

Universidad de Burgos

Facultad de Ciencias

Área de Tecnología de los Alimentos

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
IN VITRO E *IN VIVO* DE FILMS CON COMPUESTOS A
BASE DE PLATINO Y PALADIO**

TRABAJO FIN DE GRADO

Dirigido y tutorizado por

**Ana María Díez Maté y Beatriz Melero Gil
Memoria presentada por**

Adriana Calle Galerón

Julio, 2018

VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos CURSO: 2017-2018

Dña. Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil informa de que el alumno Dña. Adriana Calle Galerón, ha realizado el trabajo "Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro e in vivo de films con compuestos a base de platino y paladio", bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indiquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 4 de Julio de 2018

Fdo.: Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

Dña. Adriana Calle Galerón y Dñas. Ana María Diez Maté y Beatriz Melero Gil autor y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto

Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 4 de Julio de 2018

Fdo.: Adriana Calle Galerón

Fdo.: Ana María Diez Maté

Fdo.: Beatriz Melero Gil

ÍNDICE

1. RESUMEN /ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	1
3. OBJECTIVES	2
4. MATERIALES Y MÉTODOS	2
4.1 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE DISTINTOS FILMS	2
4.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL COMPUESTO EN FILM CON MAYOR EFECTO	6
4.3 COMPARATIVA DEL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO EN FILM VS. EN SOLUCIÓN	7
4.4 ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA APLICACIÓN DE UN FILM ELABORADO CON EL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UN ALIMENTO (MINI-HAMBURGUESAS DE CERDO).	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS MISMOS	8
5.1 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE DISTINTOS FILMS	9
5.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL COMPUESTO EN FILM CON MAYOR EFECTO	10
5.3 COMPARATIVA DEL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO EN FILM VS. EN SOLUCIÓN	11
5.4 ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA APLICACIÓN DE UN FILM ELABORADO CON EL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UN ALIMENTO (MINI-HAMBURGUESAS DE CERDO).	12
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	18

1. RESUMEN/ ABSTRACT

Tanto el paladio como el platino son compuestos con demostrada actividad antitumoral. A lo largo de este trabajo fin de grado, se realizó un estudio de distintos films con compuestos en base a estos elementos para evaluar si también presentan efecto antimicrobiano sobre microorganismos patógenos y alterantes que afectan a los alimentos.

Además se intenta determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto con mayor efecto antimicrobiano, el GAAS-9D concluyendo que es menor de 0,5 mg/ml para la mayoría de los microorganismos testados y siendo dicho efecto menor en film que en solución. A pesar de que en los estudios *in vitro*, dicho compuesto, se presenta como una opción válida frente a distintos microorganismos, en la prueba realizada sobre producto, mini-hamburguesas de cerdo, no se observó ningún efecto antimicrobiano sobre la microflora nativa del producto.

Both palladium and platinum are compounds with antitumor activity. Throughout this final degree project, a study of different compounds based on these elements was carried out to study the antimicrobial effect they exerted on films on pathogenic microorganisms and more important alterations at present.

We try to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of one of the studied compounds, the GAAS-9D concluding that it must be lower for 0,5 mg / ml in some of the cases and said effect being less in film than in solution. Although *in vitro* studies, this compound is presented as a valid option against different microorganisms, in the product test, mini -pork burgers, no antimicrobial effect was observed on the native microflora of the product

2. INTRODUCCIÓN

Existen muchos microorganismos patógenos y alterantes que a día de hoy pueden ser nocivos e incluso fatales. Los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (microorganismos patógenos) o de intoxicaciones (toxinas de microorganismos). La causa de la contaminación de los alimentos viene dada por falta de medida de higiene durante la producción, preparación y conservación de los alimentos facilitando la persistencia y el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes y transformando el alimento en no apto para el consumo humano [1].

Entre los microorganismos patógenos más comúnmente transmitidos por los alimentos destacan: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella spp*, *Staphylococcus aureus* entre otros [2] ; y por otro lado como microorganismos alterantes nos encontramos con: *Brochothrix thermosphacta*, bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* o *Weissella viridescens* que modifican la apariencia del alimento, provocando malos olores o sabores, o cambiando el color del mismo.

En el 2005 se publicó en la Unión Europea un reglamento en el que se establecen los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, [3] con el fin que los alimentos tengan una mayor seguridad e inocuidad para el consumidor.

En los últimos años, el consumidor se ha vuelto más exigente a la hora de llenar la cesta de la compra, ya que se está concienciando más sobre la calidad y la seguridad alimentaria. Siendo cada vez más competente a la hora de elegir entre un producto y otro además que hay un mayor abanico en cuanto a la oferta de un mismo producto. Todas las empresas de este sector buscar el innovar pero sin afectar sensorialmente al producto y modificándolo sus propiedades lo menos posible con el objetivo de atraer al consumidor. Todo esto ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías y la combinación de las mismas.

A lo largo de este trabajo fin de grado se realizará un estudio sobre films elaborados con unos compuestos a base de platino y paladio con el fin de conocer si es posible su uso a la hora de alargar la vida útil de los productos alimentarios.

3. OBJECTIVES

General aim:

To study the antimicrobial effect *in vitro* and *in vivo* of films made with different inorganic compounds based on platinum and palladium against food pathogenic and spoilage microorganisms.

For this, the following specific objectives have been proposed:

- Study of the *in vitro* antimicrobial effect of different films made with inorganic compounds based on platinum and palladium against food pathogenic and spoilage microorganisms.
- Study of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the film made with the compound the greatest antimicrobial effect *in vitro*.
- Comparison of the *in vitro* antimicrobial effect of the film compound with the greatest antimicrobial in film vs solution.
- *In vivo* study of the effect of the film made with the compound with the greatest antimicrobial effect on a food rproduct such as (mini-pork burgers).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE DISTINTOS FILMS

La primera fase del ensayo se ha centrado en comprobar la sensibilidad de distintos microorganismos patógenos y alterantes seleccionados en función de sus características (Tabla 1) frente a 12 films elaborados con compuestos a base de paladio y platino.

Los compuestos utilizados en el estudio (Tabla 2) fueron seleccionados a base a los resultados obtenidos en estudios previos [4]. Los films (Tabla 3) fueron preparados por el área de Química Inorgánica de la Universidad de Burgos con una concentración final aproximadamente de 6 mg/ml.

Tabla 1. Bacterias alterantes y patógenas seleccionadas.				
Bacterias	Identificación cepa	Gram	Tipo de respiración	Clasificación
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 3241	-	Aerobia	Alterante
<i>Salmonella spp.</i>	CECT 132	-	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Escherichia coli</i>	CECT 501	-	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 457	-	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 559	-	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Campylobacter jejuni</i>	CECT 7572	-	Microaerófila	Patógeno
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CECT 847	+	Anaerobia facultativa	Alterante
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 394	+	Anaerobia facultativa	Alterante
<i>Weissella viridescens</i>	CECT 283	+	Anaerobia facultativa	Alterante
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376	+	Anaerobia	Patógeno
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 30	+	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	+	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ILSI-4	+	Anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Bacillus cereus</i>	CECT 148	+	Anaerobia facultativa	Patógeno
CECT: Colección española de cultivos tipo; ILSI: International life Sciences Institute; (+): Positivo; (-): Negativo				

Tabla 2. Compuestos empleados en la elaboración de los films.			
Nombre	Fórmula	Peso Molecular (g/mol)	Solubilidad
Lm1b	PtCl ₂ (PTA) ₂	580,29	Agua, DMSO
Lm 4E	PtCl ₂ (DAPTA) ₂	724,43	Agua, DMSO
Lm 10	Pd(C ₅ H ₄ SN) ₂ (PTA) ₂	641,04	Agua, DMSO
Lm 8	PdCl ₂ (DAPTA) ₂	635,77	Agua, DMSO
Lm 3C	Pt(C ₅ H ₄ SN) ₂ (PTA) ₂	572,55	Agua, DMSO
SFA 17,1	PdCl ₂ (PTA) ₂	491,33	Agua, DMSO
SFA 19,1	Pt(C ₄ H ₃ SN ₂) ₂ (PTA) ₂	731,66	Agua, DMSO
GAAS-9D	Pd(C ₄ H ₃ SN ₂) ₂ (PTA) ₂	643,01	Agua, DMSO
Lm 6D	Pt(C ₅ H ₄ SN) ₂ (DAPTA) ₂	873,68	Agua, DMSO
Lm 5	Pt(C ₄ H ₃ SN ₂) ₂ (DAPTA) ₂	875,8	Agua, DMSO
Lm 11	Pd(C ₄ H ₃ SN ₂) ₂ (DAPTA) ₂	785,06	Agua, DMSO
Lm 12	Pd(C ₅ H ₄ SN) ₂ (DAPTA) ₂	787,17	Agua, DMSO
AgNO ₃	AgNO ₃	169,87	Agua, DMSO

Tabla 3. Films con los compuestos seleccionados para realizar el estudio de actividad antimicrobiana.			
Nombre del film	Fórmula film	% molar monómero	Concentración mg/ml compuesto
Lm 1b	49,95VP/49,95MMA/0,1lm1b//1E/1AIBN	0,1	4,93
Lm 4E	49,95VP/49,95MMA/0,1lm4//1E/1AIBN		7,03
Lm 10	49,95VP/49,95MMA/0,1lm10//1E/1AIBN		6,22
Lm 8	49,95VP/49,95MMA/0,1lm8//1E/1AIBN		6,17
Lm 3C	49,95VP/49,95MMA/0,1lmb3b//1E/1AIBN		7,08
SFA17,1	49,95VP/49,95MMA/0,1SFA17,1//1E/1AIBN		4,77
SFA19,1	49,95VP/49,95MMA/0,1SFA19,1//1E/1AIBN		7,10
GAAS 9D	49,975VP/49,975MMA/0,1Gass9//1E/1AIBN		6,24
Lm 6D	49,95VP/49,95MMA/0,1lm6//1E/1AIBN		8,48
Lm 5	49,95VP/49,95MMA/0,1lm5//1E/1AIBN		8,50
Lm 11	49,95VP/49,95MMA/0,1lm4//1E/1AIBN		7,62
Lm12	49,95VP/49,95MMA/0,1lm12//1E/1AIBN		7,64
AgNO ₃	49,95VP/49,95MMA/0,1AgNO ₃ //1E/1AIBN		1,65
DMSO	50VP/50MMA//1E/1AIBN		0,00
VP: Vinil pirrolidona (C ₆ H ₉ NO); MMA: Metracrilato de metilo (C ₅ H ₈ O ₂); E: Entrecruzante= Dimetracrilato etilglicol (C ₁₀ H ₁₄ O ₄); AIBN: Iniciador térmico (C ₈ H ₁₂ N ₄)			

Para poder comprobar la sensibilidad que presentan las distintas bacterias frente a los 12 films elaborados, fue necesario incorporar en el análisis un control negativo: el DMSO (disolvente); y un control positivo en film: AgNO₃. (Tabla 3).

Los 14 microorganismos (Tabla 1) seleccionados se encuentran en estado latente a -70 °C en sus respectivos caldos y con un 20 % de glicerol actuando como crioprotector en el congelador del Área de Tecnología de los Alimentos. Para poder comenzar con nuestro estudio, las bacterias fueron sembradas y cultivadas el tiempo y temperatura necesaria para cada una de ellas en placas Petri con su medio específico, mediante siembra por agotamiento con el fin de aislarlas para su puesta a punto desde el glicerinado (Tabla 4).

Las bacterias *Salmonella spp.*, *Pseudomonas putida*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* se sembró en TSA (España, Scharlau sentmenat) y para *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* en TSA + 0,6 % LEVADURA (Italia, Pronadisa). Las bacterias ácido lácticas alterantes: *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridescens* se sembraron en agar MRS (Madrid, Oxoid). Y por último, *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* en agar NUTRIENT (Oxoid) + 0,5 % de sangre desfibrinada de oveja (Massachusetts, Thermo scientific). Estas dos últimas bacterias requieren una atmósfera especial para su incubación: *Clostridium perfringens* necesita atmósfera anaerobia, que se consigue mediante la incubación en jarra de anaerobiosis junto con bolsas generadoras de anaerobiosis AnaeroGen™

(AN0025, Oxoid). En el caso de *Campylobacter jejuni* que es microaerófilo (85% N₂, 5% O₂ y 10% CO₂), requiere de incubación en jarra de anaerobiosis pero con sobre de CamyGen™ (CN0025, Oxoid).

Por otro lado, los caldos de crecimiento se emplearon una vez aisladas las colonias de cada una de las cepas con el fin de conseguir la suficiente concentración de cada una de ellas para poder llegar a la concentración deseada (Tabla 4). Estos caldos son: el BHI y MRS BROTH (Oxoid) y el caldo TSB (Nueva Jersey, Merk). Finalmente una vez obtenidas las concentraciones deseadas de 8log UFC/ml se sembraron según corresponde (Tabla 4), en agar de crecimiento MULLER HILTON (Scharlau sentmetan), MRS BROTH (Oxoid) y NUTRIENT (Oxoid) + 5 % SANGRE (Thermo scientific).

Tabla 4. Materiales y necesidades de los microorganismos.

Bacterias	Agar crecimiento	Caldo crecimiento del o/n	Agar experimento	Temperatura incubación (°C)	Tiempo incubación (h)	DO 610 nm*
<i>Pseudomonas putida</i>	TSA	TSB	MUELLER-HILTON	30	24	0,7
<i>Salmonella spp.</i>	TSA	TSB	MUELLER-HILTON	37	24	0,3
<i>Escherichia coli</i>	TSA	BHI	MUELLER-HILTON	37	24	0,2
<i>Shigella sonnei</i>	TSA	TSB	MUELLER-HILTON	37	24	0,5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	TSA	TSB	MUELLER-HILTON	42	24	0,5
<i>Campylobacter jejuni</i>	NUTRIENT + 5% SANGRE	BHI	NUTRIENT + 5% SANGRE	37	48	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	TSAYE	TSBYE	MUELLER-HILTON	26	24-48	0,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS AGAR	MRS BROTH	MRS AGAR	30	24	0,3
<i>Weissella viridescens</i>	MRS AGAR	MRS BROTH	MRS AGAR	30	24	0,3
<i>Clostridium perfringens</i>	NUTRIENT + 5% SANGRE	BHI	NUTRIENT + 5% SANGRE	37	24	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA	BHI	MUELLER-HILTON	37	24	0,5
<i>Listeria innocua</i>	TSAYE	BHI	MUELLER-HILTON	37	24	0,125
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSAYE	BHI	MUELLER-HILTON	37	24	0,125
<i>Bacillus cereus</i>	TSA	BHI	MUELLER-HILTON	37	24	0,7

DO: Densidad óptica que hay que ajustar para tener una concentración de 8 log UFC/ml.; (-): *Campylobacter jejuni* no posee DO porque no produce turbidez en caldo durante su crecimiento; o/n: overnight en caldo de crecimiento específico durante 18 horas.

Una vez aislada una colonia representativa de cada bacteria, se traspasada al correspondiente caldo de crecimiento incubando durante 18 horas a la temperatura requerida por cada uno de los microorganismos para poder obtener un inóculo en fase estacionaria (o/n) (Tabla 4).

Tras el o/n, se ajusta la densidad óptica del caldo con el objetivo de obtener todos los microorganismos con una concentración de 8 log UFC/ml. Para ello se lleva a cabo la medición de la turbidez con el espectrofotómetro (modelo U-1900 Hitachi, Japan) a una longitud de onda de 610 nm y se ajustó a densidad óptica a la indicada en la Tabla 4 con el caldo de crecimiento específico para cada una de las bacterias.

Una vez ajustada la concentración a 8 log UFC/ml, se siembran en superficie 250 μ l o 150 μ l en función del diámetro de las placas petri, 150 mm o 90 mm respectivamente, en el agar correspondiente mediante un asa de Digralsky. Las placas se dejan secar durante una hora en la campana de flujo laminar (BIO-11-A, TELSTAR).

Una vez secas las placas, se depositan los films con los compuestos a estudiar de un tamaño de 0,6 cm, junto al film con el control positivo y film sin compuesto como blanco para la determinación de la eficacia antibacteriana. Además, se realizan unos pocillos en el agar mediante la parte posterior de una pipeta Pasteur esterilizada en el que se introducen 40 μ l del disolvente utilizado en la disolución de los compuestos (DMSO) como control negativo.

Las placas se incubaron a unas temperaturas y condiciones específicas durante 24 horas en función de los microorganismos sembrados (Tabla 1 y 4). Pasado ese tiempo se miden los halos de inhibición obtenidos (cm).

Una vez obtenidos los resultados de todos los microorganismos, se decide hacerlo por triplicado solo con los microorganismos GRAM positivos en base a los resultados obtenidos en este trabajo y en uno anterior en el que se estudió el efecto antimicrobiano de los mismos compuestos en solución [4].

4.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL COMPUESTO EN FILM CON MAYOR EFECTO

En la segunda fase del trabajo, se selecciona el film que más efecto tuvo en el apartado anterior y se prepararon 3 films a distintas concentraciones: 0,5 mg/ml, 1 mg/ml y 3 mg/ml, con el fin de encontrar la CMI. Todas estas concentraciones inferiores a la concentración de la primera fase general (aproximadamente 6mg/ml). También se prepara 3 6films con las mismas concentraciones de nuestro control positivo (AgNO_3) y el film sin compuesto actuando como blanco.

Se realiza el experimento de la misma forma que en la primera fase del trabajo pero solo con las bacterias gram positivas (ver Tabla 1).

Además se incorporan otras 5 cepas de microorganismos alterantes y patógenos (Tabla 5) aprovechando la adquisición de las mismas por parte del Área de Tecnología de los Alimentos para comprobar si en su caso el film también tenía efecto antimicrobiano.

El estudio de la CMI se realizó por triplicado.

Tabla 5. Microorganismos incorporados para observar el efecto antimicrobiano del film con el compuesto con mayor efecto.

Bacterias	Agar crecimiento	Caldo crecimiento o/n	Agar experimento	Temperatura incubación (°C)	Tiempo incubación (h)	8 log UFC/ml
<i>Vibrio alginolyticus</i>	NUTRIENT BROTH+2%NaCl	NUTRIENT BROTH + 2% NaCl	NUTRIENT + 2% NaCl	30	24	0,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	BHI	TSA	NUTRIENT + SANGRE 0,5%	37	24	0,125
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB	TSA	MUELLER-HILTON	30	24	0,2
<i>Aeromona caviae</i>	TSB	TSA	MUELLER-HILTON	30	24	0,125
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TSB	TSA	MUELLER-HILTON	30	24	0,25
Para el <i>Vibrio alginolyticus</i> se empleó NUTRIENT BROTH + 2% NaCl (Alemania, EMSURE)						

4.3 COMPARATIVA DEL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO EN FILM VS. EN SOLUCIÓN

En esta tercera fase se realizó una comparativa de los resultados obtenidos para el compuesto seleccionado con mayor efecto frente a los resultados obtenidos para este mismo compuesto en solución [4].

Con la finalidad de comprobar si el film ocasiona algún tipo de interferencia en la difusión del compuesto y por lo tanto, afectar a su capacidad antimicrobiana.

4.4 ESTUDIO *IN VIVO* DE LA APLICACIÓN DE UN FILM ELABORADO CON EL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UN ALIMENTO (MINI-HAMBURGUESAS DE CERDO).

Se llevó a cabo un estudio *in vivo* del film con el compuesto inorgánico GAAS-9D a concentración 0,5 mg/ml, seleccionado en el apartado 3.2 con la menor concentración de las estudiadas en el apartado 3.3 con efecto antimicrobiano.

Se partió de 1 kg de carne de cerdo procedente directamente del matadero que se picó mediante la picadora (A320, Moulinex) y, mediante un molde, se formaron hamburguesas de 20 gramos.

Se prepararon 14 hamburguesas por lote:

- Lote "C": control.
- Lote "F": hamburguesas con el film sin compuesto.
- Lote "FC": hamburguesas con el film con el compuesto seleccionado, el GAAS-9D.

Las hamburguesas una vez hechas, en función del lote al que pertenecían, se dejaban tal cual (C) o se cubrían por ambas caras con el film correspondiente (F y FC) de 4x4 cm, finalmente se depositaron en bandejas blancas (Moldes IK) y envueltas con film transparente alimentario comercial. Todos los lotes

preparados se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante los 5 días del estudio.

Se realizaron análisis microbiológicos para el estudio de la evolución de los microorganismos que habitualmente deterioran estos productos (Tabla 4) con el objetivo de evaluar si el film con el compuesto tiene algún efecto sobre su vida útil. Para ello, se analizó un lote el mismo día que se elaboran las mini-hamburguesas (t=0), a t=1 (día 1), t=4 (día 4) y t=5 (día 5) por duplicado. Para el análisis microbiológico se diluyó (1:10), la hamburguesa entera (20 g) junto con el film si lo tuviera junto con 180 ml de agua de peptona (Oxoid) en el Stomacher (400, Laboratory blender). A continuación se realizó las diluciones 1:10 necesarias para poder hacer la siembra en los distintos medios y condiciones (Tabla 6).

Se utilizó el medio agar PCA (Scharlab) para aerobios mesófilos totales, MRS (Oxoid) selectivo para bacterias ácido lácticas, agar PAB (Oxoid) medio selectivo de *Pseudomonas* el cual requiere el suplemento (C-N SR102, Oxoid), agar VRBG (WWR Chemicals BDH) para *Enterobacterias*, agar STAA (Oxoid) para el crecimiento específico de *Brochothrix thermosphacta* que además requiere suplemento (SR0151E selectivo, oxoid) y agar Baird-Parker o B-P (Vitoria, Biolife) medio de crecimiento específico de *Staphylococcus aureus* requiere suplemento (EGG YOLK TELLURITE EMULSION, Biolife). Todo este proceso se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 6. Medios empleados en el análisis de vida útil.					
Microorganismos	Medio	Metodo siembra	Temperatura incubación (°C)	Tiempo incubación (h)	Réplicas
Aerobios Mesófilos Totales	PCA	Profundidad	30	48	R1
					R2
Bacterias ácido lácticas	MRS	Superficie	30	48	R1
					R2
<i>Pseudomonas</i>	PAB	Superficie	30	48	R1
					R2
<i>Enterobacterias</i>	VRBG	Profundidad	37	24	R1
					R2
<i>Brothothrix thermosphacta</i>	STAA	Superficie	26	48	R1
					R2
<i>Staphylococcus aureus</i>	B-P	Superficie	37	48	R1
					R2
Siembra en profundidad: 1000 µl de alícuota junto con el medio PCA o VRBG líquidos, remover hasta homogeneizar y dejar enfriar hasta solidificar. En el caso del VRBG además se le añadirá otra capa y se dejará solidificar; Siembra en superficie: se añade 100 µl sobre la placa Petri con el medio solidificado y se extiende con asa Digrafsky.					

Se ha llevado a cabo un análisis de la varianza mediante un ANOVA simple con el programa Statgraphics Centurion XVII, mediante un test de múltiple rango y utilizando el método de Tukey con el cual se crearon intervalos de confianza entre las medias controlando la tasa de error.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE DISTINTOS FILMS

En la Tabla 7 se encuentran recogidos los resultados sobre el tamaño del halo de inhibición originado por los films de los diferentes compuestos. En este primer apartado se comenzó con las 14 bacterias seleccionadas, en la primera réplica se confirmó lo observado en el trabajo anterior [4], las bacterias gramnegativas son resistentes a todos los compuestos estudiados y por tanto no se observa ningún halo de inhibición en las mismas, así que en las siguientes dos réplicas del trabajo no se incluyeron. Por tanto, en la tabla 7 sólo se presentan la media de las tres réplicas realizadas, de aquellos films que presentaron efecto antimicrobiano causando halos inhibición sobre bacterias gram positivas. Los microorganismos gram positivos que no aparecen en la tabla 7, se debe a que ninguno de los film probados presentó efecto antimicrobiano.

Nos centramos en las bacterias gram positivas para observar detalladamente el efecto que ocasionan sobre ellas (Tabla 7).

Tabla 7. Halo de inhibición (cm) de los films con diferentes compuestos en bacterias grampositivas.								
Bacterias GRAM POSITIVAS	FILMS ELABORADOS CON LOS DISTINTOS COMPUESTOS							
	LM 10	SFA 17,1	SFA 19,1	GAAS 9-D	LM 6D	AgNO ₃ (+)	Disco	DMSO (-)
<i>Brochothrix thermophacta</i>	0,90±0,8	x	x	0,75±0,0	x	x	x	x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,95±0,2	x	x	0,87±0,1	x	x	x	x
<i>Listeria innocua</i>	1,03±0,4	x	x	0,80±0,0	x	x	x	x
<i>Listeria monocytogenes</i>	x	x	x	0,77±0,1	x	x	x	x
<i>Bacillus cereus</i>	1,17±0,1	x	x	0,87±0,1	x	x	x	x
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,90±0,1	0,78±0,2	1,20±0,4	1,27±0,3	0,92±0,0	x	x	x
<i>Weissella viridescens</i>	0,68±0,3	x	x	0,93±0,1	x	x	x	x
<i>Clostridium perfringens</i>	x	x	x	x	x	x	x	x

El ensayo se realizó por triplicado, en la tabla se muestran los valores medios con su desviación estándar. La "x" representa la ausencia de inhibición. El diámetro de los films es de 0,6 cm. Los recuadros resaltados son los que mostraron un resultado positivo en los 3 ensayos realizados.

En la tabla 7, se muestran los film elaborados con los compuestos seleccionados que han tenido algún tipo de efecto antimicrobiano, destacando el film formado por el compuesto LM 10 y el film formado por el compuesto GAAS 9-D.

Leuconostoc mesenteroides es la especie que presenta mayor sensibilidad a los distintos compuestos, al igual que en otro estudio [4], coincide con que esta especie se ve afectada a concentraciones mínimas inhibitorias más bajas en comparación con el resto de bacterias estudiadas.

Al comparar los resultados de la tabla 7 con otros estudios en los que se estudian la actividad antimicrobiana en disolución, coinciden en que los compuestos seleccionados no son efectivos frente a las bacterias gramnegativas, ni frente a *Clostridium perfringens* (grampositiva anaerobia). Además los compuestos LM 10 y GAAS-9D han sido en ambos estudios los compuestos que mayor efecto antimicrobiano han originado ya sea en disolución como en films [4].

Es en base a estos resultados, se selecciona el compuesto GAAS-9D debido a que presenta mayor efecto antimicrobiano para llevar a cabo el resto de partes por las que está compuesto el estudio.

Por otro lado, el control positivo AgNO_3 , no presenta ningún tipo de efecto a la concentración estudiada (1,65 mg/ml), es por lo que en el apartado 5.2 se llevó a cabo el estudio de la concentración mínima inhibitoria del compuesto seleccionado en film, el GAAS-9D, frente al control positivo (AgNO_3) en film en las mismas concentraciones.

5.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO EN FILM

En la Tabla 8 se observan los resultados obtenidos del film con el compuesto seleccionado (GAAS-9D) a distintas concentraciones (0,5 mg/ml, 1mg/ml y 3 mg/ml) para el estudio de la concentración mínima inhibitoria. Esta tabla muestra la media de tres réplicas con su desviación estándar junto a los resultados obtenidos para el control positivo a las mismas concentraciones (AgNO_3).

Los resultados más destacados que se obtienen son:

- Los resultado obtenidos para la concentración de 1 mg/ml no aparecen en la tabla 8, puesto que no eran coherentes al haber efecto antimicrobiano a concentraciones por encima y por debajo, pero no a esta concentración para ninguna de las cepas estudiadas. Lo mismo se observó en el control positivo, y la causa podría deberse a que la concentración de este film no correspondía a 1 mg/ml. Se llega a esta conclusión debido a que una característica que presentan estos films es que a mayor concentración del compuesto, el film muestra una coloración más intensa debido a los dobles enlaces, y posteriormente al terminar el estudio y al analizar los resultados se observó que esta característica no se cumplía en los film de dicha concentración, mostrando un color parecido, o incluso más blanco que los films de concentración 0,5 mg/ml.

- La concentración 0,5 mg/ml del compuesto GAAS-9D tiene efecto antimicrobiano sobre las mismas bacterias que ejerce efecto a concentraciones mayores. Esto podría indicar que el compuesto en el film se encuentra saturado, pudiendo ser la CMI menor a la concentración de 0,5 mg/ml para la mayoría de las bacterias estudiadas, excepto para *Bacillus cereus* que mostró mayor resistencia a concentraciones probadas menores de 6 mg/ml. De nuevo se observa que *Leuconostoc mesenteroides* es la especie más sensible a las distintas concentraciones de este compuesto al presentar el tamaño de los halos mayor.
- Por otro lado, como ya se observó en el apartado anterior, las bacterias que no han mostrado sensibilidad ni a una concentración de 0,5 mg/ml ni a 3 mg/ml del compuesto GAAS-9D, puede deberse a dos razones:
 - Que la concentración mínima estaría por encima de 6 mg/ml.
 - Que el compuesto no tenga efecto antimicrobiano sobre estas bacterias que no han mostrado sensibilidad ya que en otro estudio [4] a concentración de 1 mg/ml en disolución del compuesto GAAS-9D, tampoco había efecto.
- Por último, se observa que una concentración del control positivo (AgNO_3), inferior a 3 mg/ml no es adecuada para la mayoría de las bacterias estudiadas, lo que podría explicar los resultados obtenidos en el primer apartado donde se usó una concentración de 1,65 mg/ml.

Tabla 8. Diámetro de los halos en cm del films con compuesto GAAS-9D a distintas concentraciones estudiadas para buscar la CMI.					
Microorganismos	GAAS-9D			AgNO₃	
	0,5 mg/ml	3 mg/ml	6 mg/ml	0,5 mg/ml	3mg/ml
<i>Pseudomonas putida</i>	X	X	X	X	0,93±0,20
<i>Salmonella spp</i>	X	X	X	X	0,77±0,03
<i>Echerichia coli</i>	X	X	X	X	0,75±0,10
<i>Shigella sonnei</i>	X	X	X	0,73±0,10	0,83±0,20
<i>Yersinia enterolitica</i>	X	X	X	0,88±0,10	0,95±0,10
<i>Campylobacter jejuni</i>	X	X	X	0,78±0,10	0,93±0,10
<i>Brochotrix thermoxphacta</i>	0,95±0,10	0,93±0,10	0,75±0,00	X	0,65±0,00
<i>Leuconostum mesenteroides</i>	1,32±0,50	1,57±0,30	1,27±0,30	X	0,75±0,10
<i>Weisella viridescens</i>	1,35±0,30	0,80±0,70	0,93±0,10	X	0,70±0,10
<i>Clostridium perfringens</i>	X	X	X	X	0,80±0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,12±0,03	0,73±0,60	0,87±0,10	0,77±0,10	0,90±0,00
<i>Listeria innocua</i>	1,07±0,40	0,63±0,60	0,80±0,00	X	0,73±0,10
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,67±0,60	0,70±0,60	0,77±0,10	X	0,78±0,10
<i>Bacillus cereus</i>	X	X	0,87±0,10	X	0,73±0,10
<i>Vibrio alginolyticus</i>	X	X	X	1,25±0,60	1,40±0,60
<i>Shewanella putrefaciens</i>	X	X	X	1,08±0,10	1,38±0,10
<i>Aeromona caviae</i>	X	X	X	X	X
<i>Pseudomona fluorensceus</i>	0,82±0,70	0,62±0,60	X	X	X
<i>Enterococcus faecalis</i>	X	X	X	0,62±0,03	0,75±0,00

Ensayo realizado por triplicado, se muestran los valores medios junto con la desviación estándar. La "X" representa ausencia de inhibición o inferior al diámetro del film (0,6cm).

5.3 COMPARATIVA DEL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO EN FILM VS. EN SOLUCIÓN.

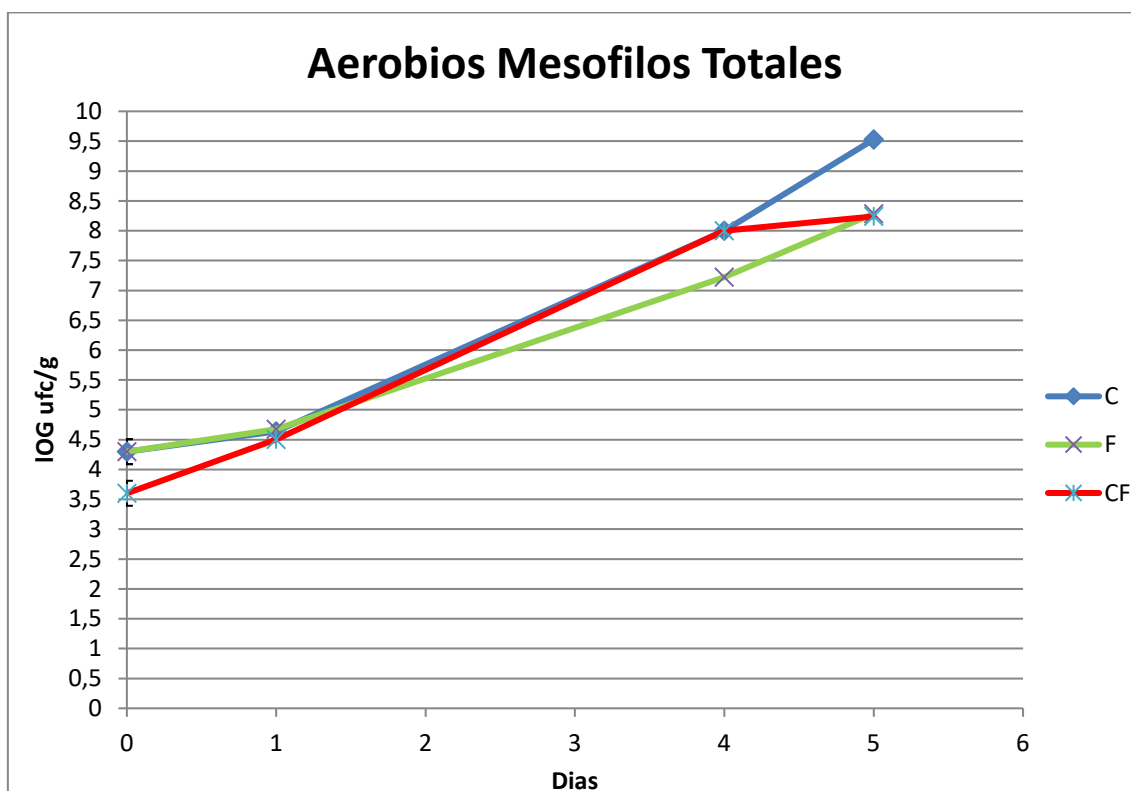
En la tabla 9 se muestra una comparativa del compuesto seleccionado, el GAAS-9D en disolución [4] frente a los resultados obtenidos tras su incorporación en film. Se observan que las distintas concentraciones en film tienen un efecto antimicrobiano algo menor que en disolución. Estos resultados podrían indicar que, los componentes del film actúan como interferente, existiendo un posible efecto matriz por parte del film impidiendo que el compuesto no tenga el mismo efecto que en disolución.

Tabla 9. Diámetro de los halos (cm) de los films con el compuesto GAAS-9D y el mismo en disolución.			
Microorganismos	FILM		DISOLUCIÓN
	GAAS-9D		GAAS-9D
	0,5 mg/ml	3mg/ml	1mg/ml
<i>Pseudomonas putida</i>	X	X	X
<i>Salmonella spp.</i>	X	X	X
<i>Echerichia coli</i>	X	X	X
<i>Shigella sonnei</i>	X	X	X
<i>Yersinia enterocolitica</i>	X	X	X
<i>Campylobacter jejuni</i>	X	X	X
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	0,95±0,10	0,93±0,10	1,4±0,30
<i>Leuconostum mesenteroides</i>	1,32±0,50	1,57±0,30	2,1±0,00
<i>Weisella viridescens</i>	1,35±0,30	0,80±0,70	1,6±0,10
<i>Clostridium perfringens</i>	X	X	X
<i>Staphylococcus Aureus</i>	1,12±0,03	0,73±0,60	1,9±0,30
<i>Listeria innocua</i>	1,07±0,40	0,63±0,60	1,7±0,40
<i>Listeria Monocytogenes</i>	0,67±0,60	0,70±0,60	1,9±0,30
<i>Bacillus cereus</i>	X	X	1,1±0,00
Ensayo realizado por triplicado, se muestran los valores medios junto con la desviación estándar. La "X" representa ausencia de inhibición o inferior al diámetro del film (0,6cm).			

El compuesto GAAS-9D presenta mayor efecto antimicrobiano en disolución que en film, debido a los problemas acontecidos con la concentración 1 mg/ml sería necesario repetir el ensayo para confirmar la interferencia que pueda originar la estructura y composición del film.

5.4 ESTUDIO *IN VIVO* DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FILM ELABORADO CON EL COMPUESTO CON MAYOR EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE UN ALIMENTO (MINI-HAMBURGUESAS DE CERDO).

En la gráfica 1 se presentan los resultados de la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos totales a lo largo del tiempo.



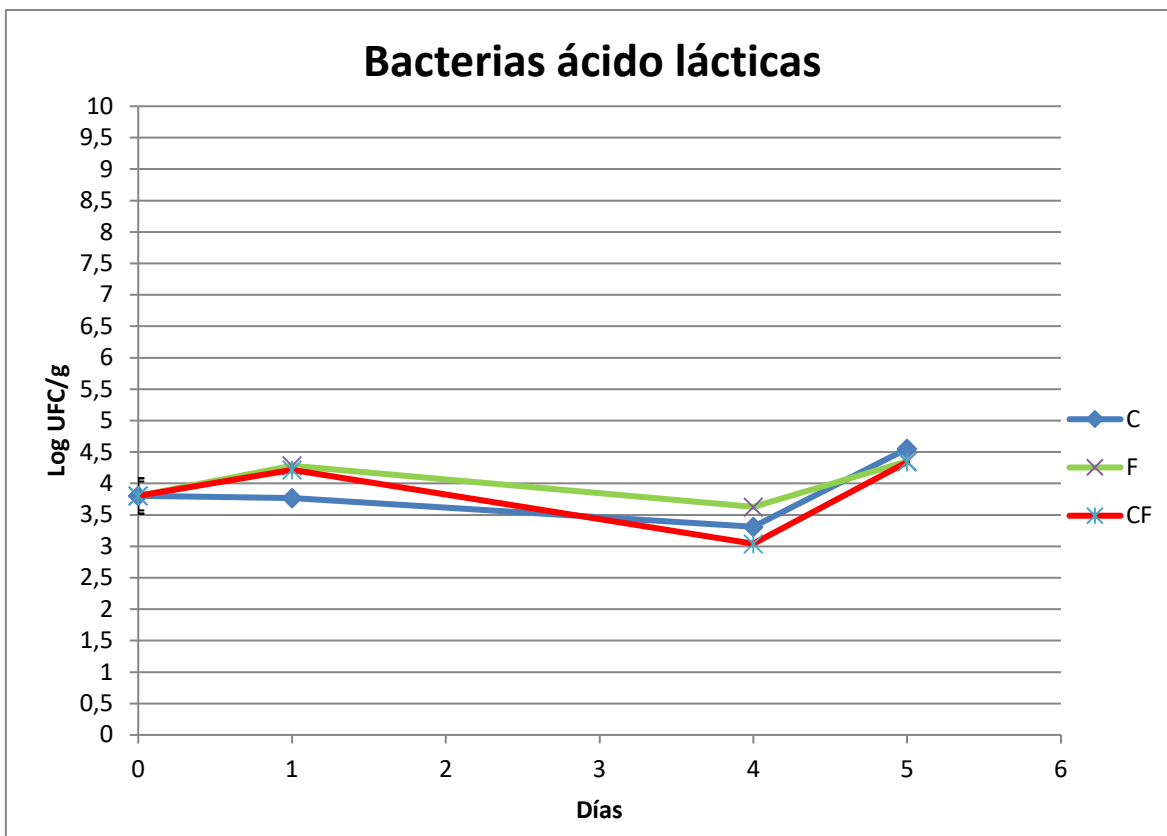
Gráfica 1. Crecimiento de Aerobios Mesófilos Totales (log UFC/g) a lo largo del tiempo.

Además se realizó un estudio estadístico en el que se confirma que hay diferencias significativas a lo largo del tiempo para el lote C (Tabla 10).

Tabla 10. Evolución de los recuentos de aerobios mesófilos totales.				
Aerobios mesófilos totales	Tiempos			
	0	1	4	5
C	A 4,30 a	A 4,64 a	A 8,00 b	A 9,53 a
F	A 4,30 a	A 4,68 a	A 7,20 a	A 8,29 a
CF	A 4,30 a	A 4,69 a	A 8,00 a	A 8,24 a

A: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre lotes ($p < 0,05$)
a y b: letra minúsculas diferentes indican diferencias significativas a lo largo del tiempo para un mismo lote.

Para las bacterias ácido lácticas, según la Gráfica 2 se observa como los tres lotes siguen una misma tendencia de crecimiento.



Gráfica 2. Crecimiento de bacterias ácido lácticas (log UFC/g) a lo largo del tiempo.

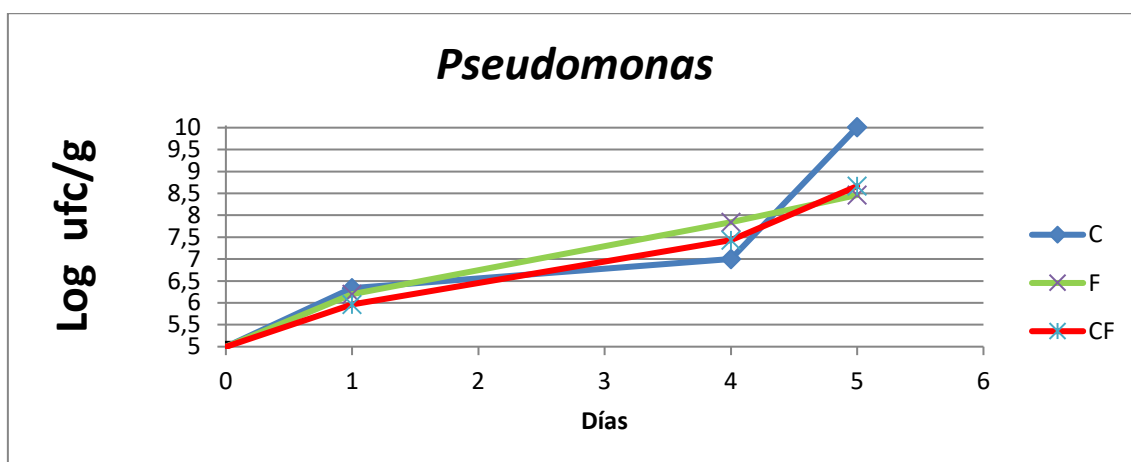
En el estudio estadístico (Tabla 11) se confirma que no existen diferencias significativas entre lotes ni a lo largo del tiempo para un mismo lote.

Tabla 11. Evolución de los recuentos de bacterias ácido lácticas.				
Bacterias ácido lácticas	Tiempos			
	0	1	4	5
C	A 3,80 a	A 3,47 a	A 3,04 a	A 4,34 a
F	A 3,80 a	A 4,37 a	A 3,31 a	A 4,35 a
CF	A 3,80 a	A 4,22 a	A 3,63 a	A 4,55 a

A: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre lotes ($p < 0,05$)
a: letra minúsculas diferentes indican diferencias significativas a lo largo del tiempo para un mismo lote.

Con estos resultados obtenidos, se ve como no existe un efecto del film con o sin el compuesto seleccionado (GAAS-9D) sobre las bacterias ácido lácticas de nuestro producto en estudio (mini-hamburguesas de cerdo), a pesar de que en el estudio in vitro a la concentración de 0,5 mg/ml sí tenían efecto frente a dos bacterias lácticas típicas de productos cárnicos como son *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella viridescens*. Esta diferencia en los resultados se puede deber a que la propia matriz alimentaria interfiere protegiéndolas.

En los resultados para *Pseudomonas* spp., según la gráfica 3, las tres muestras presentan un crecimiento ascendente de las UFC/g, siendo este microorganismo la flora predominante del producto.



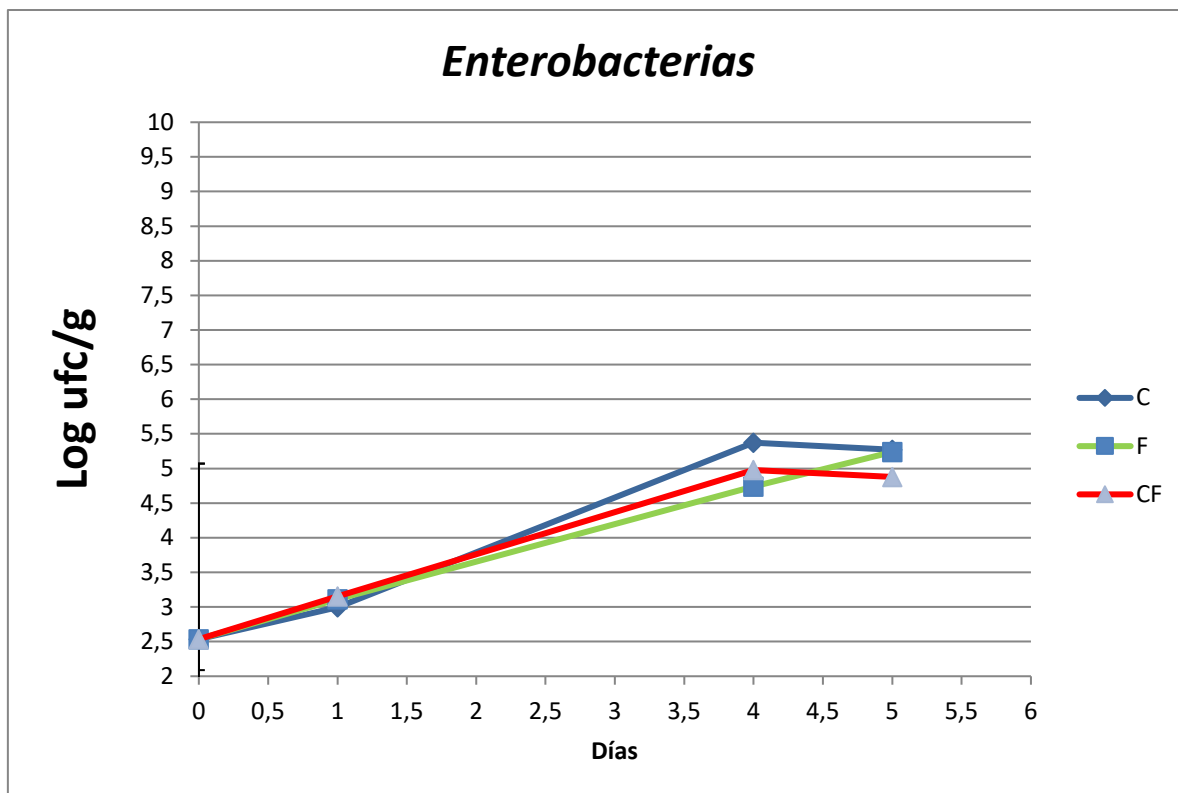
Gráfica 3. Crecimiento de *Pseudomonas* (log UFC/g) a lo largo del tiempo.

Tabla 12. Evolución de los recuentos de <i>Pseudomonas</i> spp.				
<i>Pseudomonas</i>	Tiempos			
	0	1	4	5
C	A 5,00 a	A 6,33 a	A 7,00 a	B 10,00 b
F	A 5,00 a	A 6,20 a	A 7,80 a	A 8,46 a
CF	A 5,00 a	A 5,96 a	A 7,40 a	A 8,66 a

A y B: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre lotes ($p < 0,05$)
a y b: letra minúsculas diferentes indican diferencias significativas a lo largo del tiempo para un mismo lote.

Como se observa en la Gráfica 3 y en la Tabla 12, el recuento a tiempo $t=5$ por parte de C se observa un significativo crecimiento ($p < 0,05$) frente a los otros dos lotes (F y CF), esto podría deberse a un posible efecto barrera al oxígeno que ejerce el film, influyendo en el crecimiento de las mismas pero no a un posible efecto del compuesto GAAS-9D, puesto que no hay diferencias entre las muestras F y CF. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los apartados previos donde se observaba que a ninguna de las concentraciones probadas, este compuesto tenía efecto sobre la cepa probada perteneciente a este género: *Pseudomonas pútida*.

Para las *enterobacterias* están representados los resultados en la gráfica 4. En ella se puede apreciar como hay cambios significativos a lo largo del tiempo (Tabla 13).



Grafica 4. Crecimiento de *Enterobacterias* (log UFC/g) a lo largo del tiempo.

Tabla 13. Evolución de los recuentos de <i>Enterobacterias</i> .				
<i>Enterobacterias</i>	Tiempos			
	0	1	4	5
C	A 2,53 a	A 2,90 a	A 4,33 a	A 5,50 b
F	A 2,53 a	A 3,08 a	A 4,74 a	A 5,52 a
CF	A 2,53 a	A 3,13 a	A 4,98 a	A 4,88 a

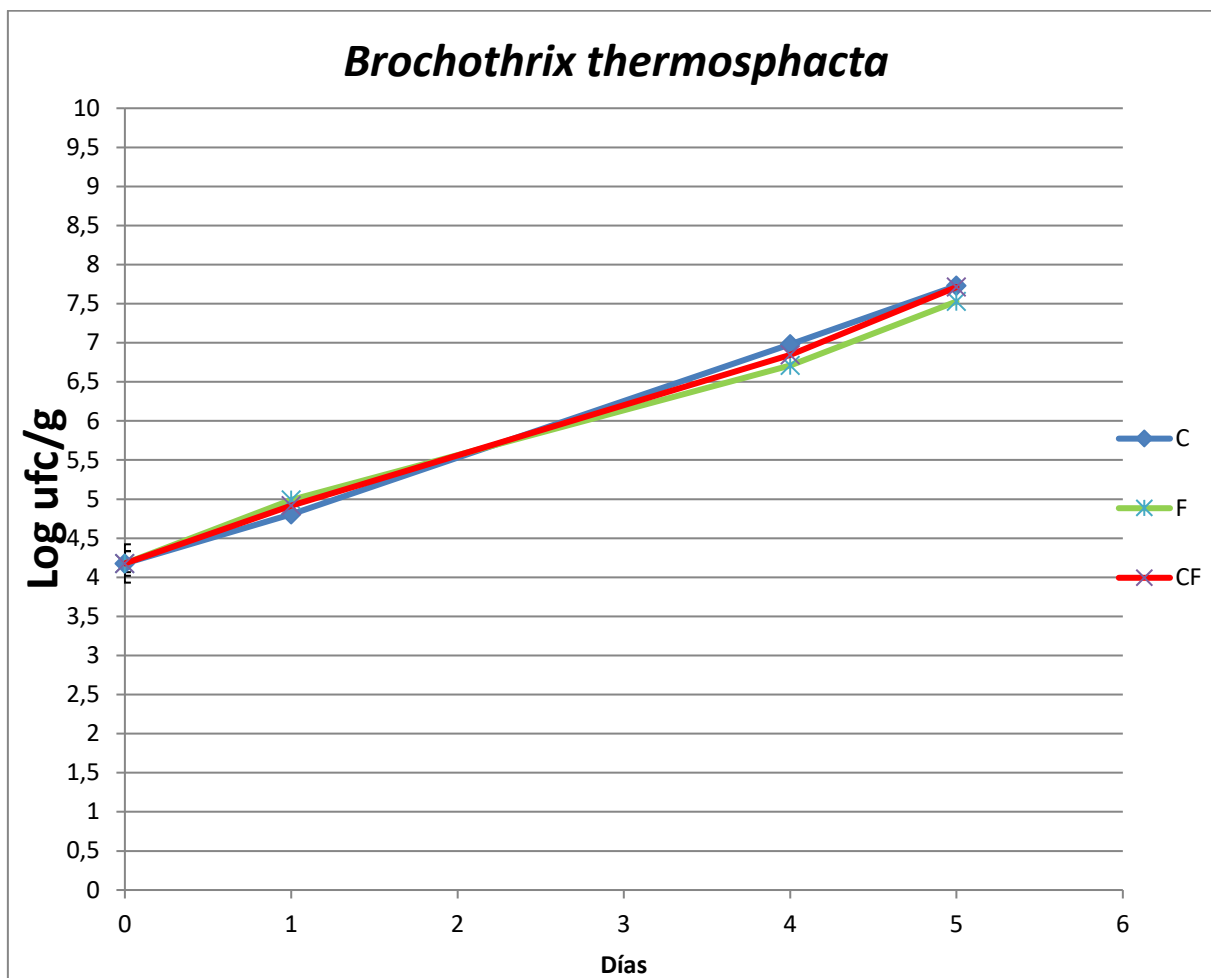
A: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre lotes ($p < 0,05$)
a y b: letra minúsculas diferentes indican diferencias significativas a lo largo del tiempo para un mismo lote.

En la gráfica 4, se observa como por parte del lote C, hay diferencias significativas entre el $t=4$ y $t=5$, mientras que en los otros lotes no.

El crecimiento de *Enterobacterias* a lo largo del tiempo va disminuyendo si se encuentra a una temperatura optima de refrigeración (en nuestro caso, refrigeramos las mini-hamburguesas a 4°C)

El que hayamos obtenido unos valores diferentes del lote control respecto del film con compuesto o solo film, no indica que el film con compuesto ejerza efecto inhibitorio.

Para el *Brochothrix thermosphacta*, como se puede visualizar en la gráfica 5 no hay diferencias entre las muestras, con esto se puede afirmar que el compuesto GAAS-9D no ejerce ningún efecto antimicrobiano para dicha bacteria cuando se encuentra de forma nativa en el producto, debido probablemente a lo indicado en el caso de las bacterias lácticas.



Gráfica 5. Crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* (log UFC/g) a lo largo del tiempo.

El estudio estadístico mostrado en la tabla 14 nos confirma que no hay diferencia significativa entre las muestras analizadas.

Tabla 14. Evolución de los recuentos de <i>Brochothrix thermosphacta</i>.				
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Tiempo			
	0	1	4	5
C	A 4,17 a	A 4,8 b	A 6,19 a	A 7,66 a
F	A 4,17 a	A 4,9 a	A 6,71 a	A 7,6 a
CF	A 4,17 a	A 4,95 a	A 6,85 a	A 7,69 a

A: Muestra si para cada tiempo las muestras de los lotes son significativamente iguales.
a: Muestra si en cada lote a lo largo del tiempo las muestras siguen siendo las mismas.

Por último, el medio B-P específico para de *Staphylococcus* spp., y hubo ausencia total de la especie *S. aureus* en las muestras estudiadas. *S. aureus*, apenas hubo recuento de colonias en ninguna de las muestras estudiadas.

Se observó esta tendencia en los tres lotes a lo largo del tiempo, dando un resultado casi inexistente. Al no aparecer en el lote C, no se puede afirmar que el film y/o film con el compuesto ejerzan algún tipo de efecto inhibitorio frente a esta especie.

Con todos estos resultados representados en las gráficas podemos concluir con que no hay efecto del film con el compuesto GAAS-9D sobre la propia microflora de las mini hamburguesas ya que según pasa el tiempo, el compuesto GAAS-9D no actúa de barrera para frenar la multiplicación de los distintos microorganismos propios de la carne.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos con otros trabajos donde se emplean compuestos naturales, como el quitosano, se ve que este último sí que obtiene un efecto antimicrobiano sobre la carne de cerdo, entre otros [5].

En otros estudios que se han realizado en la carne de hamburguesa empleando extractos naturales obtenidos de tubérculos (*Tropaeolum tuberosum*) también se ha observado efecto antimicrobiano sobre la *Listeria monocytogenes* gracias a su alto contenido en glucosinolatos [6].

6. CONCLUSIONES

- Los compuestos GAAS-9D y LM10 en films son los compuestos que presentan un mayor efecto antimicrobiano de los estudiados.
- Serían necesarios más ensayos in vitro con el fin de buscar la CMI de GAAS-9D. Para la mayoría de las bacterias gram positivas estudiadas estaría por debajo de 0,5 mg/ml. En cambio para las bacterias gram negativas estaría por encima de 6 mg/ml, siendo estas bacterias las más resistentes a los films probados.
- Dentro de las bacterias gram positivas, *Leuconostoc mesenteroides* es la más sensible a los compuestos estudiados y *Bacillus cereus*, la más resistente a compuesto con mayor efecto antimicrobiano.
- Existe un posible efecto matriz del film que interfiere sobre el efecto antimicrobiano del compuesto probado.
- El film con el compuesto GAAS-9D *in vivo* no presenta efecto antimicrobiano sobre las bacterias nativas presentes en el producto.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Rugama, F. A., & Castillo, Y. (Febrero, 2010). *Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Estelí.

- [2] FDA U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. (11 de 08 de 2017). Obtenido de U.S. Department of Health and Human Services:
<https://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>
(Visitado 13 de Junio 2018).
- [3] Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión. (15 de noviembre de 2005). *Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.*
- [4] Agud, V. R. (Marzo 2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de compuestos a basa de platino y paladio. Trabajo Fin Grado UBU.*
- [5] V., C. V., & Arias, J. I. (s.f.). *Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. Avances en Ciencias Veterinarias V27 N° 1 2012 .*
- [6] Restrepo, L. M., & Fernanda Paz Cañón, C. (Bogotá 2017). *Efecto antimicrobiano del extracto de cubio (Tropaeolum tuberosum) frente a Listeria monocytogenes en carne de hamburguesa . UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE INGENIERÍA .*