

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

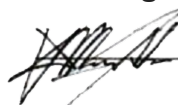
INFORME DE CONCLUSIÓN DEL PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL:
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
AISLADAS DE LA PIEL DE VOLUNTARIOS SANOS

Realizado en el periodo del 9 de Septiembre de 2024 al 9 de Marzo de 2025

Perteneciente al proyecto

ESTUDIO DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA EN *STAPHYLOCOCCUS*
AISLADOS DE PIEL EN SUJETOS CON Y SIN DERMATITIS ATÓPICA

Luz María Melgoza C.
Asesora interna: Dra. Luz María Melgoza Contreras



Asesor externo: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

Alumno: Katya Mejía Muñoz

Matrícula: 2193028323

Lugar de realización:

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Índice

Introducción.....	3
Planteamiento del problema y justificación.....	3
Objetivo General.....	4
Objetivos específicos.....	4
Antecedentes.....	4
Materiales y Métodos.....	6
Resultados.....	8
Conclusión.....	16
Referencias Bibliográficas.....	17

Introducción

La piel está sometida permanentemente a la interacción con todo tipo de componentes ambientales y por ende actúa como la primera barrera defensiva del cuerpo humano: desde su compacta y hermética estructura hasta su capacidad de secretar péptidos antimicrobianos. Entre toda su complejidad también se incluye la presencia de una vasta microbiota que dificulta la colonización de microorganismos patógenos, sea de manera directa, por la secreción de moléculas antimicrobianas; o de forma indirecta por la reducción en la disponibilidad de espacio y nutrientes.

La microbiota de la piel está compuesta por una gran cantidad de géneros bacterianos, principalmente, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. De entre ellos, los miembros del género *Staphylococcus* tienen una especial relevancia por su papel en la infección de heridas, la contaminación de catéteres e incluso la exacerbación de ciertas condiciones autoinmunes, como la dermatitis atópica y la psoriasis. *Staphylococcus aureus* es el estafilococo de mayor importancia clínica, no sólo por su elevada resistencia a una vasta cantidad de moléculas antimicrobianas, sino también por su capacidad de producir una alta variedad de factores de virulencia que le dotan de una capacidad única para resistir y evadir la respuesta inmunitaria mientras perpetúa los ciclos de inflamación.

La finalidad de este proyecto fue identificar y caracterizar presuntos *Staphylococcus aureus* aislados con anterioridad de la piel de voluntarios sanos, con el objetivo de armar un banco de cepas que funcionarán como controles comparativos respecto a otros estafilococos dorados encontrados en sujetos que padezcan alguna afección médica, como dermatitis atópica. Para lo anterior, se reactivaron 8 cepas, almacenadas anteriormente a -70°C , realizando estrías para aislamiento en agar soya-tripticaseína; posteriormente, se les aplicó la prueba de la coagulasa utilizando plasma fresco de conejo con EDTA, las cepas positivas se seleccionaron y se sembraron en caldo soya-tripticaseína para su caracterización bioquímica por medio de las pruebas de catalasa, DNAsa termoestable, reducción de nitratos, urea, fermentación de manitol, hemólisis y resistencia a antimicrobianos; al mismo tiempo, se realizó la extracción de su DNA por columna de sílice; finalmente, se realizó una PCR para la amplificación del gen 16s y nucA, para la identificación molecular. Los resultados obtenidos se plasmaron en una serie de tablas comparativas donde se incluyó a cada una de las bacterias analizadas.

Planteamiento del problema y justificación

Las bacterias del género *Staphylococcus* son comensales comunes de la piel humana, pero algunas cepas, especialmente *Staphylococcus aureus*, pueden volverse patógenas y causar infecciones graves. La identificación de factores de

virulencia, resistencia a antibióticos y capacidad para producir enzimas clave en estas cepas puede proporcionar información crucial para entender su potencial patogénico y las condiciones que podrían convertirlas en agentes infecciosos.

Objetivo General

Identificar y caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la piel de voluntarios sanos, estableciendo un banco control para futuras comparaciones con cepas de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Objetivos específicos

1. Verificar la pureza de las cepas previamente almacenadas a -70°C mediante la evaluación de la morfología colonial, en agar soya-tripticaseína.
2. Aplicar la prueba de la coagulasa a cada cepa reactivada para sustentar como un posible miembro de la especie *aureus*.
3. Realizar la caracterización bioquímica de las cepas, por medio de las pruebas de catalasa, DNAsa termoestable, nitratos, urea, fermentación de manitol y hemólisis.
4. Evaluar la resistencia de las cepas a antimicrobianos, utilizando la técnica de Kirby-Bauer.
5. Extraer y verificar la pureza del ADN genómico de cada cepa coagulasa positiva.
6. Realizar la identificación molecular de la bacteria aplicando una PCR de punto final para amplificar el gen *16 s* y el gen *nucA*.
7. Comprobar la presencia de amplicones con una electroforesis en gel de agarosa.

Antecedentes

La función principal de la piel es actuar como barrera física, química e inmunológica entre el cuerpo y su entorno, por esta razón la piel está asociada a una comunidad diversa de microbios, como bacterias, hongos y virus que viven en su superficie. Esta comunidad microbiana y su entorno se denomina microbioma. El microbioma comensal es clave para mantener la función de barrera de la piel, ya que participa en procesos fisiológicos esenciales de ésta (Lee & Kim, 2022). A partir de ensayos en cultivos se pueden identificar a los microorganismos de la piel y examinarlos mediante secuenciación de ADN (Edslev *et al.*, 2020). La estrategia más común para analizar y describir las diferentes especies de microorganismos que componen la microbiota de la piel es la secuenciación basada en amplicones, este método se ha empleado extensamente para estudiar las comunidades bacterianas, enfocándose en el gen del ARN ribosómico 16s, que es altamente conservado; es importante considerar que se pueden obtener resultados poco coherentes debido a

contaminación ambiental o por reactivos en este tipo de métodos independientes de cultivo (Grogan *et al.*, 2019).

Samaras y Hoptroff (2020) mencionan que en el microbioma de la piel pueden encontrarse miembros de los géneros *Cutibacterium*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. En conjunto, estas bacterias suelen constituir entre el 45% y el 80% del microbioma cutáneo total cuando se consideran sus abundancias relativas promedio.

El género *Staphylococcus* se compone de bacterias Gram-positivas y anaerobias facultativas, que se agrupan regularmente según la producción de coagulasa, enzima que cuenta con la capacidad de transformar el fibrinógeno en fibrina. Los estafilococos coagulasa positiva son en general patógenos, como *S. aureus*, que es el de mayor importancia del género (Thomson *et al.*, 2022).

Staphylococcus aureus tiene la característica de ser β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo, es una bacteria con clasificación coco Gram positivo que se agrupa en racimos (Pasachova Garzón *et al.*, 2019), además, es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, ya que este patógeno puede provocar una gran variedad de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas moderadas hasta casos graves como neumonía y sepsis mortal (Cheung *et al.*, 2021). El tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus* se ve complicado debido a su creciente resistencia a los antibióticos, a diversos factores de patogenicidad y virulencia, y a la expresión de una amplia gama de proteínas presentes en la superficie de la bacteria. Estas proteínas juegan un papel crucial en la colonización e invasión celular en el huésped, así como en la formación de biopelículas. La combinación de estos mecanismos de patogenicidad y virulencia permite que la bacteria persista tanto en el huésped como en el entorno, sobreviviendo a condiciones adversas, al sistema inmunológico y a los antimicrobianos (Caldas & Macas, 2023).

La enzima coagulasa es una prueba para la confirmación de la especie *aureus*, al ser coagulasa positiva, también se puede hacer prueba de catalasa, ya que *S. aureus* produce oxígeno, al interactuar con el peróxido de hidrógeno. Los medios de cultivo también facilitan la identificación de la especie, en el agar manitol salado, que contiene agentes inhibidores para restringir el crecimiento a solo especies de *Staphylococcus*, las colonias típicas de *S. aureus* adquieren un color amarillo como resultado de la fermentación del manitol. El agar DNAsa se emplea para identificar cepas patógenas, dado que la actividad desoxirribonucleasa es un indicador de patogenicidad, en este medio se evalúa la capacidad del patógeno para hidrolizar el ADN, lo que se evidencia por la aparición de halos transparentes en el agar. En medios como el agar Baird Parker, las colonias de *S. aureus* se ven de color negro debido a la reducción del telurito (Pasachova Garzón *et al.*, 2019).

En un estudio en 2019 Hernández Aguilera y colaboradores realizaron pruebas para la identificación de *S. aureus* realizaron pruebas bioquímicas de catalasa, coagulasa, oxidasa, DNasa, Voges-Proskauer y ureasa, además del método cualitativo de difusión en disco de Kirby-Bauer como prueba de susceptibilidad a antimicrobianos. En la identificación de *Staphylococcus Thomson et al. (2022)* incubaron a 37°C por 24 horas en agar salado manitol sus muestras y aquellos que resultaron ser coagulasa positivo los aislaron en agar sangre.

Zhou *et al. (2022)* mencionan que los métodos de PCR se han establecido progresivamente como una de las técnicas más eficientes para la detección de *Staphylococcus spp.*, destacando por ser rápidos, precisos y sencillos y que en la actualidad se han identificado dianas moleculares específicas para detectar especies patógenas comunes de *Staphylococcus spp.* mediante ensayos de PCR. Entre las dianas específicas habituales para *S. aureus* se encuentran *nuc*, *entB*, *mecA*, *femA*, *femB*, *kan*, *sa422* y *tuf*.

Wood *et al.* en 2021, obtuvieron nueve muestras negativas en el cultivo de *S. aureus* confirmándolo mediante la secuenciación del ARNr 16s que contenía ADN bacteriano y utilizaron un fluorómetro Invitrogen Qubit 4 para cuantificar la carga de ADN de cada una de las muestras.

Materiales y Métodos

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de inmunobiología de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México, fue una investigación microbiológica descriptiva muestral en donde se utilizaron 8 cepas de posibles *Staphylococcus aureus* aislados de la piel de voluntarios sanos, aplicando técnicas clásicas de microbiología y biología molecular.

A. Reactivación de cepas

1. Tomar con un asa bacteriológica un poco de la cepa a aislar y sembrar en caja petri con medio agar soya-tripticaseína mediante estrías.
2. Incubar la caja petri con la bacteria.

B. Pruebas bioquímicas

1. Realizar prueba de coagulasa utilizando plasma fresco de conejo con EDTA.
2. Realizar prueba de catalasa utilizando peróxido de hidrógeno.
3. Realizar prueba de DNasa termoestable utilizando agar DNasa.
4. Realizar prueba de reducción de nitratos y de fermentación de manitol utilizando caldo nitrato para la reducción de nitratos y agar manitol salado para la fermentación de manitol.
5. Realizar prueba de urea utilizando medio de urea.
6. Realizar prueba de hemólisis utilizando agar sangre.

C. Resistencia a antimicrobianos

1. Realizar prueba de resistencia a antimicrobianos utilizando la técnica de Kirby-Bauer.

D. Extracción de ADN

1. Colocar en medio líquido soya-tripticaseína una colonia aislada de la cepa e incubar en agitación.
2. Tomar 1.8 mL del medio con la cepa incubada, llevar a centrifugar y retirar el sobrenadante.
3. Lavar la biomasa con PBS estéril y centrifugar.
4. Agregar buffer de lisis y hacer choque térmico.
5. Añadir solución de lisozima.
6. Incubar en baño seco.
7. Añadir binding buffer y proteinasa K.
8. Incubar en baño seco.
9. Agregar isopropanol y homogenizar.
10. Verter en un sistema de columna y centrifugar.
11. Añadir buffer inhibidor a la columna con los ácidos nucleicos y centrifugar.
12. Lavar 3 veces y secar la columna.
13. Añadir buffer de elución y centrifugar.
14. Medir la concentración obtenida en nanodrop.

E. Identificación molecular con PCR punto final

1. Preparar máster mix con primers específicos para el gen.
2. Preparar muestra de ADN con máster mix en tubo para PCR.
3. Llevar muestra al termociclador y comenzar los ciclos.
4. Retirar la muestra del termociclador luego de 35 ciclos.
5. Preparar gel de agarosa 1% con TBE 1X e indicador y dejar solidificar.
6. Colocar el gel en cámara de electroforesis horizontal y cubrir con solución TBE 1X.
7. Colocar en cada pozo del gel la muestra, el control negativo y el control positivo respectivamente.
8. Encender la cámara a 100 mV por 15 minutos.
9. Comprobar la presencia del amplicón con un transiluminador.







Resultados








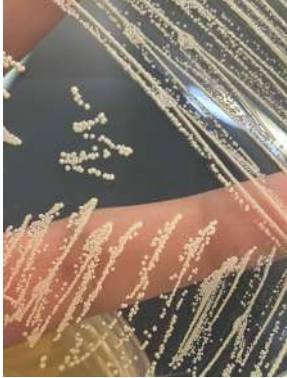
Al hacer una revisión en resultados anteriores, se descartó a una cepa como posible *aureus*, por lo que todas las pruebas se realizaron únicamente a las 7 cepas restantes.

A. Reactivación de cepas

Las cepas se lograron reactivar obteniendo colonias aisladas, la cepa H35b fue la única que presentó contaminación al observar dos colonias con morfología diferente, por lo que se sembró cada colonia nuevamente, a continuación se presentan los resultados en formato de tabla para su mejor visualización.

Tabla 1. Resultados de cultivos en caja petri

Cepa	Foto del cultivo	Foto de las colonias aisladas
H19a		
H19b		
H19c		






H19d		
H35b		
C74a		
C70d-1		

B. Pruebas bioquímicas

- Prueba de coagulasa

Se obtuvo un resultado positivo para todas las cepas, en el caso de la cepa H35b, una de las colonias resultó coagulasa negativa, por lo que se consideró como contaminante, permitiéndonos purificar la cepa dejando sólo a la colonia coagulasa positiva.








Tabla 2. Resultados de prueba de coagulasa

Cepa	Positivo o negativo	Evidencia fotográfica
H19a	Positivo	
H19b	Positivo	
H19c	Positivo	
H19d	Positivo	
H35b	Positivo	
C74a	Positivo	
C70d-1	Positivo	

- Prueba de catalasa

Todas las cepas dieron positivas a la prueba de catalasa, a continuación se muestran las imágenes de los resultados.

Tabla 3. Resultados de prueba de catalasa

Cepa	H19a	H19b	H19c	H19d	H35b	C74a	C70d-1
Imagen							

- Prueba de DNAsa termoestable

Por motivos presupuestarios no se logró realizar esta prueba.

- Prueba de reducción de nitratos

Todas las cepas dieron resultado negativo para esta prueba.

- Prueba de fermentación de manitol

Todas las cepas presentaron fermentación de manitol.








Tabla 4. Resultados de prueba de fermentación de manitol

Cepa	H19a	H19b	H19c	H19d	H35b	C74a	C70d-1
Imagen							

- Prueba de ureasa

Las cepas dieron un resultado negativo para ureasa.


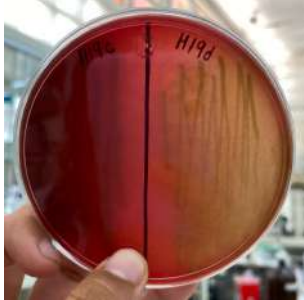

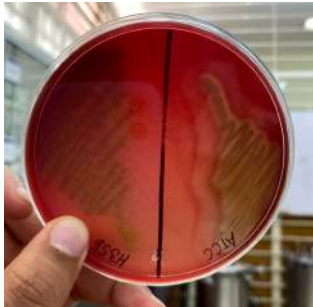
Tabla 5. Resultados de prueba de ureasa

Cepa	H19a	H19b	H19c	H19d	H35b	C74a	C70d-1
Imagen							

- Prueba de hemólisis

Todas las cepas mostraron hemólisis en el agar sangre.

Tabla 6. Resultados de prueba de hemólisis

Cepas	Imagen	Descripción
H19a y H19b		En ambas cepas se presenta un cambio de coloración en medio
H19c y H19d		La cepa H19c (izquierda) no muestra una hemólisis tan intensa como la cepa H19d, en donde podemos ver un cambio de color.
C74a y C70d-1		Para ambas cepas se presenta hemólisis alrededor del cultivo.
H35b y ATCC 6538		La hemólisis en H35b se logra apreciar con el cambio de color del medio, sin embargo ninguna de las cepas presenta una hemólisis tan fuerte alrededor del cultivo como el ATCC utilizado

Para finalizar este apartado se muestra una tabla comparativa de las pruebas bioquímicas (tabla 7).

Tabla 7. Tabla comparativa de resultados en pruebas bioquímicas. Positivo (+) y negativo (-)

	H19a	H19b	H19c	H19d	H35b	C74a	C70d-1
Coagulasa	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Nitratos	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	+	+	+	+	+	+	+

C. Resistencia a antimicrobianos

En la tabla 8 se muestra el diámetro de los halos presentes en los cultivos en centímetros para cada antibiótico y su resultado, apareciendo una R en caso de presentar resistencia o S en caso de ser sensible al antibiótico correspondiente.

Tabla 8. Resultados de la prueba para antimicrobianos (Halos de inhibición en cm)

	H19a	H19b	H19c	H19d	H35b	C74a	C70d-1
Penicilina	2.4	2.5	2.3	2.1	2.2	3.4	3.5
Interpretación	R	R	R	R	R	S	S
Cefoxitina	2.5	2.1	2.5	2.4	2.5	2.5	2.4
Interpretación	S	R	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	2.8	2.9	2.6	2.4	2.7	2.4	2.1
Interpretación	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	2.7	3.0	2.7	2.7	2.7	2.5	2.6
Interpretación	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	2.9	2.5	2.6	2.5	-	3.0	2.7
Interpretación	S	S	S	S	-	S	S
Eritromicina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	2.3
Interpretación	R	R	R	R	R	S	S

D. Extracción de ADN

Se presentan en formato de tabla las concentraciones obtenidas y la pureza del ADN extraído.

Tabla 9. Resultados de extracciones de ADN

CEPA	ng/uL	A260/280	A260/230
H19a	6.7	2.11	2.66
H19b	5.1	2.16	0.27
H19c	3.9	1.79	0.48
H19d	5.4	1.92	0.46
H35b	7.9	1.94	0.52
C74a	30.8	1.34	0.48
C70d-1	9.0	2.02	0.4

E. Identificación molecular con PCR punto final

Resultados de PCR punto final para gen 16s

La ubicación en los pozos fue la siguiente:

1. ATCC 6538 (Control positivo)
2. *E. faecalis* (Control negativo)
3. ATCC 6538 (Control positivo)
4. Control de Mezcla sin ADN (Control negativo)
5. Control ATCC sin primers (Control negativo)
6. H19a
7. H19b
8. H19c
9. H19d
10. H35b
11. C74a
12. Vacío
13. C70d-1
14. Vacío

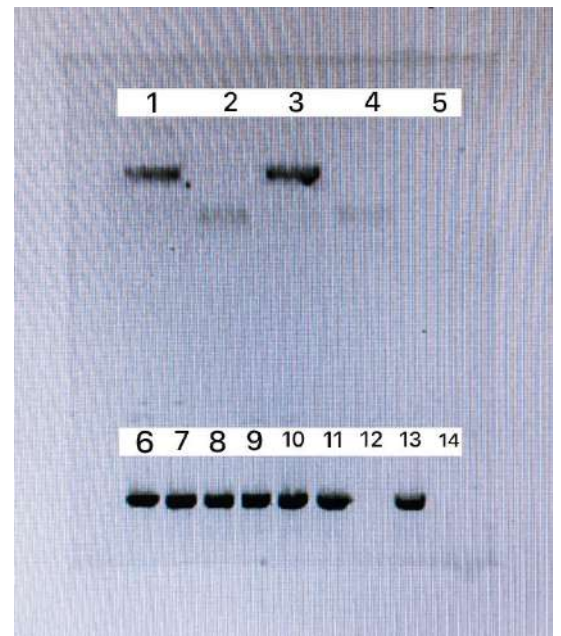


Figura 1. Resultados de PCR para gen 16s

Resultados de PCR punto final para gen nuc

La ubicación en los pozos fue la siguiente:

1. ATCC 6538 (Control positivo)
2. *E. faecalis* (Control negativo)
3. Vacío
4. Control de Mezcla sin ADN (Control negativo)
5. Control ATCC sin primers (Control negativo)
6. ATCC 6538 (Control positivo)
7. H19a
8. H19b
9. H19c
10. H19d
11. H35b
12. C74a
13. C70d-1
14. *E. faecalis* (Control negativo)

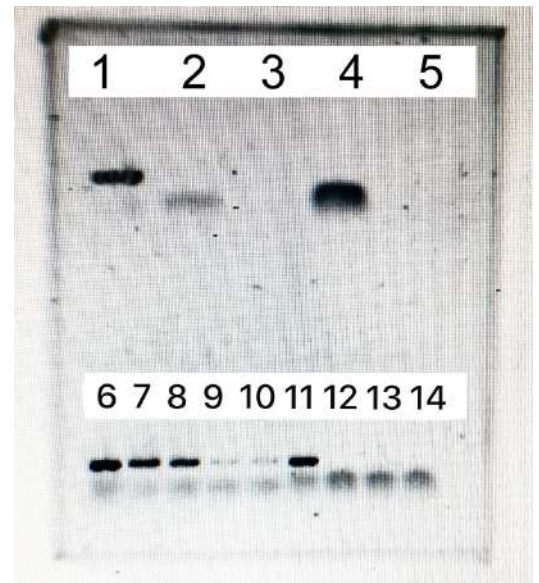


Figura 2. Resultados de PCR para gen nuc

Se presentaron problemas con las muestras de los pozos 9 y 10, así que se repitió la técnica para la cepa H19c y H19d al no tener bandas claras, en la figura 3 tenemos:

1. ATCC 6538 (Control positivo)
2. *E. faecalis* (Control negativo)
3. Control de Mezcla sin ADN (Control negativo)
4. Control ATCC sin primers (Control negativo)
5. H19c
6. H19d

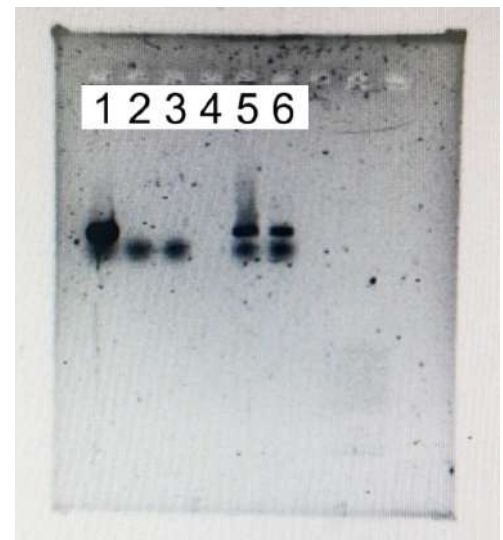


Figura 3. Resultados de PCR para gen nuc en dos cepas

Conclusión

La reactivación de las bacterias permitió comprobar la pureza de las cepas almacenadas y asegurar un banco de muestras confiable. La mayoría de las cepas fueron compatibles con el perfil bioquímico de *S. aureus*, aunque algunas diferencias fenotípicas resaltaron la importancia de la biología molecular para su confirmación. Además, el perfil de susceptibilidad antimicrobiana mostró resistencia a penicilina y eritromicina, alineándose con reportes de otros autores, lo que destaca la necesidad de monitorear la resistencia antimicrobiana para un adecuado manejo terapéutico. La pureza del ADN permitió confirmar la identidad de las cepas mediante PCR, detectando el gen *16s* en todas y el *nuc* en cinco. Con estos resultados, se logró establecer un banco de *S. aureus* de voluntarios sanos para futuras comparaciones con cepas de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Referencias Bibliográficas

- Caldas, G. N. C., & Macas, E. T. P. (2023). *Identificación de Staphylococcus Aureus en el área de hospitalización en el Hospital Aida León de Rodríguez Lara, Girón–Azuay*. Dialnet.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9152332>
- Cheung, GYC, Bae, JS y Otto, M. (2021). Patogenicidad y virulencia de *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12 (1), 547–569.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Edslev, S. M., Agner, T., & Andersen, P. S. (2020). Skin Microbiome in Atopic Dermatitis. *Acta dermato-venereologica*, 100(12), adv00164.
<https://doi.org/10.2340/00015555-3514>
- Grogan, M. D., Bartow-McKenney, C., Flowers, L., Knight, S. A. B., Uberoi, A., & Grice, E. A. (2019). Research Techniques Made Simple: Profiling the Skin Microbiota. *The Journal of investigative dermatology*, 139(4), 747–752.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.024>
- Hernández Aguilera, V., García, M., García, J., Pérez Ybarra, L., & Rodríguez Leo, C. (2019). *Staphylococcus aureus* en escolares portadores asintomáticos del estado Aragua, Venezuela. *Revista Biomédica*.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2020/bio201b.pdf>
- Lee, H., & Kim, M. (2022). Skin Barrier Function and the Microbiome. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(21), 13071.
<https://doi.org/10.3390/ijms232113071>
- Pasachova Garzón, J, Ramírez Martínez, S, & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38. Retrieved August 23, 2024, from

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025&lng=en&tlng=es.

Samaras, S., & Hoptroff, M. (2020). The Microbiome of Healthy Skin. *In Skin Microbiome Handbook: From Basic Research To Product Development*, 1-32. <https://doi.org/10.1002/97811119593058.ch1>

Thomson, P., García, P., Miles, J., Isla, D., Yáñez, C., Santibáñez, R., Núñez, A., Flores-Yáñez, C., Del Río, C., & Cuadra, F. (2022). Isolation and Identification of *Staphylococcus* Species Obtained from Healthy Companion Animals and Humans. *Veterinary sciences*, 9(2), 79. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020079>

Wood, C., Sahl, J., Maltinsky, S., Coyne, B., Russakoff, B., Yagüe, D. P., Bowers, J., & Pearson, T. (2021). SaQuant: a real-time PCR assay for quantitative assessment of *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, 21(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02247-6>

Zhou, B., Ye, Q., Chen, M., Li, F., Xiang, X., Shang, Y., Wang, C., Zhang, J., Xue, L., Wang, J., Wu, S., Pang, R., Ding, Y., & Wu, Q. (2022). Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp. *Food Control*, 131, 108478. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108478>