



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Máster en

## Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO ANTIMICROBIANO BASADO EN  
LA INCORPORACIÓN DE LAE EN NANOCELULOSA

DEVELOPMENT OF AN ANTIMICROBIAL ACTIVE PACKAGING BASED  
ON THE INCORPORATION OF LAE IN NANOCELLULOSE

Autor/es

NICOLÁS GRACIA VALLÉS

Director/es

FILOMENA ALMEIDA SILVA

CRISTINA NERÍN DE LA PUERTA

Facultad de Veterinaria

2018



# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 CNF utilizadas y preparación de los films.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Medios de cultivo y bacterias utilizadas .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Motilidad bacteriana: “swarming” y “swimming” .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Ensayo de inhibición de la formación de biofilms bacterianos .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Determinación de la concentración de LAE en disolución acuosa.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 Recta de calibrado de LAE en disolución acuosa .....</b>	<b>20</b>
<b>3.7 Afinidad entre el LAE y los films de CNF.....</b>	<b>20</b>
<b>3.8 Lavado de los films de CNF-LAE .....</b>	<b>21</b>
<b>3.9 Actividad antimicrobiana del LAE en films de CNF frente a <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>3.10 Ensayo <i>in vitro</i> de los films CNF-LAE sobre un cultivo de <i>L. monocytogenes</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.11 Ensayo <i>in vivo</i> de los films de LAE en jamón cocido .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Motilidad bacteriana: “swarming” y “swimming” .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Ensayo de inhibición de la formación de biofilms bacterianos .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Recta de calibrado de LAE en disolución acuosa .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Afinidad entre el LAE y los films de CNF.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Lavado de los films de CNF-LAE .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Actividad antimicrobiana del LAE en films de CNF frente a <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>4.7 Ensayo <i>in vitro</i> de los films CNF-LAE sobre un cultivo de <i>L. monocytogenes</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8 Ensayo <i>in vivo</i> de los films de LAE en jamón cocido .....</b>	<b>41</b>
<b>5. Conclusión .....</b>	<b>44</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>51</b>



## Resumen

Los patógenos alimentarios son un problema de seguridad alimentaria, especialmente en los alimentos listos para el consumo (RTE), al no recibir ningún tratamiento previo a su consumo, por lo que cualquier contaminación microbólica que contengan será transmitida al consumidor. El objetivo de este proyecto fue el desarrollo de un envase activo antimicrobiano basado en films de nanofibras de celulosa (CNF) con el antimicrobiano etil lauroil arginato (LAE) capaz de inhibir el crecimiento o eliminar bacterias patógenas alimentarias en alimentos cárnicos RTE, mejorando su conservación y seguridad alimentaria. Para ello, se llevó a cabo un estudio de la actividad antimicrobiana de cuatro CNF (02, 03, 04 y 05), evaluando parámetros como la motilidad bacteriana de  $\beta$ -swimming y  $\beta$ -swarming, así como la capacidad de inhibir la formación de biofilms de cuatro relevantes patógenos alimentarios, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* verotoxigénica, *Bacillus cereus* y *S. Typhimurium*. Las CNF seleccionadas demostraron capacidad de inhibir la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, el principal patógeno presente en alimentos RTE, y por lo tanto se seleccionó esta bacteria para los estudios posteriores. A continuación, se realizaron análisis microbiológicos *in vitro* para comprobar la capacidad antimicrobiana de los films de CNF-LAE frente a *L. monocytogenes*. Para caracterizar la afinidad del LAE de las CNF utilizadas, se optimizó un método cromatográfico de extracción líquido-líquido para la determinación de LAE en disoluciones acuosas que posteriormente se aplicó al estudio de la incorporación y liberación del LAE en los films de CNF. Tras los resultados obtenidos se seleccionaron CNF 03 y CNF 05, debido a su mayor afinidad para la molécula de LAE. Por último, se utilizaron los films de CNF seleccionados en una prueba *in vivo*, utilizando jamón cocido (alimento RTE) al que se inoculó *L. monocytogenes* para comprobar la actividad antimicrobiana de los films de CNF-LAE. Este ensayo reveló que los films de CNF-LAE podían causar una ligera disminución en los recuentos de *L. monocytogenes*, así como en la carga microbiana total de las muestras de jamón.

## **Summary**

Food pathogens are a relevant problem in terms of food safety, especially with respect to ready-to-eat foods (RTE), as they do not receive any treatment prior to their consumption, which means that any microbiological contamination present in the food product will be directly transmitted to the consumer. The goal of this project was the development of an antimicrobial active package based on cellulose nanofibrill films (CNF) containing the antimicrobial compound ethyl lauroyl arginate (LAE), that is capable of inhibiting or eliminating the growth of pathogenic bacteria in ready-to-eat meat foods, improving their preservation and food safety. For this purpose, the antimicrobial activity of four CNFs (02, 03, 04 and 05) was studied, evaluating parameters such as bacterial swimming and swarming motility, as well as the ability to inhibit the formation of biofilms, of four relevant foodborne pathogens, such as *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *S. Typhimurium*. The selected CNFs were able to inhibit the formation of *L. monocytogenes* biofilms, which is the main pathogen present in RTE foods, and therefore this bacterium was selected for subsequent studies. Subsequently, *in vitro* microbiological analyses were carried out to check the antimicrobial capacity of CNF-LAE films against *L. monocytogenes*. To characterize LAE affinity to the CNF under study, a liquid-liquid extraction chromatographic method was optimized for the determination of LAE in aqueous solutions, which was later applied to the study of the incorporation and release of LAE from CNF films. After the obtained results, CNF 03 and CNF 05 were selected for the subsequent assays, due to their greater affinity to the LAE molecule. Finally, the *in vivo* antimicrobial activity of the selected CNF-LAE films was studied in cooked ham (RTE food) artificially contaminated with *L. monocytogenes*. This assay revealed that CNF-LAE films were able to cause a slight decrease in *L. monocytogenes* counts as well as the total microbial load of ham samples.

## 1. Introducción

La insalubridad de los alimentos siempre ha representado un problema de salud para el ser humano, y aún persiste hoy en día. La existencia de enfermedades de transmisión alimentaria sigue siendo un problema de salud importante tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (OMS, 2007).

Los alimentos insalubres suponen una amenaza para la salud a escala mundial y ponen en peligro la vida de todos, en especial de los grupos más vulnerables como los lactantes, los niños pequeños, las embarazadas, las personas mayores y las personas con enfermedades subyacentes. La ingesta de alimentos insalubres está relacionada con la muerte de unos 2 millones de personas al año, en su mayoría niños. Estos alimentos contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas que son responsables de más de 200 enfermedades. Teniendo en cuenta estos datos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a los gobiernos elevar la inocuidad de los alimentos al rango de prioridad de salud pública, estableciendo y aplicando sistemas eficaces en materia de inocuidad que permitan asegurar que los productores y proveedores actúen de forma responsable y suministren alimentos inocuos a los consumidores. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de fabricación o de distribución. Sin embargo, una buena parte de las enfermedades transmitidas por los alimentos son causadas por alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en el hogar, en establecimientos que sirven comida o en los mercados (OMS, 2017). Por ello es muy importante que los alimentos sean inocuos cuando los adquieren los consumidores, para limitar las contaminaciones posteriores. La carga bacteriana presente en muchos alimentos es bastante elevada en la microflora de los alimentos. Además de las bacterias alterantes, también existen bacterias patógenas responsables de enfermedades de origen alimentario, como es el caso de *Escherichia coli* verotoxigénica, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*.

*Escherichia coli* verotoxigénica es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo de la familia de las enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Es una bacteria anaerobia facultativa, móvil por flagelos perítricos y no forma esporas (OMS, 2018a). La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, pero las cepas verotoxigénicas producen verotoxinas o toxinas shiga, que son responsables de un aumento del nivel de infección. Dentro de las cepas veroxigénicas,

el serotipo más importante es *E. coli* O157:H7. Este es un patógeno alimentario que causa infecciones moderadas o graves, con mayor incidencia de muertes en niños y en ancianos. Entre los síntomas de la enfermedad se destacan los calambres abdominales y la diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica), pudiendo estar asociada a fiebre y vómitos, con un periodo de incubación medio de tres a cuatro días. En algunos casos más graves, la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, el síndrome hemolítico urémico (SHU), que se puede desarrollar en el 10% de los pacientes, con una tasa de letalidad de 3-5%. El origen principal de los brotes son los productos de carne picada cruda o poco cocinada, la leche cruda y las hortalizas contaminadas por materia fecal (OMS, 2018a; Butler, *et al.*, 2006).

*Salmonella enterica* serotipo Typhimurium: es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que presenta movilidad debido a la presencia de flagelos (FAO, 2007). Esta bacteria es uno de los serotipos de *Salmonella* que más frecuentemente provoca infecciones alimentarias en humanos, llamadas salmonelosis. Esta infección se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos. En la mayoría de los casos, los síntomas son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños y ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida. Por lo general, la salmonelosis se contrae a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal, como los huevos, carne de porcino, vacuno, aves de corral y leche (OMS, 2018b).

*Bacillus cereus* es un bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio y móvil que produce dos tipos de toxiiinfecciones alimentarias en humanos, la forma diarreica y la forma emética. Los principales alimentos que pueden ser fuente de transmisión de *B. cereus* son carnes, vegetales, especias, leche cruda, etc., ya que *B. cereus* está muy difundido en el medio ambiente. Como resultado, diversos alimentos como vegetales, leche cruda, especias y alimentos listos para el consumo (RTE, siglas del inglés ñready-to-eatö) a menudo están contaminados con esporas de *B. cereus* (FDA, 2012; EFSA, 2016a).

Junto a las tres bacterias mencionadas, uno de los patógenos más frecuentemente encontrados en los alimentos RTE es *Listeria monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes*: es un bacilo Gram positivo, anaeróbico facultativo, psicrótrofo y con flagelos perítricos. Es móvil a temperaturas inferiores a 30 °C. Esta bacteria se distribuye ampliamente en el medio ambiente incluyendo suelo, vegetación, materia fecal y agua, siendo resistente a diversas condiciones ambientales, como la alta salinidad o la acidez, lo que le permite sobrevivir durante más tiempo en condiciones adversas (FAO, 2004). *L. monocytogenes* posee, también, la capacidad de formar biofilms en alimentos RTE (Enriques and Fraqueza, 2017). Esta bacteria es responsable de una de las enfermedades infecciosas bacterianas de origen alimentario más peligrosas, la listeriosis. La listeriosis más peligrosa es la invasiva, que afecta a grupos de alto riesgo como las embarazadas, ancianos, lactantes e inmunodeprimidos. Se caracteriza por síntomas graves y una alta tasa de mortalidad (20-30%). Entre sus síntomas se encuentran la fiebre, los dolores musculares, la septicemia y la meningitis. En embarazadas puede causar abortos y en los recién nacidos bajo peso, septicemia o meningitis. Según datos de la OMS, los alimentos de alto riesgo para contraer esta enfermedad son los fiambres, productos cárnicos listos para comer (carnes y salchichas cocinadas, curadas o fermentadas), quesos blandos y pescados ahumados (OMS, 2018c). Según datos de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en 2016 se registraron 2.536 casos de listeriosis invasiva en la Unión Europea (UE) con una mortalidad del 16,2%, siendo la población mayor de 65 años la más afectada, especialmente por encima de los 84 años (EFSA, 2017). La presencia de *L. monocytogenes* en comida RTE según la EFSA fue detectada más habitualmente en productos pesqueros (5,6%), pescado (4,7%), productos cárnicos (3,1%) y en quesos blandos (2,5%). Comparando los datos de 2016 con los 2015, hubo un descenso de *L. monocytogenes* del 15% en las muestras de los principales alimentos RTE analizados (EFSA, 2017; EFSA 2016b), pero este patógeno sigue siendo responsable de muchas de las muertes derivadas de infecciones alimentarias. Este hecho supone un problema de seguridad alimentaria grave, ya que los alimentos RTE son especialmente proclives a causar enfermedades si han sufrido tratamientos incompletos o una manipulación inadecuada después de ser tratados, debido a que no reciben ningún tratamiento térmico, ni de otro tipo, por parte del consumidor que pudiera eliminar posibles contaminaciones microbianas. Así, cualquier contaminación bacteriana producida durante la producción o la distribución, puede llegar hasta el consumidor y causarle una enfermedad.

Las bacterias patógenas tienen varios mecanismos a través de los cuales provocan enfermedades en humanos (Faleiro, 2009). Esos mecanismos no son necesarios para la replicación vegetativa, pero contribuyen al aumento de eficacia al colonizar al hospedador, evitar las defensas inmunológicas, potenciar la resistencia frente a antibióticos o el daño directo a células y tejidos lo que da lugar a la enfermedad. Algunos de estos factores son (Wilson *et al.*, 2002) la cápsula, la producción de toxinas o la capacidad de formar biofilms.

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz extracelular orgánica polimérica producida por ellos mismos y adherida a una superficie viva (biofilm de mucosa) o inerte y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes (AECOSAN, 2010; Puga *et al.* 2016). La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm ofrece ventajas importantes como proteger a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementar la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilitar el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilitar la transferencia de material genético (DNA). Todas estas circunstancias pueden incrementar la capacidad de supervivencia de las bacterias cuando se encuentra en la forma de biofilm. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra los biofilms bacterianos (AECOSAN, 2010; Donlan and Costerton, 2002).

La motilidad bacteriana, debida a la presencia de flagelos, es un factor importante para la formación de biofilms, ya que los movimientos bacterianos, como el òswarmingò y òswimmingò (Guttenplan and Kearns, 2013; AECOSAN, 2010), están involucrados en la adhesión y crecimiento del biofilm. La motilidad de òswarmingò es un proceso mediante el cual las bacterias pueden avanzar rápidamente (varios nm s<sup>-1</sup>) en superficies sólidas húmedas de forma coordinada. La motilidad de òswimmingò es un proceso por el cual una bacteria puede moverse por líquidos con la ayuda de flagelos (Déziel *et al.*, 2000; Boehm *et al.*, 2010). La formación de biofilms en la industria alimentaria es una gran fuente de problemas, ya que los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y alimentos (Srey *et al.* 2012).

Para evitar brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con patógenos alimentarios, la industria alimentaria ha desarrollado varias estrategias para controlar y/o eliminar el crecimiento de patógenos en los alimentos: el uso de atmósfera modificada, envasado al vacío, adición de conservantes o tratamientos térmicos. Actualmente se han desarrollado nuevas tecnologías de procesado y envasado de alimentos en la búsqueda de una conservación más eficiente y una mayor salubridad como son las altas presiones hidrostáticas, radiaciones ionizantes, ultrasonidos o envasado activo (*Silva et al.*, 2017).

El envasado activo de alimentos consiste en el desarrollo de nuevas opciones de envasado que tienen sustancias agregadas como antimicrobianos, antioxidantes o absorbentes que interactúan activamente con la atmósfera del envasado o el producto alimenticio para evitar procesos de oxidación, crecimiento microbiano u otras rutas responsables del deterioro de los alimentos, permitiendo prolongar la vida útil de los alimentos y mantener su calidad (*Vilela et al.*, 2018; *Nerín*, 2018). El envasado activo se considera una opción valiosa para las industrias de producción de materiales de envasado y para la industria alimentaria con un mercado global en crecimiento. Según los últimos datos del Market Research Future, en 2016, el mercado de envasado activo e inteligente representó 15,11 mil millones de dólares y se espera que este valor se duplique en los próximos cinco años (Market Research Future, 2018).

En lo que respecta a los envases activos con propiedades antimicrobianas, algunas de las estrategias ya descritas se refieren a la incorporación de compuestos antimicrobianos como la lisozima, la nisin, los aceites esenciales, lactoferrina y el etil lauroil arginato en distintos materiales de envase (tabla 1):

Agente antimicrobiano	Material de envasado	Alimento	Microorganismo/% de inhibición	Referencia
Nanofibras de lisozima	Pululano	-	<i>Staphylococcus aureus</i> /40%	Silva <i>et al.</i> , 2018
Nisin	PHB/PCL	Jamón	<i>Lactobacillus plantarum</i> /40%	Correa <i>et al.</i> , 2017
Aceite esencial de clavo	Proteínas de soja	Filete de atún	<i>Pseudomonas</i> spp./20%	Echeverría <i>et al.</i> , 2018
Lactoferrina	Celulosa bacteriana	Salchichas frescas	<i>E. coli</i> /70% <i>S. aureus</i> /65%	Padrão <i>et al.</i> , 2016
Etil Lauroil Arginato	EVOH	-	<i>E. coli</i> /33% <i>L. monocytogenes</i> /100% <i>S. enterica</i> /33%	Muriel-Galet <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Ejemplos de agentes antimicrobianos incorporados a diferentes polímeros para envasado activo alimentario. En la columna de microorganismos / % de inhibición se muestra el microorganismo diana y el porcentaje de inhibición frente a los controles sin agente antimicrobiano. Para los resultados de Muriel-Galet *et al.*, 2012 se tienen en cuenta los films de etil lauroil arginato de concentración 1%. PHB/PLC: polihidroxibutirato /policaprolactona. EVOH:etilen-vinil-alcohol.

El etil lauroil arginato (LAE) es un compuesto catiónico tensoactivo, soluble en agua, que se sintetiza a partir de L-arginina HCL, etanol, cloruro de tionilo, hidróxido de sodio, cloruro de laurilo y agua desionizada (FAO, 2008). Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a mohos, levaduras y bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, debido a sus propiedades como surfactante. Los surfactantes son capaces de interaccionar con proteínas, cargadas negativamente, presentes en la membrana celular y así desintegrar las membranas celulares a concentraciones muy bajas, provocando alteraciones del potencial de membrana, permeabilidad celular y, en última instancia, la muerte bacteriana (Becerril *et al.*, 2012; Pezo *et al.*, 2012; VEDEQSA, 2015).

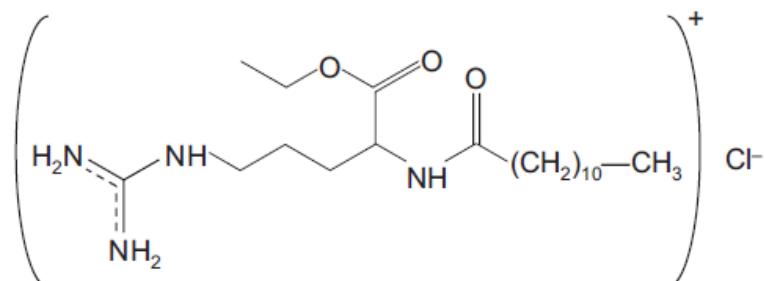


Figura 1. Estructura química del LAE (Pezo *et al.* 2012).

En cuanto a la toxicidad del LAE en humanos, un informe de la EFSA (2007) refiere que este compuesto no es genotóxico en mamíferos, aunque en estudios de larga duración en ratas con concentraciones de 15000 y 50000 ppm se observaron afecciones en el revestimiento del estómago y una reducción de glóbulos blancos en la sangre periférica. Los NOAEL, es decir, la máxima concentración de una sustancia que no causa alteraciones adversas observables, calculados en estos estudios son de 106 mg/kg peso corporal/día y de 50 mg/kg peso corporal/día. (EFSA, 2007). La EFSA basándose en estos estudios establece, para humanos, una ingesta diaria aceptable (ADI) de LAE de 0,5 mg/kg peso corporal/día (EFSA, 2009). Esta baja toxicidad se debe a la rápida metabolización del LAE por hidrólisis del éster etílico y lauroil amida a los productos intermedios, éster etílico de arginina y N- -lauroil-L-arginina, y luego a etanol, ácido láurico y arginina. La arginina experimenta un catabolismo de aminoácidos naturales a la urea y la ornitina. La ornitina puede luego metabolizarse a CO<sub>2</sub> y urea. El ácido láurico es un ácido graso que puede entrar en el metabolismo normal de los ácidos grasos. El etanol se puede convertir por acción del alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en acetato, que puede entrar en vías bioquímicas normales. Por lo que, en la ingestión humana, el LAE se descompondrá en productos de metabolismo normal (EFSA, 2007; VEDEQSA, 2015).

En cuanto a su utilización como aditivo alimentario, la Unión Europea (UE) incluyó el LAE como conservante alimentario en el Reglamento (UE) Nº 506/2014 del 15 de mayo del 2014 por el que se modificaba el anexo II del Reglamento (CE) Nº 1333/2008 y el anexo del Reglamento (UE) Nº 231/2012 por lo que se refiere al uso del LAE como conservante en determinados productos cárnicos tratados térmicamente. Se le asignó el número öE 243ö y se estableció una dosis máxima de 160 mg/kg en productos cárnicos tratados térmicamente, a excepción de salchichas emulsionadas, salchichas ahumadas y pasta de hígado. Este límite se estableció teniendo en cuenta la ADI de 0,5 mg/kg peso corporal/día y con el porcentaje de exposición de la población al LAE (EFSA, 2013). Además, la utilización de LAE como conservante alimentario no genera cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos, dado que es inodoro e insípido. Debido a las características del LAE como conservante alimentario en los últimos años se han propuesto varias estrategias para su aplicación como conservante en alimentos, siendo una de ellas en envasado activo. Aunque algunos envases activos conteniendo LAE hayan sido propuestos (tabla 2), el desarrollo de envases capaces de incorporar

eficazmente este compuesto sigue siendo problemático, ya que es una molécula cargada positivamente. Así, es necesario buscar nuevos polímeros aptos para envase que sean capaces de incorporar eficazmente las moléculas de LAE a la vez que permiten su liberación del polímero para que el compuesto pueda ejercer su actividad antimicrobiana.

<b>Material de envasado</b>	<b>Alimento</b>	<b>Microorganismo/ % de inhibición</b>	<b>Referencia</b>
EVOH	-	<i>E. coli</i> /33% <i>L. monocytogenes</i> /100% <i>S. enterica</i> /33%	Muriel-Galet <i>et al.</i> , 2012
EVOH	Pollo Surimi	<i>E. coli</i> /30% <i>L. monocytogenes</i> /45%	Muriel-Galet <i>et al.</i> , 2015
PLA	Jamón cocido	<i>L. monocytogenes</i> /50% <i>S. Typhimurium</i> /50%	Theinsathid <i>et al.</i> , 2012

Tabla 2. Ejemplos de utilización de LAE en envasado activo alimentario. En la columna de microorganismos / % de inhibición se muestra el microorganismo diana y el porcentaje de inhibición frente a los controles sin agente antimicrobiano. Para los resultados de Muriel-Galet *et al.*, 2012 se tienen en cuenta los films de etil lauroil arginato de concentración 1%. PLA: políacido láctico.

En la búsqueda de materiales más sostenibles, en los últimos años, se han desarrollado nuevas nanomoléculas derivadas de la celulosa llamadas nanofibras de celulosa (CNF). Estas moléculas se pueden obtener de una variedad de fuentes que incluyen madera, residuos agrícolas y cultivos bacterianos, por lo que la CNF es renovable, biodegradable y se obtiene de recursos sostenibles no basados en petróleo. La celulosa bacteriana se obtiene a través de procesos de fermentación que involucran especies de *Gluconacetobacter*; mientras que la celulosa vegetal implica la extracción de CNF a partir de biomasa lignocelulósica. (Powell *et al.*, 2015; Jack *et al.*, 2016; Dufresne, 2013).

La producción de CNF a partir de madera se basa en varios tratamientos previos que facilitan una nanofibrilación homogénea de las fibras de pulpa. La superficie de las CNF está cubierta con numerosos grupos hidroxilo activos que hacen que las CNF sean fuertemente hidrófilas y reactivas. Aprovechando esta característica, se han propuesto numerosos pretratamientos químicos dirigidos a estos grupos hidroxilo, que incluyen la oxidación mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il oxil (TEMPO) que resulta en la introducción de grupos carboxilo y aldehído; la carboximetilación, que introduce grupos

carboximetilo; y el tratamiento con metaperyodato de sodio, que produce unidades de 2,3-dialdehido (Liimatainen *et al.*, 2012). La oxidación de los grupos laterales alcohólicos formando carboxilos y aldehídos en el esqueleto de celulosa, cambia radicalmente las propiedades de CNF. Por ejemplo, el CNF oxidado usando el reactivo TEMPO tiene la capacidad de formar hidrogeles (Chinga-Carrasco and Syverud, 2014) que pueden aplicarse en una amplia gama de campos, como las áreas de biomédica, farmacéutica y alimentos. Además, cuando se secan, estos hidrogeles de CNF tienen la capacidad de formar films lisos, fuertes y transparentes, con altas propiedades de barrera. Los films de CNF son hidrofílicos, con una alta capacidad de absorber agua y humedad de la atmósfera. Los films de CNF pueden ser ópticamente transparentes si las nanofibras de celulosa están densamente empaquetadas y los intersticios entre las fibras son lo suficientemente pequeños para evitar la dispersión de la luz. La densidad de los films basados en nanofibras es una propiedad importante, considerando su posible aplicación como barreras en el envasado alimentario, ya que pueden servir como portadores de sustancias activas como antioxidantes y antimicrobianos (Chinga-Carrasco and Syverud, 2012; Dufresne, 2013).



Figura 2. En la izquierda un hidrogel de CNF y en la imagen de la derecha un film de CNF.

Teniendo en cuenta el carácter iónico cargado negativamente de los films formados por CNF oxidadas por TEMPO, éstos podrían permitir la incorporación eficiente del surfactante iónico cargado positivamente, LAE, y el desarrollo de nuevos films para utilizar en el envasado alimentario. Además, debido a la flexibilidad que presentan los films de CNF, éstos se podrían utilizar en productos cárnicos como salchichas o embutidos en sustitución de las envolturas o tripas, naturales o artificiales, que se utilizan actualmente en la industria cárnea.

## **2. Objetivos**

El objetivo general del trabajo es el desarrollo de un film de nanocelulosa (CNF) con etil lauroil arginato (LAE) para alimentos cárnicos tratados térmicamente listos para el consumo, que sea capaz de inhibir el crecimiento o eliminar bacterias patógenas alimentarias.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar la influencia de las CNF en la motilidad bacteriana ( $\beta$ -swimming y  $\beta$ -swarming).
- Evaluar la influencia de los films de CNF en la formación de biofilms bacterianos.
- Implementación de un método espectrofotométrico para la determinación de LAE basado en una extracción líquido-líquido.
- Estudio de la afinidad de los films de CNF con el LAE.
- Determinación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los films de CNF con LAE.
- Determinación de la capacidad antimicrobiana *in vivo* de los films de CNF con LAE en productos RTE cárnicos tratados térmicamente.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 CNF utilizadas y preparación de los films

Se utilizaron cuatro CNF diferentes durante este estudio. Las CNF fueron suministradas por el doctor Gary Chinga-Carrasco. Las CNF recibidas se produjeron a partir de fibras de pulpa de *P. radiata*. Las fibras fueron tratadas químicamente con oxidación mediada por 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-iloxil (TEMPO), usando 3 mmol de hipoclorito de sodio (NaClO) por gramo de celulosa. Las fibras de pulpa (1% de consistencia) se homogeneizaron 2 o 3 veces. Las CNF se nombraron CNF 02, CNF 03, CNF 04 y CNF 05. La concentración inicial de las CNF utilizadas era de 0,8% (m/v) en agua. En la tabla 3 se observa la caracterización de las CNF utilizadas.

CNF	Carga (mmol/g)	Nº de pasos en el homogeneizador
02	982 ± 7,6	2
03	982 ± 7,6	3
04	1158 ± 0,9	2
05	1158 ± 0,9	3

Tabla 3. Caracterización de las cuatro CNF utilizadas durante el estudio. Se muestra su carga en mmol/g y el número de pasos en el homogeneizador.

Respecto a la preparación de los films de CNF, se llevaron a cabo tamaños de film diferentes y con varias concentraciones de LAE en placas de 96 pocillos, de 24 pocillos, placas de Petri de 55 y 90 mm y placas cuadradas de 120 mm. Los films preparados tenían un gramaje de 40 g/m<sup>2</sup> y 20 g/m<sup>2</sup>, preparadas partiendo de una disolución inicial de CNF de 0,4% (m/v). El cálculo de la cantidad de CNF necesaria para cada tipo de film se realizó mediante las siguientes fórmulas, teniendo en cuenta el gramaje de 40 g/m<sup>2</sup>:

$$\text{Masa de celulosa g} = \text{Área de la placa m}^2 * \text{Gramaje g/m}^2$$

$$\text{Masa de celulosa al 0,4\% g} = \frac{\text{Masa de celulosa g} * 100}{[\text{celulosa 0,4\%}]}$$

La CNF se diluyó en H<sub>2</sub>O miliQ y se homogenizó con un agitador magnético. A continuación, se añadió el LAE a unas concentraciones de LAE de 0,10 g/L, 0,2 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L y 2 g/L para obtener un porcentaje de LAE/CNF de 0,5%, 1%, 2,5%, 5% y

10 % respectivamente. Los volúmenes de LAE que se añadieron a las CNF preparadas se calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

$$\text{Masa de LAE (g)} = \frac{\% \text{ LAE} * \text{Masa de celulosa (g)}}{100}$$

$$V \text{ LAE (mL)} = \frac{\text{Masa LAE (g)}}{[\text{LAE}] (\text{g/L})}$$

Una vez añadido el LAE se volvió a homogenizar con un agitador magnético y se llevó la disolución a un baño de ultrasonidos durante 45 min para intentar eliminar la mayor cantidad de burbujas que fuera posible. Por último, se añadió la disolución de CNF con LAE sobre la placa y se dejó secar durante varios días a temperatura ambiente hasta que se formó el film. Se prepararon a su vez films control de las cuatro CNF sin LAE.



Figura 3. Disoluciones de CNF-LAE en placas de Petri de 55 mm, que deben dejarse secar a temperatura ambiente para conseguir la formación del film.

### 3.2 Medios de cultivo y bacterias utilizadas

En los ensayos y pruebas realizados en este proyecto se utilizaron cuatro cepas bacterianas de referencia: *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Bacillus cereus* CECT 131, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 y *Escherichia coli* verotoxigénica CECT 5947. Las cepas bacterianas se almacenaron en el medio de cultivo apropiado, suplementado con 30% (v/v) de glicerol, a -80 °C. Se subcultivaron *E. coli*, *S. Typhimurium* y *B. cereus* en placas de agar Mueller-Hinton Agar (MHA, Scharlab, España) a 37 °C en condiciones aeróbicas; mientras que *L. monocytogenes* se subcultivó en placas Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Scharlab Spain) en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera. En cuanto al crecimiento en medio líquido,

todas las cepas se cultivaron a 37 °C en condiciones aeróbicas utilizando caldo Mueller-Hinton (MHB, Scharlab, España), con la excepción de *L. monocytogenes*, donde se utilizó el caldo Brain Heart Infusion (BHI, Scharlab Spain). El crecimiento de bacterias de las matrices alimentarias utilizadas se llevó a cabo en varios medios sólidos: para el recuento de bacterias totales mesófilas se utilizó el medio Plate Count Agar (PCA, Scharlab, España) a 30 °C en condiciones aeróbicas, para el recuento de bacterias ácido lácticas se utilizó el medio Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, Scharlab, España) en condiciones de microaerofilia con un 6% de O<sub>2</sub> a 30 °C y por último, el recuento de *L. monocytogenes* se realizó en medio selectivo PALCAM Agar (Scharlab, España) a 30 °C en condiciones aerobias, donde *L. monocytogenes* crece con una coloración grisácea.

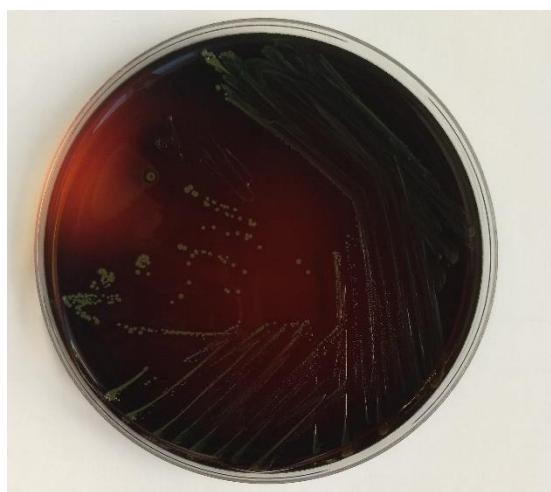


Figura 4. Siembra por agotamiento de *L. monocytogenes* en medio PALCAM donde se aprecia la coloración grisácea de las colonias.

### 3.3 Motilidad bacteriana: õswarmingö y õswimmingö

Para conocer la capacidad de la CNF a la hora de inhibir o impedir el movimiento bacteriano de õswimmingö y õswarmingö de las cepas de *E. coli*, *S. Typhimurium*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* se realizó un ensayo utilizando: caldo de Luria-Bertrani (LB, Scharlab, España) suplementado con un 0,5% de glucosa (Inoue *et al.*, 2007) (Oxoid, España) y un 0,3% y un 0,5% de agar (Di Bonaventura *et al.*, 2008) (Scharlab, España) para los ensayos de õswimmingö y õswarmingö, respectivamente. Estos medios se complementaron con un 5% de cada muestra de CNF (CNF 02, CNF 03, CNF 04 y CNF 05) y se vertieron en placas de Petri estériles de 55 mm. Cada placa se inoculó en el centro de la superficie de agar con 5 µL de un cultivo líquido de cada cepa que contenía aproximadamente 1x10<sup>9</sup> CFU/mL. Todas las placas se incubaron en

condiciones aeróbicas a 37 °C, con la excepción de *L. monocytogenes* que se incubó a 25 °C (Di Bonaventura, *et al.*, 2008). El tiempo de incubación de los ensayos de ñswimmingö fue diferente dependiendo del tipo de cada cepa bacteriana y de su cinética de crecimiento, siendo 7 h para *E. coli* verotoxigénica, 6 h para *S. Typhimurium*, 24 h para *B. cereus* y 48 h para *L. monocytogenes*. Para los ensayos de ñswarmingö, se observaron las placas inoculadas después de 24 horas de incubación, con la excepción de *L. monocytogenes*, donde se requirió un período de incubación de 48 horas. La medición de los halos de crecimiento tanto en ñswimmingö como en ñswarmingö se realizó con un calibrador digital y cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la formación de halo de ñswimmingö o ñswarmingö, comparando los halos obtenidos en las placas de control con los halos obtenidos en las placas con CNF.

### **3.4 Ensayo de inhibición de la formación de biofilms bacterianos**

La actividad inhibidora de formación de biofilms se determinó según Reeser *et al.*, 2007 con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon biofilms bacterianos de las cuatro cepas en estudio en placas de 24 pocillos que contienen films de CNF con un gramaje de 20 g/m<sup>2</sup>. Los films de CNF (CNF 02, 03, 04 y 05) se prepararon como está descrito en el apartado 3.1. Se prepararon suspensiones bacterianas con una absorbancia de 0,02 (OD<sub>600</sub>) a partir de cultivos sembrados en el medio líquido apropiado para cada bacteria (según lo descrito anteriormente en el apartado X) e incubados durante 24 h a 37 °C. Se inoculó 1 ml de cada suspensión en las placas que contenían los films de CNF. Se usaron placas sin films de CNF como control positivo. Los controles negativos se prepararon reemplazando el volumen de la suspensión bacteriana por los medios de cultivo apropiados, BHI en vez de *L. monocytogenes* y MHB para las otras tres bacterias. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C. Después de la incubación, se eliminó el sobrenadante y las bacterias unidas a los pocillos se lavaron dos veces con 1 mL de NaCl 0,9%. Posteriormente, los biofilms se tiñeron con un 1 mL de una solución de cristal violeta al 1% (m/v) en etanol al 95% (v/v) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los pocillos teñidos se lavaron tres veces con agua y se dejaron secar durante 30 minutos a 50 °C. A continuación, se añadió 1 mL de una solución decolorante (80% etanol/20% acetona) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por último, se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm y los

resultados se expresaron como porcentaje de disminución de la absorbancia frente al control positivo. Este ensayo se realizó al menos tres veces independientes.

### 3.5 Determinación de la concentración de LAE en disolución acuosa

El objetivo de este método es determinar la concentración de LAE que se encuentra en una disolución acuosa. La concentración de LAE (ppm) se determinó utilizando un método espectrofotométrico previamente desarrollado por el grupo de investigación (Pezo et al. 2012), con algunas modificaciones para mejorar el protocolo en cuestiones de gasto de reactivos y facilidad de operación. Este método está basado en la detección espectrofotométrica del par iónico formado entre el LAE y el complejo inorgánico tiocianato de cobalto ( $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$ ) en solución acuosa, seguido de su extracción líquido-líquido en un solvente orgánico. Para la realización del método se mezclaron 3,5 mL de una solución de reactivo stock de  $\text{Co}(\text{SCN})_4^{2-}$  (35,0 g de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  y 15,0 g de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  en 35 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ) con 25 mL de disoluciones acuosas de LAE y 2,5 mL de 1, 2-dicloroetano en tubos de 50 mL.

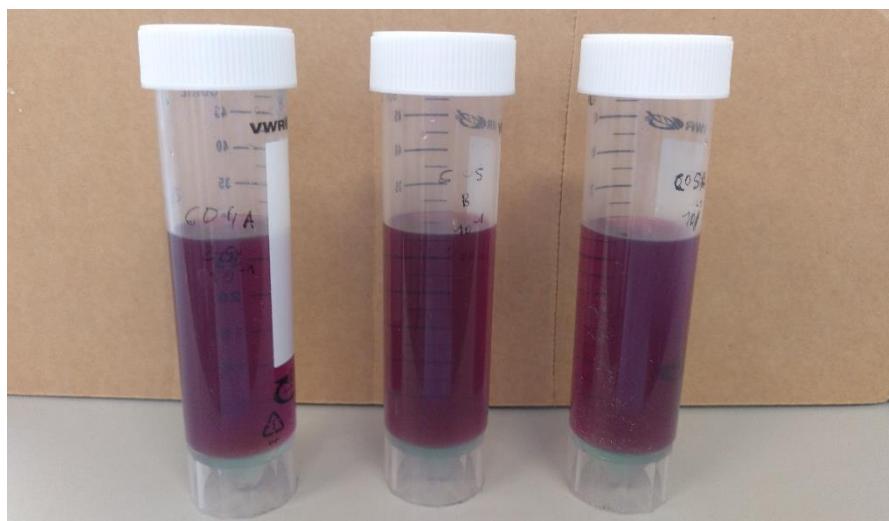


Figura 5. Aspecto de la disolución acuosa de LAE tras añadir el 1, 2-dicloroetano y el tiocianato de cobalto. Se puede observar en la base de los tubos una ligera coloración azul, que indica la presencia de LAE que ha reaccionado con el dicloroetano.

Las muestras se agitaron vigorosamente, utilizando un vórtice, durante 1 minuto y se dejaron reposar durante 5 min para que se separaran las fases acuosa y orgánica. A continuación, se eliminó la mayor parte de la fase acuosa hasta dejar un volumen final de 7,5 mL y, posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm. Después de la centrifugación, se recuperó la fase orgánica inferior y se midió la

absorbancia de los extractos azules de dicloroetano a 623 nm. Toda el agua utilizada en este método es H<sub>2</sub>O miliQ para evitar interferencias.

### **3.6 Recta de calibrado de LAE en disolución acuosa**

Para calcular la recta de calibrado de LAE en disolución acuosa, que se utilizaría en los ensayos de afinidad y lavado para determinar la concentración de LAE en disolución, se prepararon patrones de LAE a diferentes concentraciones. Las disoluciones patrón preparadas para la recta de calibrado tenían concentraciones de 1,1; 2,5; 5; 7,5; 10, 15, 20 y 25 ppm de LAE en agua miliQ con un pH de 4, las concentraciones de la recta patrón se eligieron a partir del protocolo desarrollado en Pezo *et al.*, 2012. Para la realización de los patrones, en primer lugar, se preparó una disolución madre de 1000 ppm de LAE (Myrenat®-ET, VEDEQSA, España) de la que se obtuvieron dos disoluciones de trabajo: una disolución de 100 ppm y otra de 10 ppm, de donde se prepararon los patrones mencionados anteriormente. El pH se ajustó con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 y 0,01 M y se midió utilizando un pHmetro Seven Easy (Mettler Toledo, España). El método utilizado para determinar la concentración de LAE en disolución acuosa es el explicado en el apartado 3.5. Toda el agua utilizada fue H<sub>2</sub>O miliQ para evitar interferencias. Se llevaron a cabo cinco medidas de cada punto en diferentes días para demostrar la reproducibilidad del método.

### **3.7 Afinidad entre el LAE y los films de CNF**

Para determinar cuál de las cuatro CNF (CNF 02, 03, 04 o 05) tenía la mayor afinidad con el LAE, se diseñó este ensayo, en el cual se determinaba la cantidad de LAE que no se unía a los films de CNF en disolución acuosa.

En primer lugar, se prepararon films sin LAE con un gramaje de 40 g/m<sup>2</sup> como se describe en el apartado 3.1. Para el ensayo se cortaron cuadrados de 2x2 cm (peso aproximado de 15-17 mg) de cada film de CNF y se colocaron en tubos de 50 mL que contenían 25 mL de una disolución de LAE en agua a diferentes concentraciones. Las disoluciones de LAE preparadas tenían concentraciones de 5, 25, 100, 150, 200, 250 y 400 ppm. Las muestras se incubaron a una agitación orbital de 400 rpm y temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, los films de CNF se retiraron de los tubos con pinzas y la cantidad de LAE no absorbida por los films se determinó en los 25 mL de disolución usando el método espectrofotométrico descrito anteriormente en el apartado 3.5. Con los resultados obtenidos se hizo una curva de saturación donde se representó

gráficamente la concentración de LAE unido frente a la de LAE total inicial. Toda el agua utilizada fue H<sub>2</sub>O miliQ para evitar interferencias. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

La afinidad del LAE con los films de CNF se calculó utilizando la ecuación de Scatchard (eq. 1) (Atkins, 2008), linealizando la curva de saturación, que representa gráficamente la cantidad de ligando unido al sustrato entre el ligando libre frente a la cantidad de ligando unida al sustrato. A partir de la gráfica se puede obtener la constante de disociación Kd, ya que la pendiente de la recta es -1/Kd, y la concentración máxima de LAE que se une a cada film, que es la abscisa en el origen.

Ecuación de Scatchard en este ensayo:

$$K_d = \frac{[LAE]\text{libre} ([LAE]\text{máx unida} - [LAE]\text{unida})}{[LAE]\text{unida}}$$

*Ecuación 1: Ecuación de Scatchard (Atkins, 2008)*

### **3.8 Lavado de los films de CNF-LAE**

Para conocer la concentración de LAE que se perdía en los films de CNF 02, 03, 04 y 05 al estar en contacto con agua se prepararon films de LAE-CNF con un gramaje de 40 g/m<sup>2</sup> y porcentajes de LAE/CNF de 2,5 y 5% (p/p) tal como se describió anteriormente en el apartado 3.1. Para el ensayo se cortaron cuadrados de 2x2 cm (peso aproximado de 15-17 mg) de cada película de CNF-LAE y se colocaron en tubos de 50 mL que contenían 25 mL de agua. Las muestras se incubaron a una agitación de 400 rpm y temperatura ambiente durante 24 h. Luego, los films de CNF-LAE se retiraron de los tubos con pinzas y la cantidad de LAE liberada en el agua se determinó usando el método espectrofotométrico descrito anteriormente (apartado 3.5). Toda el agua utilizada fue H<sub>2</sub>O miliQ para evitar interferencias. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

### **3.9 Actividad antimicrobiana del LAE en films de CNF frente a *L. monocytogenes***

Para evaluar la capacidad antimicrobiana del LAE frente a *L. monocytogenes* se prepararon films de CNF (CNF 02, CNF 03, CNF 04 y CNF 05) con un gramaje de 40 g/m<sup>2</sup> que contenían 0,5, 1, 5 y 10% (m LAE/m CNF) de LAE (Myrenat®-ET, VEDEQSA, España) en placas de 96 pocillos, según se explica en el apartado 3.1.

Los inóculos de *L. monocytogenes* se llevaron a cabo preparando suspensiones de *L. monocytogenes* con una absorbancia de 0,02 (OD<sub>600</sub>) a partir de cultivos incubados durante 24 h a 37 °C en medio líquido BHI. Se inocularon 200 µL de la suspensión bacteriana en los pocillos de las placas que contenían los films de CNF-LAE. Se utilizaron placas que contenían pocillos con films de CNF sin LAE como controles positivos. Los controles negativos se prepararon reemplazando el volumen del inóculo de *L. monocytogenes* por el medio de cultivo líquido BHI. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se extrajo el volumen (200 µL) de cada pocillo y se trasvasaron a otra placa de 96 pocillos para realizar diluciones seriadas. Las diluciones se llevaron a cabo tomando 20 µL de la muestra y diluyéndola en 180 µL de NaCl 0,9% estéril. Posteriormente, se sembraron 10 µL de cada dilución, utilizando una pipeta multicanal, en placas de medio Plate Count Agar (PCA, Scharlab, España) de acuerdo con el método descrito por Chen *et al.*, 2003. En la figura 8 se puede observar un esquema del método.

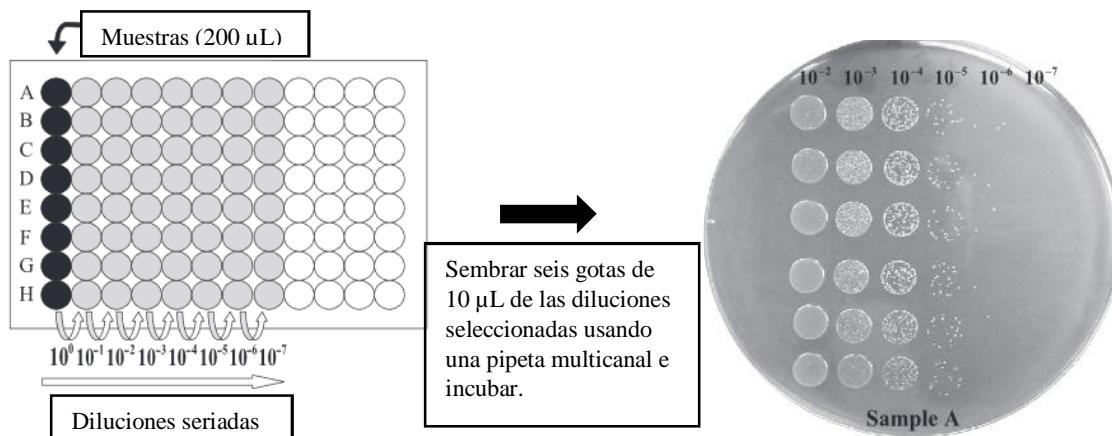


Figura 6. Esquema del método, diseñado por Chen *et al.*, 2003, utilizado para la siembra de las muestras.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, y se determinó el número de colonias de *L. monocytogenes*. El nivel de detección de este método es de 1x10<sup>2</sup> CFU/mL. Las muestras se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Se utilizó este método debido a que es rápido y eficaz, ya que permite obtener fácilmente resultados, mientras que utilizando los métodos de siembra habituales sería muy costoso tanto en tiempo como en material.

### **3.10 Ensayo *in vitro* de los films CNF-LAE sobre un cultivo de *L. monocytogenes***

En este ensayo se probó la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los films de CNF 02, 03, 04 y 05 con diferentes concentraciones de LAE en un medio de cultivo con *L. monocytogenes*. Se prepararon films de 2x2 cm de las cuatro CNF a diferentes concentraciones de LAE, al 0,5%, 1%, 2,5% y 5%. Se hicieron por duplicado, ya que la mitad de los films fueron lavados en 25 mL de H<sub>2</sub>O durante 24 h en agitación a 400 rpm (igual que en el apartado 3.8), después del lavado se dejaron secar los films. La otra mitad, no lavada, sirvió de control frente a los films lavados, con la finalidad de evaluar si el lavado de los films afectaba a su capacidad antimicrobiana.

Por otro lado, se preparó el inóculo de *L. monocytogenes* que se sembró en las placas de medio MHA. En primer lugar, se preparó un inóculo en NaCl 0,9% con una absorbancia a 625 nm entre 0,08-0,12, que indicaba que la concentración de *L. monocytogenes* se encontraba en torno a  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Una vez que se obtuvo este primer inóculo se hizo una dilución 1:100 para conseguir una concentración bacteriana de  $1 \times 10^6$  CFU/mL. A continuación, se sembraron 100 µL en placas de medio MHA y se extienderon sobre la superficie, utilizando un asa de Drigalsky para conseguir una extensión del inóculo lo más homogénea posible. Tras esto se dejó secar durante 10-15 min.

Por último, se colocaron los films de CNF en la superficie del medio, aplicando una ligera presión para que el film se adhiriese correctamente, pero teniendo cuidado para no perforar el agar. Se dejaron incubar las placas a 37 °C midiendo los halos de inhibición a las 24h y 48 h. A las 48 h se quitó el film de CNF y se incubó 72 h a 37 °C para observar si se mantenía el halo de inhibición y medirlo. Debido a la disponibilidad de films de CNF solo pudo hacerse una réplica, por lo que los resultados obtenidos no pueden considerarse definitivos.



Figura 7. Ensayo *in vitro* con el film sin lavar de CNF 04 de 2x2 cm con 0,5% de LAE. En el medio MHA.

### 3.11 Ensayo *in vivo* de los films de LAE en jamón cocido

El último ensayo que se realizó fue la aplicación de los films CNF-LAE en alimentos RTE cárnicos previamente inoculados con una concentración conocida de *L. monocytogenes*. El alimento utilizado fue jamón cocido (figura 11) adquirido en un supermercado local. El protocolo desarrollado está basado en el utilizado por Jofré *et al.*, 2007.



Figura 8. Jamón cocido utilizado. Contiene jamón de cerdo, sal, agua, aromas y conservador E250 (nitrito de sodio).

Los films de CNF se prepararon con un gramaje de 40 g/m<sup>2</sup> según lo explicado en el apartado 3.1 en placas cuadradas de 120 mm, con unas concentraciones de LAE de 5 y 10%. También se hicieron films control sin LAE. A partir de los resultados obtenidos en el apartado 4.4 se prepararon films de CNF 03 y CNF 05. CNF 05 era la que más

cantidad de LAE ligaba, mientras que CNF 03 se eligió por sus características de carga y por su afinidad con el LAE, ya que seguía uniendo más LAE que CNF 02. El inóculo de *L. monocytogenes* se preparó a partir de una suspensión bacteriana en NaCl 0,9% con una absorbancia de 0,08-0,12 a OD<sub>625</sub> ( $1 \times 10^8$  CFU/mL), que se diluyó 100 veces para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Una vez preparado el inóculo, se prepararon muestras de 4 g de jamón cocido, en placas de Petri de 90 mm, sobre las que se inocularon 200 µL de la suspensión de *L. monocytogenes* ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) en la superficie para conseguir una concentración bacteriana de  $5 \times 10^4$  CFU/g. Se dejaron secar durante 1 h en ambiente estéril. A continuación, se colocaron los films de CNF en la superficie de las muestras, ejerciendo presión para que el film se adhiriese correctamente al jamón cocido, y las muestras que se refrigeraron a 4 °C durante una semana.

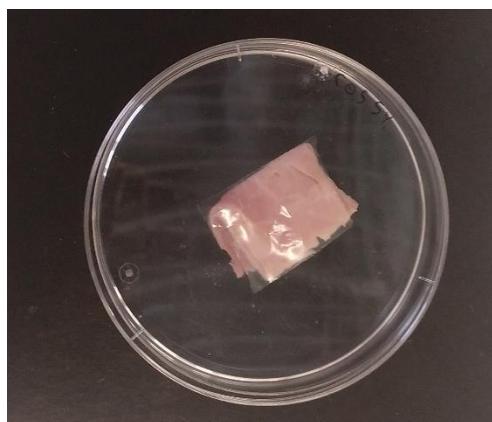


Figura 9. Muestra de jamón cocido de 4 g con un film de CNF 05 con un 5% de LAE.

Las muestras se analizaron los días 0 (únicamente los controles), 1, 3 y 7. Para los análisis microbiológicos, las muestras (4 g) se colocaron en bolsas de Stomacher con 36 mL de agua de peptona y se homogeneizaron en un Stomacher-400 Circulator (Seward, Reino Unido) durante 3 min a 300 rpm. A continuación, se hicieron diluciones seriadas, se sembraron 100 µL de las muestras en los diferentes medios selectivos utilizados y se incubaron en las condiciones óptimas para cada tipo de bacteria/populación: para *L. monocytogenes* se sembraron en medio PALCAM y se incubaron 48 h a 37 °C; las bacterias ácido lácticas se sembraron en medio MRS agar y se incubaron 72 h a 30 °C en microaerofilia; y, por último, las bacterias mesófilas totales se sembraron en medio PCA y se incubaron 72 h a 30 °C. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Motilidad bacteriana: ñswarmingö y ñswimmingö

La motilidad bacteriana es una característica clave para las bacterias a la hora de la formación de biofilms. Por ello se quiso comprobar la capacidad de las cuatro CNF utilizadas en este estudio (CNF 02, 03, 04 y 05) para reducir la motilidad de *E. coli* verotoxigénica, *S. Typhimurium*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*. Se evaluó tanto la motilidad de ñswimmingö como la de ñswarmingö.

En primer lugar, los resultados obtenidos en la inhibición del ñswimmingö fueron positivos, ya que se consiguieron porcentajes de inhibición entre 7,9% en el caso de *S. Typhimurium* con CNF 03 y 73,8% para *B. cereus* con CNF 04. En la figura 13 se ve la gráfica con los porcentajes de inhibición de cada CNF con cada cepa bacteriana. La CNF 02 es la que mejor porcentaje de inhibición tiene sobre las cuatro bacterias, siempre por encima del 50%, siendo mayor con *E. coli*. La siguiente en capacidad inhibitoria es CNF 05 con unos porcentajes entre 44,3% (*L. monocytogenes*) y 53,3% (*B. cereus*). La CNF 03 fue la que menor poder inhibitorio tuvo en las cuatro cepas bacterianas utilizadas, siendo *L. monocytogenes* la que fue más inhibida con un 23,4%. Por último, CNF 04 fue la más irregular variando entre 26,7% con *L. monocytogenes* y 73,8% con *B. cereus*. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (de la Fuente-Núñez et al., 2012) en los que los compuestos con actividad antimicrobiana inhiben favorablemente la motilidad de ñswimmingö. En la tabla 4 se pueden ver las imágenes de los halos de ñswimmingö para cada CNF y el control de cada cepa bacteriana utilizada en este ensayo.

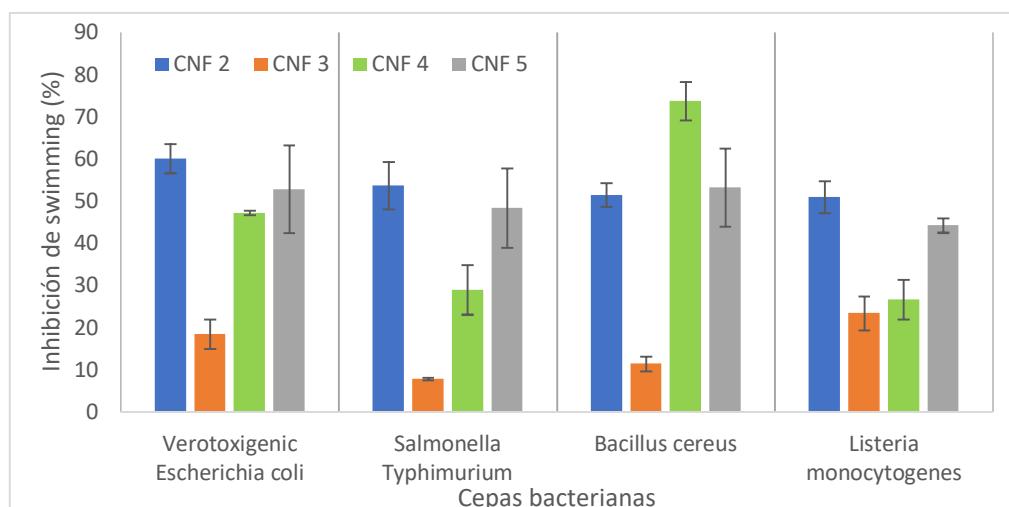


Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de inhibición de ñswimmingö frente a cada cepa bacteriana. En azul oscuro se muestra la CNF 02, en naranja CNF 03, en verde CNF 04 y en gris CNF 05. Los datos están representados con la desviación estándar (SD).

ØSwimmingø		Muestra CNF			
Cepa bacteriana	Control	CNF 2	CNF 3	CNF 4	CNF 5
<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica					
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>					
<i>Bacillus cereus</i>					
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>					

Tabla 4. Halos de motilidad de Øswimmingø obtenidos de cada cepa bacteriana con las diferentes CNF y el control

En segundo lugar, los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de ñswarmingö demostraron que la CNF no era capaz de inhibir la motilidad de ñswarmingö, sino que la promovía. El único resultado positivo fue con *B. cereus* y CNF 03, donde la inhibición era del 13,5%. En la figura 14 se pueden ver los resultados obtenidos en una representación gráfica. La CNF 02 promovió el ñswarmingö en todas las cepas, pero donde menor impacto tuvo fue en *L. monocytogenes*. CNF 03 soló inhibió el ñswarmingö en *B. cereus*, como se ha mencionado anteriormente, mientras que lo promovió con las otras tres bacterias, aunque el impacto fue pequeño en *S. Typhimurium* y en *L. monocytogenes*. CNF 04 fue, con diferencia, la que más aumento de ñswarmingö causó, llegando a ser un 145,6% mayor en el caso de *S. Typhimurium*. Donde menos aumentó fue en *E. coli* y *L. monocytogenes*. Por último, para CNF 05 donde menos aumento de ñswarmingö hubo fue en *L. monocytogenes* y en *E.coli*. En la tabla 5 se pueden ver las imágenes de los halos de ñswarmingö para cada CNF y el control de cada cepa bacteriana utilizada en este ensayo. El aumento del ñswarmingö podría ser debido a que la CNF tiene una alta permeabilidad, que es directamente proporcional al flujo de agua en el medio, lo que provoca un aumento del ñswarmingö al permitir que las bacterias puedan extraer agua del medio, probablemente utilizando osmolitos secretados (Yang *et al.*, 2017) que permita a las bacterias moverse con mayor facilidad. Habría que realizar más estudios al respecto para confirmarlo o desmentirlo.

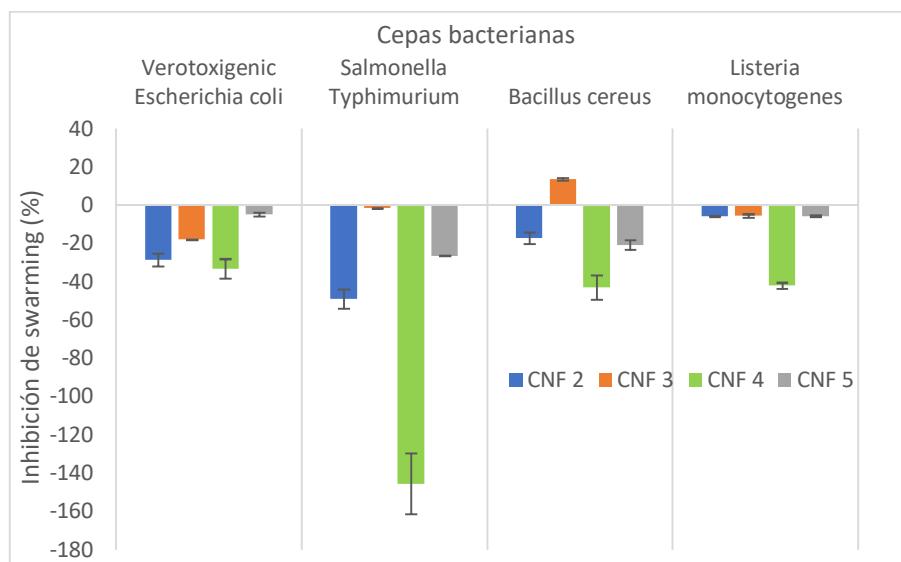


Figura 11. Representación gráfica del porcentaje de inhibición de ñswarmingö frente a cada cepa bacteriana. En azul oscuro se muestra la CNF 02, en naranja CNF 03, en verde CNF 04 y en gris CNF 05. Los datos están representados con la desviación estándar (SD).

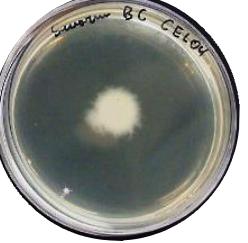
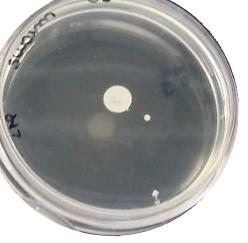
ØSwarmingö		Muestra CNF				
Bacterial strain	Control	CNF 2	CNF 3	CNF 4	CNF 5	
<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénica						
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>						
<i>Bacillus cereus</i>						
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>						

Tabla 5. Halos de motilidad de Øswarmingö obtenidos para cada cepa bacteriana con las diferentes CNF y un control.

A raíz de los resultados obtenidos, se puede observar que la CNF tiene una gran capacidad para inhibir la motilidad bacteriana de  $\beta$ -swimming en las cuatro bacterias estudiadas, mientras que potencia el movimiento de  $\beta$ -swarming.

## 4.2 Ensayo de inhibición de la formación de biofilms bacterianos

La motilidad bacteriana y la formación de biofilms están relacionados, aunque se excluyen mutuamente. Hay una transición de motilidad a biofilm, donde se inhibe el movimiento bacteriano para que se pueda formar el biofilm (Guttenplan and Kearns, 2013). Los efectos provocados por los films de CNF en la motilidad bacteriana podrían causar alteraciones en el desarrollo de los biofilms bacterianos.

En la figura 15 se pueden observar los resultados obtenidos, donde se representa la ratio de relaciones de absorbancia media frente a las muestras inoculadas y los controles negativos. Los ensayos de formación de biofilms en placas cubiertas con films de CNF mostraron que los films no afectaron a la capacidad de *E. coli* verotoxigénica, *S. Typhimurium* y *B. cereus* para adherirse a la superficie del film de CNF, obteniéndose relaciones de absorbancia similares entre las CNF y el control (pocillos sin films de CNF). Aunque se ha descrito que las bacterias Gram negativas con menor motilidad de  $\beta$ -swarming tienen una mayor capacidad para formar biofilms (Murray *et al.*, 2010), los resultados obtenidos en este documento no corroboran este hecho, ya que la mayor motilidad de  $\beta$ -swarming causada por las CNF no resultó en una menor formación de biofilms. Esto puede deberse al hecho de que la formación de biofilms podría estar relacionada con otros factores más allá de la motilidad flagelar bacteriana, ya que los ensayos de motilidad de  $\beta$ -swimming y  $\beta$ -swarming no pueden relacionarse directamente con la adherencia bacteriana. Además, dado que los CNF están en forma de hidrogel (húmedo) en los ensayos de motilidad (apartado 4.1) y en forma de film (seco) en este ensayo, también pueden haber alterado la superficie del CNF y, conjuntamente, su interacción con cepas bacterianas.

Sin embargo, en el caso de *L. monocytogenes*, se obtuvo una reducción de cinco veces en la capacidad de formación de biofilm, a pesar de los valores de inhibición de motilidad más bajos obtenidos, lo que puede indicar que los films de CNF interfieren con la deposición y adherencia de células de *L. monocytogenes* por mecanismos no relacionados con la alteración de la motilidad flagelar. Teniendo en cuenta la capacidad antibiofilm de los cuatro films de CNF probados contra *L. monocytogenes*, un patógeno

importante transmitido por los alimentos en alimentos listos para el consumo, se decidió seguir con este patógeno como única bacteria estudiada en el resto de los ensayos con los films de CNF en este proyecto.

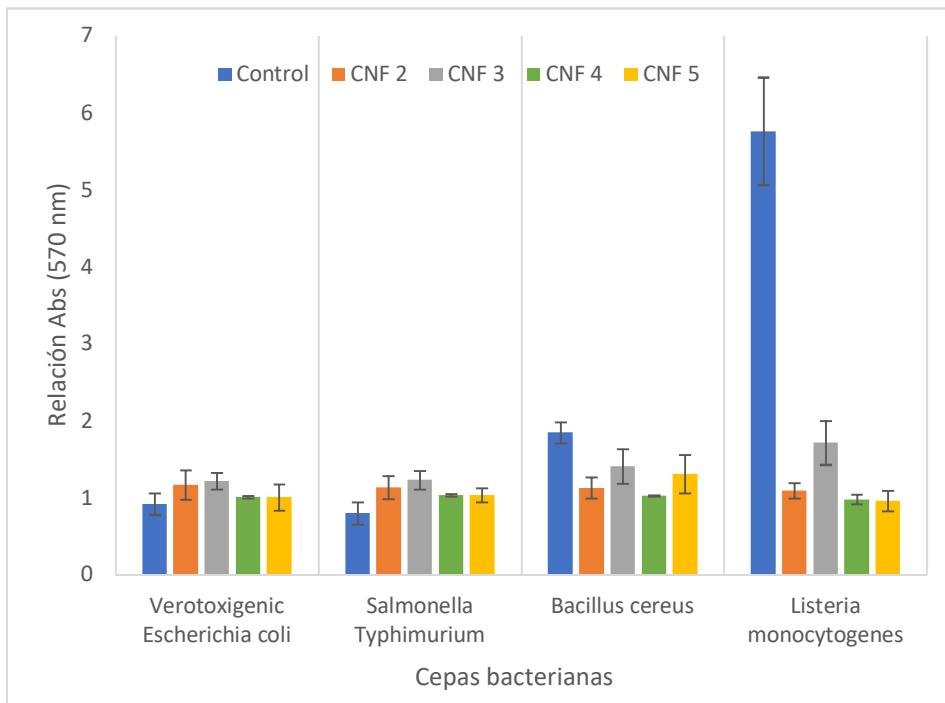


Figura 12. Formación de biofilms bacterianos con CNF y sin CNF (Control); en azul se representa le control, en naranja CNF 02, en gris CNF 03, en verde CNF 04 y en amarillo CNF 05. Los valores se expresan como relaciones de absorbancia media (570 nm) frente a las muestras inoculadas y los controles negativos. Las barras de error corresponden a valores SD de al menos tres réplicas independientes.

#### 4.3 Recta de calibrado de LAE en disolución acuosa

Se realizaron 5 medidas con las disoluciones patrón de LAE para calcular la recta de calibrado que se puede observar en la figura 17. La recta obtenida comprueba la linealidad entre la absorbancia y la concentración de LAE, ya que su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es 0,9973. Se puede observar también que es un método bastante preciso, dado que la desviación estándar de las medidas de absorbancia efectuadas en distintos días es pequeña. La ecuación de la recta de calibrado obtenida se utilizará para calcular la cantidad de LAE en disolución acuosa en los ensayos de incorporación y liberación de LAE.

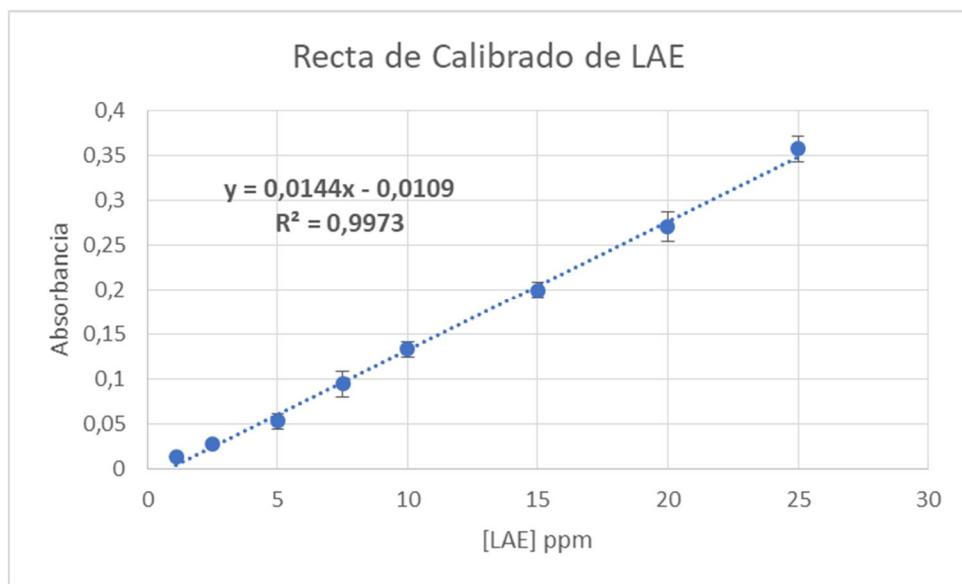


Figura 13. Gráfica de la recta de calibrado que representa la absorbancia medida frente a la concentración de LAE en ppm. También se muestra la ecuación de la recta, su  $R^2$  y la desviación estándar de cada punto.

#### 4.4 Afinidad entre el LAE y los films de CNF

Dada la carga negativa de los films de CNF oxidado y la carga positiva general de LAE, se estudió la afinidad del LAE a los films de las cuatro CNF utilizadas (CNF 02, 03, 04 y 05). Se quiso conocer la concentración máxima de LAE que los films eran capaces de unir y las constantes de disociación ( $K_d$ ) de las cuatro CNF.

En la figura 18 se pueden observar las curvas de saturación de las cuatro CNF con una concentración de LAE ascendente en disolución acuosa. La saturación de los cuatro films de CNF se alcanzaba en la disolución acuosa de 250 ppm de LAE. En los films de CNF 02 la máxima concentración de LAE incorporada fue de 11,88 ppm/mg de film. Para los films de CNF 03 la máxima concentración unida de LAE fue de 12,31 ppm/mg de film. En cuanto a los films de CNF 04, la máxima concentración de LAE que el film de CNF fue capaz de unir fue 13,00 ppm/mg de film. Por último, los films de CNF 05 fueron capaces de unir una concentración de LAE máxima de 14,27 ppm/mg de film.

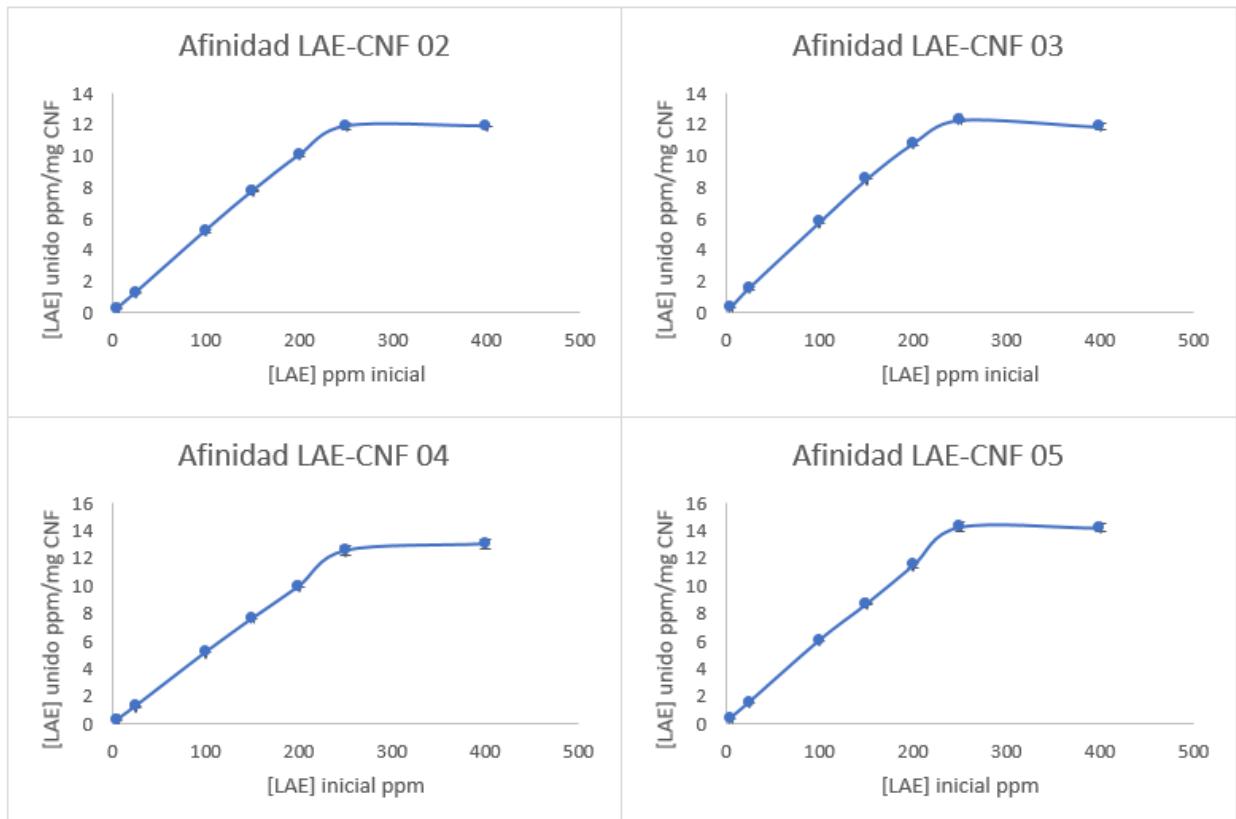


Figura 14. Curvas de saturación de las cuatro CNF en presencia de LAE, a distintas concentraciones, en disolución acuosa. Se representa la concentración de LAE unido a cada mg de CNF frente a la concentración inicial de LAE utilizada. La desviación estándar se calcula a partir de al menos tres muestras independientes.

Los films hechos a partir de CNF 05 fueron los que más concentración de LAE fueron capaces de unir, mientras que los de CNF 02 fueron los que menos concentración de LAE unieron.

Una vez obtenidos los resultados de las curvas de saturación, se llevó a cabo una regresión lineal utilizando la ecuación de Scatchard para calcular las constantes de disociación, utilizando la fórmula y la representación gráfica que se explicaron en el apartado 3.6. En la figura 19 se puede observar la linealización de Scatchard.

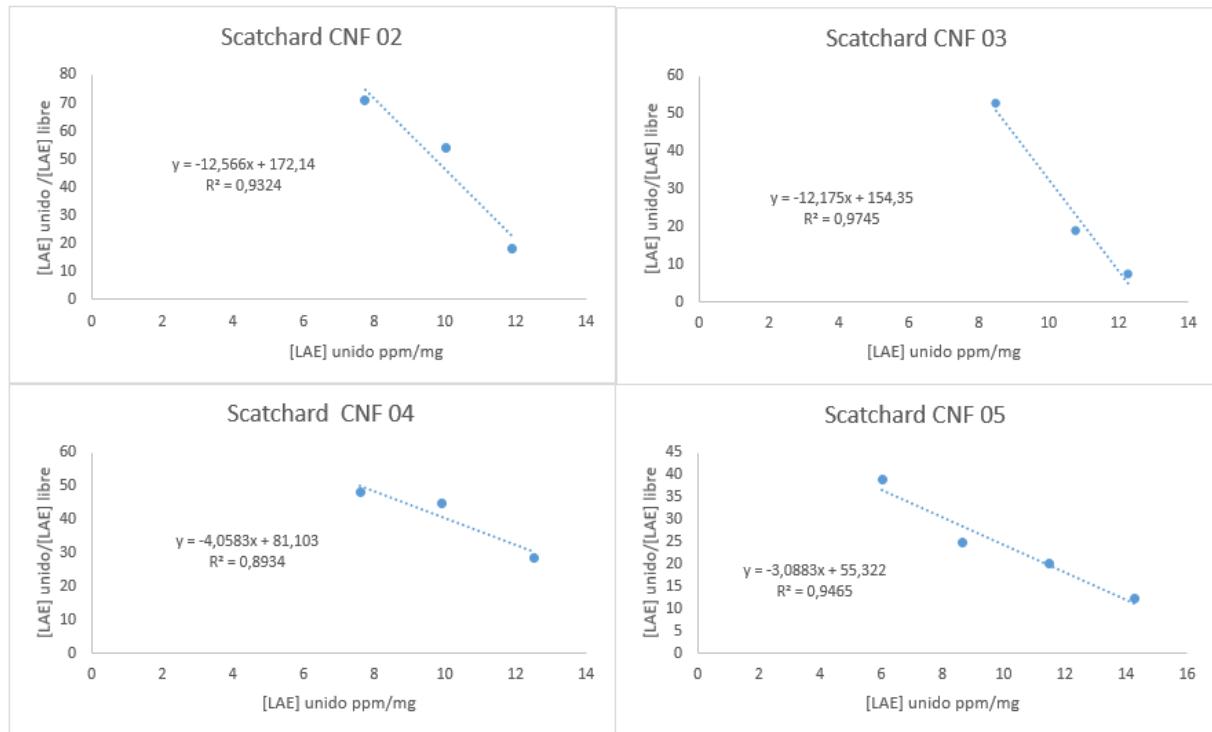


Figura 15. Linealizaciones de Scatchard de las curvas de saturación de las cuatro CNF. Se representa la concentración de LAE unido (ppm/mg) entre la concentración de LAE libre (ppm) frente a la concentración de LAE unido (ppm/mg) a los films de CNF.

Las linealizaciones obtenidas no fueron muy buenas, como se puede apreciar en los  $R^2$ , pero dieron una idea aproximada de la  $K_d$  de cada CNF frente al LAE. Los valores de la  $K_d$  se calcularon a partir de la pendiente de la recta obtenida en la linelaización de Scatchard, como se explica en el apartado 3.6. En la tabla 6 se pueden observar las  $K_d$  y las concentraciones máximas de LAE obtenidas a partir de la curva de saturación. Cuanto menor sea  $K_d$  menor es la concentración de LAE necesaria para saturar el film, y mayor es la afinidad del film hacia el LAE. Esto concuerda con los datos obtenidos de concentración máxima de LAE que era capaz de unir cada film de CNF. La mayor  $K_d$  obtenida es la de CNF 05 con un valor de 0,32 ppm/mg, y también es CNF 05 el que necesita una mayor concentración de LAE para saturarse. Mientras que CNF 02 tiene la menor  $K_d$  con un valor de 0,079 ppm/mg y coincide con que es la CNF que menor cantidad de LAE necesita para saturarse.

CNF	K <sub>d</sub> (ppm/mg)	[LAE] máx (ppm/mg) C. saturación
<b>CNF 02</b>	0,079	11,88
<b>CNF 03</b>	0,082	12,31
<b>CNF 04</b>	0,25	13,00
<b>CNF 05</b>	0,32	14,27

Tabla 6. En la tabla se muestran las K<sub>d</sub> (ppm/mg), obtenidas de la linealización de Scatchard, y las concentraciones de LAE máximas (ppm/mg), obtenidas a partir de la curva de saturación, para cada film de CNF utilizado.

Todos los valores de K<sub>d</sub>, obtenidos de la linealización de Scatchard, concuerdan con las concentraciones máximas de LAE, obtenidas de la curva de saturación. La CNF que mayor afinidad tiene por el LAE es la CNF 02 y por ello necesita menos cantidad de LAE para saturarse, mientras que CNF 05 es la que menor afinidad tiene por el LAE, ya que necesita mayor cantidad de LAE para saturarse. Las diferencias entre las cuatro CNF se deben a las distintas cargas que hay entre CNF 02 y 03 respecto a CNF 04 y 05 y nº de homogenizaciones, como se puede observar en la tabla 3. Una carga mayor parece permitir a las CNF incorporar mayor cantidad de LAE, mientras que las diferencias de afinidad se pueden deber a los diferentes grupos que se forman al oxidarse las CNF por acción del TEMPO. En cuanto al número de homogenizaciones, las CNF que fueron homogenizadas tres veces (03 y 05) incorporan más LAE que las que lo fueron dos veces (02 y 04).

#### 4.5 Lavado de los films de CNF-LAE

Se estudió la cantidad de LAE que se perdía de los films de CNF al ser lavados en agua en agitación constante durante 24 h. Como se puede observar en la tabla 8 no fue posible cuantificar el LAE en ninguno de los films de las cuatro CNF utilizadas, lo que indica que la concentración de LAE en las disoluciones de lavado es inferior a 1.1 ppm.

CNF	2,5 % LAE		5 % LAE	
	[LAE] ppm	[LAE] lavado	[LAE] ppm	[LAE] lavado
<b>CNF 02</b>	16	NQ	32	NQ
<b>CNF 03</b>	16	NQ	32	NQ
<b>CNF 04</b>	16	NQ	32	NQ
<b>CNF 05</b>	16	NQ	32	NQ

Tabla 7. Se muestra, para los films de 2,5 y 5% de LAE, la concentración máxima de LAE (ppm) que se podría detectar en el lavado y la concentración de LAE detectada tras el lavado. NQ: no cuantificable.

Con los resultados obtenidos, se deduce que la unión entre el LAE y los films de CNF preparados es fuerte, ya que no se detecta LAE al lavar los films de ninguna de las cuatro CNF utilizadas.

#### 4.6 Actividad antimicrobiana del LAE en films de CNF frente a *L. monocytogenes*

Una vez observado que los films de CNF inhibían la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, los films de CNF fueron suplementados con LAE a distintas concentraciones para potenciar su actividad. La actividad antimicrobiana del etil lauroil arginato (LAE) en medio líquido frente a *L. monocytogenes* se probó en placas de 96 pocillos que contenían films de CNF con LAE incorporado a diferentes concentraciones. Posteriormente se sembraron en placas de PCA y se contaron las colonias presentes.

En la tabla 8 se pueden observar los resultados numéricos obtenidos. Se observa que el LAE es capaz de inhibir el 100% del crecimiento de *L. monocytogenes* a partir de una concentración de 1% LAE/CNF en las cuatro CNF utilizadas (CNF 02, CNF 03, CNF 04 y CNF 05). Mientras que con una concentración de 0,5% LAE/CNF se consigue al menos una reducción de 2 log CFU/mL frente al film control sin LAE (LAE 0%). En la CNF 02 hay una reducción de 2,44 log CFU/mL del crecimiento de *L. monocytogenes* en los films de LAE 0,5% LAE/CNF frente al film control sin LAE. Para CNF 03 la reducción es de 3,82 log CFU/mL en los films de LAE 0,5% frente al film control, esta fue la CNF donde mayor inhibición hubo con LAE 0,5%. Para CNF 04 la reducción es de 3,34 log CFU/mL en los films de LAE 0,5% frente al film control sin LAE. Y en

CNF 05 la reducción es de 2,19 log CFU/mL, siendo esta la CNF donde menor inhibición se obtuvo con LAE 0,5%. Para el resto de las concentraciones de LAE (1, 5 y 10%) se obtuvo una reducción total del crecimiento de al menos 11,5 log CFU/mL.

Actividad antimicrobiana de los films con LAE (log CFU/mL)					
CNF	Control 0% LAE	0,5% LAE	1% LAE	5% LAE	10% LAE
<b>CNF 02</b>	13,45±0,08	11,01±0,31	ND	ND	ND
<b>CNF 03</b>	13,51±0,09	9,69±0,61	ND	ND	ND
<b>CNF 04</b>	13,45±0,06	10,11±0,12	ND	ND	ND
<b>CNF 05</b>	13,43±0,09	11,24±0,26	ND	ND	ND

Tabla 8. Actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* de los films conteniendo LAE al 0%, 0,5%, 1%, 5% y 10%. Los resultados están expresados como la media del log CFU/mL ± la desviación estándar de al menos tres muestras independientes. ND ó no detectado; indica que los valores de CFU/mL <100 CFU/mL.

A partir de los resultados obtenidos se demostró la actividad antimicrobiana del LAE y, además, su eficacia para seguir manteniéndola al ser incorporado en los films de CNF frente a *L. monocytogenes*. Los resultados son similares a los obtenidos por Mauriel-Galet *et al.* (2012) al utilizar films de etilen-vinil-alcohol (EVOH) con LAE incorporado frente a *L. monocytogenes*, aunque los films de CNF/LAE tienen mayor actividad frente a *L. monocytogenes* que algunos de los films de EVOH.

#### 4.7 Ensayo *in vitro* de los films CNF-LAE sobre un cultivo de *L. monocytogenes*

En la prueba *in vitro* realizada se evaluó la actividad antimicrobiana de los films de CNF con LAE a través de un ensayo de difusión en agar donde se determinaron los halos de inhibición de los films de las cuatro CNF utilizadas frente a *L. monocytogenes*. Este ensayo se realizó a distintos tiempos de incubación para determinar si la actividad antimicrobiana de los films se mantenía a lo largo de varios días. En las tablas 9, 10 y 11 se pueden ver los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada film de CNF a las concentraciones de LAE utilizadas y a los diferentes tiempos, para los films lavados y sin lavar.

A las 24 horas:

Halo de inhibición (mm)					
0,5% LAE	Lavado	Sin lavar	1% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	22,41	24,81	CNF 02	24,60	26,03
CNF 03	20,00	22,80	CNF 03	25,55	25,56
CNF 04	23,29	23,60	CNF 04	23,55	24,23
CNF 05	23,56	23,72	CNF 05	28,38	28,50
2,5% LAE	Lavado	Sin lavar	5% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	25,92	27,66	CNF 02	26,28	29,60
CNF 03	26,53	28,27	CNF 03	26,12	29,54
CNF 04	23,27	26,89	CNF 04	27,19	27,22
CNF 05	27,98	27,95	CNF 05	27,80	29,43

Tabla 9. Diámetro en mm de los halos de inhibición de los films de las distintas CNF a las concentraciones de LAE de 0,5%, 1%, 2,5% y 5%. Se comparan los films lavados con los no lavados a las 24 h.

A las 24 h, se observó que los films lavados tenían un halo de inhibición menor comparado con los no lavados. Esto podía deberse a que en los ensayos de lavado de los films (apartado 4.5) se perdiera una pequeña cantidad de LAE, ya que el límite de cuantificación del método es de 1.1 ppm. Los halos de inhibición fueron mayores con concentraciones de 5% de LAE. Los halos de inhibición de los films lavados con una concentración de 1% de LAE fueron superiores a los de 0,5% de LAE sin lavar, lo que parecería indicar que no sería necesario utilizar un alto porcentaje de LAE en los films para conseguir la inhibición de *L. monocytogenes*. La CNF 05 fue la que obtuvo mejores resultados, ya que los films con un 1% de LAE produjeron los mayores halos de inhibición (28 mm) tanto en los films lavados como en los no lavados. Las CNF 02, 03 y 04 produjeron halos más pequeños que la CNF 05 a todas las concentraciones de LAE probadas excepto al 5% donde los halos de inhibición fueron similares para todas las CNF.

A las 48 horas:

Halo de inhibición (mm)					
0,5% LAE	Lavado	Sin lavar	1% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	20,00	23,67	CNF 02	23,51	25,31
CNF 03	20,00	22,46	CNF 03	23,55	24,81
CNF 04	20,00	20,00	CNF 04	20,00	23,85
CNF 05	20,00	22,04	CNF 05	25,44	25,93
2,5% LAE	Lavado	Sin lavar	5% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	23,72	28,70	CNF 02	24,61	28,51
CNF 03	26,07	28,19	CNF 03	25,35	27,96
CNF 04	22,42	26,11	CNF 04	25,11	27,16
CNF 05	25,35	26,61	CNF 05	25,73	27,67

Tabla 10. Diámetro en mm de los halos de inhibición de los films de las distintas CNF a las concentraciones de LAE de 0,5%, 1%, 2,5% y 5%. Se comparan los films lavados con los no lavados a las 48 h.

A las 48 h, se apreció una ligera reducción de los halos de inhibición. En los films lavados con una concentración de 0,5% de LAE, el halo se redujo al tamaño del film (2x2 cm). La CNF 05 (figura 20) lavada siguió siendo la más efectiva, ya que los films con 1% de LAE produjeron el mayor halo. En los films lavados con 2,5% de LAE, los films de CNF 03 produjeron mayores halos en comparación con los obtenidos para los films de CNF 05. Mientras que a una concentración de LAE del 5%, los films lavados de las cuatro CNF produjeron halos similares, siendo los films CNF 02 y 04 los menos efectivos.

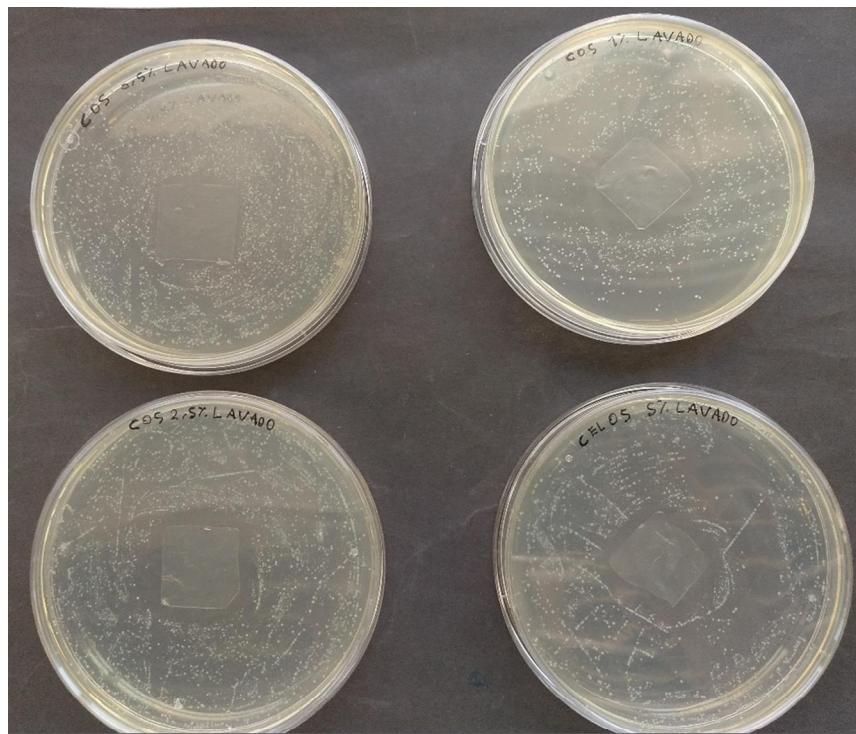


Figura 16. Antibiogramas frente a *L. monocytogenes* de los films de CNF 05 a las 48 h de incubación a 37°C. Arriba a la izquierda 0,5% LAE, arriba a la derecha 1% LAE, abajo a la izquierda 2,5% LAE y abajo a la derecha 5% LAE.

A las 120 horas (72 h sin el film):

Halo de inhibición (mm)					
0,5% LAE	Lavado	Sin lavar	1% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	19,88	21,36	CNF 02	23,33	24,38
CNF 03	18,78	21,47	CNF 03	20,18	23,79
CNF 04	14,50	20,08	CNF 04	18,68	24,97
CNF 05	20,51	21,95	CNF 05	24,78	23,97
2,5% LAE	Lavado	Sin lavar	5% LAE	Lavado	Sin lavar
CNF 02	24,46	27,54	CNF 02	23,84	27,37
CNF 03	21,56	27,15	CNF 03	22,58	27,88
CNF 04	21,05	26,13	CNF 04	22,66	26,60
CNF 05	24,62	26,60	CNF 05	25,17	27,34

Tabla 11. Diámetro en mm de los halos de inhibición de los films de las distintas CNF a las concentraciones de LAE de 0,5%, 1%, 2,5% y 5%. Se comparan los halos de los films lavados con los no lavados a las 120 h (72 h sin films).

A las 120 h, tras haber retirado los films durante 72 h, se observó una reducción sustancial del halo de inhibición en las CNF 03 y 04, que en el caso del film de CNF 03 con 0,5% LAE lavado se redujo a un diámetro de 11,78 mm, es decir, una reducción a prácticamente la mitad del diámetro del film. Los halos de los films de CNF 02 y 05 fueron los que mejor se mantuvieron respecto a los medidos a las 48 h de incubación, siendo los films de CNF 05 (figura 21) los que produjeron mayores halos de inhibición en los films lavados.

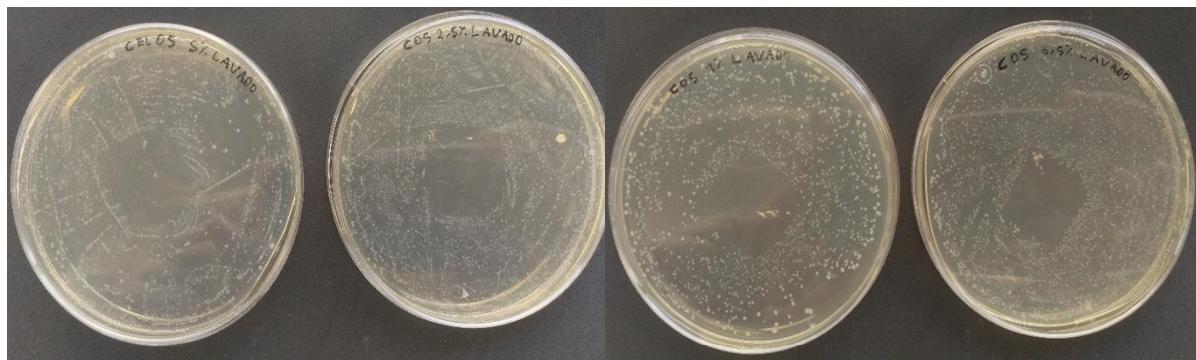


Figura 21. Antibiogramas frente a *L. monocytogenes* de la CNF 05 lavada a las 120 h (72 h tras retirar el film). De izquierda a derecha 5%, 2,5%, 1%, y 0,5% LAE.

Los resultados obtenidos demostrarían que los films de CNF con LAE son capaces de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre la superficie de un medio de cultivo sólido y mantener su efecto una vez retirado el film. Este mantenimiento del halo de inhibición al retirarse el film indicaría que hay transferencia de LAE a la superficie del medio de cultivo, provocando que el crecimiento de *L. monocytogenes* siga inhibido. Esto supuso que el LAE sería capaz de migrar desde el film hasta el alimento, potenciando su efecto antimicrobiano. Se observó un menor halo de inhibición en los films lavados con H<sub>2</sub>O miliQ durante 24 h frente a los no lavados.

Esto parece indicar que, aunque no se haya detectado LAE en las disoluciones de lavado del apartado 4.5, parece existir alguna liberación residual de LAE que explicaría los menores halos de inhibición obtenidos. A pesar de ser coherentes con las demás pruebas realizadas, los resultados obtenidos en este ensayo son apenas orientativos, ya que solo se pudo hacer una réplica, debido a falta de disponibilidad de CNF.

#### **4.8 Ensayo *in vivo* de los films de LAE en jamón cocido**

En la prueba *in vivo* se evaluó la eficacia de los films de CNF-LAE, con concentraciones de 5 y 10% (p/p) LAE/CNF, en un alimento RTE como el jamón cocido previamente inoculado con  $5 \times 10^4$  CFU/g de *L. monocytogenes*. También se

cuantificaron las bacterias totales mesófilas y las bacterias ácido lácticas para ver si los films de CNF-LAE reducían el crecimiento de la microflora normal del alimento.

En las tablas 12 y 13 se pueden observar los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo*. Tanto en CNF 03 como en CNF 05 la población de *L. monocytogenes* se mantuvo constante (entre 4,03-4,08 log CFU/g) en los controles con films de 0% de LAE. Para CNF 03, en los films con 5 y 10% de LAE hubo una reducción en la concentración de *L. monocytogenes* de 0,39 y 0,44 log CFU/g, respectivamente en el día 7. En cuanto a las bacterias mesófilas totales y a las ácido lácticas, la diferencia de crecimiento entre los film control y los que tenían LAE incorporado es de, aproximadamente, 0,4 log CFU/g, siendo mayor en los films con un 5% de LAE.

CNF 03	<i>L. monocytogenes</i> log CFU/g			Bacterias totales log CFU/g			Bacterias lácticas log CFU/g		
	Día	Control 0%LAE	5% LAE	10% LAE	Control 0%LAE	5% LAE	10% LAE	Control 0%LAE	5% LAE
0	4,07±0,01	4,07±0,01	4,07±0,01	7,43±0,04	7,43±0,04	7,43±0,04	7,35±0,09	7,35±0,09	7,35±0,09
1	4,03±0,04	3,79±0,09	3,85±0,01	8,13±0,09	7,95±0,04	7,87±0,07	7,89±0,04	7,61±0,04	7,83±0,04
3	4,08±0,02	3,77±0,01	3,81±0,11	8,36±0,04	8,14±0,11	8,21±0,02	8,10±0,03	7,87±0,24	7,99±0,06
7	4,07±0,06	3,68±0,05	3,63±0,09	8,41±0,02	8,02±0,04	8,09±0,01	8,22±0,03	7,72±0,15	7,92±0,11

Tabla 12. En la tabla se muestra el crecimiento de *L. monocytogenes*, las bacterias totales mesófilas y las bacterias ácido lácticas con los films de CNF 03 a distintas concentraciones de LAE (0, 5, 10% LAE/CNF) en los días analizados. Los resultados se expresan en log CFU/g junto con la desviación estándar.

Respecto a los resultados obtenidos de los films de CNF 05, hay que indicar que son similares a los de CNF 03. En los films con 5 y 10% de LAE hubo una reducción en la concentración de *L. monocytogenes* de 0,33 y 0,44 log CFU/g, respectivamente, en el último día del ensayo. En cuanto a las bacterias mesófilas totales y a las ácido lácticas, la diferencia de crecimiento entre los film control y los que tenían LAE incorporado es de, aproximadamente, 0,2-0,3 log CFU/g. Los resultados de bacterias totales son ligeramente inferiores a los obtenidos en CNF 03, aunque en ambas CNF la disminución en el crecimiento fue mayor en los films de 5% de LAE que en los de 10%.

CNF 05	<i>L. monocytogenes</i> log CFU/g			Bacterias totales log CFU/g			Bacterias lácticas log CFU/g		
	Día	Control 0%LAE	5% LAE	10% LAE	Control 0%LAE	5% LAE	10% LAE	Control 0%LAE	5% LAE
0	4,04±0,09	4,04±0,09	4,04±0,09	7,42±0,03	7,42±0,03	7,42±0,03	7,45±0,01	7,45±0,01	7,45±0,01
1	4,03±0,09	3,84±0,01	3,83±0,05	8,13±0,09	7,93±0,06	7,98±0,03	7,90±0,05	7,66±0,07	7,79±0,17
3	4,06±0,10	3,72±0,06	3,80±0,02	8,36±0,04	8,13±0,04	8,20±0,05	8,13±0,07	7,78±0,07	7,90±0,07
7	4,03±0,06	3,71±0,02	3,60±0,02	8,50±0,14	8,24±0,05	8,30±0,18	8,19±0,03	7,91±0,03	8,04±0,10

Tabla 13. En la tabla se muestra el crecimiento de *L. monocytogenes*, las bacterias totales mesófilas y las bacterias ácido lácticas con los films de CNF 05 a distintas concentraciones de LAE (0, 5, 10% LAE/CNF) en los días analizados. Los resultados se expresan en log CFU/g junto con la desviación estándar.

No se obtuvieron grandes reducciones en la concentración de *L. monocytogenes* con ninguno de los dos films, aunque sí que hubo una reducción significativa de alrededor de 0,4 log CFU/g. Estos resultados son menores que los obtenidos por otros autores que han trabajado con films de LAE (Muriel-Galet *et al.*, 2015; Theinsathid *et al.* 2012). Esto es probablemente debido a que por razones de disponibilidad de films de CNF no se pudo cubrir completamente las muestras de jamón cocido, sino únicamente por la superficie donde se realizó la inoculación. Para futuros ensayos se recomendaría la utilización de dos films de CNF en cada cara de la muestra, similar a los films separadores que hay en los envases de jamón, así el efecto antimicrobiano sería superior. De esta forma también se conseguiría una mayor inhibición del crecimiento de las bacterias mesófilas totales y ácido lácticas, pudiendo aumentar la vida útil del alimento. Otra ventaja sobre los films separadores que se utilizan en la actualidad es que los films de CNF son biodegradables lo que los hace ideales para aplicaciones desechables y también supondría una menor utilización de plásticos reduciendo los efectos nocivos al medio ambiente.

## 5. Conclusión

En este proyecto se ha pretendido demostrar la capacidad de las CNF de inhibir la motilidad bacteriana y la formación de biofilms, conocer la afinidad entre los films de CNF y el LAE y, por último, conocer la actividad antimicrobiana de los films de CNF-LAE frente a *L. monocytogenes* en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar, las CNF fueron capaces de inhibir la motilidad bacteriana de  $\beta$ -swimming en las cuatro bacterias estudiadas, pero no inhibieron la motilidad de  $\beta$ -swarming sino que la potenciaron. Los films de CNF fueron capaces de reducir la formación de biofilms de *L. monocytogenes*, mientras que en las otras tres bacterias estudiadas (*E. coli* verotoxigénica, *S. Typhimurium* y *B. cereus*) no se verificó reducción en la formación de biofilms. En segundo lugar, se implementó con éxito un método espectrofotométrico para la determinación de LAE que permite la detección sencilla del LAE presente en disoluciones acuosas. Con respecto a la afinidad de las distintas CNF estudiadas para el LAE, se obtuvo que la CNF 05 permitió la incorporación de la mayor concentración de LAE, mientras que CNF 02 y CNF 03 fueron las CNFs que más afinidad por el LAE demostraron gracias a las constantes de disociación obtenidas. En los estudios de liberación de LAE de los films de CNF-LAE, no se ha cuantificado LAE en las disoluciones acuosas, ya que la concentración de LAE liberada de los films estaría por debajo del límite de cuantificación del método espectrofotométrico desarrollado, aunque sí que se detectó LAE por debajo del límite de cuantificación. En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de los films de CNF-LAE, se demostró la actividad antimicrobiana de éstos frente a *L. monocytogenes* tanto en medio líquido como en medio sólido. Finalmente, en el ensayo *in vivo* con jamón cocido se obtuvo una pequeña reducción de la población de *L. monocytogenes* y una ligera reducción del crecimiento de las bacterias totales y ácido lácticas. Los resultados de *L. monocytogenes* son prometedores, por lo que sería interesante una optimización del método y la realización de futuros ensayos para mejorar la capacidad antimicrobiana de los films de CNF-LAE.

## 6. Bibliografía

- AGENCIA ESPAÑOLA DE CONSUMO, SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN (AECOSAN), 2010. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria.
- ATKINS, P. and DE PAULA, J., 2008. Química Física (8<sup>a</sup> edición). *Editorial Médica Panamericana*.
- BECERRIL, R., MANSO, S., NERIN, C. and GÓMEZ-LUS, R., 2013. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32(2), pp. 404.
- BOEHM, A., KAISER, M., LI, H., SPANGLER, C., KASPER, C.A., ACKERMANN, M., KAEVER, V., SOURJIK, V., ROTH, V. and JENAL, U., 2010. Second Messenger-Mediated Adjustment of Bacterial Swimming Velocity. *Cell*, 141(1), pp. 107.
- BUTLER, F., DUFFY, G., ENGELJOHN, D., LAMMERDING, A. M. and TOMPKIN, R. B., 2006. *Escherichia coli* O157:H7 in fresh raw ground beef.
- CHEN, C. Y.; NACE, G. W. and IRWIN, P. L., 2003. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55 (2), pp. 475.
- CHINGA-CARRASCO, G. and SYVERUD, K., 2012. On the structure and oxygen transmission rate of biodegradable cellulose nanobarriers. *Nanoscale Research Letters*, 7, pp.192.
- CHINGA-CARRASCO, G. and SYVERUD, K., 2014. Pretreatment-dependent surface chemistry of wood nanocellulose for pH-sensitive hydrogels. *Journal of Biomaterials Applications*, 29(3), pp. 423.
- CORREA, J. P., MOLINA, V., SANCHEZ, M., KAINZ, C., EISENBERG, P., and MASSANI, M. B., 2017. Improving ham shelf life with a polyhydroxybutyrate/polycaprolactone biodegradable film activated with nisin. *Food Packaging and Shelf Life*, 11, pp. 31.

DE LA FUENTE-NUNEZ, C., KOROLIK, V., BAINS, M., NGUYEN, U., BREIDENSTEIN, E.B.M., HORSMAN, S., LEWENZA, S., BURROWS, L. and HANCOCK, R.E.W., 2012. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), pp. 2696.

DÉZIEL, E., COMEAU, Y. and VILLEMUR, 2000. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, 183(4), pp. 1195.

DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M. and IANIERI, A., 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (6), pp. 1552.

DONLAN, R. M. and COSTERTON, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167.

DUFRESNE, A., 2013. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials today*, 16(6), pp. 220.

ECHEVERRÍA, I., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., MAURI, A. N., and MONTERO, M. P., 2018. Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite-clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 266, pp. 142.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2007. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to an application on the use of ethyl lauroyl arginate as a food additive. *EFSA Journal*, 511, pp. 1.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2007. Refined exposure assessment of ethyl lauroyl arginate based on revised proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*, 11(6), pp. 3294.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2009. Statement on the evaluation of the new information provided on the food additive ethyl lauroyl arginate. *EFSA Journal*, 7(10), pp. 1333.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2016a. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. Including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7), pp. 4524.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2016b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), pp. 4634.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), pp. 5077.

FALEIRO, P. L., 2009. Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. *Universidad Complutense de Madrid*.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2007. Food Safety Risk Profile for *Salmonella* species in broiler (young) chickens.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2008. Ethyl Lauroyl Arginate. Chemical and Technical Assessment.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 2012. Bacteriological Analytical Manual: *Bacillus Cereus*.

<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070875.htm>

GUTTENPLAN, S.B. and KEARNS, D.B., 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS microbiology reviews*, 37(6), pp. 849.

HENRIQUES, A.R. and FRAQUEZA, M.J., 2017. Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology*, 81, pp. 180.

- INOUE, T.; SHINGAKI, R.; HIROSE, S.; WAKI, K.; MORI, H. and FUKUI, K., 2007. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 189 (3), pp. 950.
- JACK, A.A., NORDLI, H.R., POWELL, L.C., POWELL, K.A., KISHNANI, H., JOHNSEN, P.O., PUKSTAD, B., THOMAS, D.W., CHINGA-CARRASCO, G. and HILL, K.E., 2017. The interaction of wood nanocellulose dressings and the wound pathogen *P. aeruginosa*. *Carbohydrate Polymers*, 157, pp. 1955.
- JOFRÉ, A., GARRIGA, M. and AYMERICH, T., 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 70(11), pp. 2498.
- LIIMATAINEN, H., VISANKO, M., SIRVIO, J.A., HORMI, O.E.O. and NIINIMAKI, J., 2012. Enhancement of the Nanofibrillation of Wood Cellulose through Sequential Periodate-Chlorite Oxidation. *Biomacromolecules*, 13(5), pp. 1592.
- MARKET RESEARCH FUTURE, 2018. Active and intelligent packaging market research report - Forecast to 2023.
- MURIEL-GALET, V., LÓPEZ-CARBALLO, G., GAVARA, R. and HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., 2012. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International journal of food microbiology*, 157(2), pp. 239.
- MURIEL-GALET, V., LÓPEZ-CARBALLO, G., GAVARA, R. and HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., 2015. Antimicrobial effectiveness of lauroyl arginate incorporated into ethylene vinyl alcohol copolymers to extend the shelf-life of chicken stock and surimi sticks. *Food and bioprocess technology*, 8(1), pp. 208.
- MURRAY, T.S., LEDIZET, M. and KAZMIERCZAK, B.I., 2010. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of medical microbiology*, 59(5), pp. 511.
- NERÍN, C., 2010. Antioxidant active packaging and antioxidant edible films. *Woodhead Publishing*, 2(31), pp.496.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2007. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2017. Inocuidad de los alimentos. Notas descriptivas. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2018a. *E. coli*. Notas descriptivas. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2018b. *Salmonella* (no tifoidea). Notas descriptivas. [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2018c. Listeriosis. Notas descriptivas. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>

PADRÃO, J., GONÇALVES, S., SILVA, J. P., SENCADAS, V., LANCEROS-MÉNDEZ, S. and PINHEIRO, A. C., 2016. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. *Food Hydrocolloids*, 58, pp. 126.

PEZO, D.; NAVASCUES, B.; SALAFRANCA, J.; NERIN, C., 2012. Analytical procedure for the determination of Ethyl Lauroyl Arginate (LAE) to assess the kinetics and specific migration from a new antimicrobial active food packaging. *Analytica Chimica Acta*, 745, pp. 92.

POWELL, L.C., KHAN, S., CHINGA-CARRASCO, G., WRIGHT, C.J., HILL, K.E. and THOMAS, D.W., 2016. An investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. *Carbohydrate Polymers*, 137, pp. 191.

PUGA, C.H., SANJOSE, C. and ORGAZ, B., 2016. Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control*, 65, pp. 143.

REESER, R.J., MEDLER, R.T., BILLINGTON, S.J., JOST, B.H. and JOENS, L.A., 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), pp. 1908.

SILVA, F., DOMINGUES, F.C. and NERÍN, C., 2017. Trends in microbial control techniques for poultry products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), pp. 591.

SILVA, N. H. C. S., VILELA, C., ALMEIDA, A., MARRUCHO, I. M., and FREIRE, C. S. R., 2018. Pullulan-based nanocomposite films for functional food packaging: Exploiting lysozyme nanofibers as antibacterial and antioxidant reinforcing additives. *Food Hydrocolloids*, 77, pp. 921.

SREY, S., JAHID, I.K. and HA, S., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), pp. 572.

THEINSATHID, P., VISESSANGUAN, W., KRUENATE, J., KINGCHA, Y. and KEERATIPIBUL, S., 2012. Antimicrobial Activity of Lauric Arginate-Coated Polylactic Acid Films against Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium on Cooked Sliced Ham. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, 77(2), pp. 142.

UNIÓN EUROPEA (UE), 2014. Reglamento (UE) Nº 506/2014 de la Comisión Europea.

VEDEQSA, 2015. LAE A breakthrough in food safety.

VILELA, C., KUREK, M., HAYOUKA, Z., RÖCKER, B., YILDIRIM, S., ANTUNES, M.D.C., NILSEN-NYGAARD, J., PETTERSEN, M.K. and FREIRE, C.S.R., 2018. Review: A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 80, pp. 212.

WILSON, J. W., SCHURR, M. J., LEBLANC, C. L., RAMAMURTHY, R., BUCHANAN, K. L. and NICKERSON, C. A., 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*, 78(918), pp. 216.

YANG, A., TANG, W. S., SI, T. and TANG, J. X., 2017. Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical journal*, 112, pp. 1462.

## **7. Anexos**

Artículo en revisión que se ha realizado con parte de los resultados obtenidos en el Trabajo de Fin de Máster:

### **Antimicrobial activity of biocomposite films containing cellulose nanofibrils and ethyl lauroyl arginate**

Filomena Silva<sup>Ã\*,<sup>E</sup></sup>, Nicolás Gracia\*, Birgitte H. McDonagh<sup>†</sup>, Fernanda C. Domingues<sup><sup>E</sup></sup>, Cristina Nerín<sup>×</sup>, Gary Chinga-Carrasco<sup>+\*</sup>

<sup>Ã</sup>ARAJD ó Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo, Zaragoza, Spain

\*Faculty of Veterinary Medicine, University of Zaragoza, Calle de Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

<sup>E</sup>CICS-UBI ó Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Avenida Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>×</sup>I3A ó Aragon Institute of Engineering Research, University of Zaragoza, Calle Mariano Esquillor s/n, 50018 Zaragoza, Spain

<sup>†</sup>RISE PFI, Høgskoleringen 6b, 7491 Trondheim, Norway

\*Corresponding authors:

Gary Chinga-Carrasco: gary.chinga.carrasco@rise-pfi.no

Filomena Silva: filomena@unizar.es

## **Abstract**

Food packaging is tailored to keep food fresh for a prolonged period of time, to increase shelf-life and prevent microbial degeneration. However, traditional food packaging is made from non-degradable polymers that pose an environmental threat if not disposed of properly. To address this, we here describe preparation of cellulose nanofibril (CNF) films and hydrogels that show antimicrobial activity against common foodborne pathogens (*B. cereus*, verotoxigenic *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium*). Furthermore, negatively charged CNFs were modified with ethyl lauroyl arginate (LAE), which is an antimicrobial agent. CNF films were able to bind LAE molecules up to a maximum concentration of 145-160 ppm. This novel strategy overcomes the current hurdles with LAE incorporation into packaging materials. LAE-CNF biocomposite films exerted a bactericidal activity against a major foodborne pathogen present in ready-to-eat food (*L. monocytogenes*) even at 1% LAE. Our work show how antimicrobial agents can be incorporated in biopolymer films, offering a green and antimicrobial alternative for packaging of RTE meat products.

**Keywords:** cellulose nanofibrils; foodborne pathogens; ethyl lauroyl arginate; food packaging films; *Listeria monocytogenes*

**Synopsis:** Our work describes the development of a novel antimicrobial food packaging film made from sustainable and renewable nanocellulose fibrils.

## Introduction

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth, found in *e.g.* wood, cotton, hemp, and other plant-based materials. Besides cellulose, plant fibres are also composed of hemicellulose and lignin. Cellulose consists of chains of glucopyranose units, which in turn are ordered in nanofibrils that contain crystalline and amorphous regions<sup>1</sup>. Generally, cellulose nanofibrils (CNF), which is one type of nanocellulose, can be obtained from two main sources: bacteria and plants. Bacterial cellulose is obtained through fermentation processes involving *Gluconacetobacter* species; while plant cellulose involves the extraction of CNF from lignocellulosic biomass. Production of CNF from wood is based on various pre-treatments that facilitate a homogeneous nanofibrillation of pulp fibres. The surface of CNF is covered with numerous active hydroxyl groups that render the CNFs strongly hydrophilic and reactive. Taking advantage of this feature, numerous chemical pre-treatments targeted at these hydroxyl groups have been proposed, including: (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO)-mediated oxidation (introduction of carboxyl and aldehyde groups), carboxymethylation (introduction of carboxymethyl groups), and sodium metaperiodate (yields 2,3-dialdehyde units)<sup>2</sup>. Oxidation of alcoholic side groups into carboxylic and aldehyde moieties onto the cellulose backbone radically change the surface properties of CNF. For instance, oxidized CNF can form hydrogels<sup>3</sup> that can be applied in a vast array of fields, such as the biomedical, pharmaceutical and food areas.

Nanocellulose has several promising properties for food packaging; it can form a transparent barrier of high strength that has low oxygen transmission rate<sup>4</sup>. With the already inherent properties of nanocellulose films as packaging material, introducing a secondary property such as antimicrobial activity would be highly beneficial for food preservation and concomitantly a reduction in food waste. However, studies on the

effect of nanocellulose on bacterial inhibition are scarce. Powell *et al.* and Jack *et al.*, assessed the interaction of neat TEMPO CNF (carboxyl content: 0.86 mmol/g) with *Pseudomonas aeruginosa* and demonstrated a dose-dependent inhibition of bacterial growth in suspension, probably due to a limited motility of the bacteria in the highly viscous TEMPO CNF<sup>5</sup>.

Moreover, TEMPO mediated oxidized nanocelluloses have also been modified with antimicrobial components. Oliveira de Castro and co-authors treated cellulose nanocrystals (CNC) by TEMPO mediated oxidation in order to graft cyclic oligosaccharides (cyclodextrins) onto the surface of oxidized CNC (carboxyl content: 1.32 mmol/g)<sup>6</sup>. The approach was applied to load the modified CNC system with antimicrobial components, with controlled release and antibacterial properties against *Bacillus subtilis*. Modification of TEMPO CNF has recently been explored by utilizing the negative charge of the oxidized nanofibrils to adsorb positively charged cationic nisin molecules<sup>7</sup>. The oxidized TEMPO CNF (carboxyl content: 1.91 mmol/g) modified with nisin was tested against *Bacillus subtilis* and a clinically relevant *Staphylococcus aureus*. The authors reported a higher activity of the biocomposite material, compared to using free nisin in solution.

Ethyl lauroyl arginate (LAE, E-243)<sup>8</sup> is an EFSA-approved antimicrobial component for its use in processed meat products. It is highly efficient in preserving fresh food, and can extend the shelf-life of the product. However, due to its amphoteric, ionic nature, it is challenging to incorporate LAE in already available packaging materials<sup>9</sup>. As mentioned above, TEMPO CNFs exhibit carboxyl and aldehyde groups on their surface that could potentially react with LAE amine groups and its overall positive charge. Thus, such interaction is expected to facilitate the immobilization of LAE in a CNF network system with effective antimicrobial properties.

Taking this into consideration, we herein explore the use of TEMPO CNF as a matrix for the development of active food packaging films containing LAE. The biocomposite material was tested against a series of microorganisms such as *Bacillus cereus*, verotoxigenic *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*, thus comprehensively assessing the antimicrobial properties against common foodborne pathogens.

## **Materials and methods**

### **CNF synthesis**

Two series of CNF grades were utilized in this study. The CNF were produced from *P. radiata* kraft pulp fibres. The pulp fibres were chemically pre-treated with (2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-yl)oxyl (TEMPO) mediated oxidation<sup>2c</sup>, using 3.0 mmol hypochlorite (NaClO) per gram of cellulose. The kraft pulp fibres (1 % consistency) were homogenized with a Rannie 15 type 12.56X homogenizer (operated at 1000 bar pressure). The nanofibrillated material was collected after 2 and 3 passes through the homogenizer, resulting into two CNF samples denominated CNF\_2 and CNF\_3, respectively.

### **Nanocellulose film morphology**

Films were made by dispersion casting in Petri dishes. The films were allowed to dry at room temperature (20• C) for 5-7 days. Samples of 10 mm x 20 mm were cut from each film and fixed on microscopy slides using a double-sided tape. The samples were sputtered with a thin layer of gold (Agar Auto Sputter Coater). Ten Laser profilometry (LP) topography images were acquired from each film surface, using a LP (Lehmann, Lehman Mess-Systeme AG Baden-Dättwil, Germany). The lateral and z-resolution of the LP system was 1 µm and 10 nm, respectively. The size of the local areas was 1 mm x 1 mm. The root-mean-square (Sq) was quantified on the LP images.

Atomic force microscopy (AFM) suspensions were analyzed with a Veeco mulimodeV at room temperature. AFM tips (SA-air) with a spring constant  $\sim 0.4 \text{ N m}^{-1}$  were purchased from Bruker AFM probes. Freshly cleaved mica was attached to a magnetic stub with double-sided tape. Top layers of mica were then removed before sample application.  $25\mu\text{L}$  of diluted (MQ-water, 0.5 wt %) sample was applied to mica and air dried prior to analysis. Height and peak force error data were collected with dimensions 2x2um at a resolution of 1024 samples/line with an aspect ratio equal to 1.

### **Antimicrobial susceptibility assays**

#### Bacterial strains and growth conditions

Four bacterial reference strains were used in this study: *Listeria monocytogenes* CECT 911, *Bacillus cereus* CECT 131, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 and verotoxigenic *E. coli* CECT 5947. Bacterial strains were stored in the appropriate culture medium supplemented with 30% (v/v) glycerol at -80 °C. Verotoxigenic *E. coli*, *S. Typhimurium* and *B. cereus* were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA, Scharlab, Spain) plates at 37 °C in aerobic conditions; whereas *L. monocytogenes* was subcultured in Brain Heart Infusion agar (BHIA, Scharlab Spain) plates at the same temperature and atmosphere conditions. Regarding growth in liquid medium, all strains were grown at 37 °C in aerobic conditions using Mueller-Hinton broth (MHB, Scharlab, Spain), with the exception of *L. monocytogenes*, where Brain Hear Infusion (BHI, Charlab Spain) broth was used.

#### Swimming assays

For these assays, Luria-Bertrani (LB, Scharlab, Spain) broth containing 0.5% glucose<sup>10</sup> (Oxoid, Spain) and 0.3% agar<sup>11</sup> (Scharlab, Spain), was supplemented with 5% of each nanocellulose sample and poured into 55 mm sterile plates. Each plate was inoculated in

the centre of the plate at the agar surface with 5 µL of an overnight liquid culture of each strain containing approximately  $1 \times 10^9$  CFU/mL. All plates were incubated in aerobic conditions at 37 °C, with the exception of *L. monocytogenes* which was incubated at 25 °C<sup>11</sup>. The end point for swimming assays was different for each bacterial strain, depending on its growth kinetics, namely 7h for verotoxigenic *E. coli*, 6h for *S. Typhimurium*, 24h for *B. cereus* and 48h for *L. monocytogenes*. Results are expressed as percentage of inhibition of swimming halo formation by comparing the halos obtained in control plates with the halos obtained in plates with CNFs. All halos were recorded with a digital calliper and each assay was performed at least in triplicate.

#### Biofilm assays

Antibiofilm activity was determined according to Reeser and collaborators<sup>12</sup> with some modifications. Briefly, bacterial biofilms of all the four strains under study were prepared in 24-well flatbottom polystyrene microtitre plates containing nanocellulose films. Nanocellulose films were prepared in each plate well at 20 g/m<sup>2</sup> and allowed to dry up to constant weight at room temperature. Bacterial suspensions (0.02 OD<sub>600</sub>) were prepared from overnight grown cultures (37°C) in the appropriate growth media as described above. 1 mL of each suspension was inoculated into the plates containing nanocellulose films. Microtitre plates without nanocellulose films were used as positive control. Negative controls were prepared as mentioned before, replacing the bacterial suspension volume by the appropriate culture media. Plates were incubated 24 h at 37°C. After incubation, the planktonic cells were removed from each well by washing two times with 2 mL of 0.9% NaCl. Afterwards, biofilms were stained with 1 mL of a 1% (w/v) crystal violet solution in 95% (v/v) ethanol for 10 min at room temperature for 5 min. Stained wells were rinsed thoroughly three times with water and allowed to dry for 30 min at 50 °C. Biofilm formation was quantified by the addition of 1 mL of

80:20% ethanol:acetone solution to the crystal violet stained cells and, after 15 min of incubation, the absorbance of the solution was recorded at 570 nm. This procedure was done, at least three independent times.

#### Antimicrobial activity of nanocellulose films containing ethyl lauroyl arginate (LAE)

For this purpose, nanocellulose films at a grammage of 20 g/m<sup>2</sup> containing 0.5, 1, 5 and 10% (w LAE/w CNF) of LAE (Myrenat®-ET, VEDEQSA, Spain) were prepared in 96-well flat bottom polystyrene microtitre plates. *L. monocytogenes* suspensions (0.02 OD<sub>600</sub>) were prepared from overnight grown cultures (37°C) in Brain Heart Infusion broth. 100 µL of suspension was inoculated into the plates containing LAE-nanocellulose films. Microtitre plates containing nanocellulose films without LAE were used as positive control. Negative controls were prepared as mentioned before, replacing the bacterial suspension volume by the appropriate culture media. Plates were incubated for 24 h at 37°C. After incubation, an aliquot of planktonic cells were removed from each well and plated for the determination of viable cell counts. Serial dilutions were prepared in sterile 0.9% NaCl and plated onto Plate Count agar (PCA, Scharlab, Spain) according to the method described by Chen et al., 2003<sup>13</sup>. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the number of colonies was determined. The detection level of this plating method was 1x10<sup>2</sup> CFU/mL. Experiments were conducted, at least, in three independent assays.

#### **Study of LAE binding to nanocellulose films**

##### Determination of LAE concentration

LAE concentration (in ppm) was determined using a previously developed protocol by our research group <sup>14</sup> with some modifications. Briefly, 3.5 mL of a Co(SCN)<sub>4</sub><sup>2-</sup> stock reagent solution (35.0 g of NH<sub>4</sub>SCN and 15.0 g of Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in 35 mL of H<sub>2</sub>O) were

mixed with 25 mL of LAE aqueous solutions and 2.5 mL of 1,2-dichloroethane in a 50 mL tube. Samples were vigorously vortexed for 1 min and the samples were centrifuged for 10 min at 4000 rpm. After centrifugation, the bottom organic phase was recovered and the absorbance of the blue dichloroethane extracts was recorded at 623 nm. Calibration graphs were constructed with LAE standards with concentrations ranging from 1.1 to 25 ppm in water. All the experiments were performed in triplicate.

#### LAE binding affinity to CNF films

Blank CNF films with a grammage of 40 g/m<sup>2</sup> were prepared in 90 mm Petri plates as described above for 20 g/m<sup>2</sup> films. After drying, 2x2 cm squares (approximate weight of 17-19 mg) were cut from each CNF film and placed in 50 mL tubes containing 25 mL of each LAE solution (5, 25, 100, 150, 200, 250 and 400 ppm). Samples were incubated at an orbital agitation of 400 rpm and room temperature for 24h. Then, CNF films were withdrawn from the tubes with tweezers and the remaining unbound LAE was determined using the spectrophotometric method described above. All samples were conducted in triplicate.

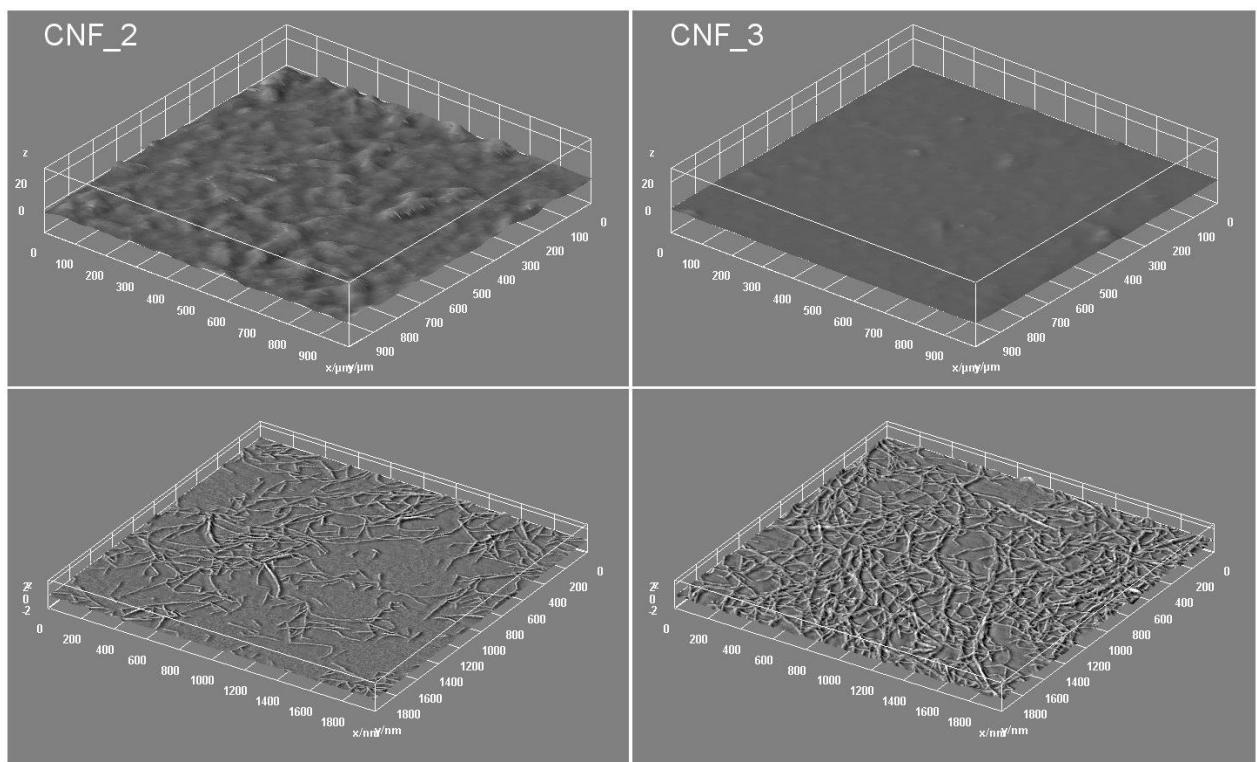
#### Stability of LAE contained in CNF films

LAE-CNF films with a grammage of 40 g/m<sup>2</sup> and LAE/CNF percentages of 2.5 and 5% (w/w) were prepared as described above for 20 g/m<sup>2</sup> LAE-CNF films. After drying, 2x2 cm squares (approximate weight of 15-17 mg) were cut from each CNF film and placed in 50 mL tubes containing 25 mL of ultra-pure water. Samples were incubated at an orbital agitation of 400 rpm and room temperature for 24h. Then, CNF films were withdrawn from the tubes with tweezers and the amount of LAE released into the water was determined using the spectrophotometric method described above. All samples were conducted in triplicate.

## Results and discussion

### CNF characterization

CNF were produced through a homogenizer, and the number of passes greatly affected nanofibrillation and furthermore their morphology. A higher fraction of cellulose nanofibrils, and a lower fraction of residual fibers were observed with an increased number of passes. The sample homogenized twice (CNF\_2) had more residual fibers than the sample homogenized three times (CNF\_3), as can be seen in Figure 1.



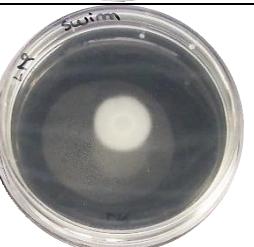
**Figure 1:** Structural quantification of CNF films (upper row) and nanofibrils (lower row). The relatively large structures observed on the film surface of the CNF\_2 sample correspond to residual cellulose fibers. The size of the local images laser profilometry images is 1 mm x 1 mm. The size of the AFM images is 2 x 2 cm.

The AFM analysis revealed that the nanostructure of the cellulose nanofibrils were thin treads with a diameter size distribution of less than 20 nm. Our previous work has concluded that a higher yield of nanofibrils and a lower fraction of residual fibers result in films with a smoother surface (Chinga-Carrasco et al., 2014). This was also observed here, in which film samples made from CNF\_3 were significantly smoother (roughness  $0.32 \pm 0.07$ ) than the corresponding films made of CNF\_2 (roughness  $1.65 \pm 0.22$ ).

### Bacterial motility and biofilm formation

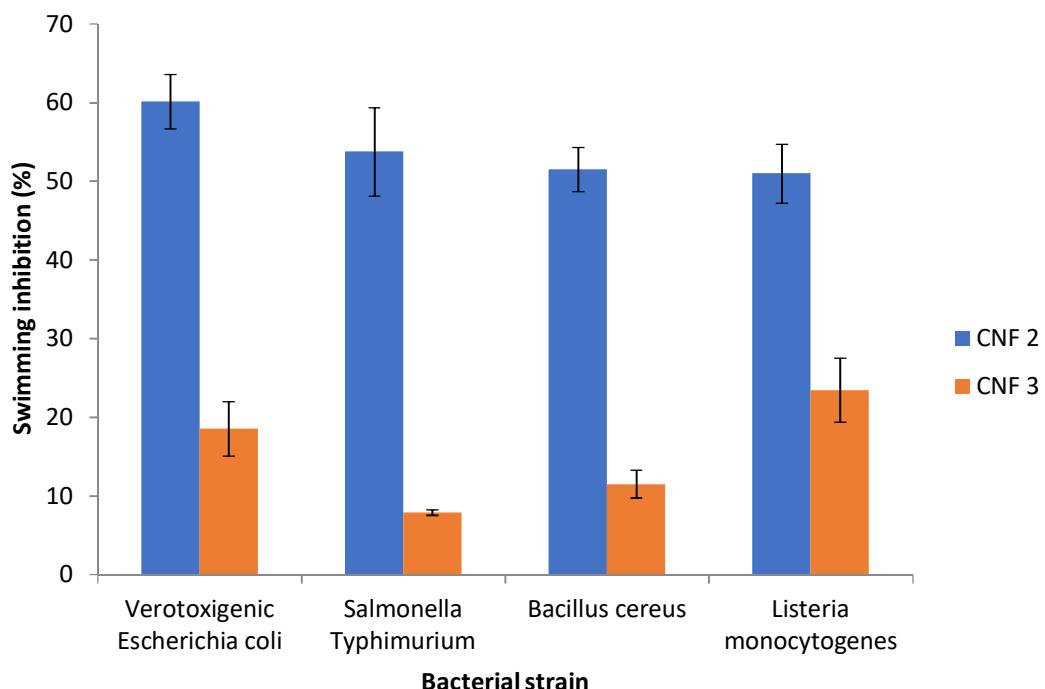
The ability of pathogenic bacteria to adapt, spread rapidly and colonize their preferred environments is largely determined by their motility<sup>15</sup>. The best known modes of bacterial motility, such as swimming, swarming and twitching, are associated with the flagellum<sup>15b</sup>. Swimming is an individual mode of bacterial movement that is driven by rotation of the flagella<sup>16</sup>. In addition, others have shown that bacterial motility seems to play a role in the virulence of several foodborne bacteria such as *Salmonella spp.*, *E. coli* and *L. monocytogenes*<sup>17</sup>. Our previous findings state that CNFs might exhibit antibacterial activity<sup>5</sup>. Here, we wanted to investigate further how CNFs can influence bacterial motility through a specific investigation on bacterial swimming of common foodborne pathogens.

Swimming is the fastest form of motility among bacteria<sup>15a</sup> and takes place in liquid environments<sup>18</sup>. Our results show that CNFs successfully inhibit bacterial swimming *in vitro*, with inhibition values ranging from 7.9 to 60.1% with respect to control samples (Figure 2 and Figure 3). CNF\_3 yielded lower values of inhibition than CNF\_2 samples, probably because samples still contain a significant percentage of cellulose fibers, which can act as a physical barrier for bacteria and hinder bacterial motility.

Bacterial strain	Control	CNF 2	CNF 3
<b>Verotoxigenic <i>Escherichia coli</i></b>			
<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>			
<b><i>Bacillus cereus</i></b>			
<b><i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i></b>			

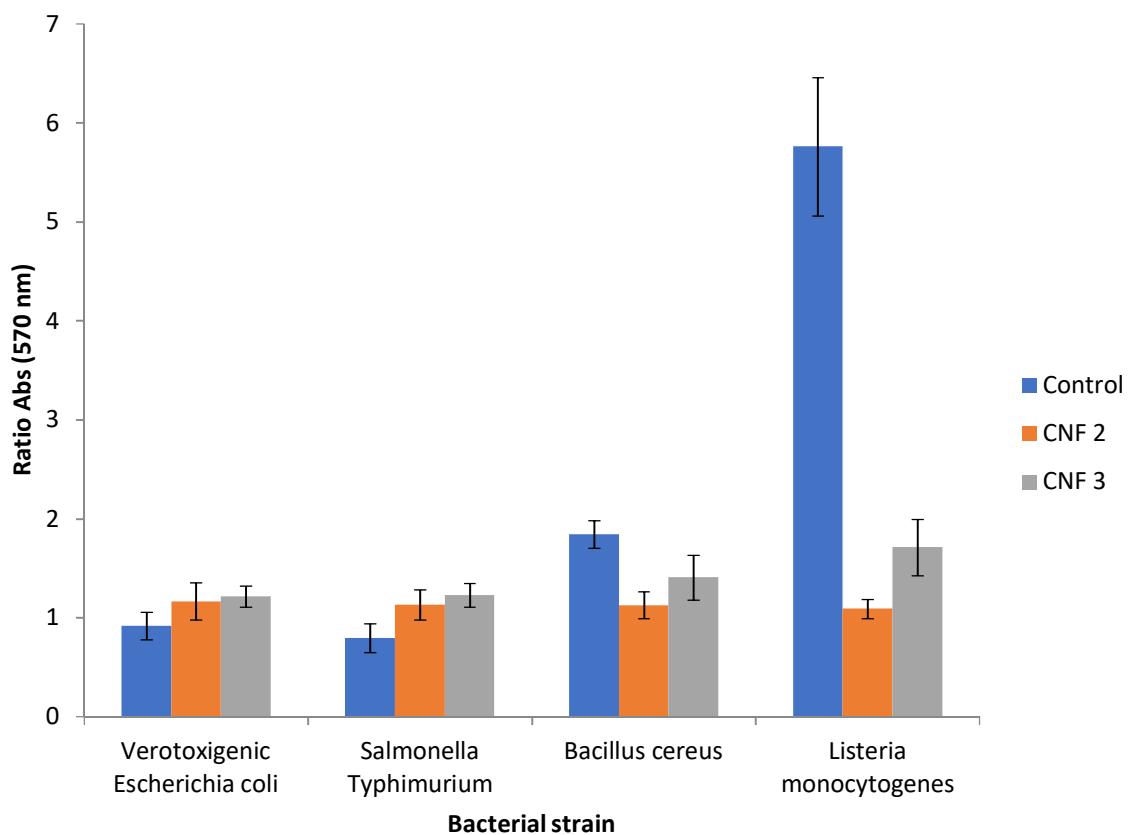
**Figure 2:** Swimming motility halos obtained each bacterial strain with and without (Control) CNFs.

CNF\_2 showed similar swimming inhibition values for all bacteria tested, ranging from 51 to 60%, while CNF\_3 exhibited more diverse inhibition values. Inhibition of bacterial swimming seems to corroborate the antimicrobial activity of CNFs already demonstrated in our previous study<sup>5a</sup>. These results are also in agreement with the results obtained by other authors where compounds with antimicrobial activity favorably inhibit swimming motility<sup>19</sup>.



**Figure 3:** Swimming motility assays. Results are expressed as percentage of swimming inhibition in relation to positive controls (swimming media without CNFs). Error bars correspond to SD values of at least two independent replicates.

Bacterial motility and biofilm formation are closely related, but mutually exclusive. The ‘move-or-stick’ switch of the cell involves the ability of the bacterium to sense and respond to a surface<sup>20</sup>. Here, we studied whether CNF inhibition of bacterial motility and also the different roughness of the films could result in alterations in the bacterial adhesion and consequent biofilm formation (Figure 4). Biofilm formation assays in plates covered with CNF films showed that CNF films did not affect the ability of verotoxigenic *E. coli*, *S. Typhimurium* and *B. cereus* to adhere to the film surface, with similar absorbance ratios being obtained between CNF and control (plate wells without films).



**Figure 4:** Bacterial biofilm formation with CNFs and without CNF (Control). Values are expressed as mean absorbance (at 570 nm) ratios between inoculated samples and negative controls. Error bars correspond to SD values of at least three independent replicates.

These findings show that inhibition of bacterial swimming motility caused by CNFs did not result in reduced biofilm formation, as expected, meaning that, in these bacteria, biofilm formation can be related to other factors beyond bacterial flagellar motility. Furthermore, another possible explanation for these results could be the fact that CNFs were assessed in hydrogel (wet) form in swimming assays and in film (dry) form in biofilm formation assays. This conformational change from individualized nanofibrils in high viscosity hydrogels to agglomerated nanofibrils in film surfaces affects the interaction with bacterial strains differently<sup>5b</sup>.

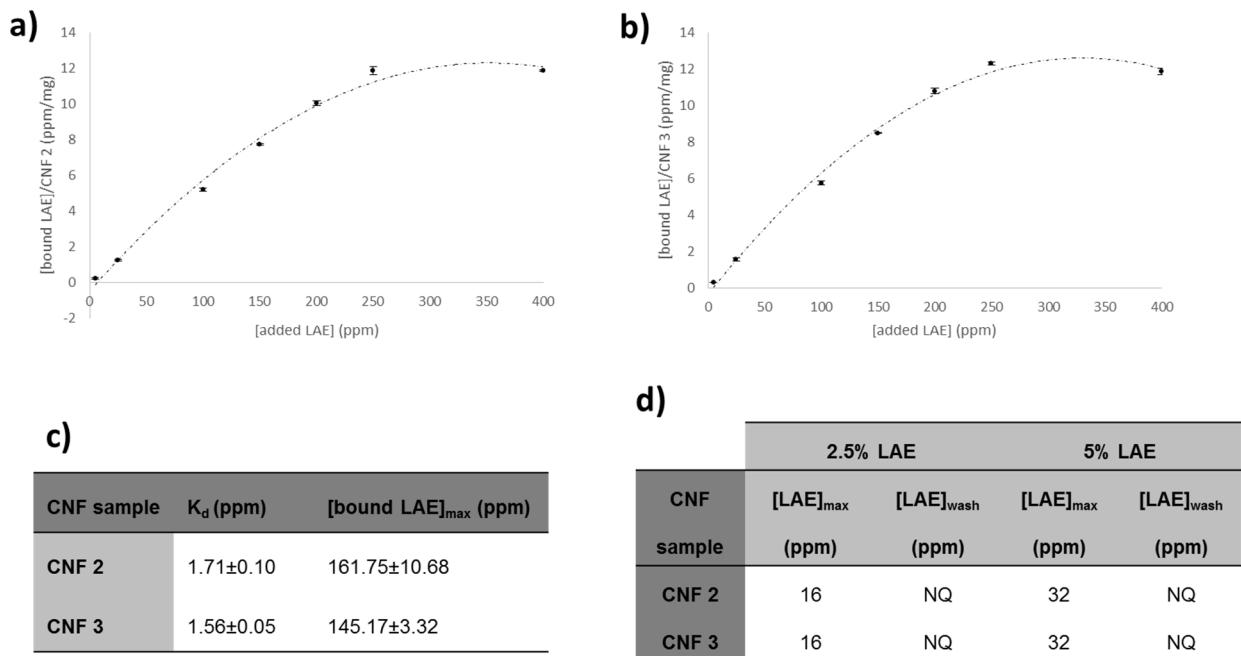
In the case of *L. monocytogenes*, a five-fold reduction in biofilm formation ability by CNF films was observed, despite the low swimming inhibition values obtained previously. This may indicate that CNF films interfere with the deposition and adherence of *L. monocytogenes* cells by mechanisms not related with the alteration of flagellar motility. Furthermore, the inhibition of bacterial adhesion, in this case, is not related with the roughness of the surface, as similar biofilm formation inhibition values were obtained for both CNF samples (CNF\_2 and CNF\_3).

### **Anti-listerial activity of LAE-CNF films**

Taking into account the anti-biofilm ability of the CNFs tested against *L. monocytogenes*, a major foodborne pathogen in ready-to-eat foods, we hypothesized if it could be possible to develop a packaging film that could potentiate CNF antimicrobial action. For this purpose, we aimed at incorporating the antimicrobial LAE (E-243)<sup>8</sup> into the synthetized CNF films.

Previous results from our research group reported an aldehyde content of 71 µmol/g and carboxyl content of 855 µmol/g for a similar CNF grade produced from the same pulp fibres<sup>21</sup>. Hence, given the negative charge of the oxidized CNF and the overall positive charge of LAE, we studied the affinity of LAE to the CNF films. As the degree of oxidation and the amount of carboxyl and aldehyde groups was similar in both CNF tested, binding of LAE to both CNF films was very similar (Figure 5) with maximum LAE binding capacity of 161.75 and 145.17 ppm of LAE for CNF\_2 and CNF\_3, respectively. The dissociation constants of LAE (1.71 and 1.56 ppm for CNF\_2 and CNF\_3, respectively) were similar between the two CNFs. This suggests that it is not the roughness or morphology of the CNF that determine binding to LAE but the surface oxidation imparted by TEMPO. Furthermore, one can conclude that LAE binding to

CNF is quite strong, as no LAE is detected when washing LAE-CNF films (Figure 5d) for 24h with continuous stirring.



**Figure 5:** LAE binding to CNF films: a) saturation curve of LAE binding to CNF 2, b) saturation curve of LAE binding to CNF 3, c) LAE binding parameters determined by the Scatchard linear regression method, d) LAE losses from the CNF films during the washing steps in water. NQ = not quantifiable; LAE concentration values <1.1 ppm.  $[LAE]_{max}$  refers to the maximum LAE theoretical concentration in the 25 mL water volume, if LAE release from the CNF films was 100%,  $[LAE]_{wash}$  refers to the LAE concentration detected in the 25 mL washing medium (water).

Regarding the anti-*Listeria* activity of LAE-CNF films, our results (Table 1) show that, with the exception of CNF films with 0.5% LAE, all CNF films containing LAE (1, 5 and 10%) were able to cause a 100% inhibition of *L. monocytogenes* growth at LAE concentrations as low as 1% LAE.

**Table 1:** Anti-listerial activity of LAE containing films. Results are expressed as mean±SD of at least three independent replicates. ND = not detected; CFU/mL values <100 CFU/mL. Means±SD followed by the same letter are not significantly different using one-way ANOVA.

LAE films antimicrobial activity (log CFU/mL)					
CNF sample	Control	0.5% LAE	1% LAE	5% LAE	10% LAE
<b>CNF 2</b>	13.45±0.08 <sup>a</sup>	11.01±0.31 <sup>b</sup>	ND	ND	ND
<b>CNF 3</b>	13.51±0.09 <sup>a</sup>	9.69±0.61 <sup>c</sup>	ND	ND	ND

These findings corroborate the anti-listerial activity of LAE already described by other authors <sup>22</sup> but our results go beyond antimicrobial susceptibility tests and demonstrate LAE's effectiveness even when bound to CNF and provide a new strategy for the use of CNF films in the development of antimicrobial packaging films for processed meat products.

## Conclusions

The need to develop biodegradable, bio-resourced packaging materials has driven our research in the pursuit of developing new, antibacterial CNF-based films for food packaging. The synthesized TEMPO-oxidized CNFs could be successfully used for the development of cohesive films with different roughness profiles through a simple procedure that depends on the number of processing passes through a homogenizer. Furthermore, both CNFs in the form of hydrogels were able to inhibit bacterial swimming motility and, in the form of films, they inhibited the formation of biofilms by *Listeria monocytogenes*. Through the inherent negative charge of CNFs, we were able to incorporate a food preservative (LAE) into the films. CNF films proved to be able to effectively bind LAE molecules up to a maximum of around 145-160 ppm and that this binding was stable, with no LAE losses even after washing. As a proof-of-concept, these LAE-CNF films demonstrated a potent activity against *L. monocytogenes* at concentrations as low as 1% LAE. To our knowledge, this is the first study describing

and characterizing the incorporation of LAE into TEMPO-oxidized CNF films with demonstrated anti-Listeria activity, which can lead to the rapid development of antimicrobial packaging strategies for ready-to-eat meat products.

### Acknowledgement

The Research Council of Norway is acknowledged for the support to the Norwegian Micro- and Nano-Fabrication Facility, NorFab, project number 245963/F50. Mirjana Filipovic at RISE PFI is acknowledged for skillful assistance in the preparation of the CNF materials. During part of this work, Filomena Silva acknowledged a post-doctoral fellowship [grant number SFRH/BPD/79250/2011] from Fundação para a Ciência e Tecnologia within the scope of QREN ó POPH ó Advanced Formation programs co-funded by Fundo Social Europeu and MEC. This work was partially funded by FEDER funds through Programa Operacional Factores de Competitividade ó COMPETE and by National Funds through FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia within the scope of project PEst-C/SAU/UI0709/2011. The authors also acknowledge the funding provided by the Gobierno de Aragón (Spain) and Fondo Social Europeo to the GUIA group [financiación grupo GUIA T-10].

### References

1. Khan, A.; Huq, T.; Khan, R. A.; Riedl, B.; Lacroix, M., Nanocellulose-Based Composites and Bioactive Agents for Food Packaging. *Crit Rev Food Sci* 2014, 54 (2), 163-174.
2. (a) Liimatainen, H.; Visanko, M.; Sirviö, J. A.; Hormi, O. E. O.; Niinimaki, J., Enhancement of the Nanofibrillation of Wood Cellulose through Sequential Periodateó Chlorite Oxidation. *Biomacromolecules* 2012, 13 (5), 1592-1597; (b) Wagberg, L.;

- Decher, G.; Norgren, M.; Lindstrom, T.; Ankerfors, M.; Axnas, K., The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir* 2008, 24 (3), 784-795; (c) Saito, T.; Nishiyama, Y.; Putaux, J. L.; Vignon, M.; Isogai, A., Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* 2006, 7 (6), 1687-1691.
3. Chinga-Carrasco, G.; Syverud, K., Pretreatment-dependent surface chemistry of wood nanocellulose for pH-sensitive hydrogels. *J Biomater Appl* 2014, 29 (3), 423-432.
4. (a) Chinga-Carrasco, G.; Syverud, K., On the structure and oxygen transmission rate of biodegradable cellulose nanobarriers. *Nanoscale Res Lett* 2012, 7; (b) Fukuzumi, H.; Saito, T.; Wata, T.; Kumamoto, Y.; Isogai, A., Transparent and High Gas Barrier Films of Cellulose Nanofibers Prepared by TEMPO-Mediated Oxidation. *Biomacromolecules* 2009, 10 (1), 162-165.
5. (a) Powell, L. C.; Khan, S.; Chinga-Carrasco, G.; Wright, C. J.; Hill, K. E.; Thomas, D. W., An investigation of Pseudomonas aeruginosa biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. *Carbohydr Polym* 2016, 137, 191-197; (b) Jack, A. A.; Nordli, H. R.; Powell, L. C.; Powell, K. A.; Kishnani, H.; Johnsen, P. O.; Pukstad, B.; Thomas, D. W.; Chinga-Carrasco, G.; Hill, K. E., The interaction of wood nanocellulose dressings and the wound pathogen P. aeruginosa. *Carbohydr Polym* 2017, 157, 1955-1962.
6. de Castro, D. O.; Tabary, N.; Martel, B.; Gandini, A.; Belgacem, N.; Bras, J., Controlled release of carvacrol and curcumin: bio-based food packaging by synergism action of TEMPO-oxidized cellulose nanocrystals and cyclodextrin. *Cellulose* 2018, 25 (2), 1249-1263.
7. Weishaupt, R.; Heuberger, L.; Siqueira, G.; Gutt, B.; Zimmermann, T.; Maniura-Weber, K.; Salentinig, S.; Faccio, G., Enhanced Antimicrobial Activity and Structural

Transitions of a Nanofibrillated Cellulose-Nisin Biocomposite Suspension. *ACS applied materials & interfaces* 2018, 10 (23), 20170-20181.

8. Nerin, C.; Becerril, R.; Manso, S.; Silva, F., Chapter 23 - Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Antimicrobial Activity and Applications in Food Systems A2 - Barros-Velázquez, Jorge. In *Antimicrobial Food Packaging*, Academic Press: San Diego, 2016; pp 305-312.
9. Muriel-Galet, V.; Carballo, G. L.; Hernández-Muñoz, P.; Gavara, R., Chapter 24 - Ethyl Lauroyl Arginate (LAE): Usage and Potential in Antimicrobial Packaging A2 - Barros-Velázquez, Jorge. In *Antimicrobial Food Packaging*, Academic Press: San Diego, 2016; pp 313-318.
10. Inoue, T.; Shingaki, R.; Hirose, S.; Waki, K.; Mori, H.; Fukui, K., Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 2007, 189 (3), 950-957.
11. Di Bonaventura, G.; Piccolomini, R.; Paludi, D.; D'Orio, V.; Vergara, A.; Conter, M.; Ianieri, A., Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* 2008, 104 (6), 1552-1561.
12. Reeser, R. J.; Medller, R. T.; Billington, S. J.; Jost, B. H.; Joens, L. A., Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73 (6), 1908-1913.
13. Chen, C. Y.; Nace, G. W.; Irwin, P. L., A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 2003, 55 (2), 475-9.

14. Pezo, D.; Navascues, B.; Salafranca, J.; Nerin, C., Analytical procedure for the determination of Ethyl Lauroyl Arginate (LAE) to assess the kinetics and specific migration from a new antimicrobial active food packaging. *Analytica Chimica Acta* 2012, 745, 92-98.
15. (a) Weller-Stuart, T.; Toth, I.; De Maayer, P.; Coutinho, T., Swimming and twitching motility are essential for attachment and virulence of *Pantoea ananatis* in onion seedlings. *Mol Plant Pathol* 2017, 18 (5), 734-745; (b) Josenhans, C.; Suerbaum, S., The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002, 291 (8), 605-614.
16. (a) Morales-Soto, N.; Anyan, M. E.; Mattingly, A. E.; Madukoma, C. S.; Harvey, C. W.; Alber, M.; Deziel, E.; Kearns, D. B.; Shrout, J. D., Preparation, imaging, and quantification of bacterial surface motility assays. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2015, (98); (b) Lippolis, J. D.; Brunelle, B. W.; Reinhardt, T. A.; Sacco, R. E.; Nonnecke, B. J.; Dogan, B.; Simpson, K.; Schukken, Y. H., Proteomic analysis reveals protein expression differences in *Escherichia coli* strains associated with persistent versus transient mastitis. *J Proteomics* 2014, 108, 373-381.
17. (a) Allison, S. E.; Silphaduang, U.; Mascarenhas, M.; Konczy, P.; Quan, Q. Y.; Karmali, M.; Coombes, B. K., Novel Repressor of *Escherichia coli* O157:H7 Motility Encoded in the Putative Fimbrial Cluster OI-1. *Journal of Bacteriology* 2012, 194 (19), 5343-5352; (b) O'Neil, H. S.; Marquis, H., *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infection and Immunity* 2006, 74 (12), 6675-6681; (c) Barbosa, F. D.; Neto, O. C. D.; Batista, D. F. A.; de Almeida, A. M.; Rubio, M. D.; Alves, L. B. R.; Vasconcelos, R. D.; Barrow, P. A.; Berchieri, A., Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella Enteritidis* in the chicken. *Braz J Microbiol* 2017, 48 (4), 754-759.

18. Kearns, D. B., A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 2010, 8 (9), 634-644.
19. de la Fuente-Nunez, C.; Korolik, V.; Bains, M.; Nguyen, U.; Breidenstein, E. B. M.; Horsman, S.; Lewenza, S.; Burrows, L.; Hancock, R. E. W., Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012, 56 (5), 2696-2704.
20. (a) Guttenplan, S. B.; Kearns, D. B., Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *Fems Microbiol Rev* 2013, 37 (6), 849-871; (b) Belas, R., When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular Microbiology* 2013, 90 (1), 1-5.
21. Rees, A.; Powell, L. C.; Chinga-Carrasco, G.; Gethin, D. T.; Syverud, K.; Hill, K. E.; Thomas, D. W., 3D Bioprinting of Carboxymethylated-Periodate Oxidized Nanocellulose Constructs for Wound Dressing Applications. *Biomed Res Int* 2015.
22. (a) Ma, Q.; Davidson, P. M.; Zhong, Q., Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *International Journal of Food Microbiology* 2013, 166 (1), 77-84; (b) Becerril, R.; Manso, S.; Nerin, C.; Gómez-Lus, R., Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control* 2013, 32 (2), 404-408.