



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Susana Pascual De La Cruz**

**Determinación de la capacidad antimicrobiana de películas biodegradables enriquecidas con metalo-compuestos iónicos de Mn(III) para su aplicación como envase alimentario**

Determinación da capacidade antimicrobiana de películas biodegradables enriquecidas con metalo-compostos iónicos de Mn(III) para súa aplicación como envase alimentario

Determination of the antimicrobial capacity of biodegradable films enriched with ionic Mn(III) metal compounds for application as food packaging.

Traballo Fin de Grao

*06/2024*

# Índice

1	Introducción.....	9
1.1	Seguridad alimentaria.....	9
1.2	Contaminación bacteriana en la industria láctea.....	9
1.3	Principales bacterias patógenas en la industria láctea.....	10
1.3.1	Bacterias gramnegativas.....	10
1.3.1.1	<i>Escherichia coli</i> STEC O157:H7.....	10
1.3.1.2	<i>Salmonella enterica</i> .....	11
1.3.2	Bacterias grampositivas.....	12
1.3.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
1.3.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
1.4	Envases de alimentos.....	13
1.4.1	Envases activos.....	13
1.4.2	Tipos de envases activos.....	14
1.4.2.1	Envases activos eliminadores.....	14
1.4.2.2	Envases activos emisores.....	14
1.4.3	Envases comestibles.....	14
1.4.3.1	Ventajas de los envases comestibles.....	14
1.4.3.2	Componentes de los envases comestibles.....	15
1.4.3.2.1	Quitosano.....	15
1.4.4	Envases antimicrobianos a base de quitosano.....	16
1.4.5	Antioxidantes como compuesto activos para el enriquecimiento de envases antimicrobianos a base de quitosano.....	17
1.5	Complejos manganosalen.....	18
2	Objetivos e hipótesis.....	19
3	Materiales y Métodos.....	20

3.1	Compuesto de estudio.....	20
3.2	Cepas empleadas en este trabajo .....	20
3.2.1	Crecimiento de cepas en medios de cultivo y aislamiento de colonias ..	21
3.2.2	Preparación del inóculo bacteriano.....	21
3.2.3	Ajuste de la densidad óptica y preparación de las diluciones.....	21
3.2.4	Estimación de la concentración bacteriana en la suspensión bacteriana de partida.....	22
3.3	Evaluación de la capacidad antimicrobiana del compuesto manganosalen sobre las cepas objeto de estudio .....	22
3.3.1	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	22
3.3.2	Difusión en agar mediante aplicación en gota.....	23
3.3.2.1	Estudio de la sinergia del Mn-salen y el quitosano .....	24
3.3.3	Ensayo de cinética de muerte bacteriana: “Time kill assay” .....	25
3.3.3.1	Análisis estadístico y estimación de la reducción logarítmica .....	25
4	Resultados.....	26
4.1	Crecimiento de cepas en medios de cultivo y aislamiento de colonias para obtener cultivos puros.....	26
4.2	CMIs de Mn-salen para cada una de las cepas estudiadas .....	27
4.3	Efecto antimicrobiano del compuesto Mn-salen sobre cada una de las cepas determinado mediante difusión en agar mediante aplicación en gota .....	27
4.4	Efecto del compuesto Mn-salen sobre el crecimiento de cada cepa en estudio mediante “Time kill assay”.....	31
5	Discusión y perspectivas .....	36
6	Conclusiones.....	40
7	Anexos.....	42
8	Referencias bibliográficas .....	45

# Índice de acrónimos

Aw	Actividad del agua
CAT	Catalasa
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DE	Desviación estándar
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades ( <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ( <i>European Food Safety Authority</i> )
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana ( <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )
GPx	Glutation peroxidasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
LB	Luria Bertani
LOD	Límite de detección ( <i>Limit of detection</i> )
LREC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia coli</i>
MH	Muller Hinton
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OD	Densidad óptica ( <i>Optical Density</i> )
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SE	Enterotoxinas estafilocócicas ( <i>Staphylococcal enterotoxins</i> )
SFP	Intoxicación alimentaria por estafilococos ( <i>Staphylococcal Food Poisoning</i> )
SOD	Superóxidodismutasa
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de toxinas Shiga ( <i>Shiga toxin-producing Escherichia coli</i> )
TSA	Tryptone Soy Agar
UFC	Unidades formadoras de colonias

# Resumen

La OMS estima que los alimentos contaminados afectan a 600 millones de personas y causan 420.000 muertes anuales. En este contexto, la contaminación bacteriana en productos lácteos representa una de las mayores amenazas para la seguridad alimentaria con brotes asociados a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Con el objetivo de contribuir a la seguridad alimentaria este trabajo de Fin de Grado tuvo como objetivo evaluar la capacidad antimicrobiana de un complejo manganosalen ( $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$ ) con el fin de introducirlo en envases comestibles biodegradables.

Para ello se realizaron distintos ensayos incluyendo, la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), pruebas de difusión en agar mediante aplicación en gota, tanto del compuesto individual como combinado con el quitosano a distintas concentraciones, y ensayo de cinética de muerte bacteriana utilizando cepas de las especies mencionadas.

La CMI de  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$  fue de 0,469 mg/mL (*S. aureus* y *S. enterica*), 1,094 mg/mL (STEC) y 1,25 mg/mL (*L. monocytogenes*). Los ensayos de difusión mostraron halos de inhibición a concentraciones iguales o superiores a 5 mg/mL en las cuatro cepas evaluadas, siendo *S. aureus* la más resistente al complejo. La combinación de  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$  con quitosano no evidenció efecto sinérgico, observándose que la inhibición correspondía principalmente al quitosano. El crecimiento bacteriano en presencia de 5 mg/mL del complejo disminuyó significativamente en comparación con el control durante las 3, 6 y 24 h de estudio. Se observó efecto bactericida (reducción igual o superior a 3 log) a las 6 h en todas las cepas, excepto en *S. enterica*, donde se alcanzó a las 24 h.

Los resultados muestran una actividad antimicrobiana dependiente de la cepa o especie, y sugieren que el complejo es un agente prometedor para su incorporación en matrices alimentarias. No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar su eficacia en condiciones reales.

**Palabras claves:** *E. coli* O157:H7; *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, capacidad antimicrobiana, complejo manganosalen.

## Resumo

A OMS estima que os alimentos contaminados afectan a 600 millóns de persoas e causan 420.000 mortes anuais. Neste contexto, a contaminación bacteriana en produtos lácteos representa unha das maiores ameazas para a seguridade alimentaria con gromos asociados a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Co obxectivo de contribuír á seguridade alimentaria, este traballo de Fin de Grao tivo como obxectivo avaliar a capacidade antimicrobiana dun complexo manganosalen ( $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$ ) co fin de introduci-lo en envases comestibles biodegradables.

Para iso realizáronse distintos ensaios, incluíndo a determinación da concentración mínima inhibitoria (CMI), probas de difusión en agar mediante aplicación en gota, tanto do composto individual como combinado co quitosano a distintas concentracións, e ensaio de cinética de morte bacteriana empregando cepas das especies mencionadas.

A CMI de  $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$  foi de 0,469 mg/mL (*S. aureus* e *S. enterica*), 1,094 mg/mL (STEC) e 1,25 mg/mL (*L. monocytogenes*). Os ensaios de difusión mostraron halos de inhibición a concentracións iguais ou superiores a 5 mg/mL nas catro cepas avaliadas, sendo *S. aureus* a máis resistente ao complexo. A combinación de  $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$  con quitosano non evidenciou efecto sinérxico, observándose que a inhibición correspondía principalmente ao quitosano. O crecemento bacteriano en presenza de 5 mg/mL do complexo diminuíu significativamente en comparación co control durante as 3, 6 e 24 h de estudo. Observouse efecto bactericida (redución igual o superior a 3 log) ás 6 h en todas as cepas, agás en *S. enterica*, onde se alcanzou ás 24 h.

Os resultados mostran unha actividade antimicrobiana dependente da cepa ou especie, e suxiren que o complexo é un axente prometedor para a súa incorporación en matrices alimentarias. Non obstante, son necesarios estudos adicionais para confirmar a súa eficacia en condicións reais.

**Palabras claves:** *E. coli* O157:H7; *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, capacidade antimicrobiana, complexo manganosalen.

# Abstract

The WHO estimates that contaminated food affects 600 million people and causes 420,000 deaths annually. In this context, bacterial contamination in dairy products represents one of the greatest threats to food safety with outbreaks linked to *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.

With the aim of contributing to food safety, this Final Degree Project aimed to evaluate the antimicrobial capacity of a manganosalen complex ( $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$ ) in order to introduce it into biodegradable edible packaging.

To this end, different tests were carried out, including the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), agar diffusion tests by droplet application, both of the individual compound and combined with chitosan at different concentrations, and bacterial death kinetics test using strains of the aforementioned species.

The MIC of  $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$  was 0.469 mg/mL (*S. aureus* and *S. enterica*), 1.094 mg/mL (STEC) and 1.25 mg/mL (*L. monocytogenes*). Diffusion assays showed inhibition halos at concentrations equal to or greater than 5 mg/mL in the four strains evaluated, with *S. aureus* being the most resistant to the complex. The combination of  $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$  with chitosan did not show a synergistic effect, and it was observed that the inhibition corresponded mainly to chitosan. Bacterial growth in the presence of 5 mg/mL of the complex decreased significantly compared to the control during the 3, 6 and 24 h study. Bactericidal effect (reduction equal to or greater than 3 log) was observed at 6 h in all strains, except in *S. enterica*, where it was reached at 24 h.

The results show an antimicrobial activity dependent on the strain or species, and suggest that the complex is a promising agent for incorporation into food matrices. However, additional studies are required to confirm its efficacy in real conditions.

**Keywords:** *E. coli* O157:H7; *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial capacity, manganosalen complex.

# Resumen gráfico

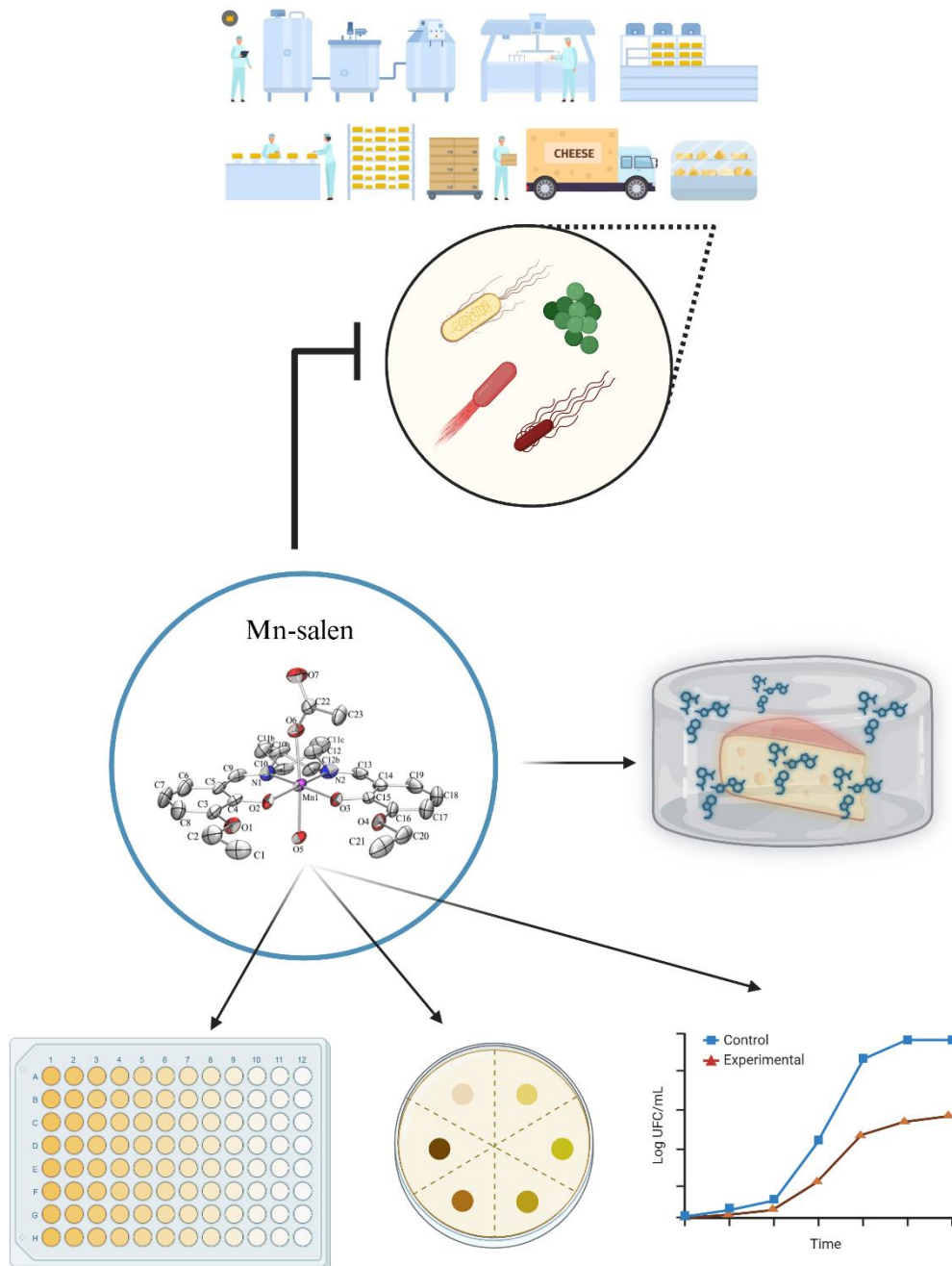


Figura 1: Resumen gráfico: Estudio de la capacidad antimicrobiana de un complejo manganosalen y su posible efecto sinérgico en combinación con quitosano, frente a bacterias patógenas frecuentemente asociadas a la contaminación de productos lácteos.

# 1 Introducción

## 1.1 Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria y el suministro de una nutrición sostenible son prioridad en la agenda mundial y temas clave dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas (Garvey, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el consumo de alimentos contaminados afecta aproximadamente a 600 millones de personas al año, causando alrededor de 420.000 muertes. Así mismo, las enfermedades transmitidas por los alimentos resultan en costes económicos significativos, incluidos los gastos de atención médica, la pérdida de productividad y los gastos relacionados con su retirada del mercado (Kim *et al.*, 2025).

El término contaminante incluye cualquier materia no deseada que se encuentra en el producto y que repercute negativamente en su calidad (Kamboj *et al.*, 2020). La contaminación de los alimentos puede ser de origen químico o biológico. En concreto la contaminación biológica incluye microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos, a menudo con carácter patógeno (Garvey, 2019).

## 1.2 Contaminación bacteriana en la industria láctea

Los quesos, a pesar de caracterizarse como productos seguros para el consumo, han estado implicados en diversos brotes de origen alimentario asociados con síntomas graves y una alta tasa de mortalidad (Little *et al.*, 2008). Al ser una matriz alimentaria rica en grasas y proteínas, se convierte en el escenario idóneo para el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos patógenos (Ferraz *et al.*, 2024).

Según datos del reporte anual de zoonosis de la Unión Europea “*One Health*”, en 2023 se registraron 392 casos de intoxicaciones y 30 hospitalizaciones por el consumo de productos lácteos contaminados. De estos, 19 fueron causados por bacterias zoonóticas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), mientras que 8 brotes fueron atribuidos a las enterotoxinas estafilocócicas (SE) secretadas por *Staphylococcus aureus* (EFSA & ECDC, 2024).

En líneas generales, el queso se puede elaborar a partir de leche cruda y leche tratada (pasteurizada o termizada). Los quesos elaborados a partir de leche cruda; leche de vaca, cabra, oveja u otros animales que no ha sido calentada a más de 40 °C ni sometida a

ningún tratamiento con el mismo efecto, se consideran microbiológicamente más susceptibles a la contaminación por microorganismos patógenos (EFSA, 2015). Por su parte, los elaborados a partir de leche pasteurizada (72 °C durante 15 segundos o 63 °C durante 30 minutos) o termizada (57–68 °C durante al menos 15 segundos) no están extensos de riesgos, ya que durante las etapas de procesado pueden sufrir recontaminación (Little *et al.*, 2008).

Un estudio realizado por la OMS (1995) en Europa indicó que el 25% de los brotes transmitidos por los alimentos podían atribuirse a la recontaminación. Entre los factores claves destacan la higiene insuficiente (1,6%), la contaminación cruzada (3,6%), el procesamiento o almacenamiento en locales inadecuados (4,2%), los equipos contaminados (5,7%) y la contaminación por personal (9,2%) (Reij & Den Aantrekker, 2004).

Para añadir un desafío adicional, las bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas, definidas como comunidades de microorganismos que se adhieren a las superficies y son un modo prevalente de crecimiento de estos microorganismos en la naturaleza. (Shi & Zhu, 2009). En la industria láctea, las biopelículas plantean desafíos significativos; *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se encuentran comúnmente en las superficies y equipos que entran en contacto con los productos lácteos, resistiendo a los procesos de limpieza y desinfección que se llevan a cabo en las plantas lácteas (Alsuwat *et al.*, 2025).

### 1.3 Principales bacterias patógenas en la industria láctea

#### 1.3.1 Bacterias gramnegativas

##### 1.3.1.1 *Escherichia coli* STEC O157:H7

*Escherichia coli* es un grupo genéticamente heterogéneo formado por bacterias cuyos miembros suelen ser no patógenos y forman parte de la microflora normal del tracto intestinal de humanos y animales. Sin embargo, ciertos subconjuntos de esta especie bacteriana han adquirido genes que les permiten causar enfermedades intestinales o extraintestinales (Gyles, 2007).

*Escherichia coli* productora de toxinas Shiga (STEC) se refiere a aquellas cepas capaces de producir al menos 1 miembro de una clase de citotoxinas potentes llamadas toxinas Shiga, sx1 y sx2 (Gyles, 2007). Dentro del patotipo STEC, el serotipo O157:H7, se

reconoció por primera vez en 1982 como un patógeno humano asociado con brotes de diarrea sanguinolenta y con casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (SUH) (Lim *et al.*, 2010).

*E. coli* O157:H7 dispone de rasgos que favorecen su proliferación y persistencia. Tiene una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C, una óptima de 37 °C y una máxima de 44 °C (Fox *et al.*, 2017). Aunque no es resistente a la temperatura de pasteurización, tiene capacidad para sobrevivir a temperaturas más bajas que las adecuadas para su crecimiento, pudiendo perdurar durante varias semanas o meses en condiciones de congelación (Gyles, 2007).

A diferencia de los otros serotipos, O157:H7 es tolerante a niveles de pH bajos, por lo que puede persistir durante largos periodos de tiempo en productos ácidos o fermentados. Un pH alrededor de 4,5 y una actividad del agua ( $a_w$ ) de 0,93 proporcionan condiciones óptimas para su desarrollo (De Oliveira *et al.*, 2017; Fox *et al.*, 2017).

Hoy en día existen otros serotipos de STEC como O26, O103, O111 y O145 que están en auge y se asocian con brotes alimentarios y enfermedades graves (EFSA & ECDC, 2021).

#### 1.3.1.2 *Salmonella enterica*

El género *Salmonella* agrupa dos grandes especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Hasta el momento, se han descrito más de 2600 serovares pertenecientes a *S. enterica* en todo el mundo capaces de causar enfermedades tanto en humanos como en animales (Jajere, 2019). La salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más comunes, con alrededor de 93,8 millones de enfermedades transmitidas por los alimentos y 155.000 muertes al año (Heredia & García, 2018).

La mayoría de los serotipos prosperan y crecen en un rango de temperatura entre 5-47 °C con un óptimo entre 32-35 °C. Sin embargo, algunos serotipos pueden crecer a una temperatura mucho más amplia, tan baja como 2 °C o tan alta como 54 °C (Jajere, 2019).

En cuanto a valores de pH y actividad del agua necesarios para su crecimiento, se puede decir que se desarrollan en ambientes cuyo pH está en torno a 4 y 9, con un rango óptimo entre 6,5 y 7,5, conjunto con una  $a_w$  entre 0,99 y 0,94 (Jajere, 2019).

### 1.3.2 Bacterias grampositivas

#### 1.3.2.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es un patógeno que se ha visto implicado en la última década como organismo causante de varios brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. La listeriosis, con una tasa de mortalidad de alrededor del 24%, afecta principalmente a mujeres embarazadas, y a personas inmunodeprimidas, provocando aborto, muerte neonatal, septicemia y meningitis (Farber & Peterkin, 1991).

*L. monocytogenes* posee una notable capacidad para sobrevivir en una impresionante diversidad de condiciones. Por un lado, se sabe que la bacteria es capaz de crecer por debajo de los 7 °C, incluso algunas cepas pueden sobrevivir a temperaturas inferiores al punto de congelación. Por otro lado, también es capaz de multiplicarse a temperaturas de hasta 45 °C, con un crecimiento óptimo entre 30 y 37 °C (Gérard *et al.*, 2018).

Entre sus otras características, destaca su elevada tolerancia a un amplio rango de pH, pudiendo crecer en ambientes con un pH entre 4,6 y 9,5. Cabe destacar que dicha tolerancia está muy relacionada con la actividad del agua, pues la bacteria no es capaz de crecer a un  $a_w$  inferior a 0,92 (Gérard *et al.*, 2018).

#### 1.3.2.2 *Staphylococcus aureus*

La intoxicación alimentaria por estafilococos (SFP) es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más comunes como resultado de la ingestión de enterotoxinas estafilocócicas preformadas en los alimentos por cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* (Baran *et al.*, 2017).

Esta bacteria, posee características que permiten su crecimiento y supervivencia en el entorno de los alimentos. Es un organismo mesófilo con una temperatura óptima de crecimiento en el rango de 37 °C a 40 °C. La temperatura mínima para su crecimiento es de aproximadamente 7,0 °C y una temperatura superior a 46 °C no es aceptable para la mayoría de las cepas. Las enterotoxinas se producen en un rango de temperatura más estrecho, con una temperatura óptima entre 40-45 °C. Es importante destacar, que las enterotoxinas pueden resistir procesos de inactivación como la pasteurización (Baran *et al.*, 2017).

En cuanto al pH, *S. aureus* es capaz de crecer en un rango de 4,0-9,8, con un óptimo de 6-7. Para la producción de enterotoxinas, necesita un pH mínimo de 5,0 y un óptimo de 7,0 (Baran *et al.*, 2017).

Un rasgo característico que distingue a *S. aureus* de otras bacterias patógenas es su alta tolerancia a bajos valores de  $a_w$ . En general, la actividad mínima de agua para su crecimiento está en el rango de 0,83 a 0,86. Con respecto a los requerimientos de producción de enterotoxinas, los valores de actividad hídrica para su producción se encuentran en su mayoría en el mismo rango que para el crecimiento del patógeno (Baran *et al.*, 2017).

#### 1.4 Envases de alimentos

Tradicionalmente, los envases han tenido una función de barrera pasiva, encargado de mantener la forma, el color y el sabor del producto, protegiéndolo de las impurezas mecánicas, microbiológicas, físicas y químicas, y evitando la pérdida de los ingredientes del producto o la entrada de sustancias indeseables del exterior (Wyrwa & Barska, 2017)

A pesar de proteger los alimentos de la contaminación externa, los envases tradicionales son incapaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas ya que no existe una interacción entre el envase y el producto (Wyrwa & Barska, 2017). Además, los materiales de embalaje utilizados por la industria láctea son a base de petróleo, no biodegradables y no totalmente reciclables, lo que actualmente representa un grave problema de contaminación (Ferraz *et al.*, 2024).

Esta preocupación ha llevado a la industria a buscar soluciones alternativas que preserven la calidad y seguridad de los productos alimentarios, y en concreto de los productos lácteos, y prolonguen su vida útil. De esta forma, surgen los denominados envases activos.

##### 1.4.1 Envases activos

Un envase activo es una solución en la que interactúan el envase, el producto y el entorno. Se trata de sistemas que modifican activamente las condiciones de los alimentos envasados, provocan una prolongación de su sostenibilidad y, por tanto, de su vida útil, y garantizan o mejoran significativamente la seguridad microbiológica y/o las propiedades sensoriales, manteniendo al mismo tiempo su calidad (Wyrwa & Barska, 2017).

## 1.4.2 Tipos de envases activos

### 1.4.2.1 Envases activos eliminadores

Los envases eliminadores están diseñados para destruir componentes no deseados del medio ambiente dentro del empaque. No hay migración directa entre un eliminador y un producto, sino solo una mejora de las condiciones dentro del empaque, lo que prolonga la vida útil del producto. Dependiendo de la aplicación, puede estar asociado con la absorción de oxígeno, humedad, etileno o dióxido de carbono (Wyrwa & Barska, 2017).

### 1.4.2.2 Envases activos emisores

El segundo grupo de envases está formado por los emisores. El principio de funcionamiento de estos se basa en la liberación de sustancias deseadas que tienen un impacto positivo en los alimentos en el entorno del envasado.

Es por medio de emisores que se puede controlar la humedad dentro del empaque, inhibir la acción agentes nocivos (emisores de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y etanol) y prevenir el crecimiento bacteriano (antibacterianos). Por lo tanto, los emisores pueden ser sustancias aromáticas, aditivos alimentarios, ingredientes alimentarios, reguladores de la humedad y sustancias activas que evitan el crecimiento de microorganismos (Wyrwa & Barska, 2017).

Entre todas las estrategias de envasado activo, en esta sección nos centraremos en los envases comestibles con actividad antimicrobiana.

## 1.4.3 Envases comestibles

Un envase o película comestible es una capa delgada preformada, hecha de material comestible, que una vez formada se puede colocar sobre o entre los componentes alimenticios (Falguera *et al.*, 2011).

### 1.4.3.1 Ventajas de los envases comestibles

A diferencia de los plásticos convencionales no biodegradables, usados comúnmente en el envasado de alimentos y asociados a riesgos para la salud humana y el medio ambiente, los biopolímeros procedentes de fuentes naturales ofrecen una alternativa sostenible y segura debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y mínima toxicidad (Siciliano *et al.*, 2024).

### 1.4.3.2 Componentes de los envases comestibles

Los envases comestibles se fabrican utilizando biopolímeros alimentarios como base. Estos biopolímeros se pueden dividir en tres categorías: hidrocoloides (polisacáridos y proteínas), lípidos y compuestos (Siciliano *et al.*, 2024).

En comparación con los polímeros sintéticos los hidrocoloides poseen propiedades más ajustables, que pueden regularse o verse influenciadas por varios factores (humedad relativa, temperatura, fuerza iónica, pH, etc.) Al ser materiales higroscópicos, los hidrocoloides absorben la humedad y se hinchan. Con el aumento de la humedad relativa y la temperatura, pueden facilitar el transporte y la tasa de liberación de los compuestos activos hacia la superficie de los alimentos (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

Además, su capacidad de barrera a los gases permite retardar la pérdida de vapores orgánicos (compuestos aromáticos) durante el almacenamiento y prevenir la formación de disolventes en los alimentos, lo que podría provocar toxicidad o pérdida de calidad (Cazón *et al.*, 2017).

#### 1.4.3.2.1 Quitosano

Dentro de la amplia gama de polisacáridos existentes para el diseño de envases comestibles, el quitosano ha atraído la atención como un potencial conservante de alimentos debido a su actividad antimicrobiana contra una amplia gama de hongos, levaduras y bacterias (Cazón *et al.*, 2017).

Proveniente de la quitina, el quitosano es un polisacárido lineal formado por unidades de 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucano unidas mediante enlaces (1 $\rightarrow$ 4). Es un material no tóxico, biodegradable, biofuncional y biocompatible (Cazón *et al.*, 2017).

El mecanismo responsable mediante el cual ejerce un efecto antimicrobiano no se ha esclarecido por completo; sin embargo, se han formulado varias hipótesis. Por una parte, se cree que provoca un cambio en la permeabilidad celular debido a las interacciones entre las moléculas de quitosano cargadas positivamente y las membranas celulares microbianas cargadas negativamente. Esta interacción provoca el escape de proteínas y otros constituyentes desde el interior celular al exterior (Cazón *et al.*, 2017).

Por otra parte, se considera que el quitosano tiene la característica innata de la actividad antimicrobiana en sí misma y forma una capa polimérica impermeable en la superficie de

las células, impidiendo el transporte de nutrientes esenciales, provocando así la muerte celular (Lin *et al.*, 2015).

Cabe destacar que dicha actividad depende de las propiedades del quitosano, incluido el grado de desacetilación y polimerización, la composición química y nutritiva del sustrato y las condiciones ambientales (por ejemplo, actividad de agua o humedad del sustrato) (Moreira *et al.*, 2011).

#### 1.4.4 Envases antimicrobianos a base de quitosano

Los envases comestibles pueden servir como portadores de una amplia gama de aditivos alimentarios, incluidos agentes antimicrobianos que pueden prolongar la vida útil del producto y reducir el riesgo de crecimiento de patógenos en las superficies de los alimentos (Cagri *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, los agentes antimicrobianos se han añadido directamente a los alimentos. Sin embargo, su actividad puede ser inhibida por diferentes componentes presentes en los productos alimenticios. En estos casos, la implementación de envases antimicrobianos puede ser más eficiente, pues permiten la migración intencionada y controlada de los agentes antimicrobianos (Falguera *et al.*, 2011).

Aunque el quitosano posee propiedades antimicrobianas naturales, su efectividad se ha visto incrementada al combinarlo con diversos compuestos naturales y sintéticos que potencian y amplían su espectro de acción. La combinación con aceites esenciales, como aceite esencial de eucalipto, clavo, canela, tomillo o árbol de té, ha mejorado la inhibición de bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella*, además de bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*. Asimismo, estos aceites incrementan la acción antifúngica contra especies como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*. La incorporación de extractos polifenólicos procedentes de té verde, granada, manzana o espirulina también potencia la actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias y hongos. Además, el uso de nanopartículas de plata y dióxido de titanio ha mostrado efectos sinérgicos, mejorando la inhibición de bacterias gramnegativas y grampositivas y reforzando la actividad antifúngica. Otros compuestos, como la vanilina y el pululano, también han sido empleados para ampliar la eficacia antimicrobiana del quitosano. Estas combinaciones hacen que las películas de quitosano sean sistemas multifuncionales con

un amplio espectro de acción, ideales para la conservación y protección de alimentos (Flórez *et al.*, 2022).

#### 1.4.5 Antioxidantes como compuesto activos para el enriquecimiento de envases antimicrobianos a base de quitosano.

En los últimos años los antioxidantes se han incorporado dentro de las películas degradables con el objetivo de potenciar tanto la capacidad antioxidante como la capacidad antimicrobiana de estos últimas y así aumentar la vida útil de los alimentos, protegiéndolos contra el enranciamiento oxidativo y la degradación por microorganismos patógenos (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante se puede lograr a través de diferentes mecanismos, como la desactivación del oxígeno singlete, la inhibición de la enzima peróxido, la quelación de los metales de transición, la desintoxicación enzimática de las especies reactivas de oxígeno y su estabilización a través de la transferencia de radicales de hidrógeno (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

No obstante, los compuestos con actividad antioxidante pueden exhibir un comportamiento prooxidante bajo ciertas condiciones. Esta actividad prooxidante puede inducir un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que paradójicamente potencia su actividad antimicrobiana (Fukumoto & Mazza, 2000; Sotler *et al.*, 2019).

Mediante esta acción se desencadenan una serie de procesos que culminan con la muerte del microorganismo. Entre ellos destacamos, la degradación de la pared celular, el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática mediante la liberación de lipopolisacáridos (LPS), lo que conduce a la fuga del contenido celular, la inactivación de enzimas esenciales y la inhibición del ADN, ARN, y la síntesis de proteínas (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

Tanto antioxidantes naturales como sintéticos han sido aplicados en sistemas de envasado activos. Entre los antioxidantes sintéticos aprobados para su uso en alimentos destacan el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA). Por otro lado, los principales antioxidantes naturales comprenden ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y aceites esenciales (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

Actualmente, la mayoría de los estudios sobre envases antimicrobianos a base de quitosano se centran en la incorporación de antioxidantes naturales. Diversos autores

(Ghasemian *et al.*, 2024; Hani Tabaie Zavareh & Ardestani, 2020; Zhang *et al.*, 2021) han demostrado su eficacia a la hora de prolongar la vida útil del queso inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Si bien los antioxidantes naturales tienen un gran potencial para mejorar la seguridad y la calidad de los alimentos, presentan ciertos obstáculos como su inestabilidad a largo plazo y su limitada resistencia a temperaturas elevadas. Además, sus intensas propiedades organolépticas pueden afectar las cualidades sensoriales de los alimentos (Singh *et al.*, 2022).

### 1.5 Complejos manganosalen

Los complejos manganosalen son compuestos de coordinación que poseen un ligando quelante de tipo salen, una clase de bases bis-Schiff obtenidas por condensación de salicilaldehído y diamina (Rouco *et al.*, 2020).

Su mecanismo de acción se basa en la desintoxicación de numerosas ROS. De esta manera actúan como antioxidantes catalíticos mimetizando la estructura y reactividad de las enzimas antioxidantes nativas, tales como superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Rouco *et al.*, 2020).

Las ROS son metabolitos parcialmente reducidos del oxígeno molecular formados en los sistemas biológicos como resultado de un metabolismo celular normal. Sin embargo, niveles excesivos de ROS provocan la oxidación de las moléculas orgánicas alterando su estructura y funciones biológicas (Rouco *et al.*, 2020).

La enzima SOD cataliza la dismutación de dos aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular. Las CAT se encargan de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y las peroxidasas son capaces de convertir  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y de eliminar otros peróxidos, incluyendo hidroperóxidos lipídicos u otros peróxidos orgánicos. A diferencia de las enzimas antioxidantes exógenas, los complejos manganosalen son más permeables a las células y tienen mejor biodisponibilidad que este tipo de enzimas (Rouco *et al.*, 2020).

## 2 Objetivos e hipótesis

A pesar de la extensa literatura sobre las capacidades antiinflamatorias y antioxidantes, de los complejos manganosalen, apenas existen estudios que evalúen su capacidad como potenciales antimicrobianos.

Por ello, el objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es evaluar la capacidad antimicrobiana de un complejo manganosalen y su posible efecto sinérgico en combinación con quitosano, frente a bacterias patógenas frecuentemente asociadas a la contaminación de productos lácteos. Para alcanzar este propósito, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la actividad antimicrobiana del complejo manganosalen frente a distintas especies bacterianas implicadas en la contaminación de productos lácteos.
2. Comparar la eficacia del complejo frente a bacterias con diferentes características estructurales, particularmente entre bacterias grampositivas y gramnegativas.
3. Evaluar el efecto combinado del complejo manganosalen con quitosano, investigando posibles interacciones sinérgicas en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Las hipótesis de este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. Determinadas concentraciones del complejo manganosalen mostrarán un efecto antimicrobiano sobre al menos una de las especies bacterianas estudiadas.
2. El complejo manganosalen presentará una actividad antimicrobiana similar entre bacterias que compartan características estructurales, como las bacterias grampositivas o gramnegativas.
3. La combinación del complejo manganosalen con quitosano ejercerá un efecto sinérgico, potenciando la actividad antimicrobiana del quitosano frente a las bacterias analizadas.

### 3 Materiales y Métodos

El quitosano, con un peso molecular comprendido entre 100-300 kDa y el ácido acético glacial (99,5% de pureza), fue adquirido a través de Acros Organics (Geel, Bélgica). El glicerol, empleado como agente plastificante, fue suministrado por Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EE. UU.)

El complejo manganosalen  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$  (Mn-salen, 500,42 g/mol) empleado en este trabajo fue proporcionado por el grupo de investigación del profesor M. Maneiro (Suprabioin, Universidad de Santiago de Compostela).

Los medios *McConkey Lactose agar* (ML) y Muller Hinton (MH) fueron adquiridos de Oxoid (Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Los medios *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth* y *Tryptone Soy agar* (TSA) se obtuvieron de PanReac AppliChem (Castellar del Vallès, Barcelona, España). El medio Luria Bertani (LB) fue proporcionado por Condalab (Torrejón de Ardoz, Madrid, España) y el PBS por Corning Incorporated (Corning, NY, EE. UU.)

#### 3.1 Compuesto de estudio

En cada uno de los ensayos se trabajó con un stock a una concentración de 10 mg/mL del compuesto (stock de trabajo). Para ello se disolvieron 10 mg en 1 mL de medio LB. La solución fue homogeneizada durante aproximadamente una hora en un baño de ultrasonidos, asegurando su completa disolución.

#### 3.2 Cepas empleadas en este trabajo

Todas las cepas objeto de estudio fueron suministradas por el Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC-USC).

Tabla 1: Especies bacterianas patógenas analizadas en este trabajo.

Bacterias grampositivas	Bacterias gramnegativas
<i>Escherichia coli</i> (patotipo STEC, serotipo O157:H7)	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Para confirmar la presencia de los genes de virulencia *stx1* y *stx2* (toxinas Shiga 1 y 2), *rfbE* (antígeno O157) y *fliC* (antígeno flagelar) en la cepa *Escherichia coli*, se empleó una PCR multiplex (**descrita en el apartado Anexos**).

### 3.2.1 Crecimiento de cepas en medios de cultivo y aislamiento de colonias

Para obtener cultivos puros, las cepas gramnegativas se sembraron inicialmente en medio ML, un medio selectivo que permite distinguir entre bacterias gramnegativas y grampositivas, inhibiendo el crecimiento de estas últimas. ML es también un medio diferencial, ya que permite distinguir entre bacterias gramnegativas fermentadoras de lactosa (lactosa positivas) y bacterias grampositivas no fermentadoras de lactosa (lactosa negativas). Por otro lado, las cepas grampositivas se sembraron en medio general TSA.

Tras la incubación durante aproximadamente 24 horas a 37 °C, se seleccionó una colonia aislada de cada cepa, la cual fue transferida a un medio de conservación compuesto por Nutrient Agar y Nutrient Broth (copia de trabajo). Además, se prepararon alícuotas para su almacenamiento a -20 °C, consistentes en una mezcla de 500 µL de glicerol al 20% y 500 µL de una suspensión bacteriana en medio LB.

Para cada uno de los ensayos realizados en el presente Trabajo de Fin de Grado, se utilizó una suspensión bacteriana inicial por cada cepa, ajustada a una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) de 0,00065, correspondiente a una concentración estimada de  $10^6$  UFC/mL. El procedimiento seguido para alcanzar dicha densidad óptica fue el siguiente:

### 3.2.2 Preparación del inóculo bacteriano

A partir de la copia de trabajo, cada una de las cuatro cepas fue inoculada en 3,00 mL de caldo LB. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 horas bajo agitación constante a 200 rpm.

### 3.2.3 Ajuste de la densidad óptica y preparación de las diluciones

De cada cultivo crecido, se tomaron 100 µL y se diluyeron en 900 µL de caldo LB, obteniéndose una dilución 1:10. A continuación, se midió la absorbancia de cada dilución con ayuda de un espectrofotómetro (Novaspec pro, Biochrom) a una longitud de onda de 600 nm ( $OD_{600}$ ). Con base en estos valores, se preparó una dilución intermedia del cultivo con una  $OD_{600}$  ajustada a 0,1. A partir de esta dilución, se realizó un segundo ajuste para

obtener la densidad óptica final deseada de  $OD_{600} = 0,00065$  (suspensión de partida en cada ensayo).

### 3.2.4 Estimación de la concentración bacteriana en la suspensión bacteriana de partida

Para confirmar que la suspensión bacteriana inicial ( $OD_{600} = 0,00065$ ) contenía una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL, se realizó un recuento viable en placas de agar. Para ello, se tomaron 100  $\mu$ L de dicha suspensión y se diluyeron en 900  $\mu$ L de PBS, realizando diluciones seriadas 1:10 hasta alcanzar una dilución final de  $10^{-5}$ . A partir de las tres últimas diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), se sembraron dos gotas de 20  $\mu$ L en placas de TSA. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, tras lo cual se realizó el recuento de UFC/mL.

## 3.3 Evaluación de la capacidad antimicrobiana del compuesto manganosalen sobre las cepas objeto de estudio

### 3.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación (Bonev *et al.*, 2008).

El análisis de la CMI se determinó en placas microtiter de 96 pocillos. En la columna 1 se distribuyeron 100  $\mu$ L del compuesto Mn-salen a una concentración de 10 mg/mL (stock de trabajo). En las columnas 2-11 se depositaron 50  $\mu$ L de medio LB. Se tomaron 50  $\mu$ L de la columna 1 y se transfirieron a la columna 2, procedimiento que se repitió sucesivamente hasta la columna 10, generando diluciones en serie 1:2 en las que la concentración del compuesto se redujo a la mitad en cada paso, tal y como se muestra en la **(Figura 2)**.

A continuación, en cada pocillo de las filas asignadas a cada cepa (desde la columna 1 hasta la 11) se añadieron 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de partida ( $OD_{600} = 0,00065$ ).

La columna 11 se empleó como control positivo (conteniendo suspensión bacteriana sin adición de compuesto), donde se esperaba un crecimiento normal de cada microorganismo y la columna 12 como control negativo (solo medio).

La microplaca se incubó a 37°C durante 24 horas en condiciones aerobias. Se realizaron cuatro replicas biológicas y dos técnicas.

	Concentración (mg/mL) del Mn-salen										11 Control positivo	12 Control negativo
	1 5,0	2 2,5	3 1,25	4 0,625	5 0,312	6 0,156	7 0,078	8 0,039	9 0,019	10 0,0097		
<b>A</b> <i>E. coli</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>B</b> <i>E. coli</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>C</b> <i>L. mono</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>D</b> <i>L. mono</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>E</b> <i>S. aureus</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>F</b> <i>S. aureus</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>G</b> <i>S. enterica</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>H</b> <i>S. enterica</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 2: Diseño de la placa microtiter de 96 pocillos. Adaptada de (Wiegand *et al.*, 2008).

### 3.3.2 Difusión en agar mediante aplicación en gota

Como una alternativa al ensayo de difusión en disco desarrollado por Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009), la difusión en agar mediante aplicación en gota consiste en depositar pequeñas gotas del compuesto antimicrobiano a distintas concentraciones sobre una placa de agar previamente sembrada con la cepa a estudiar. La difusión radial del compuesto a través de la superficie de la placa conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano y a la formación de "zonas" claras (halos) sin césped bacteriano en caso de efecto antimicrobiano (Benbettaïeb *et al.*, 2019).

Para evaluar el efecto del compuesto sobre cada cepa se depositaron 100  $\mu$ L de cada solución bacteriana de partida ( $OD_{600} = 0,00065$ ), sobre placas de MH que se extendieron para obtener un crecimiento en césped. Cada placa se dividió en 6 secciones, en las que se depositó una gota de 10  $\mu$ L del compuesto a distintas concentraciones (**Figura 3**). Las placas se incubaron durante aproximadamente 24 h a 37°C.

En la (**Tabla 2**), se muestra el volumen tomado del stock de trabajo (10 mg/mL) del Mn-salen y el volumen de agua destilada añadido para alcanzar las concentraciones deseadas.

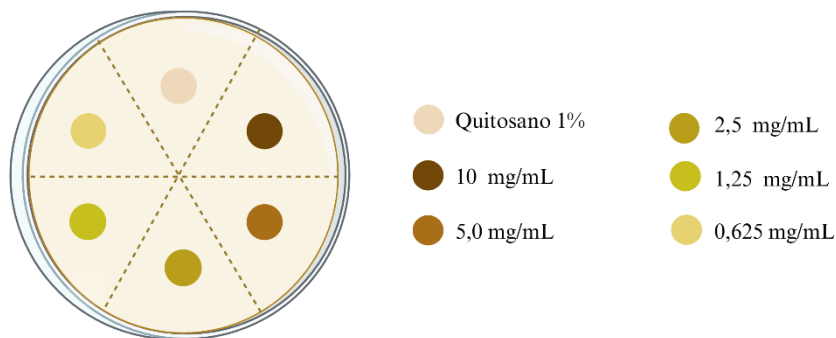


Figura 3: Disposición de las gotas (10  $\mu$ L) a distintas concentraciones en la placa de MH para evaluar el efecto antimicrobiano del Mn-salen. Imagen creada por Biorender.com (2025). Recuperado de <https://www.biorender.com>.

Tabla 2: Concentraciones ensayadas de Mn-salen y volúmenes de agua y compuesto empleados para su obtención.

Mn-salen (mg/mL)	Volumen tomado desde la disolución inicial ( $\mu$ L)	Volumen añadido de agua ( $\mu$ L)
5,00	50,0	50,0
2,50	25,0	75,0
1,25	12,5	87,5
0,625	6,25	93,7

### 3.3.2.1 Estudio de la sinergia del Mn-salen y el quitosano

Se evaluó la sinergia potencial del Mn-salen con el quitosano mediante difusión en agar mediante aplicación en gota descrito previamente, dado que la perspectiva futura es diseñar películas a base de quitosano enriquecidas con el compuesto.

Se preparó una disolución de quitosano al 1% (p/p) disolviéndolo en una solución de ácido acético al 1% (v/v), bajo agitación magnética constante. Posteriormente, se incorporó glicerol al 0,5 % (p/p) como agente plastificante.

Se disolvieron 10 mg del compuesto Mn-salen en 1 mL de la disolución de quitosano previamente preparada. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 5, 2,5, 1,25 y 0,625 mg/mL.

Siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad, se depositaron gotas de 10  $\mu$ L sobre cada sección de las placas previamente sembradas en césped con las cuatro cepas. Las

placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para cada cepa se realizaron tres replicas biológicas y dos técnicas.

### 3.3.3 Ensayo de cinética de muerte bacteriana: “Time kill assay”

Se prepararon ocho tubos de cultivo; cuatro tubos control (A) con 5 ml de medio líquido LB sin compuesto y cuatro tubos experimentales (B) conteniendo 5 mL de medio LB suplementado con el compuesto a 5 mg/mL. Se añadió a cada tubo una suspensión bacteriana de cada cepa (OD<sub>600</sub> final de aproximadamente 0,00065).

Los tubos se incubaron a 37 °C y 200 rpm. En los tiempos 0, 3, 6 y 24 h se tomaron 100 µL de cada tubo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS y a partir de estas se sembraron dos gotas de 20 µL en placas de LB agar. En la **(Tabla 3)** se muestran las diluciones sembradas para cada tiempo.

Tabla 3: Diluciones sembradas para cada tiempo durante el “Time kill assay”.

Tiempo (h)	Controles (A)	Experimentales (B)
0	10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup>
3	10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup>
6	10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup> ; 10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-1</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup>
24	10 <sup>-5</sup> ; 10 <sup>-6</sup> ; 10 <sup>-7</sup> ; 10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-1</sup> ; 10 <sup>-2</sup> ; 10 <sup>-3</sup> ; 10 <sup>-4</sup>

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se realizó un recuento del número de bacterias para cada dilución, y se determinó las UFC/mL a cada tiempo para cada una de las bacterias. Para cada cepa se realizaron tres replicas biológicas.

#### 3.3.3.1 Análisis estadístico y estimación de la reducción logarítmica

Los resultados se analizaron empleando el software GraphPad Prism 10.4.2. Se diseñaron los gráficos representando el log<sub>10</sub> UFC/mL en función del tiempo. Para el análisis estadístico se llevó a cabo un T-test. Se consideró un valor P inferior a 0,05 como estadísticamente significativo. También se calculó la reducción logarítmica para cada una de las cepas a las 0, 3, 6 y 24 horas de exposición al compuesto.

## 4 Resultados

### 4.1 Crecimiento de cepas en medios de cultivo y aislamiento de colonias para obtener cultivos puros

En la **(Figura 4)** se muestra el crecimiento de cada una de las cepas objeto de estudio en diferentes medios de cultivo. El tipo y morfología de las colonias es el esperado para cada especie bacteriana. No existieron indicios de contaminación.

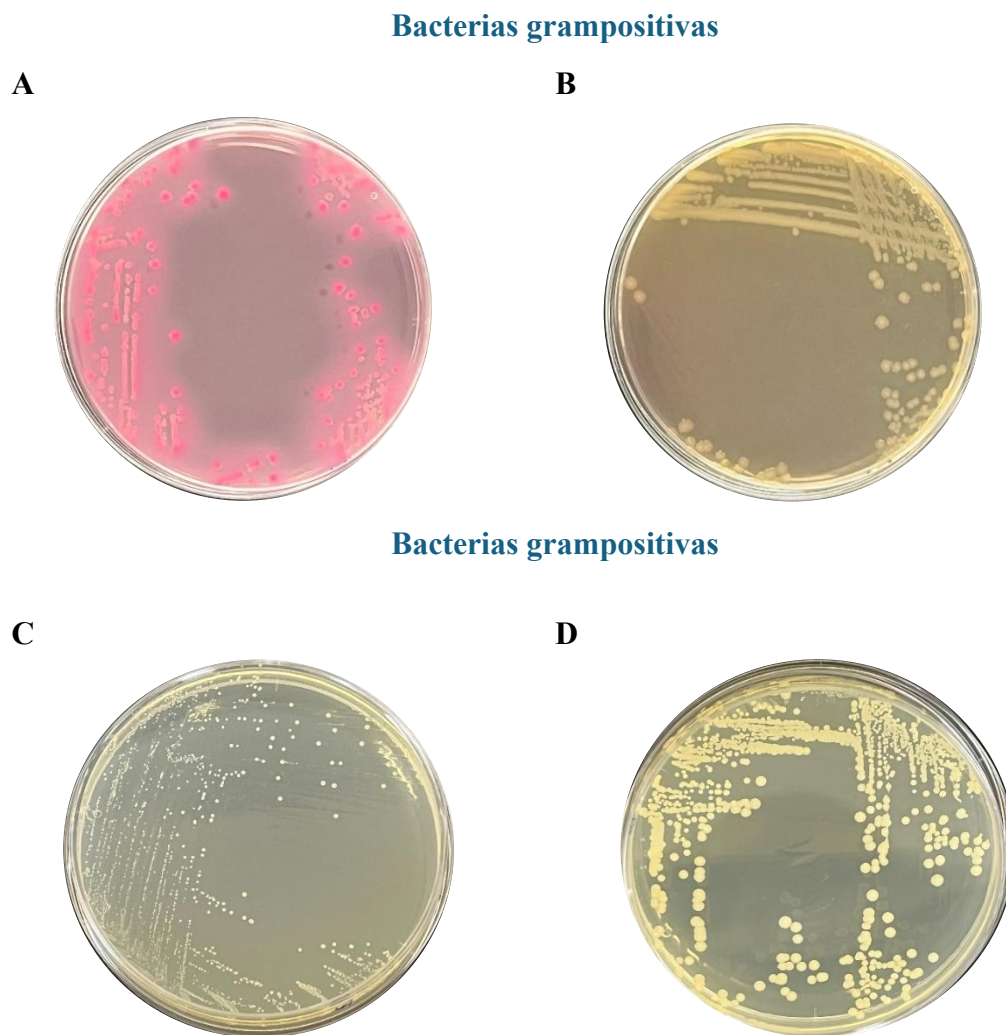


Figura 4: Las placas A y B se corresponden con las cepas gramnegativas crecidas en medio ML: (A) *E. coli*, bacteria fermentadora de lactosa (lactosa positiva: colonias rosadas) y (B) *S. enterica* bacteria no fermentadora de lactosa (lactosa negativa: colonias amarillas). Las placas C y D se corresponden con las cepas grampositivas crecidas en medio TSA: *L. monocytogenes* (C) y *S. aureus* (D).

#### 4.2 CMI de Mn-salen para cada una de las cepas estudiadas

Según el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST) el crecimiento en una microplaca se observa como turbidez o como un depósito de células en el fondo de los pocillos (*pellet*). De esta manera, la CMI se determina en función de la ausencia o presencia de dicha turbidez o *pellet* en comparación con el control positivo (EUCAST, 2024).

Los resultados muestran que la CMI de Mn-salen varía en función de la cepa y en algunos casos presenta ligeras variaciones entre las réplicas biológicas. En la **(Tabla 4)** se muestran los valores medios de CMI correspondiente a cada una de las bacterias. Las CMIs más bajas se obtuvieron para *S. enterica* y *S. aureus*, mientras que los valores más elevados correspondieron a *L. monocytogenes* y *E. coli*.

Tabla 4: Valores de las CMIs de Mn-salen en cada una de las cuatro réplicas y el valor medio obtenido de CMI  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$  DE) para cada una de las cepas.

Cepa	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	CMI media $\pm$ DE (mg/mL)
<i>E. coli</i>	1,25	1,25	0,625	1,25	1,094 $\pm$ 0,313
<i>S. enterica</i>	0,625	0,312	0,312	0,625	0,469 $\pm$ 0,181
<i>L. monocytogenes</i>	1,25	1,25	1,25	1,25	1,250 $\pm$ 0,000
<i>S. aureus</i>	0,312	0,625	0,625	0,312	0,469 $\pm$ 0,181

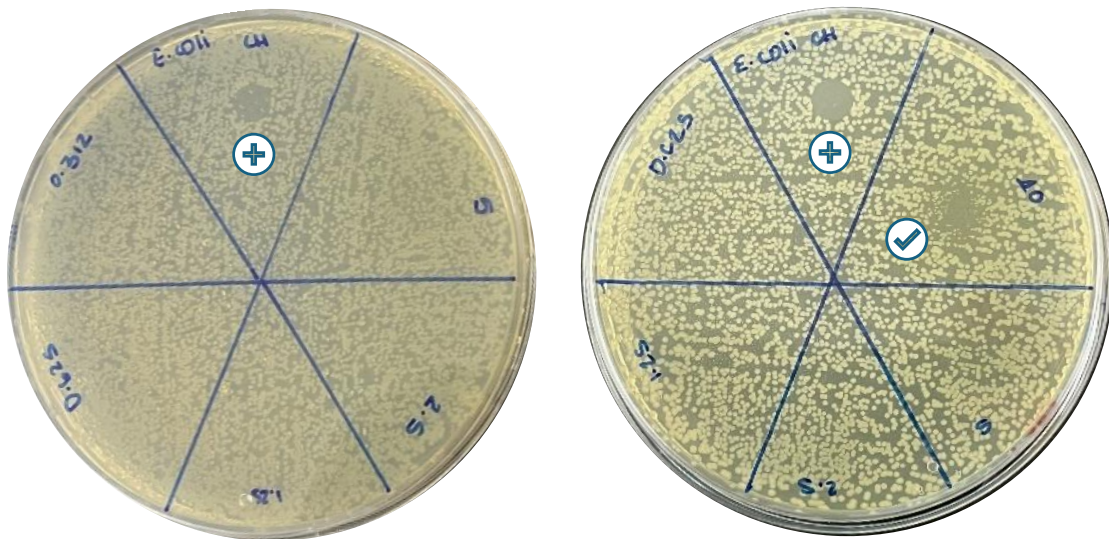
#### 4.3 Efecto antimicrobiano del compuesto Mn-salen sobre cada una de las cepas determinado mediante difusión en agar mediante aplicación en gota

Inicialmente se ensayaron cinco concentraciones del compuesto: 5,0, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,312 mg/mL, establecidas a partir de los resultados obtenidos del análisis de las CMIs. Tras observar que a 5 mg/mL no se producían halos de inhibición en ninguna cepa salvo *L. monocytogenes* se amplió el rango a 10 mg/mL. Como la concentración más baja (0,312 mg/mL) no mostraba expectativas de actividad, se omitió y se trabajó únicamente con 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 mg/mL. Además se utilizó el quitosano como control positivo, por su ya comentada actividad antibacteriana.

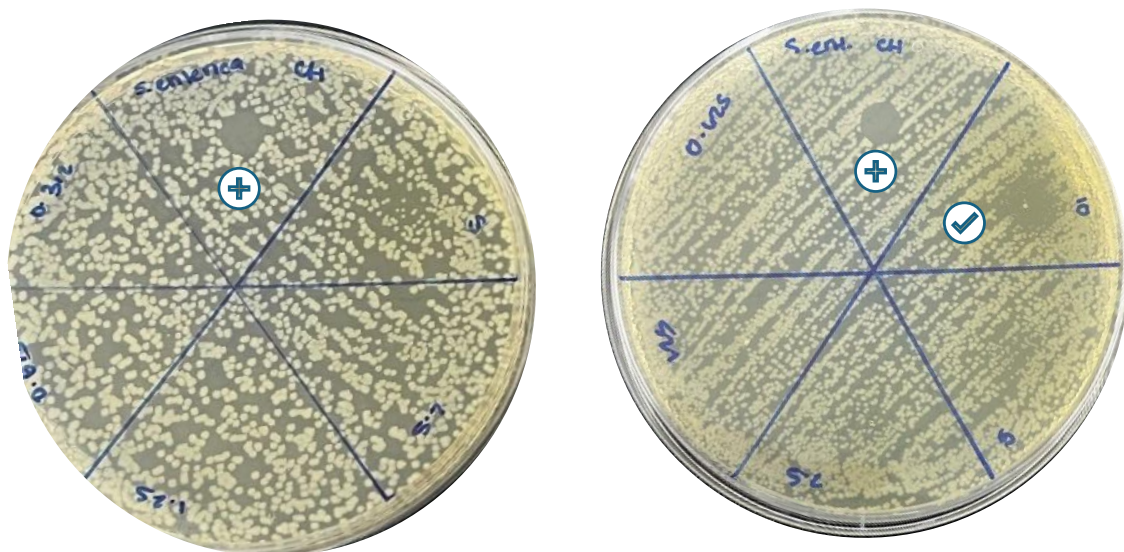
Los resultados de este ensayo se muestran en la **(Figura 5)**. Tanto para *E. coli* O157:H7 como para *S. enterica* se observan halos de inhibición a una concentración de Mn-salen de 10 mg/mL. Para *L. monocytogenes* los halos de inhibición son visibles a una concentración inferior, concretamente a 5 mg/mL, mientras que el crecimiento de *S. aureus* no es inhibido por ninguna de las concentraciones ensayadas. El control positivo (CH) (quitosano al 1%) produce los halos de inhibición esperados independientemente de la cepa estudiada.

### Bacterias gramnegativas

A

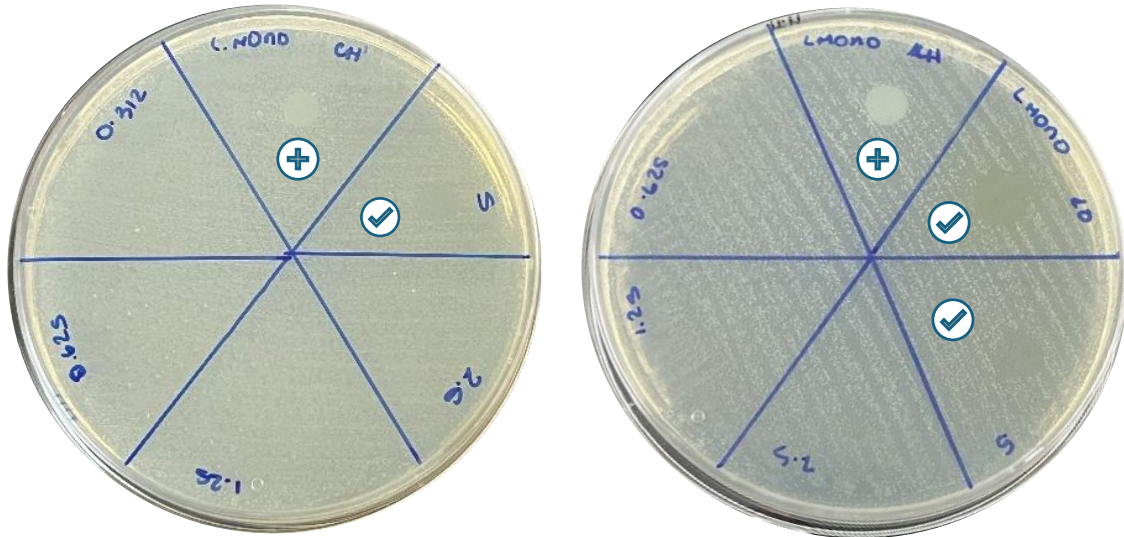


B



## Bacterias grampositivas

C



D

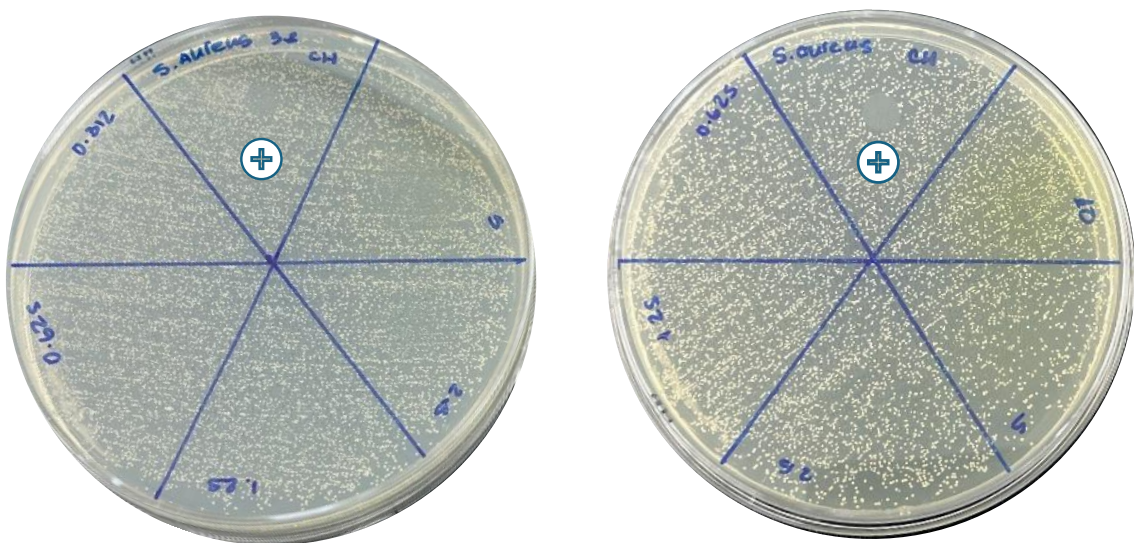
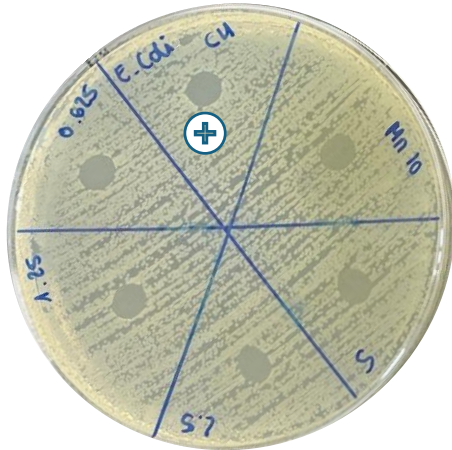


Figura 5: Efecto del Mn-salen determinado mediante ensayo de difusión en agar mediante aplicación por gota sobre *E. coli* (A), *S. enterica* (B), *L. monocytogenes* (C) y *S. aureus* (D). La columna de placas de la izquierda representa los resultados obtenidos cuando se partió de un concentración máxima de 5 mg/mL del Mn-salen (5; 2,5; 1,25 y 0,625). La columna de placas de la derecha representa los resultados obtenidos cuando se partió de una concentración máxima de 10 mg/mL (10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625). Los círculos con cruz

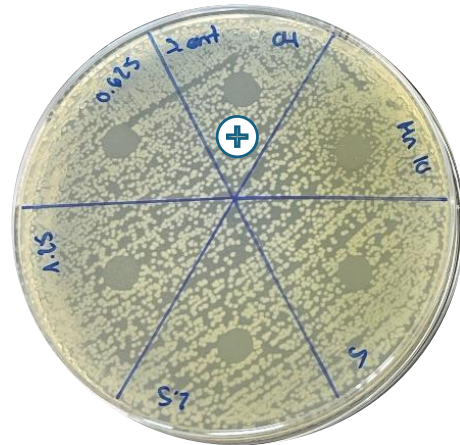
(+) corresponden al quitosano (control positivo), y los marcados con un símbolo de verificación (✓) indican zonas con inhibición bacteriana.

### Bacterias gramnegativas

A

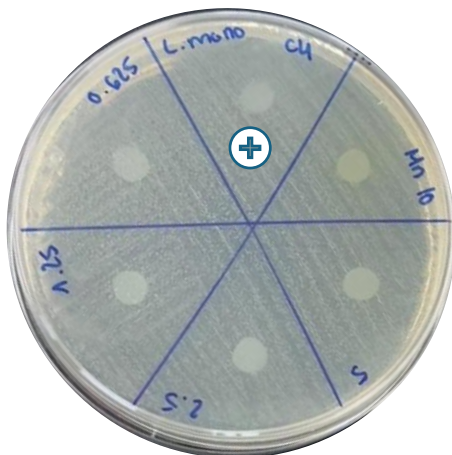


B



### Bacterias grampositivas

C



D

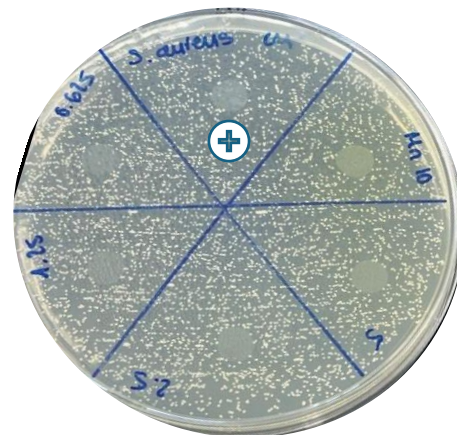


Figura 6: Efecto del Mn-salen en combinación con quitosano determinado mediante difusión en agar mediante aplicación en gota sobre *E. coli* (A), *S. enterica* (B), *L. monocytogenes* (C) y *S. aureus* (D). Las concentraciones de Mn-salen ensayadas fueron 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 mg/ml del Mn-salen combinado con quitosano. Los círculos con cruz (+) señalan las gotas aplicadas de quitosano, empleado como control positivo.

En la **(Figura 6)** se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de sinergia entre el compuesto Mn-salen y el quitosano. En estos experimentos el crecimiento bacteriano es inhibido incluso a la concentración menor ensayada (0,625 mg/mL combinada con quitosano), con halos de inhibición de entre 7 y 8 mm tanto para el quitosano puro (control positivo) como para las demás concentraciones que corresponden al quitosano combinado con diferentes concentraciones de Mn-salen.

#### 4.4 Efecto del compuesto Mn-salen sobre el crecimiento de cada cepa en estudio mediante “Time kill assay”

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de las MICs y del método de difusión en agar en gota, se seleccionó una concentración de 5 mg/mL de Mn-salen para este ensayo. Como se describió en la metodología, las cepas crecieron en ausencia (control positivo, A) y presencia (muestras experimentales, B) del compuesto durante 24 h. Se realizó el recuento de UFC/mL a las 0, 3, 6 y 24 h. La reducción logarítmica obtenida en presencia de Mn-salen respecto al control positivo se muestran en las siguientes tablas y figuras. En general, se observó una disminución significativa del crecimiento de las cepas en presencia del compuesto comparado con el control positivo a lo largo de las 24 h de duración del ensayo.

Tabla 5: Recuento bacteriano ( $\log_{10}$  UFC/mL) y reducción logarítmica de *E. coli* tras 0, 3, 6 y 24 horas de exposición al Mn-salen. Los resultados representan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$  DE) correspondientes a tres replicas biológicas.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Control (A) (<math>\log_{10}</math> UFC/mL) media <math>\pm</math> DE</b>	<b>Compuesto (B) (<math>\log_{10}</math> UFC/mL) media <math>\pm</math> DE</b>	<b>Reducción logarítmica media <math>\pm</math> DE</b>
<b>0</b>	5,373 $\pm$ 0,438	5,399 $\pm$ 0,350	-0,062 $\pm$ 0,088
<b>3</b>	7,981 $\pm$ 0,553	6,028 $\pm$ 0,256	1,952 $\pm$ 0,479
<b>6</b>	9,218 $\pm$ 0,259	5,044 $\pm$ 0,461	4,175 $\pm$ 0,344
<b>24</b>	9,829 $\pm$ 0,185	3,945 $\pm$ 0,813	5,844 $\pm$ 0,918

Tabla 6: Recuento bacteriano ( $\log_{10}$  UFC/mL) y reducción logarítmica de *S. enterica* tras 0, 3, 6 y 24 horas de exposición al Mn-salen. Los resultados representan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$  DE) correspondientes a tres replicas biológicas.

Tiempo (h)	Control (A) ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Compuesto (B) ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Reducción logarítmica media $\pm$ DE
0	5,860 $\pm$ 0,524	5,975 $\pm$ 0,382	-0,116 $\pm$ 0,162
3	7,948 $\pm$ 0,223	6,680 $\pm$ 0,395	1,268 $\pm$ 0,435
6	9,034 $\pm$ 0,069	7,093 $\pm$ 0,124	1,942 $\pm$ 0,166
24	9,563 $\pm$ 0,257	6,228 $\pm$ 1,351	3,336 $\pm$ 1,463

Tabla 7: Recuento bacteriano ( $\log_{10}$  UFC/mL) y reducción logarítmica de *L. monocytogenes* tras 0, 3, 6 y 24 horas de exposición al Mn-salen. Los resultados representan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$  DE) correspondientes a tres replicas biológicas.

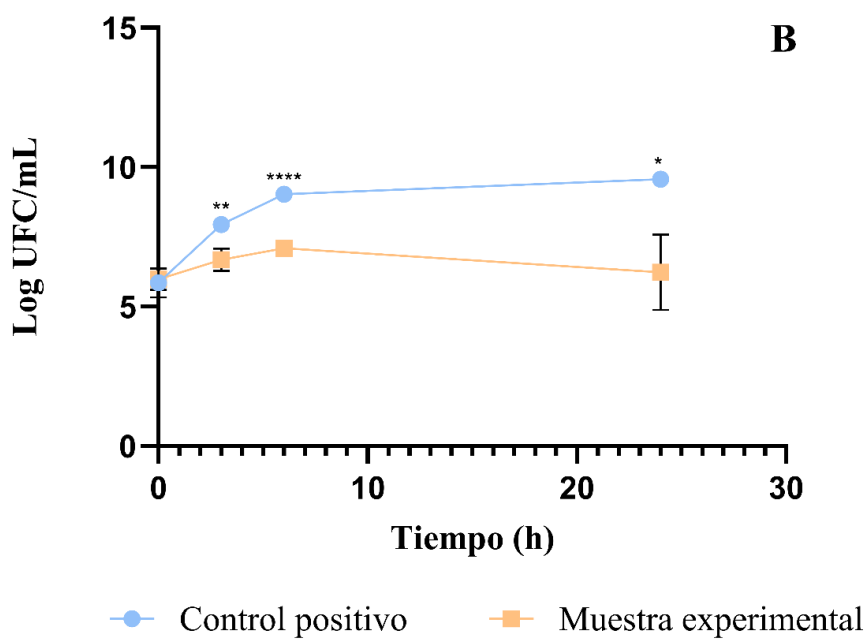
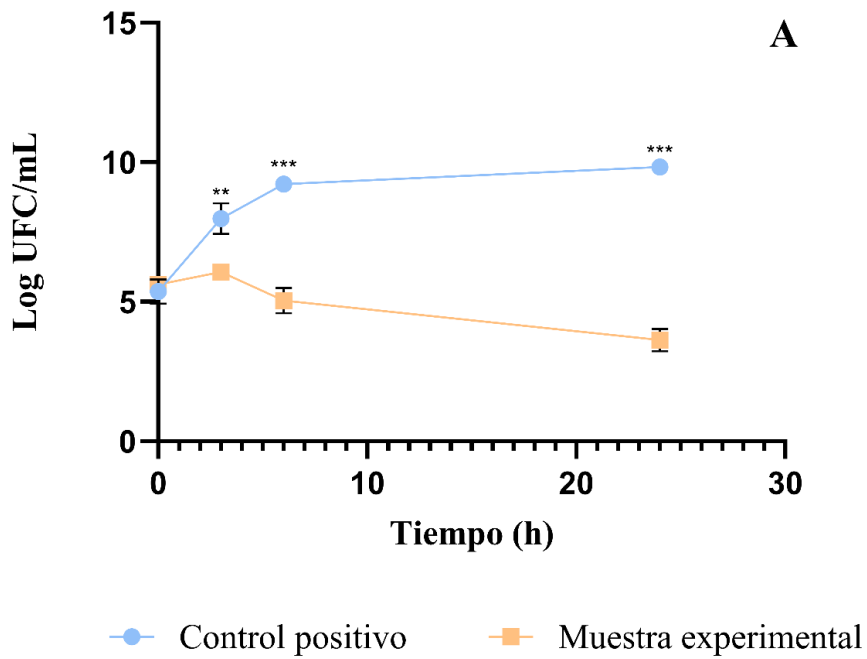
Tiempo (h)	Control (A) ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Compuesto (B) ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Reducción logarítmica media $\pm$ DE
0	6,185 $\pm$ 0,246	6,255 $\pm$ 0,302	-0,070 $\pm$ 0,110
3	7,399 $\pm$ 0,151	5,594 $\pm$ 1,004	1,805 $\pm$ 1,012
6	8,797 $\pm$ 0,384	5,092 $\pm$ 1,662	3,705 $\pm$ 1,921
24	10,253 $\pm$ 1,229	4,297 $\pm$ 1,688	5,957 $\pm$ 2,591

Tabla 8: Recuento bacteriano ( $\log_{10}$  UFC/mL) y reducción logarítmica de *S. aureus* tras 0, 3, 6 y 24 horas de exposición al Mn-salen. Los resultados representan las medias  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$  DE) correspondientes a tres replicas biológicas.

Tiempo (h)	Control A ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Compuesto (B) ( $\log_{10}$ UFC/mL) media $\pm$ DE	Reducción logarítmica media $\pm$ DE
0	4,657 $\pm$ 0,241	4,758 $\pm$ 0,102	-0,100 $\pm$ 0,174
3	5,657 $\pm$ 0,422	4,542 $\pm$ 0,952	1,115 $\pm$ 1,037

Continuación Tabla 8

6	8,246 ± 0,617	3,051 ± 0,581	5,195 ± 0,530
24	10,333 ± 1,326	2,398 ± 0,000	7,935 ± 1,326



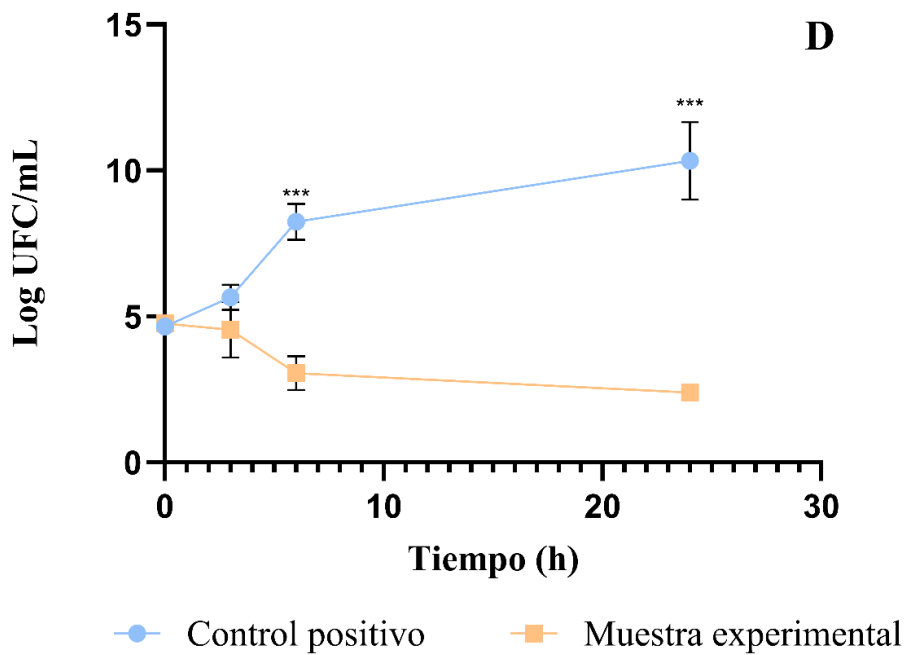
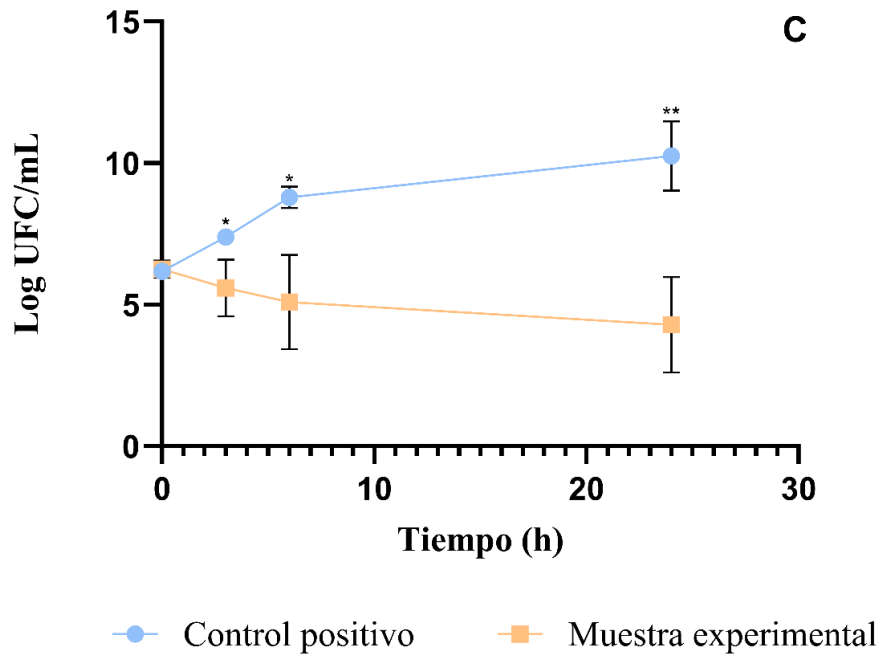


Figura 7: Efecto del complejo Mn-salen sobre el crecimiento de las bacterias patógenas en estudio estimado mediante “Time kill assay”. Curvas de crecimiento obtenidas para *E. coli* (A), *S. enterica* (B), *L. monocytogenes* (C) y *S. aureus* (D). Se representa la media

de tres replicas biológicas. Las barras verticales representan la desviación estándar (DE).

Leyenda:

- Control positivo: crecimiento de las bacterias en ausencia del compuesto
- Muestra experimental: Crecimiento de las bacterias en presencia de Mn-salen (5 mg/mL). Los asteriscos indican significancia estadística: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

## 5 Discusión y perspectivas

De manera general los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana del complejo manganosalen ( $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$ ) contra las cuatro cepas bacterianas estudiadas mostraron variaciones en la actividad antimicrobiana en función del método utilizado y de la especie bacteriana evaluada.

Se observaron variaciones en la CMI del complejo dependiendo de la cepa bacteriana evaluada. En general,  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$  mostró mayor eficacia frente a *S. enterica* y *S. aureus* con una CMI de  $0,469 \pm 0,181$  en ambas cepas. En el caso de *E. coli* y *L. monocytogenes* los valores son superiores, alcanzado una CMI de  $1,094 \pm 0,313$  y  $1,25 \pm 0$  respectivamente, con lo que estas dos últimas cepas serían ligeramente más resistentes a la acción del complejo.

En los estudios de “time kill assay”, un compuesto se puede considerar bactericida si produce la eliminación del 99,9% del inóculo final, lo cual se evidencia mediante una disminución  $\geq 3 \log_{10}$  en las UFC/mL (Standards & Barry, 1999). En este ensayo se testó una concentración del complejo de 5 mg/mL, muy superior a la obtenida en el análisis de la CMI independientemente de la cepa (entre 4-4,5 veces mayor). Los resultados confirman que a esta concentración el compuesto Mn-salen ejerce una acción bactericida significativa frente a las cuatro cepas patógenas, existiendo diferencias significativas en el tiempo de acción del compuesto y la reducción logarítmica estimada respecto al control positivo y el tiempo 0. En el caso de las cepas gramnegativas, *E. coli* y *S. enterica*, se produjo una reducción logarítmica de  $4,175 \pm 0,344$  y  $1,942 \pm 1,463$  a las 6 horas. Por otro lado, en *L. monocytogenes* y *S. aureus*, bacterias grampositivas, la reducción es de  $3,075 \pm 1,921$  y  $5,195 \pm 0,530$  respectivamente. Con lo cual, se puede confirmar el efecto bactericida del complejo a las 6 horas de exposición al mismo si bien a las 3 h la reducción logarítmica es inferior a 3, excepto en el caso de *S. enterica* donde el efecto bactericida se observa a las 24 h (reducción de  $3,336 \pm 1,463$ ). A las 24 horas, la reducción logarítmica se encuentra entre aproximadamente 5,8 y 7,8 para el resto de las cepas objeto de estudio.

Dado el efecto bactericida observado a una concentración de Mn-salen de 5 mg/mL, sería interesante realizar ensayos “time kill assays” similares donde se investiguen concentraciones más bajas y próximas las CMIs. Como se mencionó, la concentración de

5 mg/mL se seleccionó en base a los resultados obtenidos de CMI y del ensayo de difusión en agar.

Teniendo en cuenta los resultados de las CMI como del “time kill assay”, se puede concluir que el compuesto no tiene un efecto similar sobre el mismo tipo de cepas (gramnegativas o grampositivas) sino que el efecto depende más específicamente de la especie o cepa bacteriana en cuestión. Así pues, estos resultados difieren con la hipótesis inicial, concuerdan con los obtenidos por Moreira *et al.* (2016), quienes reportaron que diversos extractos antioxidantes mostraban una actividad antimicrobiana variable en función de la cepa, y que dicha actividad depende más de las características moleculares del tipo de bacterias.

Por otra parte, los resultados del ensayo de difusión en agar, difieren considerablemente de los observados en los ensayos anteriores. En estos experimentos, la única cepa cuyo crecimiento es inhibido a una concentración de 5 mg/mL es *L. monocytogenes*. El crecimiento de *E. coli* y *S. enterica* se inhibe a una concentración de 10 mg/mL, mientras que *S. aureus* es capaz de crecer incluso a esta última concentración.

Aunque no se conoce con certeza la razón por la cual existen estas diferencias tan notorias entre en el grado de inhibición que ejerce el Mn-salen entre unos y otros ensayos se podría hipotetizar que el complejo presenta una mayor eficacia en medio líquido. Esta suposición está respaldada por la naturaleza propia del ensayo de difusión en agar, cuya principal limitación radica en la capacidad de difusión del compuesto activo en el agar. La interacción entre los agentes activos y los componentes del agar podrían dificultar la difusión. De esta manera, la ausencia de inhibición del crecimiento podría deberse a la baja eficacia del compuesto activo en medio sólido o a la dificultad para difundirse en el medio de agar (Benbettaïeb *et al.*, 2019)

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo donde se estudia la capacidad antimicrobiana de este complejo manganosalen, y por tanto, los resultados obtenidos no se pueden comparar con otros existentes en la literatura. No obstante, en 2008, Singh *et al.*, demostraron que el complejo manganosalen  $C_{16}H_{14}ClMnN_2O_2$  (EUK-8), aumenta la producción de ROS tanto en células de *E. coli* en crecimiento como en células en inanición. El resultado del aumento masivo de ROS provoca un daño oxidativo importante, que finaliza con la muerte celular.

Los autores justificaron este hallazgo argumentando que EUK-8 mimetiza la acción de la enzima SOD, y por tanto convierte el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) de forma muy eficiente. Cuando los radicales superóxidos se consumen totalmente, la cadena de transporte de electrones compensa filtrando más electrones al oxígeno para regenerar  $O_2^{\bullet-}$ , que nuevamente es convertido en  $H_2O_2$  (principio de *Le Chatelier's*) (Matthijssens *et al.*, 2008).

Si la tasa de producción de  $O_2^{\bullet-}$  permaneciera constante y la reacción de dismutación fuera la única que ocurriera, el efecto del aumento de la SOD sería disminuir la concentración de  $O_2^{\bullet-}$  sin afectar la cantidad  $H_2O_2$ . Sin embargo, en el entorno celular se producen otras reacciones que reducen el  $O_2^{\bullet-}$  y, por lo tanto, generan una o varias moléculas de  $H_2O_2$ , aumentando drásticamente su concentración total (Matthijssens *et al.*, 2008).

Matthijssens *et al.* (2008) recalcaron que esta actividad es esencialmente evidente en condiciones de cultivo aeróbico (permitiendo la generación de  $O_2^{\bullet-}$ ) y el efecto del complejo manganosalen es completamente dependiente de la dosis.

Aunque no podemos afirmar con rotundidad que  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$  actúa de manera similar al compuesto citado, este mecanismo hipotético de acción podría explicar por qué el compuesto inhibe el crecimiento bacteriano de las cepas de estudio.

Por otra parte, cuando se evaluó la sinergia del complejo con el quitosano al 1%, se observaron halos de inhibición incluso a la concentración más baja del compuesto (0,625 mg/mL). Sin embargo, sus diámetros oscilaron entre 7 y 8 mm, similar al halo observado con quitosano puro en solitario (control positivo). Los resultados sugieren que los halos de inhibición son resultado en todos los casos, de la acción del quitosano, y dado que no existe un incremento del halo cuando el quitosano se combina con  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$ , la sinergia quedaría descartada. Estos efectos distan bastante de lo esperado y de los hallazgos en la literatura revisada; donde Zhang *et al.* (2021) demostraron que películas de quitosano enriquecidas con procianidinas mostraban zonas de inhibición superiores a películas hechas de quitosano puro; siguiendo la misma metodología, Hani Tabaie Zavareh & Ardestani (2020) encontraron resultados similares con películas a base de quitosano y esencia de *Mentha aquatica* L. Cabe destacar que, en estos estudios se testaron las películas directamente mediante ensayos similares y no los compuestos puros combinados como se ha hecho en este trabajo, lo que podría explicar las discrepancias.

Para confirmar si existe o no un efecto sinérgico entre el quitosano y el complejo, sería interesante realizar un “time kill assay”, donde se podría comparar el crecimiento bacteriano al exponer las cepas de forma individual al complejo manganosalen (datos que ya poseemos) y al quitosano, con el crecimiento en presencia de la combinación de ambos agentes. De esta forma podríamos evaluar cuantitativamente si la combinación acelera y/o potencia la inhibición bacteriana en relación al efecto de cada compuesto por separado.

Otro estudio relevante consistiría en ensayar la sinergia del complejo manganosalen con otros polisacáridos que permitan modular la difusión del complejo de la matriz polimérica al alimento, para lograr mayor efecto antimicrobiano.

Aunque los resultados obtenidos son prometedores y evidencia un posible efecto antimicrobiano del Mn-salen, se requieren estudios adicionales para confirmar su eficacia y viabilidad como agente antimicrobiano de uso práctico. A pesar de su eficacia para revertir diferentes daños oxidativos, neurodegenerativos, inflamatorios y cardiovasculares (Rouco *et al.*, 2020), su perfil de seguridad debe confirmarse mediante estudios de toxicidad en distintos tipos celulares e “in vivo”.

Una vez establecida la concentración óptima bactericida y segura, el próximo paso será diseñar películas biodegradables, ya sea a base de quitosano, u otros polisacáridos, enriquecidas con el complejo Mn-salen, y ensayar su capacidad antimicrobiana.

Los estudios deberían, en una etapa posterior, trasladarse a un modelo alimentario real. Considerando que las cepas seleccionadas en este estudio representan los principales contaminantes en la industria láctea y que nuestro enfoque se ha centrado en el queso, lo ideal sería utilizar lonchas de queso inoculadas con estas bacterias para evaluar si la película antimicrobiana es capaz de inhibir su crecimiento.

## 6 Conclusiones

Este trabajo constituye la primera aproximación experimental del análisis de la capacidad antimicrobiana del complejo  $MnC_{23}O_7N_2H_{29}$ , evaluando su eficacia frente a bacterias patógenas asociadas a la industria alimentaria. Este trabajo presente una novedosa contribución en la aplicación de compuesto antioxidantes con capacidad antimicrobiana en envases biodegradables activos, con potencial bactericida y aplicación en la industria alimentaria.

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. En conjunto, los resultados indicaron que el complejo manganosalen posee una actividad antimicrobiana significativa frente a las cuatro cepas estudiadas (*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*). Siendo especialmente eficaz a una concentración de 5 mg/mL, en medio líquido, donde se observó una reducción logarítmica  $\geq 3$  en el ensayo “time kill assay” en las 4 cepas analizadas, cumpliendo el criterio de actividad bactericida. Entre las cepas, *Staphylococcus aureus* fue la cepa más sensible al compuesto, alcanzando una reducción logarítmica superior a 7 tras 24 h, mientras que *Salmonella enterica* fue la más resistente, mostrando el efecto bactericida completo sólo a las 24 h de exposición.
2. El efecto antimicrobiano del compuesto parece ser específico de cepas, más que depender de grupo (bacterias grampositivas o gramnegativas).
3. La eficacia del compuesto varía en función del tipo de ensayo, observándose diferencias entre los resultados obtenidos en sustrato sólido (ensayo de difusión en agar) y en medio líquido (determinación de CMI y ensayos de cinética de muerte bacteriana- “time kill assay”). Probablemente, esta diferencia se debió a limitaciones en la difusión del compuesto en medio sólido, lo que sigue una mayor eficacia del Mn-salen en aplicaciones donde actúe en fase líquida o contacto directo
4. La combinación del Mn-salen con quitosano no produjo un efecto sinérgico en los ensayos realizados, ya que los halos de inhibición observados fueron comparables a los del quitosano puro. Esto indica que el efecto antibacteriano observado en esta formulación combinada se debe principalmente a la acción del quitosano.

5. A pesar de los resultados prometedores, se requieren estudios adicionales que incluyan la evaluación en matrices alimentarias reales, el análisis de liberación controlada del compuesto, y estudios toxicológicos que avalen su seguridad.

En conjunto,  $\text{MnC}_{23}\text{O}_7\text{N}_2\text{H}_{29}$  se posiciona como un candidato prometedor para el desarrollo de envases activos con capacidad antimicrobiana, sobre todo para envases que contengan un líquido y facilite la difusión del compuesto de la matriz polimérica al alimento. Su incorporación en películas comestibles podría representar una estrategia innovadora para mejorar la seguridad microbiológica de productos alimentarios, en particular derivados lácteos, sujeto a futuras validaciones experimentales.

## 7 Anexos

### Anexo I: Confirmación del serotipo STEC O157:H7 mediante PCR multiplex

Para confirmar que la cepa de *Escherichia coli* presenta los principales genes de virulencia tx1 (toxina Shiga 1), stx2 (toxina Shiga 2), rfbE (antígeno O157) y fliC (antígeno flagelar) (Bai *et al.*, 2010), se realizó una PCR multiplex.

#### Extracción del ADN de la cepa

Para extraer el ADN de la cepa a evaluar, con el asa de siembra se tomó una colonia individual del cultivo crecido en medio ML y se disolvió en 600 µL de agua destilada, incorporados previamente en un Eppendorf de 1 mL. Este último se calentó a ebullición durante cinco minutos a 100 °C, tiempo necesario para producir la lisis celular y liberar el material genético de la bacteria.

Tras este proceso, los 10 tubos Eppendorf se centrifugaron a 11000 rpm durante 2 minutos, de esta forma el ADN quedó en el sobrenadante listo para ser utilizado en la reacción de PCR.

#### Preparación de mezclas para la PCR multiplex

Se prepararon dos mezclas, cada uno con el objetivo de detectar dos genes. La mezcla 1 necesaria para la detección de los genes stx 1 y stx2; y la mezcla 2 para la detección de O157 rfbE y fliC<sub>H7</sub>.

Tabla 9: Componentes de la mezcla de reacción para el reactivo NZYtechTaq 2x Green Master Mix.

NZYTaq 2x Green Master Mix	Primer F* (20 µM)	Primer R* (20 µM)	Agua MiliQ estéril	ADN
12.5 µl	1 µl	1 µl	5.5 µl	5 µl

Tabla 10: Primers específicos para la mezcla 1.

Nombre del gen	Primers	[ 20 µl ]	Tª de hibridación	Secuencia nucleotídica (5´- 3´)	Tamaño (pb)
stx1	VT1-F	2 µl	55 °C	TCGCTGAATGTCATTCGCTCTG	539
	VT1-R			TCAGCAGTCATTACATAAGAAC	
stx2	VT2-F1	1 µl		TTTCTTCGGTATCCTATTCCC	358

Continuación Tabla 10

	VT2-F2			TGTCTTCAGCATCTTATGCAG	
	VT2-R			CTGCTGTCCGTTGTCATGGAA	

Tabla 11: Primers específicos para la mezcla 2

Nombre del gen	Primers	[ 20 µl ]	Tª de hibridación	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tamaño (pb)
O157 rfbE	O157-F	1 µl	62 °C	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497
	O157-R			CATTGGCATCGTGTGGACAG	
fliCH7	H7-F	2 µl		GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625
	H7-R			CAACGGTGACTTTATCGCCATTC	

#### Preparación de los tubos de PCR

Se utilizaron cinco tubos de PCR, dos para control positivo con ADN de una cepa confirmada con los cuatro genes a detectar, dos pocillos con el ADN de nuestra cepa problema y un pocillo para el control negativo donde no se añadió ADN, solo se depositó agua destilada.

Se prepararon dos Eppendorf correspondientes a la mezcla 1 y 2. Se multiplicaron los volúmenes por 5, obteniendo en el caso de la mezcla 1: 62,5 µL de la NZYTaQ 2x Green Master Mix; 35 µL de *primers* específicos (**Tabla 11**) y 2,5 µL de agua destilada. En el caso de la mezcla 2: 62,5 µL de la NZYTaQ 2x Green Master Mix; 30 µL de *primers* específicos (**Tabla 12**) y 7,5 µL de agua destilada.

En cada tubo de PCR se depositaron 20 µL de cada una de las mezclas y 5 µL del ADN extraído tanto del control positivo como de la cepa problema. El contenido de cada tubo de PCR se cargó en un carril del gel de agarosa para su posterior análisis mediante electroforesis. Se utilizaron 6 carriles, en el primero se depositó el marcador de peso molecular; en los dos siguientes el control positivo, en el cuarto y quinto la cepa problema y en el último el control negativo.

### Proceso de amplificación

La amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde las mezclas son sometidas a distintos ciclos de temperaturas necesarias en la técnica de PCR. En la **(Figura 8)** se observan las condiciones de temperatura para la amplificación, X °C en este caso corresponde con la temperatura de hibridación específica para los cebadores. Las mismas se muestran en la **Tabla 10 y 11**.

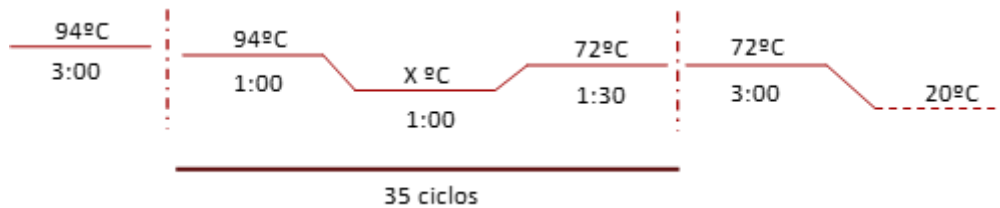


Figura 8: Condiciones generales del termociclador.

### Lectura de resultados

Los resultados se analizaron empleando el programa *ImagenLab*, el cual permite obtener una imagen digital del gel de agarosa.

Se comprobó que la cepa problema presenta los cuatro genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *O157 rfbE* y *fliC<sub>H7</sub>*.

## 8 Referencias bibliográficas

- Alsuwat, M. A., Shah, A. A., Ullah, S., Khan, R. U., Alissa, M., & Khan, M. S. (2025). Microbial Biofilm Formation to Mitigate Foodborne Pathogens Strategies and Control Measures. *Indian Journal of Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s12088-025-01461-4>
- Bai, J., Shi, X., & Nagaraja, T. G. (2010). A multiplex PCR procedure for the detection of six major virulence genes in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1), 85–89.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.05.003>
- Baran, A., Erdogan, A., Turgut, T., & Adıgüzel, M. (2017). A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. *Turkish Journal of Nature and Science*, 6(2), 100–105.
- Benbettaieb, N., Frédéric, D., & Karbowski, T. (2019). Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3431–3455.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494132>
- Bonev, B., Hooper, J., & Parisot, J. (2008). Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1295–1301.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833–848.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.833>
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- De Oliveira, C. A. F., Corassin, C. H., Lee, S. H. I., Gonçalves, B. L., & Barancelli, G. V. (2017). Chapter 5 - Pathogenic Bacteria in Cheese, Their Implications for Human Health and Prevention Strategies. In R. R. Watson, R. J. Collier, & V. R. Preedy (Eds.), *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*

- (pp. 61–75). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00005-X>
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, *13*(1), 1–95.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3940>
- EFSA & ECDC. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses report. *EFSA Journal*, *19*(12), 1–324. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EFSA & ECDC. (2024). The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal*, *22*(12), 1–201. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106>
- EUCAST. (2024). *EUCAST reading guide for broth microdilution (Versión 5.0)*. Recuperado 27 de mayo de 2025, de <https://www.eucast.org/>
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(6), 292–303.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, *55*(3), 476–511.  
<https://doi.org/10.1128/mr.55.3.476-511.1991>
- Ferraz, A. R., Pintado, C. S., & Serralheiro, M. L. (2024). A Global Review of Cheese Colour: Microbial Discolouration and Innovation Opportunities. *Dairy*, *5*(4), 768–785. <https://doi.org/10.3390/dairy5040056>
- Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Active packaging film of chitosan and Santalum album essential oil: Characterization and application as butter sachet to retard lipid oxidation. *Food Packaging and Shelf Life*, *34*, 100938.  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100938>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 681–713). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19)

- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Garvey, M. (2019). Food pollution: a comprehensive review of chemical and biological sources of food contamination and impact on human health. *Nutrire*, *44*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41110-019-0096-3>
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G., & Sindic, M. (2018). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(4), 825–843. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12552>
- Ghasemian, S. O., Ahmadi-Dastgerdi, A., Abdollahi, A., Tirtashi, F. E., Zokaei, M., Fallah, N., NajafAbadi, P. I., & Dolatyari, F. (2024). The effect of active packaging film based on chitosan containing rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on cheese shelf life. *Journal of Food Biochemistry*, *2024*(1), 2108707. <https://doi.org/10.1155/2024/2108707>
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview1. *Journal of Animal Science*, *85*(suppl\_13), E45–E62. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>
- Hani Tabaie Zavareh, S. A., & Ardestani, F. (2020). Antibacterial effects of chitosan coating containing *Mentha aquatica* L. essence against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *73*(3), 585–593. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12678>
- Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*, *4*(3), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, *15*(1), 1–23.
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance

- including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Kamboj, S., Gupta, N., Bandral, J., Gandotra, G., & Anjum, N. (2020). Food safety and hygiene: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8, 358–368.  
<https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2f.8794>
- Kim, J., Liao, X., Zhang, S., Ding, T., & Ahn, J. (2025). Application of phage-derived enzymes for enhancing food safety. *Food Research International*, 209, 116318.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116318>
- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157: H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 5.
- Lin, S., Chen, L., Huang, L., Cao, S., Luo, X., & Liu, K. (2015). Novel antimicrobial chitosan–cellulose composite films bioconjugated with silver nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 70, 395–403.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.040>
- Little, C. L., Rhoades, J. R., Sagoo, S. K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., & McLauchlin, J. (2008). Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 25(2), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.007>
- Matthijssens, F., Back, P., Braeckman, B. P., & Vanfleteren, J. R. (2008). Prooxidant activity of the superoxide dismutase (SOD)-mimetic EUK-8 in proliferating and growth-arrested *Escherichia coli* cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.023>
- Moreira, D., Gullón, B., Gullón, P., Gomes, A., & Tavaría, F. (2016). Bioactive packaging using antioxidant extracts for the prevention of microbial food-spoilage. *Food Funct.*, 7(7), 3273–3282. <https://doi.org/10.1039/C6FO00553E>
- Moreira, M. del R., Pereda, M., Marcovich, N. E., & Roura, S. I. (2011). Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. *Journal of Food Science*, 76(1), M54–M63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x>

- Reij, M. W., & Den Aantrekker, E. D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00295-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00295-2)
- Rouco, L., González-Noya, A. M., Pedrido, R., & Maneiro, M. (2020). Pursuing the Elixir of Life: In vivo antioxidative effects of manganosalen complexes. *Antioxidants*, *9*(8), 727. <https://doi.org/10.3390/antiox9080727>
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>
- Siciliano, S., Lopresto, C. G., & Lamonaca, F. (2024). From traditional packaging to smart bio-packaging for food safety: a review. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, *9*(4), 1971–1986. <https://doi.org/10.1007/s41207-024-00627-8>
- Singh, A. K., Kim, J. Y., & Lee, Y. S. (2022). Phenolic compounds in active packaging and edible films/coatings: natural bioactive molecules and novel packaging ingredients. *Molecules*, *27*(21), 7513. <https://doi.org/10.3390/molecules27217513>
- Sotler, R., Poljšak, B., Dahmane, R., Jukić, T., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Trebše, P., & Starc, A. (2019). Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta Clinica Croatica*, *58*(4.), 726–736. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.20>
- Standards, N. C. for C. L., & Barry, A. L. (1999). *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline* (Vol. 19, Issue 18). National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, PA.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wyrwa, J., & Barska, A. (2017). Innovations in the food packaging market: Active packaging. *European Food Research and Technology*, *243*, 1681–1692. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2878-2>

Zhang, L., Zhang, Z., Chen, Y., Ma, X., & Xia, M. (2021). Chitosan and procyanidin composite films with high antioxidant activity and pH responsivity for cheese packaging. *Food Chemistry*, 338, 128013.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128013>