Para la **determinación del color** se usó un fotocolorímetro Minolta Chroma Meter CM-3600d (Minolta, Osaka, Japón), observador 10° e

iluminante D65. A partir de las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL\*a\*b\* (1976), L\* (luminosidad), a\* (desviación hacia el rojo y el verde) y b\* (desviación hacia el amarillo y el azul), se calcularon las magnitudes psicofísicas de tono (h\*ab) y croma (C\*ab). A su vez, se calcularon los valores correspondientes a las diferencias de color global ( $\Delta E$ ), producidas a lo largo del periodo de almacenamiento.

Además de los parámetros fisicoquímicos de calidad estudiados a lo largo del almacenamiento, se llevó a cabo la **determinación del potencial lixiviado de los componentes de aceites esenciales inmovilizados al zumo** durante el proceso de filtración, mediante cromatografía de gases. Para las muestras filtradas con los soportes funcionalizados con carvacrol, eugenol y timol, se llevó a cabo la extracción de los componentes bioactivos mediante la mezcla de 5 mL de zumo y 5 mL de hexano. Tras la separación de las fases, se tomó la fase superior que contenía el compuesto bioactivo y se transfirió a un matraz de fondo redondo. El proceso de extracción se repitió 3 veces. La fase orgánica fue evaporada mediante presión reducida y el residuo se solubilizó en 2 mL de hexano y se introdujo en un vial de cromatografía. Para la determinación de vainillina se siguió el método de extracción en fase sólida dispersiva “QuEChERS”. Es un método que combina dos etapas, una etapa de extracción de los analitos con acetonitrilo y diferentes sales, y una fase de dispersión en fase sólida donde se realiza una limpieza o “clean-up”. En la primera etapa, se llevó a cabo la extracción de la muestra de zumo filtrado (5 mL) con acetonitrilo (10 mL), en presencia de diferentes sales (sulfato de magnesio y cloruro sódico). Tras la agitación y centrifugado (3 min, 3300 rpm), se separó el sobrenadante que fue sometido a un clean-up en fase sólida dispersiva para eliminar posibles interferentes del extracto. Tras la agitación y centrifugado con la fase clean-up, el sobrenadante fue recogido en un matraz de fondo redondo y el exceso de disolvente fue eliminado mediante presión reducida. El residuo se disolvió en 2 mL de metanol y se introdujo en un vial de cromatografía.

La determinación de los componentes de aceites esenciales potencialmente liberados de los soportes, se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas según el método descrito por Ribes et al. (2016). Los análisis fueron llevados a cabo en un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies, USA) con autoinyector (7683B) y acoplado a un detector de espectrometría de masas simple cuadrupolo (5975). La separación cromatográfica fue realizada mediante la inyección de 0,1  $\mu$ L del extracto en una columna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) en modo splitless usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: temperatura inicial 60 °C durante 3 min, incremento de la temperatura hasta 100 °C a una velocidad de 10 °C/min, seguido de calentamiento hasta 140 °C a 5 °C/min, y finalmente aumento de la temperatura hasta 240 °C a 20 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 °C y 230 °C, respectivamente. La identificación de los componentes de aceites esenciales se realizó mediante la comparación con los espectros de masas de la base de datos NIST MS Search 2.0 y de los patrones correspondientes y por comparación de tiempos de retención con los

de los patrones. La cuantificación de los mismos se calculó a partir de las rectas de calibrado de los distintos compuestos puros (método del patrón externo). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

## 2.7. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA). Con el objetivo de comprobar el efecto de la filtración a través de los soportes funcionalizados, así como el almacenamiento, sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del zumo de manzana se llevó a cabo un análisis de la varianza multifactor (ANOVA multifactorial). 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 soportes de sílice funcionalizados

Los soportes de sílice preparados fueron caracterizados mediante diversas técnicas instrumentales para confirmar la correcta inmovilización de los componentes de aceites esenciales sobre la superficie de las partículas. La Tabla 1 muestra el contenido de compuestos antimicrobianos anclados a los soportes y la influencia de este proceso de funcionalización sobre la carga superficial de las partículas. La cantidad de compuesto bioactivo inmovilizado fue calculada mediante análisis termogravimétrico y análisis elemental.

**TABLA 1.** Contenido de compuestos bioactivos inmovilizados y potencial zeta de las partículas de sílice amorfa no funcionalizadas y funcionalizadas con carvacrol, eugenol, timol y vainillina.

Soporte	$\alpha$ (mg compuesto/g SiO <sub>2</sub> )	Potencial zeta (mV)
<i>Sílice_control</i>	-	-28,6 ± 3,2
<i>Sílice_carvacrol</i>	10,2	30,1 ± 0,6
<i>Sílice_eugenol</i>	35,8	30,9 ± 5,6
<i>Sílice_timol</i>	9,0	27,6 ± 5,4
<i>Sílice_vainillina</i>	114,9	28,6 ± 1,0

Como se puede observar en la Tabla 1, la funcionalización de los soportes con carvacrol y timol resultó en una inmovilización aproximada de 10 mg de compuesto bioactivo por g de soporte, mientras que el anclado de eugenol y especialmente de vainillina fue más eficiente, obteniendo partículas de sílice funcionalizadas con mayor cantidad de materia orgánica anclada sobre su superficie. Además de establecer la cantidad de compuestos bioactivos inmovilizados, se llevó a cabo el estudio de la carga superficial mediante potencial zeta, tanto de las partículas control (no funcionalizadas) como de los

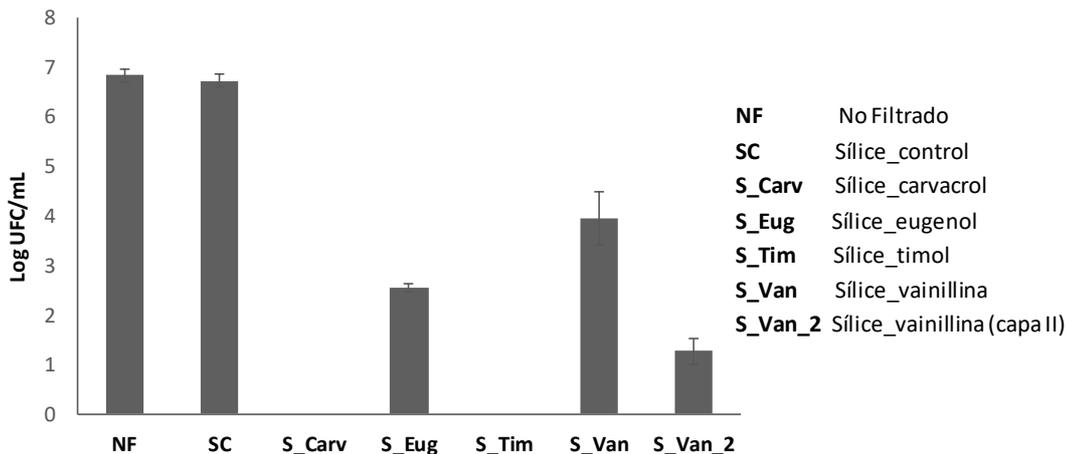
soportes de sílice funcionalizados. La sílice control mostró valores de potencial zeta negativos, debido a la presencia de grupos silanoles en la superficie del soporte. En cambio, los soportes funcionalizadas con los componentes de aceites esenciales mostraron valores de potencial zeta positivos, reafirmando así la eficiencia del método de funcionalización.

### **3.2. Efecto antimicrobiano de los soportes funcionalizados usados como elementos de filtración para zumo de manzana**

Con el fin de establecer la idoneidad del sistema de filtrado como metodología de pasteurización se evaluó la capacidad de los soportes funcionalizados para reducir al menos en 5 órdenes logarítmicos, los microorganismos patógenos, garantizando así la seguridad del producto tratado (Kiskó y Roller, 2005). Para ello, el zumo de manzana comercial fue inoculado con *E. coli* K12, como se ha comentado anteriormente, y se llevó a cabo la filtración del mismo a través de un lecho de las partículas de sílice no funcionalizada (control) y funcionalizadas con los componentes de aceites esenciales.

La Figura 1 muestra el recuento de *E. coli* K12 tras la inoculación del zumo de manzana comercial (densidad de inóculo 6-7 log UFC/mL) y tras el filtrado del zumo a través de un lecho de partículas de sílice de 0,5 cm de espesor (2 g), tanto del soporte desnudo (control) como de los soportes funcionalizados con carvacrol, eugenol, timol y vainillina. En el caso de la vainillina, se realizó además el experimento con una capa de lecho de partículas de 1 cm de espesor (4 g) (capa II).

Como se puede ver en la Figura 1, los recuentos del zumo sin filtrar o el zumo filtrado a través de la sílice no funcionalizada, muestran el mantenimiento de la carga microbiana de la bacteria inoculada ( $6,84 \pm 0,13$  y  $6,74 \pm 0,14$  log UFC/mL para el zumo no filtrado y el zumo filtrado a través de sílice control, respectivamente). El filtrado del zumo a través de las partículas funcionalizadas con carvacrol y timol permitió eliminar por completo la contaminación microbiana del zumo, lo que coincide con otros estudios que evidenciaban una elevada actividad antimicrobiana de estos compuestos en forma libre, donde bajas concentraciones de los mismos fueron capaces de inhibir la contaminación microbiana (Friedman et al., 2004). El soporte funcionalizado con eugenol mostró también la capacidad para reducir el contenido de *E. coli* del zumo de manzana, observándose una reducción aproximada de 5 órdenes logarítmicos. En el caso de la vainillina, el filtrado a través de la capa I (0,5 cm de espesor) produjo una reducción de 3 órdenes logarítmicos, no alcanzando así el nivel de pasteurización requerido. Por ello, se llevó a cabo el filtrado del zumo a través de un lecho de mayor espesor de partículas (1 cm) (capa II), resultando en una reducción de 5,5 órdenes logarítmicos.



**FIGURA 1.** Recuento de *E. coli* K12 (log UFC /mL) de zumo de manzana comercial inoculado antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de 0,5 cm de partículas de sílice no funcionalizadas (sílice control) y funcionalizadas con diferentes componentes de aceites esenciales. La capa II indica un espesor de lecho de 1 cm. (Valores promedio y desviación estándar, n=3).

Estudios similares llevados a cabo con otros tratamientos no térmicos también han garantizado la seguridad microbiológica de zumos de frutas mediante la reducción de 5 órdenes logarítmicos de la carga microbiana. El tratamiento con ultrasonidos ha demostrado su eficacia en la destrucción de bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria monocytogenes*, además de la inactivación de enzimas responsables del deterioro (Chemat et al., 2011). Las altas presiones hidrostáticas también han aportado resultados prometedores, consiguiéndose una destrucción total de *E. coli* en zumo a 400 MPa (Ahmed y Ramaswamy, 2003).

Desde el punto de vista microbiológico, se puede confirmar la idoneidad de los soportes desarrollados para su uso como elementos de filtración para la pasteurización en frío de alimentos líquidos como zumos de frutas, permitiendo estabilizar microbiológicamente la matriz alimentaria sin tener que someter el alimento a un tratamiento térmico. El mecanismo de acción de los componentes de aceites esenciales libres se debe principalmente a su carácter hidrofóbico que les permite interaccionar con los lípidos de la membrana celular, aumentando su permeabilidad y provocando la salida de componentes intracelulares junto a la alteración del metabolismo normal de la célula, dando lugar a la muerte celular (Burt, 2004; García y Palou, 2008). La inmovilización de los componentes de aceites esenciales sobre las partículas de sílice permite mantener las propiedades antimicrobianas de estos compuestos bioactivos con reconocida actividad bactericida (Ruiz-Rico et al., 2017). Tras la inmovilización en los soportes de sílice, las moléculas antimicrobianas en alta concentración local en las micropartículas de sílice interaccionan con los microorganismos durante el proceso de filtrado.

### 3.3. Influencia de la filtración y el almacenamiento sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del zumo de manzana

Con la finalidad de estudiar la influencia de la pasteurización en frío sobre el zumo a lo largo del almacenamiento en refrigeración, se llevó a cabo la determinación de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos (pH, acidez, °Brix y color) de calidad del zumo, junto a la determinación del posible lixiviado de los compuestos bioactivos inmovilizados.

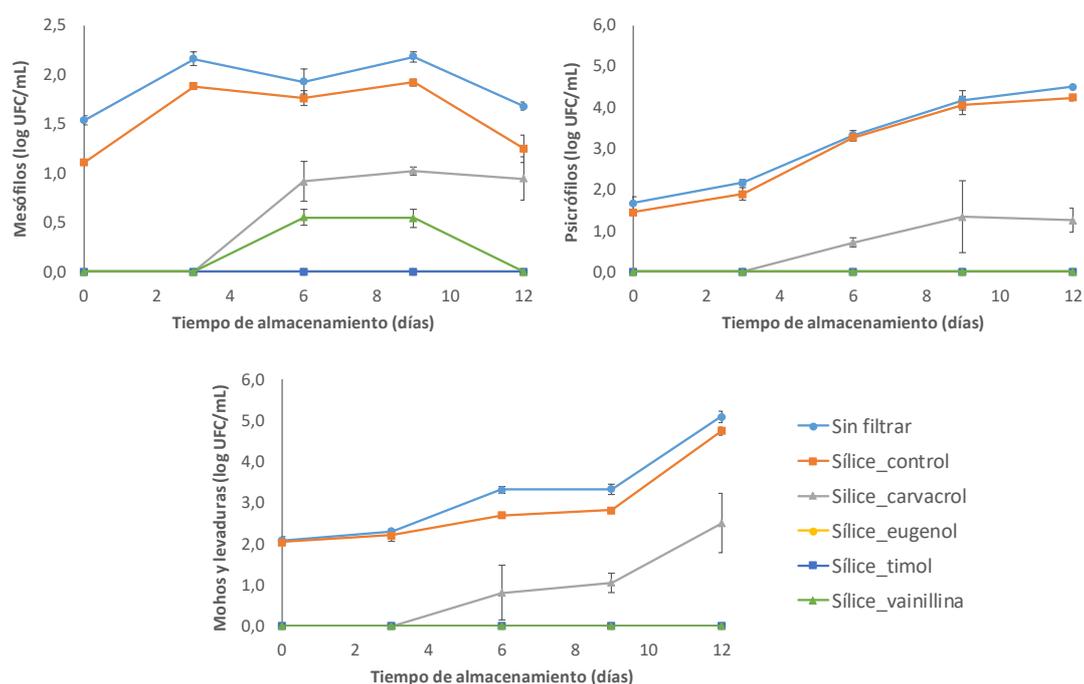
#### 3.3.1. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

La Figura 2 muestra la evolución de los recuentos de microorganismos mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras del zumo de manzana a lo largo del periodo de almacenamiento. La evolución de las enterobacterias no se muestra porque no se observó crecimiento en ningún caso. Según Maresca et al. (2011), el uso de materias primas de calidad y buenas prácticas de fabricación, así como el proceso de pasteurización y el almacenamiento en refrigeración pueden hacer que el crecimiento de estos microorganismos sea nulo. Respecto al resto de microorganismos, el proceso de filtración produjo una estabilización microbiológica de las muestras de zumo filtradas a través de las partículas funcionalizadas con los compuestos bioactivos, resultando en la inhibición total de la carga microbiana a día 0. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el zumo de manzana comercial inoculado con *E. coli* K12 (sección 3.2).

Respecto a la evolución microbiana durante el almacenamiento en refrigeración, tanto para las muestras de zumo sin filtrar como para el zumo filtrado a través de la sílice no funcionalizada se observó un aumento de los recuentos microbianos a lo largo del periodo de estudio. Para el zumo de manzana filtrado con los sólidos funcionalizados se observó una proliferación microbiana para algunos de los zumos filtrados. El zumo tratado con las partículas funcionalizadas con carvacrol mostró un aumento de los recuentos microbiológicos a partir del día 3 de almacenamiento obteniéndose el día 12 de almacenamiento recuentos alrededor de 1 log UFC/mL para aerobios mesófilos y psicrófilos y 2,5 log UFC/mL para mohos y levaduras. Por otra parte, el zumo filtrado a través de la vainillina inmovilizada inhibió el crecimiento de psicrófilos, mohos y levaduras durante todo el estudio de vida útil, pero mostró presencia de aerobios mesófilos entre los días 6 y 8 de almacenamiento, aunque los recuentos fueron bajos (0,5 log UFC/mL). Para las muestras de zumo filtradas con eugenol y timol se observó una inhibición total de la carga microbiana durante todo el estudio de vida útil.

Los resultados obtenidos cumplen con los criterios microbiológicos para productos alimenticios de la Comisión Europea (Reglamento (CE) nº 2073/2005), donde se establece como criterio de seguridad para zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados un límite microbiológico de recuento total de contaminación microbiana de 100 UFC/g. Así mismo, las directrices internacionales recomiendan como nivel satisfactorio de microorganismos aerobios mesófilos, para zumos pasteurizados, valores de  $10^4$  UFC/g (Health Protection Agency, 2009).

El tratamiento mediante la filtración con las partículas funcionalizadas fue capaz de inhibir la microbiota nativa del zumo, mejorando así los resultados obtenidos mediante otras tecnologías de pasteurización en frío. El tratamiento con ultrasonidos y altas presiones realizado por Ferrario y Guerrero (2016) no fue capaz de reducir la microbiota del zumo de forma significativa, aunque retrasó su crecimiento durante el almacenamiento. La filtración de zumo de manzana comercial inoculado con *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* a través de celulosa nano- y microtubular resultó en la eliminación de los microorganismos, pero con pérdida de las propiedades sensoriales al inicio del tratamiento, aunque dichas propiedades se fueron estabilizando a lo largo del proceso de filtrado (Gialleli et al., 2016).



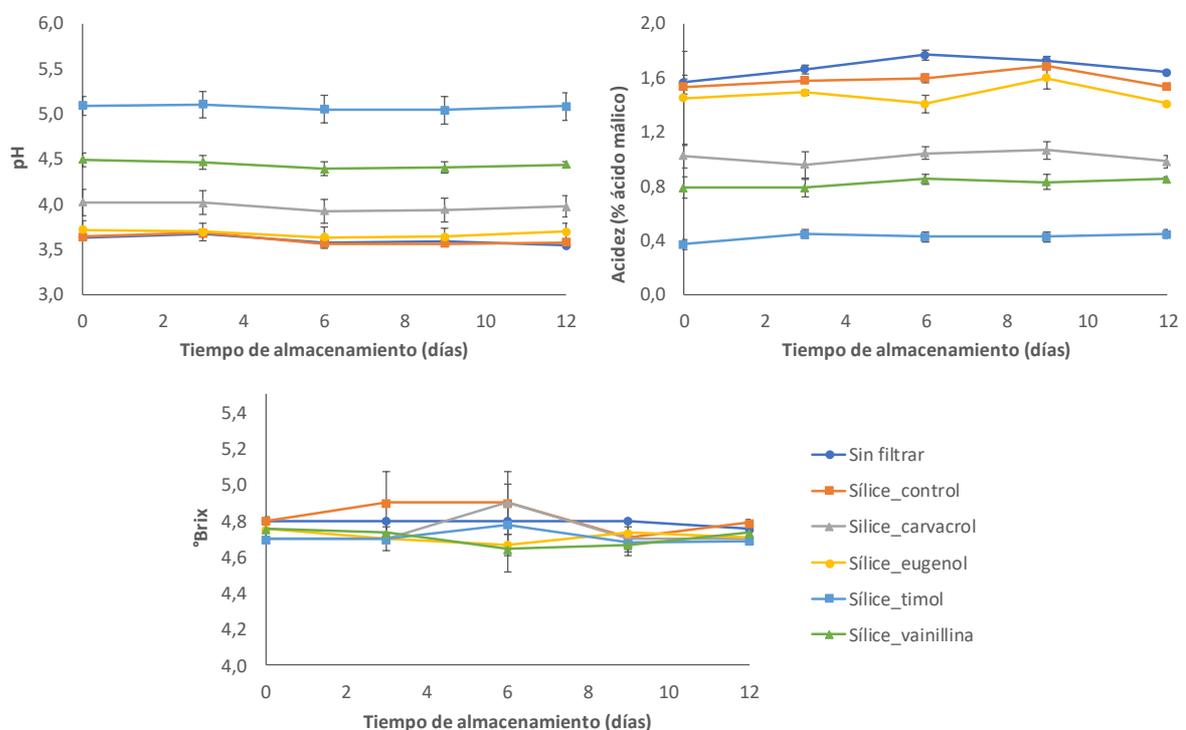
**FIGURA 2.** Recuentos microbiológicos de aerobios mesófilos, psicrófilos y mohos y levaduras de zumo de manzana fresco antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de partículas de sílice no funcionalizadas (sílice control) y funcionalizadas con componentes de aceites esenciales, a lo largo del almacenamiento en refrigeración (valores promedio y desviación estándar, n=3).

### 3.3.2. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

En la Figura 3 se muestra la evolución de los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez y °Brix) del zumo de manzana pasteurizado mediante el proceso de filtración, durante los 12 días de almacenamiento en refrigeración.

En general, los valores de pH se mantuvieron estables a lo largo del periodo de estudio para todas las muestras. El zumo no filtrado presentó un valor de pH promedio de 3,6, obteniéndose valores similares para el zumo filtrado a través de la sílice no funcionalizada y la sílice funcionalizada con eugenol (grupos homogéneos, intervalo de confianza 95%). Sin embargo,

para los zumos filtrados con el resto de soportes se observaron diferencias significativas. Para el zumo tratado con el carvacrol inmovilizado se observó un ligero incremento del pH hasta valores cercanos a 4, manteniéndose dentro del rango de pH normal para el zumo de manzana (inferior a pH 4). El filtrado con las partículas funcionalizadas con vainillina y el timol resultaron en un incremento mayor del pH con valores promedio de 4,4 y 5,1 para la vainillina y el timol, respectivamente. Ambos valores se sitúan fuera del rango de pH característico del zumo de manzana, lo que podría conllevar una percepción del sabor distinta y, en consecuencia, una disminución en la aceptabilidad por parte del consumidor. Dicha variación puede ser debida a la liberación parcial de los componentes bioactivos inmovilizados, como consecuencia del incorrecto proceso de funcionalización y lavado de los elementos de filtración, como se comentará más adelante.



**FIGURA 3.** Valores de pH, acidez (% ácido málico) y °Brix de zumo de manzana fresco antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de partículas de sílice no funcionalizadas (sílice control) y funcionalizadas con componentes de aceites esenciales, a lo largo del almacenamiento en refrigeración (valores promedio y desviación estándar, n=3).

Para la acidez, el factor 'filtrado' tuvo un efecto significativo sobre los valores de porcentaje de ácido málico. El factor 'tiempo de refrigeración' no afectó significativamente, puesto que la acidez se mantuvo estable durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración. El zumo sin filtrar, el zumo filtrado a través de las partículas control y el filtrado con eugenol mostraron valores de acidez similares, confirmando de nuevo que el proceso de filtración con las micropartículas de sílice desnudas no afecta a las propiedades fisicoquímicas

del alimento. Sin embargo, el filtrado a través del resto de los soportes funcionalizados con los componentes de aceites esenciales, excepto el eugenol, modificó los valores de acidez de forma significativa, produciendo un descenso más o menos pronunciado de la acidez. Esto concuerda con los valores de pH obtenidos, ya que el zumo filtrado con eugenol inmovilizado mantuvo un pH similar al del zumo fresco mientras que el zumo tratado con el resto de soportes funcionalizados presentó valores de pH por encima de los valores normales.

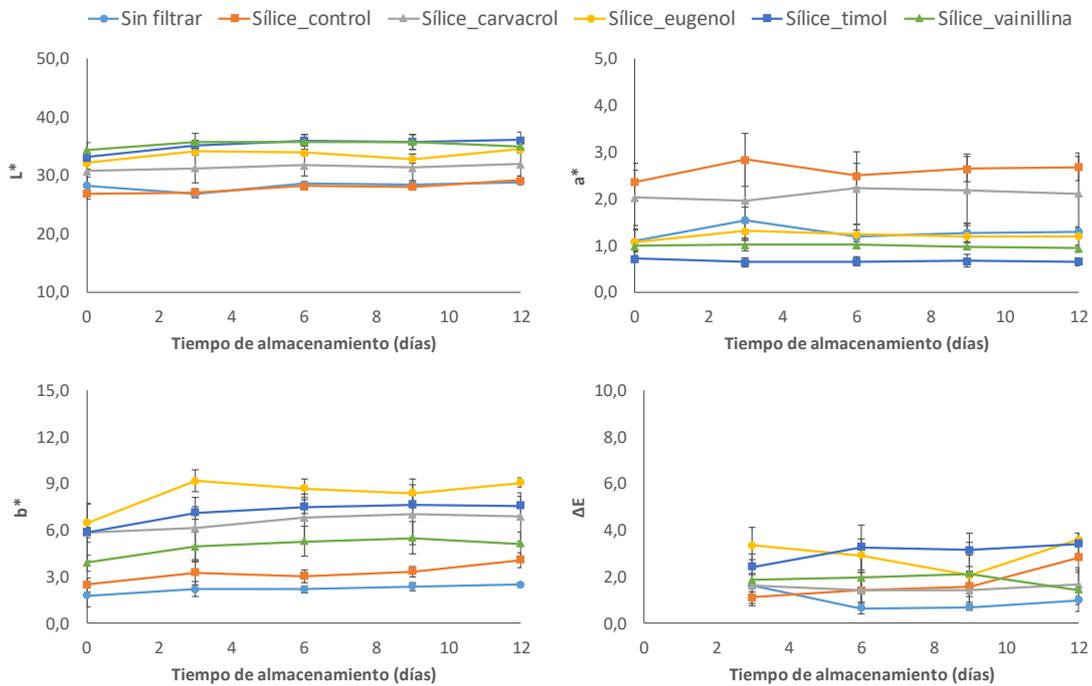
En el caso de los sólidos solubles, los valores de las diferentes muestras se mantuvieron estables a lo largo de la vida útil del zumo y las diferencias observadas entre las muestras se deben al proceso de filtración a través de los compuestos bioactivos inmovilizados. El zumo no filtrado y el zumo filtrado con la sílice control mostraron valores promedio de °Brix de 4,8, mientras que las muestras filtradas con los soportes funcionalizados presentaron valores ligeramente inferiores (4,7).

El Real Decreto 1518/2007 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que recoge los parámetros mínimos de calidad para zumos de frutas, establece como niveles adecuados para el zumo de manzana valores de 10 °Brix y 0.23-0.78 % ácido málico. En este estudio se obtuvo una concentración de sólidos solubles inferior, que puede ser debido a la variedad y estado de madurez de la fruta durante la preparación del zumo. Respecto a la acidez, se obtuvieron valores dentro del rango adecuado durante todo el periodo de estudio.

El tratamiento de zumos de frutas mediante tecnologías de filtración, como la ultrafiltración, ha mostrado en estudios previos que no afecta significativamente a los parámetros fisicoquímicos estudiados (Ortega-Rivas et al., 1998), lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo con las partículas de sílice control y las partículas funcionalizadas con eugenol. La aplicación de otros tratamientos no térmicos como los pulsos eléctricos son capaces de preservar el pH, acidez y compuestos volátiles en mayor medida que el tratamiento térmico (Aguilar-Rosas et al., 2007).

Además de los tres parámetros anteriores, se estudió el color como parámetro fisicoquímico que define la calidad del zumo, ya que es el primer atributo sensorial que percibe el consumidor. La Figura 4 muestra la evolución de los parámetros de color del zumo de manzana durante el almacenamiento. En general, se observaron diferencias en las coordenadas de color entre el zumo no tratado y el zumo filtrado a través las distintas micropartículas de sílice. Los cambios más importantes se produjeron en las coordenadas cromáticas  $a^*$  y  $b^*$ , revelando así los cambios de color de las muestras tras el filtrado. Para la coordenada  $a^*$ , no se observaron diferencias significativas entre las muestras de zumo sin filtrar y el zumo filtrado con eugenol y vainillina inmovilizados. El zumo filtrado con las partículas funcionalizadas con timol mostró valores de  $a^*$  inferiores, mientras que los que habían sido filtrados a través de las partículas no funcionalizadas y funcionalizadas con carvacrol mostraron valores positivos más altos. Para la coordenada  $b^*$ , los factores 'tiempo' y 'tipo de partícula de filtración' fueron significativos. El zumo no filtrado presentó el valor de  $b^*$  más bajo y se observó un incremento del color

amarillo para las muestras filtradas con las partículas de sílice (control<vainillina<carvacrol< timol<eugenol).



**FIGURA 4.** Coordenadas CIELab (luminosidad ( $L^*$ ),  $a^*$ ,  $b^*$ , diferencia de color ( $\Delta E$ ) de zumo de manzana fresco antes de ser filtrado y tras el filtrado a través de un lecho de partículas de sílice no funcionalizadas (sílice control) y funcionalizadas con componentes de aceites esenciales, a lo largo del almacenamiento en refrigeración (valores promedio y desviación estándar,  $n=3$ ).

Las diferencias en los atributos cromáticos tras el tratamiento de filtración son menores que con los tratamientos térmicos, los cuales producen un descenso en la calidad sensorial del zumo por pardeamiento, ya que al aumentar la temperatura aumenta la coordenada cromática  $a^*$  (Ibarz-martínez et al., 2010). Los pulsos eléctricos también han demostrado mantener el color del zumo de manzana tras el tratamiento y a lo largo de la vida útil, resultando en el mantenimiento de las coordenadas cromáticas (Evrendilek et al., 2000).

### 3.4. Lixiviado de los compuestos bioactivos inmovilizados

Además de la determinación de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de calidad del zumo, se llevó a cabo la evaluación del posible lixiviado de los compuestos bioactivos inmovilizados mediante cromatografía de gases. La Tabla 2 muestra la cantidad de compuestos bioactivos liberados y el porcentaje relativo de compuestos liberados en el efluente tras la filtración del zumo a través del lecho de partículas. En la Tabla 2 se puede ver que se produjo un leve lixiviado de los compuestos inmovilizados a la matriz alimentaria durante el proceso de filtración, excepto para el zumo filtrado con el eugenol inmovilizado donde no se detectó la molécula bioactiva (valor por

debajo del límite de detección de 1 ppm). Los compuestos que se liberaron en mayor cantidad fueron el timol y la vainillina, pudiendo afectar a las propiedades del zumo, lo que se corresponde con los resultados obtenidos para los parámetros fisicoquímicos de pH y acidez, comentados anteriormente.

Si bien es cierto que se produjo una cierta liberación de los compuestos bioactivos, el nivel de lixiviado resultó en un porcentaje de liberación de los compuestos muy bajo, teniendo en cuenta la cantidad total de moléculas inmovilizadas en los soportes (resultados de TGA en Tabla 1). De esta forma, se confirma el proceso de inmovilización covalente que mantiene anclados los compuestos bioactivos a la superficie de las partículas de sílice y, por tanto, se preservaría la integridad de los soportes como elementos de filtración para su uso repetido en el tratamiento de alimentos líquidos. No obstante, el proceso de inmovilización debe ser optimizado para garantizar la liberación cero de las moléculas ancladas.

**TABLA 2.** Lixiviado de los componentes de aceites esenciales (mg) y porcentaje relativo de lixiviado tras la filtración de 100 mL de zumo de manzana a través de los soportes de sílice funcionalizados (valores medios y desviación estándar, n=3).

<b>Soporte</b>	<b>Compuesto liberado (mg)</b>	<b>% compuesto liberado</b>
<i>Sílice_carvacrol</i>	0,63±0,18	2,5±0,7%
<i>Sílice_eugenol</i>	nd	nd
<i>Sílice_timol</i>	1,47±0,68	5,9±2,7%
<i>Sílice_vainillina</i>	1,68±1,30	0,6±0,4%

nd: no detectado

#### **4. CONCLUSIONES**

La filtración de zumo de manzana a través de micropartículas de sílice funcionalizadas con componentes de aceites esenciales ha permitido reducir en al menos 5 órdenes logarítmicos la población de *E. coli*, tomado como microorganismo patógeno de referencia, pudiendo ser considerado un método de pasteurización adecuado para garantizar la seguridad del zumo. Además, esta tecnología ha permitido asegurar la estabilidad microbiológica del producto, eliminando completamente la microbiota típica del zumo.

El proceso de filtración ha tenido una influencia variable sobre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del zumo a lo largo de su almacenamiento en refrigeración, dependiendo de la molécula bioactiva inmovilizada. El uso de las partículas funcionalizadas con eugenol ha resultado ser el más adecuado, ya que ha eliminado completamente la carga microbiana del producto sin afectar a los parámetros fisicoquímicos y con liberación cero del compuesto inmovilizado. Sería necesario completar el

estudio con un análisis organoléptico que confirme que no hay influencia de la filtración con este compuesto, sobre la percepción sensorial del zumo.

Este estudio demuestra que el sistema de pasteurización desarrollado tiene un amplio potencial en el tratamiento de zumos de frutas en la industria, el cual podría ser también aplicado a otros alimentos líquidos. Sin embargo, antes de plantear su aplicación a escala industrial es necesario optimizar la metodología para disminuir al máximo la influencia del tratamiento sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del alimento y garantizar la seguridad del producto.

## Referencias

- Aguilar-Rosas, S.F.; Ballinas-Casarrubias, M.L.; Nevarez-Moorillon, G.V.; Martin-Belloso, O.; Ortega-Rivas, E. 2007. Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, **83(1)**:41–46.
- Ahmed, J.; Ramaswamy, H.S. 2003. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. *Journal of Dairy Science*, **86(5)**:1535–1540.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*, **94(3)**:223–253.
- Chemat, F.; Zill-E-Huma; Khan, M.K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, **18(4)**:813–835.
- Choi, L.H.; Nielsen, S.S. 2005. The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*, **28(1)**: 13–29.
- Dorman, H.J.; Deans, S.G. 2008. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88(2)**: 308–316.
- Devi, R.; Alemayehu, E.; Singh, V.; Kumar, A.; Mengistie, E. 2008. Removal of fluoride, arsenic and coliform bacteria by modified homemade filter media from drinking water. *Bioresource technology*, **99(7)**:2269–2274.
- EUROPEAS, LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES. 2005. Reglamento (CE) N° 2073/2005 de La Comisión de 15 de Noviembre de 2005 Relativo a Los Criterios Microbiológicos Aplicables a Los Productos Alimenticios. *Diario Oficial de Unión Europea* 338:1–26.
- Evrendilek, G.A.; Jin, Z.T.; Ruhlman, K.T.; Qiu, X.; Zhang, Q.H. 2000. Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **1(1)**:77–86.
- Ferrario, M.; Guerrero, S. 2016. Effect of a continuous flow-through pulsed light system combined with ultrasound on microbial survivability, color and sensory shelf life of apple juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **34**:214–224.
- Friedman, M.; Henika, P.R.; Levin, C.E.; Mandrell, R.E. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(19)**:6042–6048.
- Fuenmayor, C.A.; Lemma, S.M.; Mannino, S.; Mimmo, T.; Scampicchio, M. 2014. Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, **122**:110–116.
- García, R.; Palou, E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **2(2)**: 41–51.
- Gialleli, A.I.; Bekatorou, A.; Kanellaki, M.; Nigam, P.; Koutinas, A.A. 2016. Apple juice preservation through microbial adsorption by nano/micro-tubular cellulose. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **33**:416–421.
- Gobierno de España. 2007. REAL DECRETO 1518/2007, de 16 de Noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. *Boletín Oficial del Estado (BOE)* 294: 50632–39.
- Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. *Health Protection Agency*, [en línea]. Londres, 2009. Dirección URL:

- <[http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714111812/http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1259151921557](http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714111812/http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557)> [Consulta 23 Jul. 2018]
- Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, **3**:12.
- Ibarz-martínez, R.; Pagán, J.; Garza, S.; Ibarz, A. 2010. Pardeamiento de zumos clarificados de limón tratados a altas temperaturas [Browning of clarified lemon juices treated at high temperatures]. *Scientia Agropecuaria*, **1**:07-20.
- Janatova, A.; Bernardos, A.; Smid, J.; Frankova, A.; Lhotka, M.; Kourimská, L.; Kloucek, P. 2015. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. *Industrial Crops and Products*, **67**:216–220.
- Jiao, B.; Cassano, A.; Drioli, E. 2004. Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: A Review. *Journal of Food Engineering*, **63**(3):303–324.
- Kiskó, G.; Roller, S. 2005. Carvacrol and p-cymene inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiology*, **5**: 1–9.
- Kumar Tyagi, A.; Bukvicki, D.; Gottardi, D.; Tabanelli, G.; Montanari, C.; Malik, A.; Guerzoni, M.E. 2014. Eucalyptus essential oil as a natural food preservative: in vivo and in vitro antiyeast potential. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation.
- Lipnizki, F. 2010. Membrane processes for the production of bulk fermentation products. *Membrane Technology*. Elsevier, Ltd., 121–153.
- Maresca, P.; Donsì, F.; Ferrari, G. 2011. Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *Journal of Food Engineering*, **104**(3): 364–372.
- Massini, L.; Rico, D.; Martin-Diana, A.B. 2017. Fruit juices: extraction, composition, quality and analysis *Quality Attributes of Apple Juice: Role and Effect of Phenolic Compounds*. Elsevier, Inc., 45-57.
- Morris, C.; Brody, A.L.; Wicker, L. 2007. Non-thermal food processing / preservation technologies : a review with packaging implications and science. *Packaging Technology and Science*, **20**:275–286.
- Nielsen, H.B.; Sonne, A.; Grunert, K.G.; Banati, D.; Pollák-Tóth, A.; Lakner, Z.; Olsen, N.V.; Zontar, T.P.; Peterman, M. 2009. Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production. *Appetite*, **52**(1):115–126.
- Ortega-Rivas, E.; Zárate-Rodríguez, E.; Barbosa-Cánovas, G.V. 1998. Apple juice pasteurization using ultrafiltration and pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, **76**(4):193–198.
- Papafotopoulou-Patrinou, E.; Gialleli, A.I.; Kallis, M.; Plessas, S.; Alexopoulos, A.; Mantzourani, I.; Bezirtzoglou, E.; Bekatorou, A.; Kanellaki, M.; Koutinas, A.A. 2016. Microbiological Assessment of tubular cellulose filters used for liquid foods cold pasteurization. *LWT - Food Science and Technology*, **67**:151–158.
- Ribes, S.; Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, E.; Fuentes, A.; Talens, P.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J.M. 2017. Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: application in strawberry jam. *Food Control*, **81**:181–188.
- Ros-Lis, J.V.; Bernardos, A.; Pérez, E.; Barat, J.M.; Martínez-Máñez, R. 2018. Functionalized silica nanomaterials as a new tool for new industrial applications. *Impact of Nanoscience in the Food Industry*. Elsevier, Inc., 165–196.
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, E.; 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.
- Suntres, Z.E.; Coccimiglio, J.; Alipour, M. 2015. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**(3):304–318.