



Universidad
de Navarra

Estudio de la actividad antimicrobiana de
films compuestos por nanopartículas de
TiO₂ para uso alimentario

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Bioquímica, curso 2020-2021

Alumna: Idoia Aisling Cunningham Barquín

Tutora: Dra. Itziar Vélaz Rivas

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias primero de todo a mi tutora, Itziar Vélaz, por su apoyo y ayuda en todo momento, además de por sus palabras de ánimo que me ha expresado durante estos meses de trabajo. También agradecer a Mikel Domeño y Leire Goñi, del Departamento de Química, por su ayuda y consejos, que han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Quería dar las gracias sobre todo a la doctoranda Melibea Berzosa, junto con el Dr. Carlos Gamazo, del Departamento de Microbiología y Parasitología, por su colaboración y ayuda con los ensayos de microbiología realizados en este proyecto y por proporcionar todo el material necesario para llevarlos a cabo.

También agradecer a Tania Marli, que ha sido mi compañera de ensayos y la que me ha animado en los momentos frustrantes, además de haber compartido conmigo los datos obtenidos en sus experimentos realizados con un polímero distinto a efectos de comparación.

Por último, dar gracias a la Universidad de Navarra, en concreto al Departamento de Química y al Departamento de Microbiología y Parasitología, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación.

RESUMEN

Actualmente, hay un gran interés en la industria alimentaria por dotar los *films* con los que se envasa la comida, de características que mejoren los servicios suministrados por los *films* convencionales. El objetivo es aumentar la estabilidad de los alimentos y reducir su pérdida. Una de las estrategias empleadas es el uso de la nanotecnología en la creación de envases activos, equipando a la matriz polimérica de nanopartículas que tienen actividad antimicrobiana, con el propósito de aumentar la calidad y seguridad del alimento que protegen.

Las nanopartículas de TiO₂ (NP) destacan entre las nanopartículas por su poder fotocatalítico con el que ejerce su actividad antimicrobiana. Este trabajo consiste en la derivatización de estas nanopartículas con β-ciclodextrina (βCD) y la inclusión del conservante alimentario ácido sórbico (SA) en su cavidad, para ser implementadas en una matriz polimérica hidrosoluble. En este caso se ha empleado el alcohol polivinílico (PVA) como matriz polimérica, con el propósito de crear *films* con una superficie activa y estudiar su actividad antimicrobiana en la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* y en la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

Tras este estudio, se concluye que los *films* que contienen nanopartículas de TiO₂ tienen mayor actividad antimicrobiana que aquellos que no las contienen. Por el análisis estadístico se concluye que la presencia de ácido sórbico no parece suponer una mejora significativa. No obstante, en los ensayos en disolución se observa que el ácido sórbico libre tiene un gran poder antimicrobiano, probablemente, en el caso de los *films* el conservante queda atrapado en la matriz polimérica y por eso su acción antimicrobiana queda mermada.

Palabras clave: nanopartículas de TiO₂, β-ciclodextrina, ácido sórbico, *films*, alcohol polivinílico, actividad antimicrobiana, *E. coli* y *S. aureus*.

ABSTRACT

Nowadays, the food processing industry has a great interest in supplying food-packaging films with properties that provide better services than those provided by conventional films. The aim is to increase food stability and to reduce its waste. One of the main strategies applied is the use of nanotechnology in the creation of active packages, equipping the polymer matrix of nanoparticles that possess antimicrobial activity, with the purpose of increasing the quality and safety of the food they protect.

Of all the nanoparticles, the nanoparticles of TiO₂ (NP) stand out due to their photocatalytic activity with which they exert their antimicrobial activity. This research project entails the derivatization of these nanoparticles with β-cyclodextrin (βCD) and the inclusion of food preservative, sorbic acid (SA), in its cavity, for its implementation in a hydrosoluble polymer matrix. In this case, polyvinyl alcohol (PVA) has been utilized as the polymer matrix, with the goal of creating films with an active surface and to study their antimicrobial activity in the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and in the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*.

Followed this project, it is concluded that the films containing nanoparticles of TiO₂ have a greater antimicrobial activity than those without nanoparticles. With the statistical analysis it is concluded that the presence of sorbic acid does not seem to significantly increase the antimicrobial activity. However, in the experiments in solution it was observed that the free sorbic acid has a prominent antimicrobial activity, probably, in the case of the films the preservative is trapped in the polymer matrix, depleting its antimicrobial activity.

Key words: nanoparticles of TiO₂, β-cyclodextrin, sorbic acid, films, polyvinyl alcohol, antimicrobial activity, *E. coli* and *S. aureus*.

ABREVIATURAS

Alcohol polivinílico: PVA

Especies reactivas de oxígeno: ROS

NP: Nanopartículas de TiO₂

βCD: β-ciclodextrina

SA: Ácido sórbico

NP-βCD: nanopartículas de TiO₂ derivatizadas con β-ciclodextrina

Unidades formadoras de colonias: UFC

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE DETERIORAN LOS ALIMENTOS	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.2. NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	3
1.3. BETA-CICLODEXTRINA Y SUS PROPIEDADES	5
1.4. ÁCIDO SÓRBICO COMO CONSERVANTE	7
1.5. <i>FILMS</i> DE ALCOHOL POLIVINÍLICO	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ MODIFICADAS CON BETA-CICLODEXTRINA	10
3.1.1. 1ª Modificación: Hexametildiisocianato.....	10
3.1.2. 2ª Modificación: β-ciclodextrinas.....	11
3.2. INCLUSIÓN DEL ÁCIDO SÓRBICO EN LAS BETA-CDS DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS.....	11
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ÁCIDO SÓRBICO	12
3.4. PREPARACIÓN DE <i>FILMS</i>	13
3.5. CARACTERIZACIÓN DE <i>FILMS</i>	13
3.6. PREPARACIÓN DE PLACAS McCONKEY Y PLACAS TSB	14
3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS <i>FILMS</i> EN <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	14
3.8. DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA EN DISOLUCIÓN.....	16
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1.	NANOPARTÍCULAS DE TiO ₂ MODIFICADAS CON BETA-CICLODEXTRINA	18
4.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ÁCIDO SÓRBICO	18
4.2.1.	Caracterización de las nanopartículas derivatizadas con β-ciclodextrina	18
4.2.2.	Caracterización de las nanopartículas derivatizadas cargadas con ácido sórbico ..	20
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE <i>FILMS</i>	22
4.4.	EFICACIA BACTERICIDA DE LOS <i>FILMS</i> EN <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i>	23
4.4.1.	Efecto bactericida en <i>E. coli</i>	24
4.4.2.	Efecto bactericida en <i>S. aureus</i>	26
4.5.	EFICACIA BACTERICIDA EN DISOLUCIÓN	27
4.5.1.	Efecto bactericida en <i>E. coli</i>	28
4.5.2.	Efecto bactericida en <i>S. aureus</i>	28
5.	CONCLUSIONES	30
6.	PERSPECTIVAS DE FUTURO	31
7.	BIBLIOGRAFÍA	32
8.	ANEXOS	35
8.1.	CÁLCULOS DE LA CONCENTRACIÓN DE NP, BETA-CD Y SA AL 1 Y 5%	35
8.1.1.	Cálculo de la concentración de SA al 1 y 5%.....	35
8.1.2.	Cálculo de la concentración de βCD al 1 y 5%	36
8.1.3.	Cálculo de la concentración de NP al 1 y 5%.....	36
8.2.	ESPECTROS FTIR DE LOS <i>FILMS</i>	37
8.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
8.3.1	Eficacia bactericida de los <i>films</i> en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	40
8.3.2	Eficacia bactericida de las soluciones en <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	44

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE DETERIORAN LOS ALIMENTOS

El deterioro de los alimentos por microorganismos es una gran preocupación en la industria alimentaria debido a la pérdida de comida que supone. Asimismo, otro problema causado por los microorganismos son las infecciones patógenas que pueden ocasionar tras su ingesta [1]. Según la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (FDA), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) son dos de los principales patógenos transmitidos por los alimentos [2].

1.1.1. *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa con forma de bacilo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Generalmente, esta bacteria es inofensiva en humanos, de hecho, forma parte de la flora gastrointestinal, sin embargo, hay cepas virulentas que pueden producir diferentes cuadros clínicos [3]. En la **Figura 1** se puede observar la típica estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas.

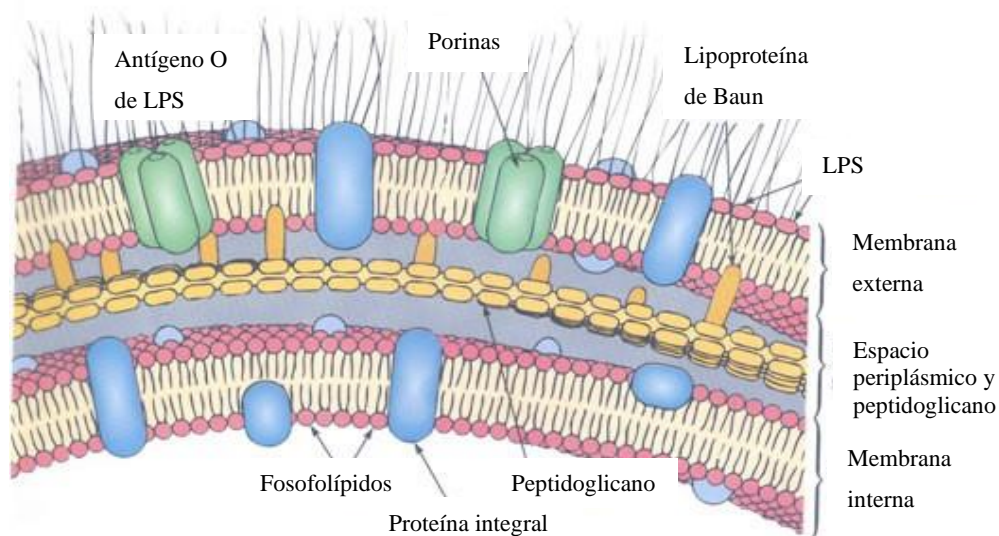


Figura 1. Esquema de la estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas [4].

La pared celular de las bacterias Gram negativas es mucho más compleja que la pared celular de las bacterias Gram positivas, debido a que contiene dos membranas lipídicas que contienen entre ellas el espacio periplásmico junto con la capa de peptidoglicano que es mucho

más fina que en bacterias Gram positivas. La membrana externa está unida a la capa de peptidoglicano mediante la lipoproteína de *Braun*, siendo la proteína más abundante en la membrana externa.

Además de esta lipoproteína, se pueden encontrar también lipopolisacáridos, que son elementos complejos y largos, formados por lípidos y carbohidratos. Presentan tres partes, el **Lípido A**, que contiene dos azúcares derivados de la glucosamina que tienen integrados tres ácidos grasos junto con fosfato o pirofosfato. La segunda parte es un **Núcleo de Polisacárido**, formado por diez azúcares, y, por último, se encuentra el **Antígeno O**, que es una cadena de polisacáridos. Las dos primeras partes son comunes en la misma bacteria, pero el Antígeno O varía según la cepa, e induce una respuesta inmune en el huésped que haya infectado. Adicionalmente, el Lípido A puede actuar como una toxina, conocida como endotoxina, que causa alguno de los síntomas que surgen de las infecciones por bacterias Gram negativas [4].

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que pertenece a la familia *Staphylococcaceae* con forma de coco que puede aparecer en parejas, cadenas o en racimos. Al igual que *E. coli*, esta bacteria no suele causar infecciones y forma parte de la microbiota de la piel y del tracto respiratorio, entre otras. Las cepas que producen virulencia son aquellas que desarrollan una cápsula mucoide externa, lo cual aumenta su capacidad para producir infecciones [5,6]. La **Figura 2** ilustra la típica pared celular de las bacterias Gram positivas.

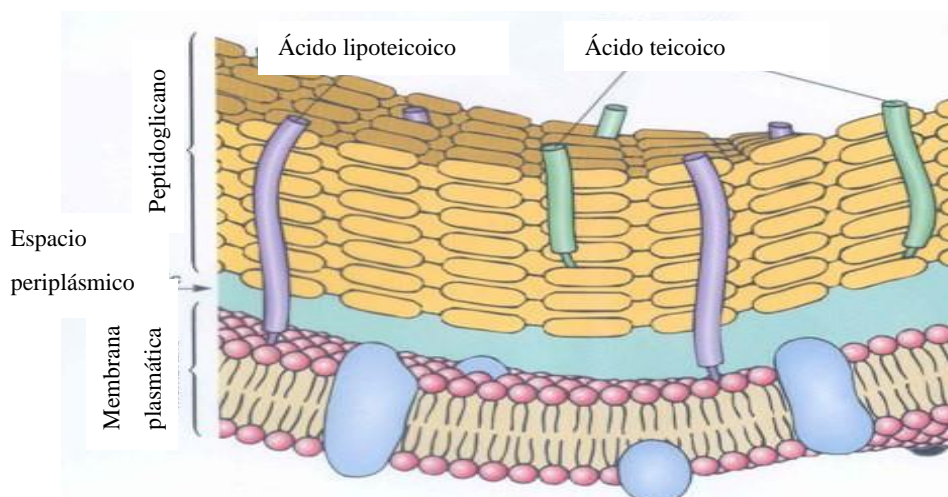


Figura 2. Esquema de la estructura de la pared celular de bacterias Gram positivas [4].

Como se puede apreciar en la **Figura 2**, la capa de peptidoglicano es más gruesa en bacterias Gram positivas, en comparación con la de las bacterias Gram negativas. Además de la capa de peptidoglicano, se pueden observar otros polímeros que forman parte de la estructura como, por ejemplo, el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico. Estos polímeros están formados por subunidades de glicerol o ribitol que se encuentran unidos mediante grupos fosfato, que cuando están covalentemente unidos a la capa de peptidoglicano son los ácidos teicoicos, y cuando se encuentran covalentemente unidos a la membrana plasmática son los ácidos lipoteicoicos. Ambos ácidos están cargados negativamente, proporcionando a la pared celular esa carga negativa.

A pesar de conocer la estructura de estos ácidos, sus funciones no son claras, pero se cree que ayudan a estabilizar y proteger la pared celular del entorno. Asimismo, cada vez hay más evidencias sobre que estos ácidos están involucrados en la unión al huésped cuando se trata de especies patógenas [4].

1.2. NANOPARTÍCULAS DE TiO_2 Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la industria alimentaria hay un gran interés en emplear la nanotecnología para preparar un tipo de envase denominado “empaquetamiento activo”, que confieran estabilidad a los alimentos y reduzcan la posibilidad de que crezcan especies patógenas en su superficie. Estos envases pueden llevar en su interior nanopartículas (NP) con actividad antimicrobiana y, a su vez, liberar compuestos bioactivos (por ejemplo, un conservante) que suponga una acción sinérgica a la de las nanopartículas. Si el conservante se vehiculiza en el envase, se evita tener que añadirlo directamente al alimento. No obstante, el uso de las nanopartículas en el embalaje de la comida no se lleva a cabo en gran escala [7,8]. Los envases activos se pueden emplear en una amplia variedad de alimentos, pero se deben tener en cuenta sus propiedades, y las condiciones de transporte y almacenaje de este [9].

Entre las nanopartículas que pueden formar parte de los envases activos, destacan las nanopartículas de TiO_2 , ya que poseen actividad fotocatalítica con el que rompen las moléculas de agua mediante irradiación por luz, generando radicales libres de oxígeno (ROS) que dañan la membrana celular de las bacterias. Estas nanopartículas se pueden encontrar en tres estructuras cristalinas diferentes: rutilo, anatasa y brookita, las dos primeras son las que causan las reacciones fotocatalíticas, teniendo más poder fotocatalítico la anatasa. Ambas tienen una estructura tetragonal, mientras que la brookita tiene estructura ortorrómbica. La banda de

valencia de TiO₂ se compone por la hibridación de los orbitales 2p del oxígeno con los orbitales 3p del titanio, mientras que los orbitales 3d del titanio corresponden a la banda de conducción. [10, 11]. Para que tenga lugar la absorción de fotones, y la posterior excitación de electrones, la radiación debe ser menor de 385 nm. Las nanopartículas absorben alrededor de un 5% de irradiación. Para que ocurra la acción fotocatalítica es importante que los fotones tengan una energía igual o superior a 3.2 eV, correspondiente al band *gap* o banda prohibida en el caso de la anatasa. La absorción de fotones conlleva a la excitación de electrones de la banda de valencia hacia la banda de conducción, dejando huecos en la banda de valencia. La **Figura 3** representa la reacción que tiene lugar cuando se da la excitación de electrones [12].

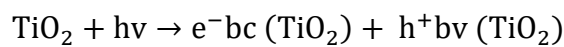


Figura 3. Reacción de la excitación de electrones desde la banda de valencia (bv) hacia la banda de conducción (bc) [12].

Este fenómeno genera la liberación de energía o la migración hacia la superficie catalítica que origina reacciones de reducción-oxidación (REDOX). El H₂O se oxida y el O₂ se reduce, generando ROS, como se observa en la **Figura 4**.

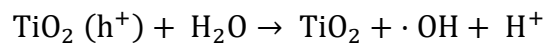
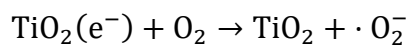


Figura 4. Reacciones REDOX que dan lugar a ROS tras la absorción de fotones y excitación de electrones [12].

Debido a la producción de ROS, en concreto los ·OH, se destruyen las paredes celulares mediante la oxidación de los fosfolípidos no saturados que forman parte de la membrana celular de las bacterias. Además del daño en la membrana celular, el DNA de la bacteria también se ve dañado. A diferencia de los aniones superóxidos, el peróxido de hidrógeno también penetra la pared celular, no obstante, ambas moléculas participan en la producción de radicales hidroxilo, que son cruciales para la destrucción bacteriana [12, 13]. La **Figura 5** representa la generación de ROS tras la iluminación solar o Ultravioleta.

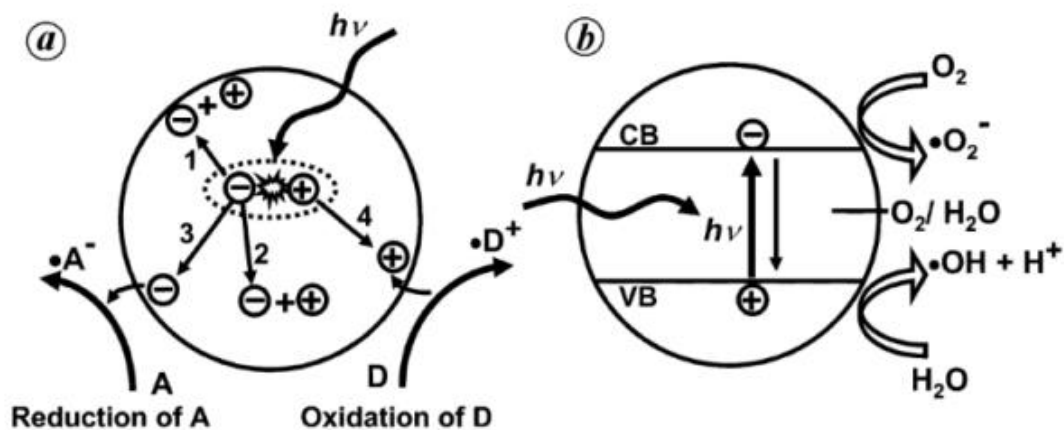


Figura 5. Formación de ROS tras la irradiación solar o Ultravioleta [12].

Como se ha mencionado anteriormente, la disrupción de la membrana celular es debido a la oxidación de fosfolípidos no saturados, lo que conlleva a un aumento de la permeabilidad. Esta disrupción de la membrana celular por los ROS provoca la pérdida de cationes de potasio y la β -galactosidasa, elementos cruciales para las bacterias. Estudios han demostrado que la reacción fotocatalítica de las nanopartículas de TiO_2 tiene la capacidad provocar la muerte de especies como *E. coli*, *S. aureus* y *P. putida* [13, 14].

El bajo coste y la prácticamente nula toxicidad del dióxido de Titanio hacen que se emplee en productos alimentarios y en productos cosméticos, como los protectores solares o la pasta de dientes. [15].

Por otro lado, se pueden potenciar las propiedades del TiO_2 mediante su derivatización con ciclodextrinas, macromoléculas que contienen una cavidad en la que se pueden incluir compuestos muy diferentes [16].

1.3. BETA-CICLODEXTRINA Y SUS PROPIEDADES

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en anillos de glucopiranososa unidos mediante enlaces α -(1 \rightarrow 4). Las ciclodextrinas naturales pueden tener 6, 7 u 8 unidades de glucopiranososa, que corresponden a la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina respectivamente, como se aprecia en la **Figura 6** [17].

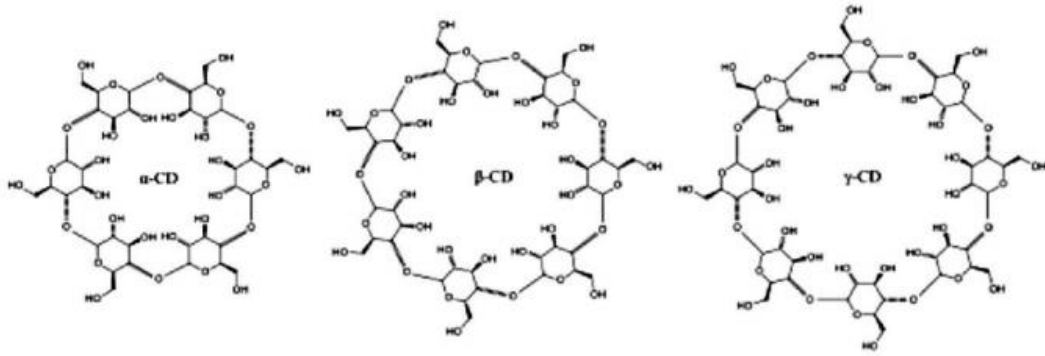


Figura 6. Estructura de la α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina [18].

Estos oligosacáridos tienen una estructura de cono truncado con propiedad anfipática, siendo su cavidad interna relativamente hidrófoba, mientras que su exterior es hidrofílico, poseyendo una solubilidad alta en disolventes polares. Debido al carácter hidrófobo de la cavidad, en su interior se introducirán con más facilidad moléculas apolares, que se pueden encontrar en estado gaseoso, líquido o sólido, formando así complejos de inclusión. En función del tamaño de la cavidad, se pueden incluir especies huésped de distinto volumen y naturaleza, creando así una gran variedad de complejos anfitrión-huésped [19].

Las ciclodextrinas se incorporan a la superficie de las nanopartículas de TiO_2 mediante un espaciador (**Figura 7**). La derivatización con ciclodextrina no afecta a la actividad fotocatalítica de las nanopartículas, además, presentan una gran ventaja, el impedimento de la agregación de nanopartículas. El espaciador permite que la especie huésped permanezca intacta dentro de la ciclodextrina. Si se incluye un conservante en la cavidad, es posible que la actividad bactericida del TiO_2 se vea potenciada [20].

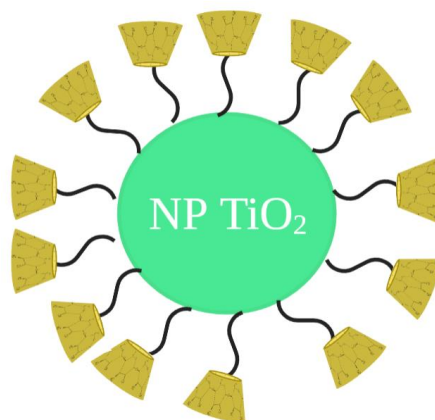


Figura 7. Esquema de la nanopartícula de TiO_2 derivatizada con β -ciclodextrina. Creado con BioRender.com.

1.4. ÁCIDO SÓRBICO COMO CONSERVANTE

Entre los conservantes que pueden formar el complejo anfitrión-huésped con la ciclodextrina, destaca el ácido sórbico debido a su acción antimicrobiana y por su reducido tamaño, capaz de incluirse dentro de la β -ciclodextrina.

El ácido sórbico es un ácido insaturado de cadena lineal, y junto con su sal de potasio, sorbato potásico, son dos de los conservantes más empleados y seguros en la preservación de los alimentos debido a su baja toxicidad, versatilidad y acción antimicrobiana en mohos y algunas levaduras, pero también en la bacteria *S. aureus* [21-23]. Se utiliza extensamente en la conservación de bebidas y alimentos al tratarse de una molécula incolora e insípida, sin embargo, si se superan las concentraciones de seguridad establecidas, pueden ser perjudiciales para la salud [21, 24].

Este conservante presenta una solubilidad baja en agua (0,16% a 20 °C) que aumenta levemente al aumentar la temperatura (4,00% a 100 °C). No obstante, es realmente soluble en alcohol. A diferencia del ácido sórbico, el sorbato de potasio es bastante soluble en agua y su solubilidad desciende con el aumento de alcohol [22]. En la **Figura 8** se observa la estructura del ácido sórbico.

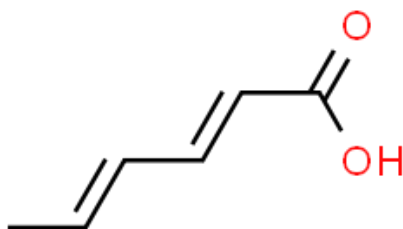


Figura 8. Estructura química del ácido sórbico [25].

1.5. FILMS DE ALCOHOL POLIVINÍLICO

En la actualidad, la mayoría de los *films* empleados en la industria agroalimentaria están formados por polímeros, siendo los más utilizados el polietileno, el polipropileno y el polietilentereftalato debido a su bajo precio, fácil obtención y estabilidad química [26]. Pese a su simple producción, la degradación de estos polímeros no es sencilla, lo que contribuye a la contaminación mundial [27]. Por esta razón, se intenta sustituir estos polímeros por otros cuyo

residuo sea más sencillo de gestionar, por ejemplo, el alcohol polivinílico (PVA), soluble en agua.

El PVA es un material transparente que proviene del acetato de polivinilo que se puede someter a una hidroxilación parcial o completa, según las propiedades físicas, químicas y mecánicas que se deseen. La solubilidad en agua y su cristalinidad disminuyen cuanto menor sea el número de los residuos de acetato. Cuando el PVA es más soluble en agua, su dureza y elasticidad se reduce, pero su flexibilidad aumenta. La gran solubilidad en agua que tiene el PVA es debido a los grupos funcionales hidroxilo que proporcionan esa hidrofiliidad. Según su finalidad, si se quiere reducir la solubilidad acuosa, se deben formar enlaces cruzados o copolimerizar con otros polímeros, como por ejemplo con el etilen-vinil-alcohol. Entonces se modifican también las propiedades mecánicas, confiriendo al *film* una mayor resistencia, pero la tasa de degradación aumenta.

Los *films* constituidos por este material actúan como una barrera física que no permite el paso de gases como el oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. Son biodegradables, biocompatibles y no son tóxicos, y por ello son candidatos a sustituir los *films* convencionales en la industria alimentaria [28].

Teniendo en cuenta estos argumentos, en este trabajo se plantea preparar envases inteligentes para el embalaje de alimentos, desarrollados a partir de PVA, un polímero soluble en agua, que tenga integradas en su matriz nanopartículas [13]. Entre las nanopartículas que se pueden incluir, destacan las de TiO_2 al tener una alta actividad fotocatalítica y antimicrobiana, y porque son económicamente rentables y poseen una baja toxicidad. Por estas propiedades, se espera que su incorporación en *films* asegure una mejor calidad y seguridad del alimento que envuelve. Además, si se une a las nanopartículas β -ciclodextrina con el conservante ácido sórbico, se espera incluso una mayor protección del alimento frente a microorganismos como *E. coli* y *S. aureus*.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en estudiar la actividad antimicrobiana de *films* de PVA con nanopartículas de TiO₂ derivatizadas con β-ciclodextrina y ácido sórbico sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Este objetivo se ha concretado en los siguientes objetivos:

- Obtención y caracterización de nanopartículas de TiO₂ derivatizadas con β-ciclodextrina.
- Inclusión del conservante ácido sórbico en la β-ciclodextrina unida a las nanopartículas y caracterización del sistema.
- Preparación y caracterización de *films* de PVA que contengan nanopartículas de TiO₂ modificadas en distintas proporciones en presencia y ausencia de conservante.
- Determinación del efecto bactericida de los sistemas preparados en las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en medio *McConkey* y medio general *tryptic soy broth* (TSB) respectivamente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ MODIFICADAS CON BETA-CICLODEXTRINA

Material:

Nanopartículas de TiO₂ (Sigma Aldrich, 21 nm, ≥99,5%), β-ciclodextrina (Sigma Aldrich, ≥99,5%), N-N-dimetilformamida seca (PanReac, 0,005% agua), hexametildiisocianato (Sigma Aldrich, 98%), acetona seca (PanReac, 0,01%) y metanol (PanReac ≥99,9%).

Método:

3.1.1. 1ª Modificación: Hexametildiisocianato

El método empleado es el descrito previamente por *Cyclodextrin-Grafted TiO₂ Nanoparticles: Synthesis, Complexation Capacity, and Dispersion in Polymeric Matrices* [29]. Se disuelven 2 g de nanopartículas de TiO₂, previamente secados en una estufa a 60 °C durante 24 horas, en 150 mL de dimetilformamida en un erlenmeyer de 200 mL. Después, se calienta la mezcla a 75 °C en una placa calefactora durante 20 minutos para eliminar la humedad presente. Una vez transcurrido este tiempo, se dispone un imán en el fondo del erlenmeyer y éste se tapa con un septum asociado a dos agujas. A través de una aguja se inyecta 4,5 mL de hexametildiisocianato mediante una jeringa, este compuesto actúa como espaciador; es importante realizar este paso rápidamente dado que este reactivo se echa a perder con facilidad por la humedad. Se asocia una de las agujas a la línea del nitrógeno que sale del manómetro, y se circula gas durante 15 minutos para asegurar una atmósfera inerte dentro del erlenmeyer.

Tras este paso, se tapa con parafilm una de las dos agujas, de forma que el gas pueda salir por la otra aguja en caso de sobrepresión en el interior del erlenmeyer. Se deja la solución con agitación constante en una campana extractora durante 3 días a 100 °C. Transcurridos los tres días, se centrifuga la mezcla a 8000 rpm a 4 °C durante media hora. El sobrenadante se desecha y el precipitado se mezcla en un vaso de precipitados con 150 mL de acetona seca. Se deja agitando la mezcla durante 30 minutos y se centrifuga en las condiciones anteriores. Este lavado debe realizarse dos veces más en las mismas condiciones y del mismo modo. Finalmente, se seca el precipitado en una estufa a 50 °C durante 24 horas.

3.1.2. 2ª Modificación: β -ciclodextrinas

Tras la primera modificación, se disuelven 9 g de β -ciclodextrina, previamente secados a 65 °C durante 24 horas en una estufa, en 150 mL de dimetilformamida. A continuación, se seca esta mezcla en una placa calefactora a 75 °C durante 20 minutos. Se vierte en el erlenmeyer TiO_2 -diisocianato, el producto de la primera modificación, se añade un imán y se tapa el erlenmeyer con un septum. Al igual que en la anterior modificación, se asocian dos agujas al septum y se hace circular nitrógeno por una de ellas durante 15 minutos, mientras que el gas sale por la otra aguja. Una vez conseguida la atmósfera inerte, se retira una de las agujas y se tapa con parafilm la que queda. Se deja reaccionar la mezcla durante 2 días a 80 °C con agitación magnética constante. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifuga a 8000 rpm y 4 °C la mezcla y se desecha el sobrenadante. El precipitado se lava con 200 mL de metanol en un vaso de precipitados durante media hora en agitación constante. Tras la media hora, se centrifuga en las mismas condiciones y se lava el precipitado del mismo modo dos veces más. Por último, se seca el precipitado a 50 °C durante 24 horas [29]. En la **Figura 9** queda resumido la síntesis de nanopartículas modificadas con β -ciclodextrinas.

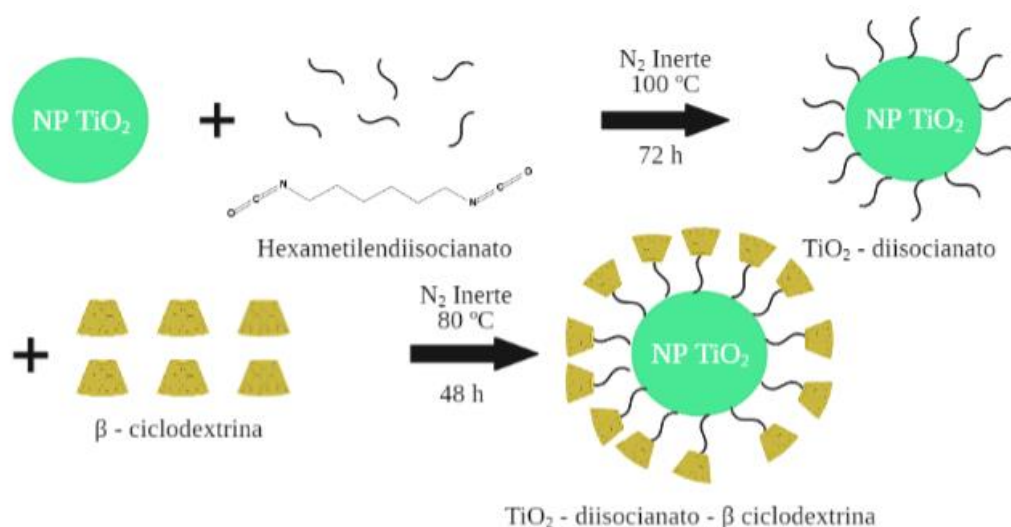


Figura 9. Esquema de la síntesis de nanopartículas TiO_2 derivatizadas con β -ciclodextrina. Creado con BioRender.com.

3.2. INCLUSIÓN DEL ÁCIDO SÓRBICO EN LAS BETA-CDS DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS

Se emplean las nanopartículas modificadas con β -ciclodextrina, ácido sórbico (Sigma Aldrich, 99%) y agua desionizada.

Método:

Se prepara una disolución de $5 \cdot 10^{-3}$ M de ácido sórbico en 100 mL, para ello se pesan 56,6 mg de ácido sórbico que se añaden en 100 mL de agua desionizada en un recipiente opaco ya que el ácido sórbico es bastante sensible a la luz, la cual provoca su degradación.

Una vez preparada la solución de ácido sórbico, se añaden a otro recipiente opaco 40 mL de esta disolución, junto con 0,75 g de las nanopartículas modificadas con β -ciclodextrina. Esta mezcla se deja agitando constantemente. La absorbancia se mide mediante un espectrofotómetro *Hewlett Packard (Agilent)* modelo 8453 a una longitud de onda de 258 nm. Se utilizan cubetas de cuarzo con tapón de 3 mL de capacidad y con un paso óptico de 1 cm. Se realiza un blanco con agua destilada y se mide la absorbancia de la disolución de ácido sórbico antes y después de añadir las nanopartículas al cabo de 1, 3, 5 y 7 horas. Para medir la absorbancia se pipetearon 20 μ L de muestra que se filtran con un filtro de 0,45 μ m de poro y se añadieron 2950 μ L de agua desionizada.

Una vez transcurridas las 7 horas, la disolución se filtra a vacío en un Kitasato mediante un embudo *Büchner*. El precipitado obtenido se seca en una estufa durante 12 horas a 50 °C para eliminar la humedad presente.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ÁCIDO SÓRBICO

Espectroscopía IR (FTIR): Se realizan espectros infrarrojos por transformada de *Fourier* (FTIR) por un lado de las nanopartículas de TiO₂, β -ciclodextrina y nanopartículas derivatizadas con β -ciclodextrina, y por otro lado de ácido sórbico, nanopartículas modificadas con β -ciclodextrina y de nanopartículas modificadas con ácido sórbico incluido. Para esta caracterización, se emplea en equipo *Shimadzu, IRSAffinity* con *ATR Golden-Gate* y controlador de temperatura (hasta 200 °C) con el software *OMNIC E.S.P.* El equipo trabaja en el IR medio (4000-600 cm⁻¹) y los espectros se recogen con una resolución de 4 cm⁻¹.

Análisis térmico: Se caracterizan los mismos compuestos que en la espectroscopía FTIR por el método termogravimétrico (TG) mediante un analizador simultáneo *TGA-sDTA 851 Mettler Toledo* con un muestreador *Mettler Toledo 801 RO*, y un controlador de gases *Mettler Toledo TSO 800 GCI*. El equipo se encuentra conectado a un baño termostático *JULABO FP50*. Se muelen los compuestos mediante un mortero de ágata y se programa una

rampa de calentamiento de 10 °C/min desde 25 °C hasta 1000 °C usando crisoles de alúmina (Al₂O₃).

3.4. PREPARACIÓN DE FILMS

Material:

Alcohol polivinílico (Sigma Aldrich, Pm=31000), nanopartículas de TiO₂ (Sigma Aldrich, 21 nm, ≥99,5%), nanopartículas modificadas con β-ciclodextrina con y sin ácido sórbico, ácido sórbico (Sigma Aldrich, 99%), etanol (PanReac) y agua destilada.

Método:

Se prepara una disolución de PVA del 10% p/V, para ello se pesan 10 g de PVA que se añaden a un matraz de fondo redondo que contiene 100 mL de agua destilada. La disolución se deja en ebullición hasta que el PVA se haya disuelto homogéneamente. Una vez disuelto el PVA, se añaden las nanopartículas de TiO₂ al 1 y 5% en tubos de Falcon, junto con 10 mL de la disolución de PVA 10% p/V. Se disponen dichos tubos de Falcon en un baño de ultrasonidos a 40 °C y en vórtex hasta su dispersión homogénea. Una vez suspendidas homogéneamente las nanopartículas, con una jeringuilla de 3 mL sin aguja, se echan 0,2 mL de cada disolución en unos aros de teflón de 1 cm de diámetro obtenidos por impresión 3D en el Departamento de Física y Matemáticas de la Universidad de Navarra. La solución dentro de los aros se deja en estufa durante 4 horas a 60 °C para que estén curados. A continuación, se precisa de una prensa hidráulica con placas calefactoras integradas (*Specac, Mini-Film Maker*) en el que se presanan los *films* a 150 °C y 0,4 toneladas durante 2 minutos para conseguir una superficie uniforme.

Una parte de los *films* obtenidos, con y sin nanopartículas derivatizadas, se sumergen en una solución de ácido sórbico de 5·10⁻³ M durante 5 segundos. Esta solución de ácido sórbico se prepara del mismo modo que en el **Apartado 3.2.**, pero el ácido sórbico se encuentra disuelto en etanol en vez de agua debido a que los *films* se disolverían en agua.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE FILMS

Los *films* se caracterizan por espectroscopía IR (FTIR) del mismo modo que la caracterización del **Apartado 3.3**. Se realizaron los siguientes espectros infrarrojos para su comparación:

- Espectro FTIR de *film* de PVA
- Espectro FTIR de *film* de PVA sumergidos en ácido sórbico junto con el espectro de ácido sórbico.
- Espectro FTIR de *film* de NP al 1 y 5%: junto con el espectro FTIR del *film* de PVA y NP.
- Espectro FTIR de *film* de NP-βCD al 1 y 5% con ácido sórbico incluido: junto con los espectros FTIR del *film* de PVA, NP modificadas y ácido sórbico
- Espectro FTIR de *film* de NP-βCD al 1 y 5% sumergidos en ácido sórbico: junto con los espectros FTIR del *film* de PVA, NP modificadas y ácido sórbico.

3.6. PREPARACIÓN DE PLACAS MCCONKEY Y PLACAS TSB

Material:

Para la preparación de placas *McConkey* se precisa de agar *McConkey* (Dfco™) y *buffer* fosfato salino (PSB) (Conda pronadisa) y para las placas de TSB se necesita *Tryptic Soy Broth* (Scharlau) y el mismo *buffer* fosfato salino (PSB).

Método:

Se preparan alrededor de unas 40 placas *McConkey*; en dos erlenmeyers de 2 L cada uno, se añaden 500 mL de agua desionizada, 7,5 g Agar *McConkey* y 0,75 g de PSB a cada uno. Para preparar unas 40 placas de TSB, en dos erlenmeyers de 2 L cada uno, se añaden también 500 mL de agua destilada, 7,5 g de TSB y 3,75 g de PSB. Ambas disoluciones se autoclavan a 121 °C y 1 bar durante 20 minutos. Una vez transcurrido el autoclavado, las placas se preparan en una cabina de flujo laminar, y se dejan hasta que el agar haya gelificado. Posteriormente, se almacenan en una cámara frigorífica.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS FILMS EN *E. COLI* Y *S. AUREUS*

Se prepara una solución de concentración bacteriana de 10⁸ UFC/mL que corresponde tanto en *E. coli* como en *S. aureus* a una densidad óptica de 0,125 (u.a.) (Espectrofotómetro *Thermo Scientific modelo Genesys 20*). Para la bacteria *E. coli* se utiliza la cepa MG1655 y para *S. aureus* se precisa de una cepa de la colección del Departamento de Microbiología y Parasitología. A continuación, se realiza una dilución 1:100 de la solución de 10⁸ UFC/mL, obteniendo una concentración final de 10⁶ UFC/mL.

En este ensayo se pretende determinar la actividad bactericida de los *films* dopados con nanopartículas en presencia y ausencia de ácido sórbico. Se coloca cada tipo de *film* en un pocillo que contiene 350 μL de la solución bacteriana de 10^6 UFC/mL, además, hay tres pocillos que solo contienen 350 μL de la misma solución bacteriana. Asimismo, tres eppendorf contendrán 350 μL de la misma solución bacteriana que no se irradian con luz LED. Las luces LED (*Ledpoint SRL*) tienen las siguientes características:

- Flujo radiante: 300 mW/m
- Longitud de onda 365 nm
- Tira led dimerizable con 300 led (60 led/m)
- Alimentación 24V (+0%, -15%)

Las muestras de *film* se irradian durante 4 horas para activar las nanopartículas y se mide la temperatura y radiación al inicio y final del ensayo. Este ensayo se realiza por triplicado para cada bacteria en cabina de flujo laminar vertical modelo *Telstar Bio II A*. Este tipo de cabinas proporcionan un ambiente aséptico debido al flujo de aire laminar libre de partículas por su filtración mediante HEPA (*high efficiency particulate air*). El filtro HEPA retiene y filtra las partículas de un tamaño igual o mayor de 0,3 μm con una eficiencia del 99,97%.

Transcurrido el tiempo de irradiación, se procede a sembrar la solución bacteriana de los pocillos y de la solución bacteriana que no ha sido irradiada. Para ello, se pipetea 100 μL de cada solución, que se llevan hasta un volumen final de 10 mL con solución salina en tubos Falcon. Después, se agita en vórtex y se siembran 100 μL ; para distribuir homogéneamente la muestra se utilizan bolas de vidrio. Una vez sembradas las placas, se incuban en una estufa a 37 °C durante 24 horas, pasado este tiempo, se procede al conteo de colonias teniendo en cuenta el factor de dilución. La siguiente figura (**Figura 10**) es un esquema de la disposición de *films* en cada pocillo.

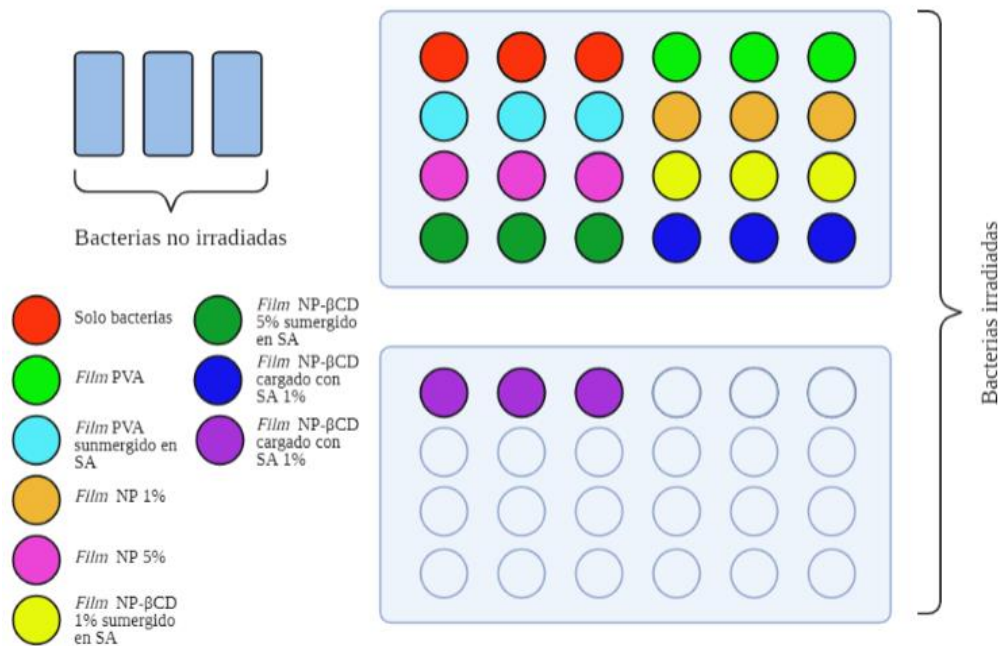


Figura 10. Esquema del ensayo de *films* en *E. coli* y *S. aureus*. Creado con BioRender.com.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN BACTERICIDA EN DISOLUCIÓN

En este ensayo se preparan soluciones con 1 y 5% de nanopartículas, β-ciclodextrina y ácido sórbico según la concentración que tienen en los *films* de NP-βCD cargadas con SA. Para ello se debe calcular la concentración de cada compuesto del complejo.

Cálculo del % de ácido sórbico:

La concentración de ácido sórbico que hay presente en un 1 y 5% de nanopartículas derivatizadas con β-ciclodextrina se determina espectrofotométricamente; se utiliza una curva patrón determinada en un estudio previo [30]. Se parte de la concentración de ácido sórbico inicial, y se resta la correspondiente a la disolución residual tras 7 horas de carga. Teniendo en cuenta los factores de dilución y el peso molecular de ácido sórbico se cuantifican los mg de ácido sórbico cargados en las ciclodextrinas, respecto a la masa de nanopartículas y se determina el % de conservante cargado. Los cálculos realizados se encuentran en el **Apartado 8.1.1.**

Cálculo del % de β-ciclodextrina:

El porcentaje de β-ciclodextrina presente en las nanopartículas derivatizadas se calcula mediante análisis térmico. Se realiza la primera derivada de la curva correspondiente de las

nanopartículas modificadas, y se observan dos picos, el primero corresponde a la pérdida de masa del espaciador, y el segundo corresponde a la pérdida de masa por la ciclodextrina [30]. Los cálculos se encuentran en la **Sección 8.1.2**.

Cálculo del % de NP:

Se determina por la diferencia de 100 de la suma de los % de ácido sórbico y ciclodextrina. Estos cálculos se encuentran en el **apartado 8.1.3**. Este ensayo se realiza de la misma manera que el anterior.

La disposición de las muestras en este ensayo de soluciones en *E. coli* y *S. aureus* se ilustra en la **Figura 11**.

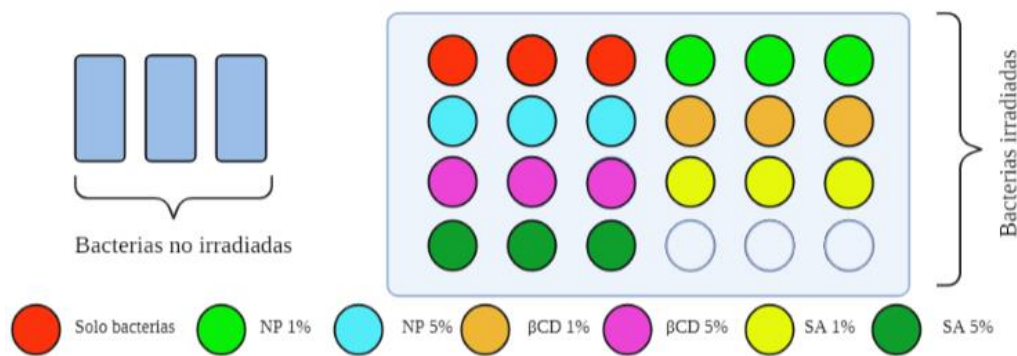


Figura 11. Representación del ensayo en disolución para *E. coli* y *S. aureus*. Creado con BioRender.com.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico se utiliza el programa *GraphPad Prism 9* para *Windows 10*. Primero se procede al test de normalidad para ver si los datos lo cumplen, después, se realiza el test de ANOVA (test de significancia) de 1 vía junto con el Test de Tukey para determinar si hay diferencias significativas en cada grupo. Se ha establecido un intervalo de confianza del 95%, es decir, se han tomado como significativos aquellos valores con una $p < 0,05$. Las gráficas obtenidas se representan en función de la media y el error obtenido.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ MODIFICADAS CON BETA-CICLODEXTRINA

Se obtienen 1,8 g de nanopartículas de TiO₂ derivatizadas con β-ciclodextrina. La modificación se confirma por espectroscopía FTIR y análisis térmico. Estas técnicas confirman que la β-ciclodextrina se ha fijado en la nanopartícula mediante el espaciador hexametildiisocianato.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ÁCIDO SÓRBICO

4.2.1. Caracterización de las nanopartículas derivatizadas con β-ciclodextrina

Espectroscopía IR (FTIR): En la **Figura 12** se recogen los espectros FTIR de las nanopartículas de TiO₂, la β-ciclodextrina y las nanopartículas derivatizadas con β-ciclodextrina. En cuanto al espectro de las nanopartículas, se puede observar una banda ancha alrededor de los 3000-3500 cm⁻¹, correspondiente al modo vibracional de tensión del enlace O-H, debido a que las nanopartículas se encuentran parcialmente hidroxiladas. Se observan dos bandas a los 600 cm⁻¹ y a los 800 cm⁻¹ que corresponden los enlaces Ti-O y Ti-OH respectivamente [31]. Estas bandas se pueden observar tanto en las nanopartículas comerciales como en las nanopartículas modificadas.

Respecto al espectro correspondiente a la ciclodextrina, se concentran entre 900-1400 cm⁻¹ los picos característicos de esta macromolécula. La banda más distintiva de la β-ciclodextrina, entre 950-1200 cm⁻¹, pertenece al acoplamiento de las vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C de las glucosas y de enlaces C-OH. Entre 1450 y 1350 cm⁻¹ se encuentra la banda asociada a los modos vibracionales de deformación de los enlaces C-H (C sp³). Por último, se observa una banda ancha a los 3000-3500 cm⁻¹ relacionado con las vibraciones de tensión de los enlaces O-H de los grupos hidroxilos de la ciclodextrina; la banda se encuentra ensanchada por la presencia de puentes de hidrógeno [30]. Esta última banda y la banda más característica de la ciclodextrina se observan también en las nanopartículas modificadas con β-ciclodextrina, quedando evidenciada su presencia.

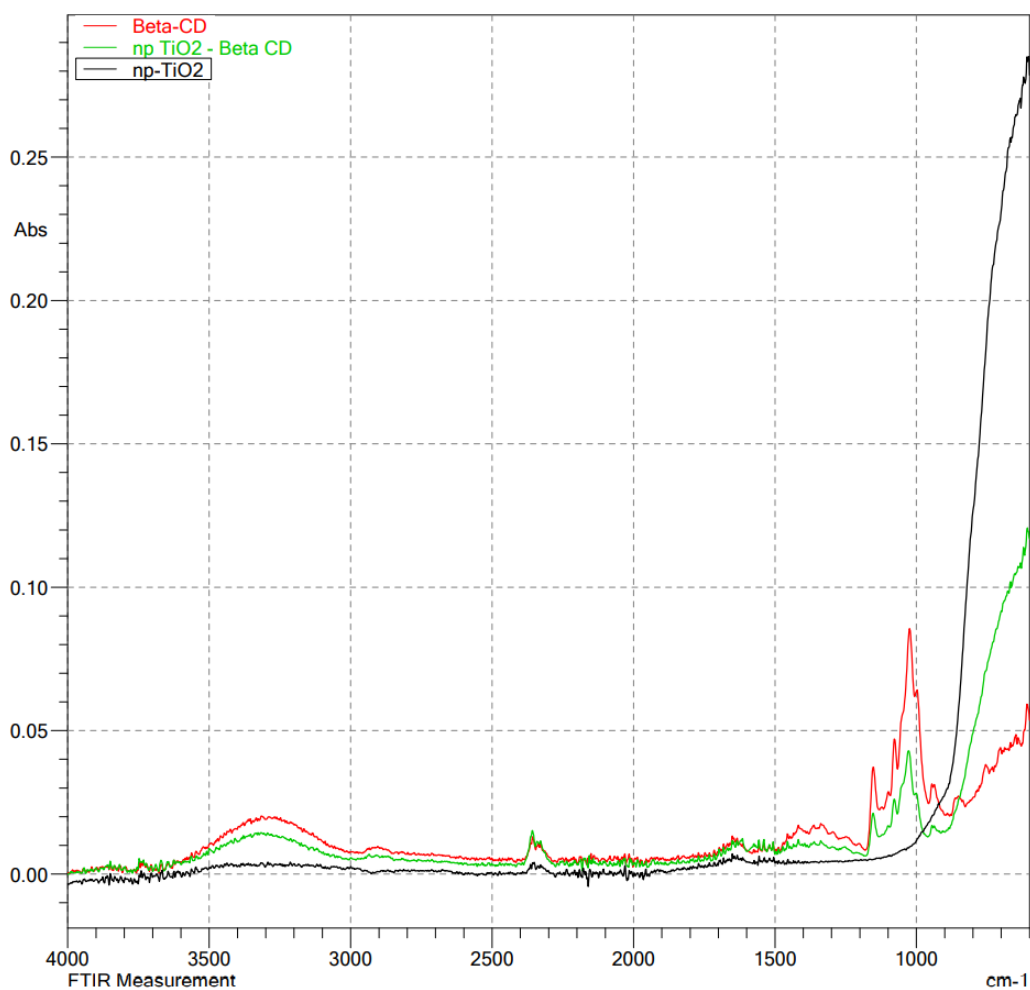


Figura 12. Espectros FTIR de β CD (arriba, rojo), NP- β CD (medio, verde) y NP de TiO_2 (abajo, negro).

Análisis térmico: Estos resultados se observan en la **Figura 13**, donde se aprecia que las nanopartículas comerciales no sufren una pérdida de masa al aplicar la rampa de temperatura mencionada en el **Apartado 3.2**. Se visualizan dos pérdidas de masa para la β -ciclodextrina, una pérdida inicial en torno a los 100 °C, y una segunda pérdida alrededor a los 320 °C. La primera pérdida corresponde a un 13,2% de muestra debido a la humedad que esta contenía. La siguiente pérdida, de un 81,6%, corresponde a la descomposición de β -ciclodextrina [30].

En el análisis térmico de las NP- β CD, la segunda pérdida de masa de la β -ciclodextrina comienza a una temperatura inferior que la de β -ciclodextrina, a los 290 °C, debido a la unión de ciclodextrina con el espaciador hexametildiisocianato. La segunda pérdida de las NP- β CD corresponde a la descomposición de la β -ciclodextrina.

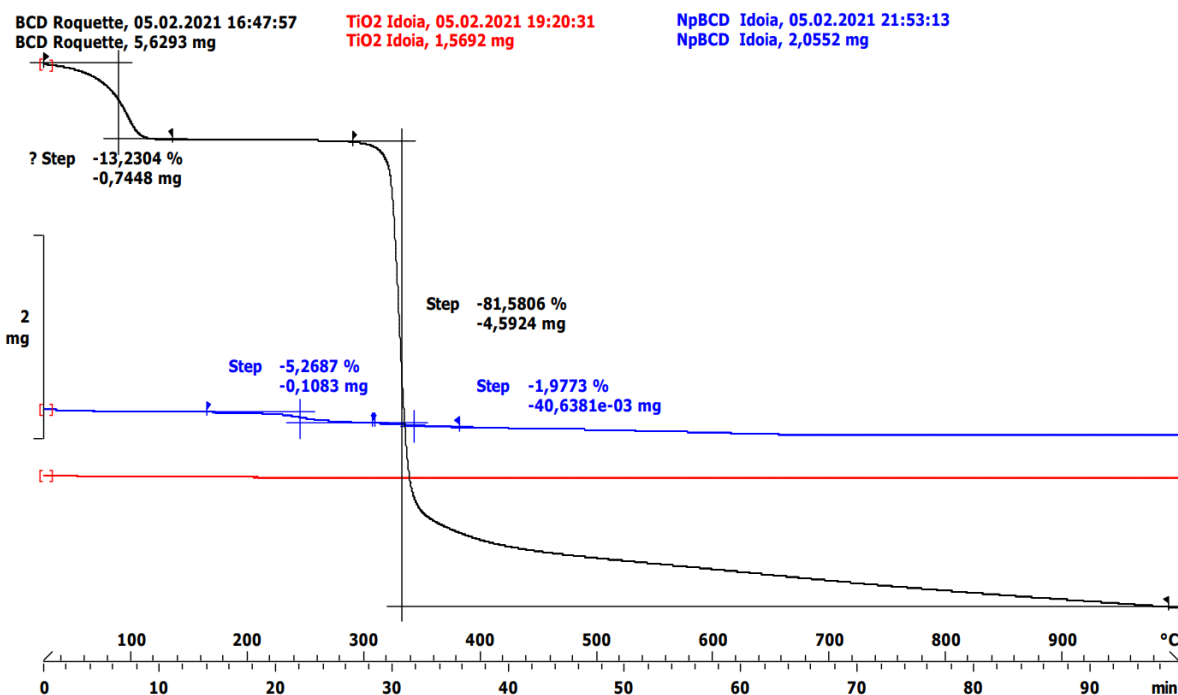


Figura 13. Termograma de la β CD (arriba, negro), NP- β CD (medio, azul) y NP de TiO_2 (abajo, rojo).

Se puede verificar, tanto por espectroscopía FTIR como por análisis térmico, que las nanopartículas modificadas contienen β CD, es decir, que la modificación ha transcurrido con éxito.

4.2.2. Caracterización de las nanopartículas derivatizadas cargadas con ácido sórbico

Espectroscopía IR (FTIR): La **Figura 14** recoge los espectros IR de las nanopartículas modificadas, del ácido sórbico y de las nanopartículas modificadas cargadas con ácido sórbico. Respecto al espectro de las NP modificadas, se observan las mismas bandas mencionadas previamente. En cuanto al espectro de ácido sórbico, se observa una banda ancha entre 2500 y 3300 cm^{-1} que corresponde al modo vibracional del enlace O-H del grupo funcional carboxilo del ácido carboxílico. El pico a 1700 cm^{-1} se asocia al modo vibracional del enlace C=O también del grupo carboxilo del ácido carboxílico. A 1650 y 1600 cm^{-1} se observan las bandas correspondientes a los modos vibracionales C=C de un grupo alqueno y un C insaturado en las posiciones α y β desde el grupo C=O. La banda de flexión que corresponde al enlace O-H del ácido carboxílico se encuentra a 1400 cm^{-1} . Las señales que aparecen entre 680-1000 cm^{-1} corresponden a los modos vibracionales y de flexión de los enlaces C=C [32].

Estas bandas presentes en el espectro IR del ácido sórbico se aprecian también en las NP- β CD cargadas con ácido sórbico, junto con la banda fundamental de Ti-O a 600 cm^{-1} y las bandas características de la β CD.

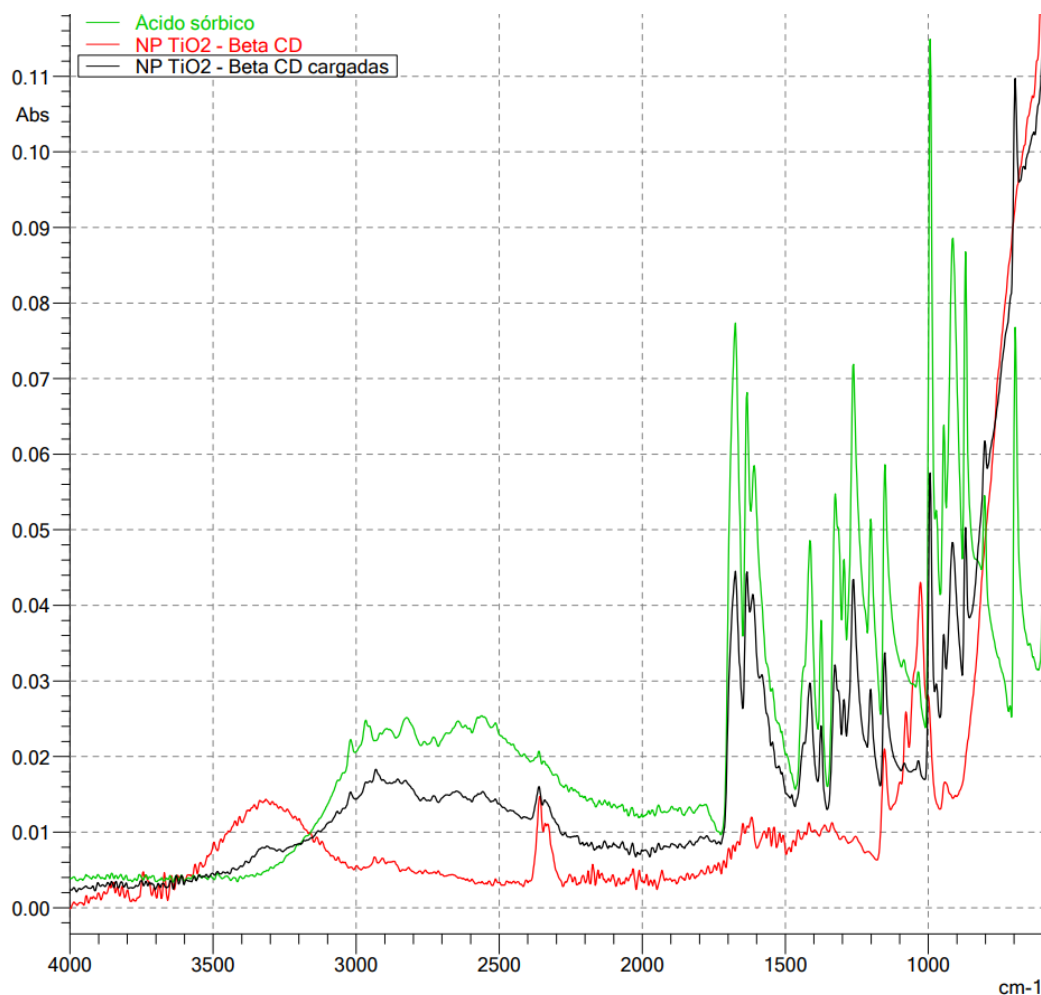


Figura 14. Espectros FTIR de SA (arriba, verde), NP- β CD cargadas con SA (medio, negro) y NP- β CD (abajo, rojo).

Análisis térmico: Las curvas TGA del ácido sórbico, de las NP- β CD y de las NP- β CD-SA se recogen en la **Figura 15**. En la curva del ácido sórbico se pueden apreciar dos pérdidas, la primera, a $135\text{ }^{\circ}\text{C}$, corresponde al dióxido de carbono liberado. La siguiente pérdida de masa, alrededor de los $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ se atribuye a materia orgánica que no ha sido descompuesta previamente [33]. La curva TGA de las NP- β CD sigue el mismo patrón mencionado anteriormente, mientras que en la curva de NP- β CD-SA se aprecia una pérdida de masa de mayor tamaño que esta última debido a que contiene la pérdida de materia orgánica del ácido sórbico y de la ciclodextrina.

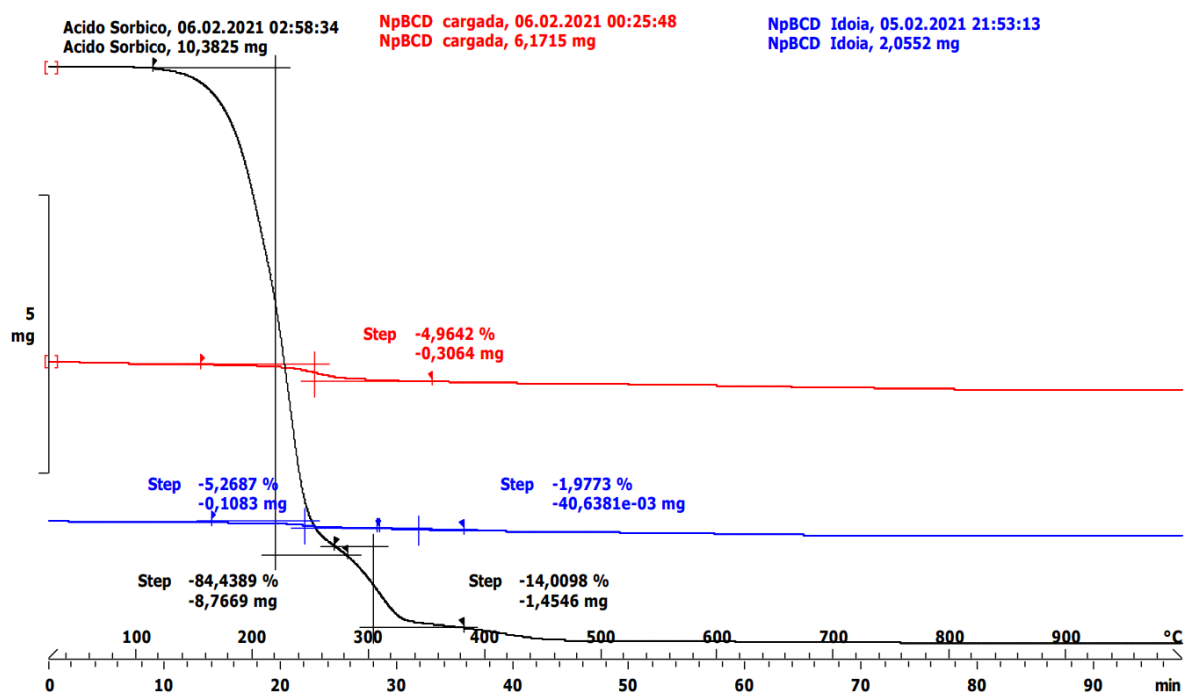


Figura 15. Termograma de SA (arriba, negro), NP-βCD cargada (medio, rojo) y NP-βCD (abajo, azul).

Mediante la caracterización por espectroscopía FTIR y análisis térmico se confirma la inclusión del ácido sórbico dentro de la cavidad de la βCD que se encuentra unida a la superficie de las NP.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE FILMS

Los distintos tipos de *films* se caracterizaron mediante Espectroscopía FTIR. Cabe destacar que, debido a la pequeña proporción de NP, βCD y ácido sórbico presentes en los *films*, no se encuentran diferencias significativas entre los diferentes espectros. El pico característico de la βCD y el pico del enlace fundamental Ti-O se encuentran tapados por las bandas correspondientes del PVA, que se encuentra en una proporción muy superior. En la **Figura 16** queda recogido el espectro del *film* de PVA, similar a los espectros de los otros *films* que se pueden localizar en los Anexos, **Sección 8.2**.

Entre 3000-3500 cm^{-1} se observa una banda ancha que corresponde a los grupos O-H del grupo hidroxilo (alcohol) del PVA y a las moléculas de agua absorbidas. Los picos que están en torno a 2900 cm^{-1} se atribuyen a los enlaces CH y CH_2 . Se localiza también una banda intensa asociada a la tensión del enlace C=O de los grupos residuales de acetato (O-C(O)-C) a 1700 cm^{-1} . La presencia de los grupos acetato indican que el PVA se encuentra parcialmente

hidrolizado. A 1400 y 1300 cm^{-1} se observan las bandas pertenecientes a la flexión de los enlaces de CH_2 y CH_3 , respectivamente [34].

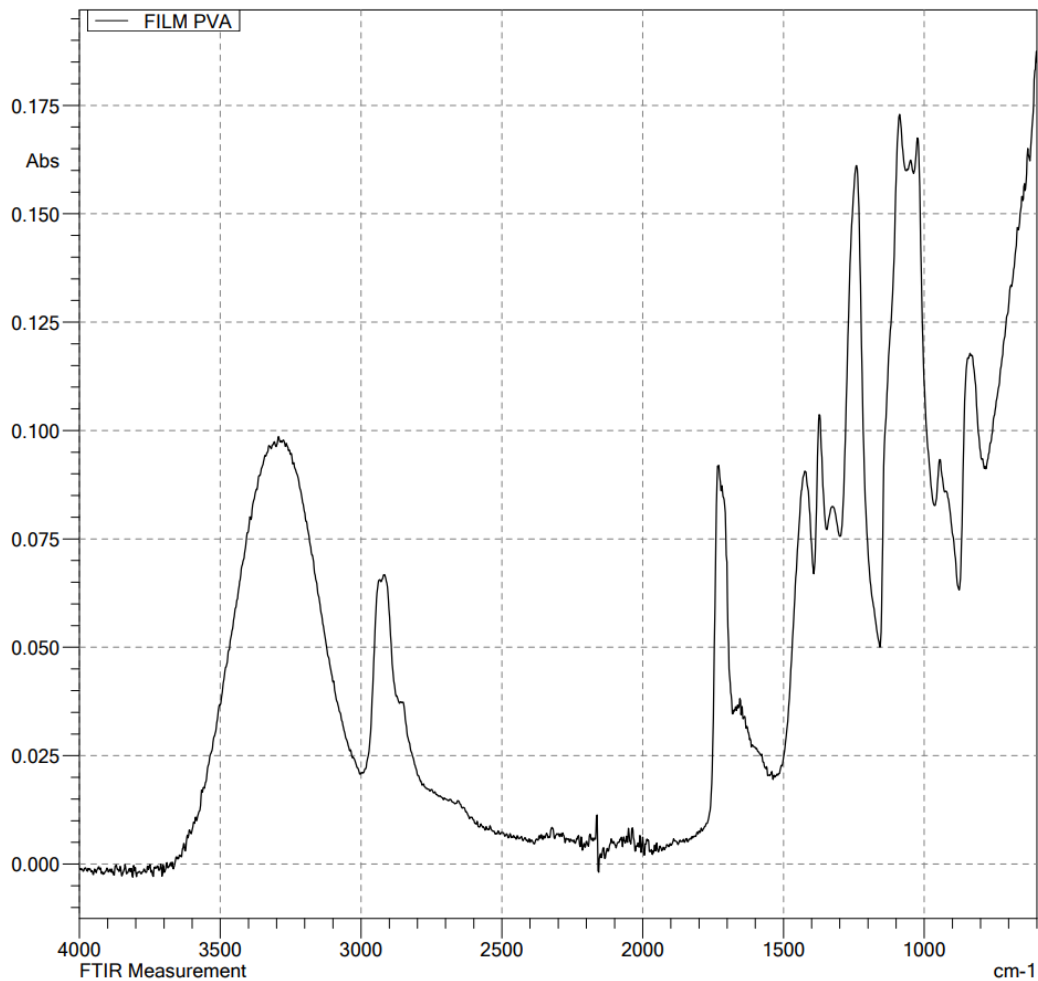












Figura 16. Espectro FTIR del *film* de PVA.

4.4. EFICACIA BACTERICIDA DE LOS *FILMS* EN *E. COLI* Y *S. AUREUS*

Los siguientes resultados muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) tras las cuatro horas de ensayo. Tanto el ensayo con *E. coli* como el de *S. aureus* han pasado el test de normalidad que queda recogido en el **Apartado 8.3.1.** de los Anexos. También queda recogido el test de significancia en el mismo apartado de los Anexos. Ambas gráficas representan el valor medio de las muestras junto con el error. En la **Tabla 1** se recoge el código de colores de cada grupo y muestra para ambos ensayos.

Tabla 1. Código de colores de cada muestra, para *E. coli* y *S aureus*.

COLOR	GRUPO	MUESTRA
	A	No irradiado
	B	Irradiado
	C	<i>Film</i> PVA
	D	<i>Film</i> PVA sumergido en SA
	E	<i>Film</i> NP 1%
	F	<i>Film</i> NP 5%
	G	<i>Film</i> NP- β CD 1% sumergido en SA
	H	<i>Film</i> NP- β CD 5% sumergido en SA
	I	<i>Film</i> NP- β CD cargado con SA 1%
	J	<i>Film</i> NP- β CD cargado con SA 5%

4.4.1. Efecto bactericida en *E. coli*

Tras contar el número de UFC después de las cuatro horas de irradiación, con excepción del Grupo A (bacterias no irradiadas), se han obtenido los siguientes resultados (**Figura 17**).

E. coli Films

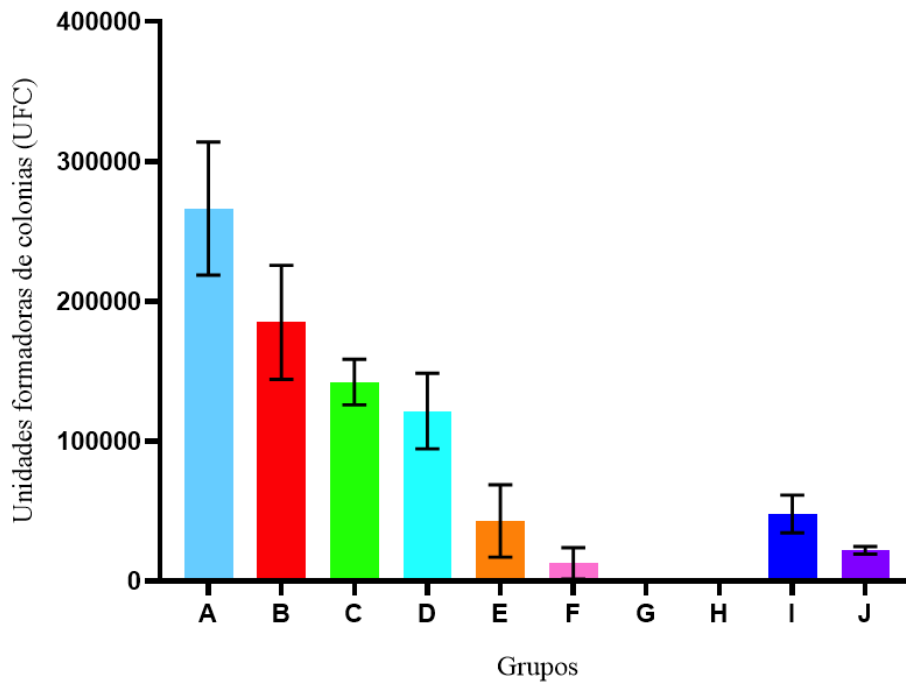


Figura 17. Representación gráfica de las UFC de *E. coli* tras 4 horas de irradiación de los distintos *films* de PVA.

Los resultados obtenidos concuerdan con los esperados. Entre las bacterias irradiadas (B) y no irradiadas (A) se ha obtenido una pequeña diferencia significativa, concluyendo así que la luz LED afecta a la bacteria *E. coli*. Sin embargo, no hay una diferencia significativa entre las bacterias irradiadas (B), y aquellas que contenían un *film* de PVA (C) y un *film* de PVA sumergido en SA (D). Por otro lado, los *films* con nanopartículas (E, F, G, H, I y J) sí presentan una gran diferencia significativa en comparación con la muestra de bacterias (B) y con los *films* sin nanopartículas (C y D).

En cuanto a los *films* que contienen nanopartículas al 1 y 5% (E y F), no se encuentran diferencias significativas entre ellas. No obstante, los *films* con nanopartículas modificadas con β -ciclodextrina que fueron sumergidos en ácido sórbico (G y H) parecen presentar un mayor efecto bactericida que las que fueron cargadas con ácido sórbico (I y J). Es posible que el ácido sórbico quede atrapado en los *films* de PVA y la esperada acción bactericida que se observa en los *films* embebidos, donde el ácido se encuentra libre, quede mermada. También puede ocurrir que durante el prensado de los *films* el ácido sórbico quedara dañado.

4.4.2. Efecto bactericida en *S. aureus*

Para el mismo ensayo realizado en *S. aureus*, se ha obtenido la siguiente representación de UFC (**Figura 18**). Se puede apreciar que los resultados han sido similares que al ensayo en *E. coli*.

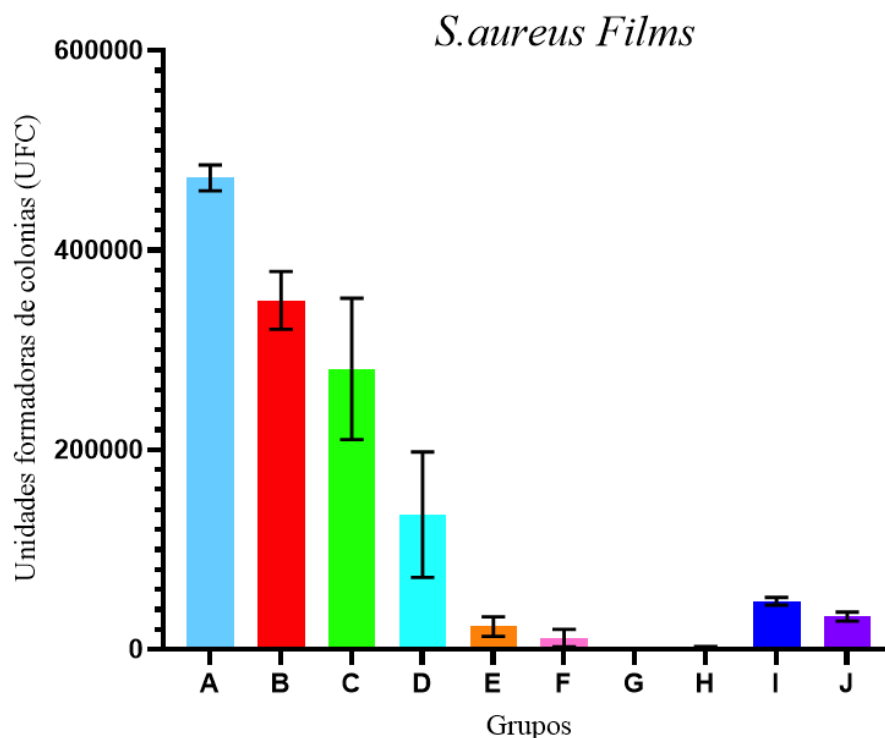


Figura 18. Representación gráfica de las UFC de *S. aureus* tras 4 horas de irradiación de los distintos *films* de PVA.

Al igual que con *E. coli*, se han encontrado diferencias significativas entre las bacterias no irradiadas (A) e irradiadas (B), quedando también evidente que la luz LED provoca la muerte celular. Tampoco hay una diferencia significativa entre la muestra de bacterias irradiadas (B) y la que contenía el *film* de PVA (C), sin embargo, sí se ha encontrado una pequeña diferencia significativa entre la muestra de bacterias irradiadas (B) y la muestra que contenía el *film* de PVA sumergido en ácido sórbico (D), que puede deberse al poder bactericida del ácido sórbico adsorbido.








Respecto a los *films* con un 5% de NP, se han encontrado diferencias significativas cuando el sistema ha sido embebido en el conservante (H) respecto al que posee las NP cargadas con el ácido (J). En cuanto a la acción bactericida del resto de *los films* con NP, no hay diferencias reseñables. En cualquier caso, queda de nuevo evidenciado que las nanopartículas de TiO₂ tienen actividad antimicrobiana.

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre los *films* de NP (E y F) y los *films* de NP- β CD embebidos en SA (G y H), se puede apreciar que, ambas bacterias han sido completamente destruidas por estos últimos *films*, y esto se puede atribuir al ácido sórbico presente en los *films* aparte de las NP.

4.5. EFICACIA BACTERICIDA EN DISOLUCIÓN

Para conocer la influencia que tiene el sistema en forma de *film* en el efecto bactericida, este ensayo se ha realizado en disolución, empleando la concentración de nanopartículas, β -ciclodextrina y ácido sórbico que hay en los *films* de NP- β CD cargados con SA al 1 y 5%. En este caso, todos los componentes se encuentran libres en el medio, no hay *films*. Los cálculos se encuentran en el **Apartado 8.1.** de los Anexos, y en la **Sección 8.3.2.** se recogen los resultados del test de normalidad y el test de significancia. Ambas representaciones son la media de los resultados junto con el error. En la **Tabla 2** queda reflejado el código de colores de cada grupo y muestra de este ensayo.

Tabla 2. Código de colores de cada muestra del ensayo en disolución.

COLOR	GRUPO	MUESTRA
	A	No irradiado
	B	Irradiado
	C	NP 1%
	D	NP 5%
	E	β CD 1%
	F	β CD 5%
	G	SA 1%
	H	SA 5%

4.5.1. Efecto bactericida en *E. coli*

En la **Figura 19** quedan recogidos los valores de UFC para cada muestra tras cuatro horas de irradiación.

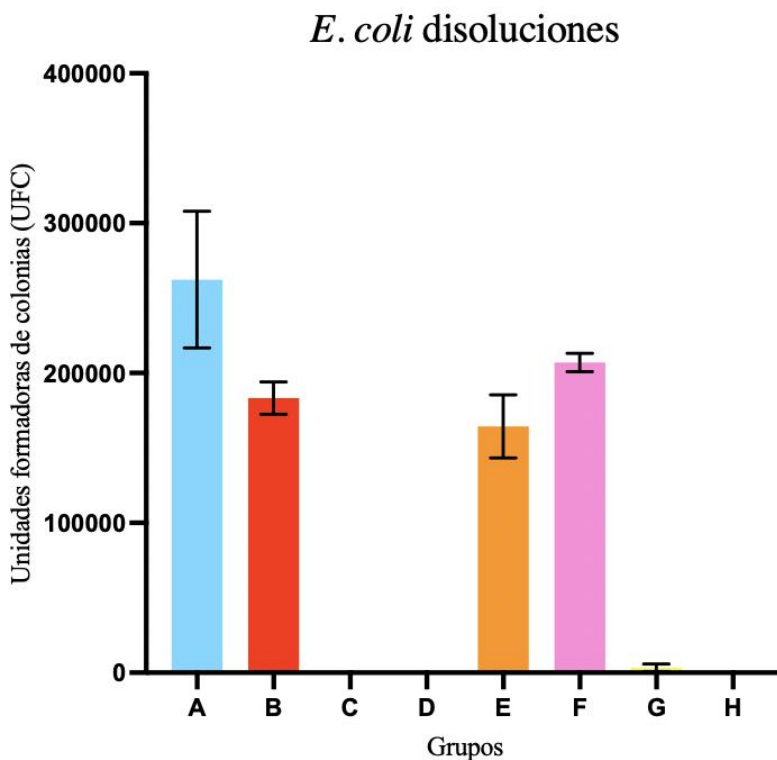


Figura 19. Representación gráfica de las UFC de *E. coli* tras 4 horas de irradiación de los distintos compuestos en disolución.

Al igual que en el ensayo anterior, hay diferencias significativas entre la muestra no irradiada (A) e irradiada (B), y también en el resto de las muestras. No existen diferencias significativas en presencia de ciclodextrina (E y F), como era de esperar, ya que esta macromolécula no tiene efecto antimicrobiano, es un oligosacárido. Sin embargo, las muestras que contienen nanopartículas (C y D) y ácido sórbico (G y H) resultan tener una actividad antimicrobiana más elevada que en los ensayos en *films* debido a que en este ensayo no se encuentran atrapadas en una matriz y pueden desempeñar su acción bactericida con mayor eficacia.

4.5.2. Efecto bactericida en *S. aureus*

A continuación, se muestra la **Figura 20** donde quedan reflejados los valores de UFC en este ensayo en disolución con la bacteria *S. aureus*.

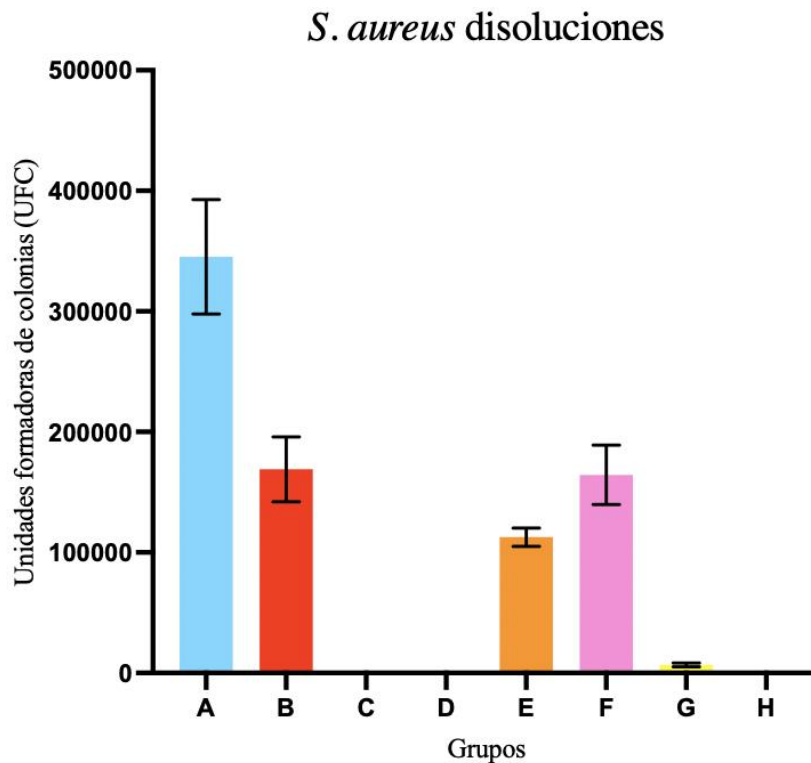


Figura 20. Representación gráfica de las UFC de *S. aureus* tras 4 horas de irradiación de los distintos compuestos en disolución

Los resultados son bastante similares a los de *E. coli*. En el caso de la muestra no irradiada de *S. aureus* aparecen más UFC que con *E. coli*, sin embargo, las nanopartículas y el ácido sórbico han tenido un efecto devastador en esta bacteria (apenas se cuentan UFC). Esto puede ser porque la pared celular de las bacterias Gram positivas es menos compleja, no posee dos membranas lipídicas como las bacterias Gram negativas y probablemente sea más fácil de destruir por efecto del TiO_2 y el conservante.

Parece que el ácido sórbico ha sido más eficaz en este ensayo que en el de los *films* debido a que no se encuentra atrapado en una matriz polimérica o porque no ha sido destruido al preparar los *films*, como se ha mencionado anteriormente.

5. CONCLUSIONES

Tras analizar y discutir los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Hay suficiente evidencia que verifica la presencia de β -ciclodextrina en las nanopartículas, por lo que el protocolo de derivatización presentado en este trabajo se ha desarrollado con éxito.
2. La inclusión de ácido sórbico en la β -ciclodextrina de las nanopartículas modificadas también queda verificada.
3. La preparación de *films* de PVA con NP derivatizadas y cargadas con conservante es posible, aunque su caracterización mediante FTIR no es viable, porque las señales de polímero, que está en mayoría, se superponen a las del resto de componentes.
4. Los *films* que contienen nanopartículas en su matriz polimérica tienen actividad antimicrobiana en las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en función de la cantidad (1 y 5%).
5. La acción bactericida de las nanopartículas prevalece sobre la del ácido sórbico cuando se encuentran integradas en la matriz polimérica de PVA.
6. En los ensayos en disolución hay indicios del poder bactericida del conservante ácido sórbico a pesar de encontrarse en una menor concentración que las nanopartículas.

6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Tras los resultados esperanzadores obtenidos sobre el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de TiO₂, incluidas en *films* de PVA y en disolución, sería de gran interés probar su eficacia en otras bacterias comunes en la contaminación de alimentos como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella*; así como de las cepas virulentas de *E. coli* y *S. aureus* [2].

También sería interesante probar otros métodos para caracterizar correctamente los *films* conteniendo nanopartículas, como el análisis térmico y la microscopía. Asimismo, se podría probar copolimerizar el alcohol polivinílico con el etilen-vinil-alcohol para evitar su degradación en agua.

En cuanto al modo de insertar el ácido sórbico en los *films*, interesa que este no pierda actividad bactericida, habría que estudiar la manera de que no quedara inactivado. Asimismo, aunque se espera que no presenten toxicidad, conviene realizar ensayos toxicológicos de los *films* conteniendo las nanopartículas, la β -ciclodextrina y el ácido sórbico, para asegurar que no influyen en la calidad del alimento. Sería interesante probar a envolver los *films* con un alimento modelo y así estudiar su comportamiento en servicio, para ver si los que contienen nanopartículas conservan el alimento durante un mayor periodo de tiempo que los que no.

Conviene realizar los ensayos con un mayor número de muestras por cada grupo para tener un mayor tamaño muestral para el análisis estadístico. Lo óptimo sería tener un mínimo de 10 muestras por grupo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rawat S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Res Libr Asian J Plant Sci Res.* 2015;5(4):47–56.
2. Los 14 patógenos principales transmitidos por los alimentos de Seguridad alimentaria para futuras mamás | FDA [Internet]. [cited 2021 Jan 12]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/people-risk-foodborne-illness/los-14-patogenos-principales-transmitidos-por-los-alimentos-de-seguridad-alimentaria-para-futuras>
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):123–40.
4. Willey, Joanne M., Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton, Lansing M. Prescott, and Joanne M. Willey. 2011. *Prescott's microbiology*. New York: McGraw-Hill. Libro.
5. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010;2(7):1751-1773. doi:10.3390/toxins2071751
6. Piñeros J. DATABiO *Staphylococcus aureus*. *Databio.* 2015;1–3.
7. He X, Hwang HM. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *J Food Drug Anal.* 2016; 24:671–81.
8. Krepker M, Shemesh R, Danin Poleg Y, Kashi Y, Vaxman A, Segal E. Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control.* 2017; 76:117–26.
9. Martínez-Tenorio Y, López-Malo Vigil A. Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 5-2.* 2011:1-12.
10. Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Sci Bull.* 2011;56(16):1639–57.
11. Agócs TZ, Puskás I, Varga E, Molnár M, Fenyvesi É. Stabilization of nanosized titanium dioxide by cyclodextrin polymers and its photocatalytic effect on the degradation of wastewater pollutants. *Beilstein J Org Chem.* 2016; 12:2873–82.
12. Banerjee, S., Gopal, J., Muraleedharan, P., Tyagi A.K. and Raj B. Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy. *Curr. Sci.* 2006; 90(10):1378-383.

13. Othman SH, Abd Salam NR, Zainal N, Kadir Basha R, Talib RA. Antimicrobial activity of TiO₂ nanoparticle-coated film for potential food packaging applications. *Int J Photoenergy*. 2014;2014.
14. Foster HA, Ditta IB, Varghese S. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 90:1847–68.
15. Grande F, Tucci P. Titanium Dioxide Nanoparticles: A Risk for Human Health? *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(9):762-9. doi: 10.2174/1389557516666160321114341. PMID: 26996620.
16. Agócs TZ, Puskás I, Varga E, Molnár M, Fenyvesi É. Stabilization of nanosized titanium dioxide by cyclodextrin polymers and its photocatalytic effect on the degradation of wastewater pollutants. *Beilstein J Org Chem*. 2016; 12:2873–82.
17. Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem*. 2004;39(9):1033–46.
18. Goñi L. Obtención y caracterización de nanopartículas modificadas con α - ciclodextrina para la liberación de ácido sórbico. 2017. Trabajo Final de Grado.
19. Iberoamericana R, Mart G. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. 2007; 8:300–12.
20. Tio A. Environmental Application of CD-Modified Titanium Dioxide. 2014;28(7).
21. Zhang Y, Liu Y, Liu W. Characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin with sorbic acid in the solid state and in aqueous solution. 2010;177–82.
22. Dharmadhikari M. Sorbic Acid *. 1974. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.626.5504&rep=rep1&type=pdf>
23. Hauser C, Wunderlich J. Antimicrobial packaging films with a sorbic acid-based coating. *Procedia Food Sci*. 2011; 1:197–202.
24. Sullivan DJ, Azlin-Hasim S, Cruz-Romero M, Cummins E, Kerry JP, Morris MA. Antimicrobial effect of benzoic and sorbic acid salts and nano-solubilisates against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and chicken microbiota biofilms. *Food Control*. 2020;107(July 2019):106786.
25. Sorbic acid | C₆H₈O₂ | ChemSpider [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.558605.html>
26. Piergiovanni L, Limbo S. *Food Packaging Materials*. Milán: Springer; 2015.

27. University of York. Poly(ethene) (Polyethylene). The Essential Chemical Industryonline; 2017. Disponible en: <http://www.essentialchemicalindustry.org>
28. PVOH Film [Internet]. [cited 2021 Jan 12]. Available from: [https://polymerdatabase.com/Films/PVOH Films.html](https://polymerdatabase.com/Films/PVOH%20Films.html)
29. Monreal-Pérez P, Isasi J, González-Benito J, Olmos D, González-Gaitano G. Cyclodextrin-Grafted TiO₂ Nanoparticles: Synthesis, Complexation Capacity, and Dispersion in Polymeric Matrices. *Nanomaterials*. 2018;8(9):642.
30. Goñi-Ciaurriz L, González-Gaitano G, Vélaz I. Cyclodextrin-grafted nanoparticles as food preservative carriers. *Int J Pharm*. 2020 Oct 15; 588:119664.
31. Ochoa Y, Ortegón Y, Enrique J, Páez R. gel: estudio del efecto de la presencia de AcacH en el sistema Synthesis of TiO₂, anatase phase by the sol-gel method: study of the effect of the presence of AcacH in the system. 2010;29–40.
32. IR Spectrum Table & Chart | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2021 Feb 26]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html#ir-table-by-compound>
33. de Jesus JHF, Szilágyi IM, Regdon G Jr, Cavalheiro ETG. Thermal behavior of food preservative sorbic acid and its derivates. *Food Chem*. 2021 Feb 1; 337:127770. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127770. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32795858.
34. Cabrera J, Paredes C, Urday E, Santiago J. Preparación Y Caracterización De Películas De Alcohol. *Rev Iberoam*. 2007;8(4):323–32.

8. ANEXOS

8.1. CÁLCULOS DE LA CONCENTRACIÓN DE NP, BETA-CD Y SA AL 1 Y 5%

8.1.1. Cálculo de la concentración de SA al 1 y 5%

La ecuación de la curva patrón es la siguiente. Siendo y la absorbancia a 258 nm y x la concentración molar del ácido sórbico.

$$y = 24788x - 0,0234$$

Los datos empleados son Abs_0 (0,78305) y Abs_7 (0,58680), teniendo en cuenta el factor de dilución se obtienen las siguientes concentraciones:

- Concentración inicial de ácido sórbico: 0,00480 M
- Concentración final de ácido sórbico: 0,00366 M

Por tanto, los mg de ácido sórbico adsorbidos son:

$$(0,00480 - 0,00366) M \times 0,04 L \times 112,12 g/mol = 5,27 mg.$$

Se cargaron 750 mg de NP modificadas, por lo que el % de mg de ácido sórbico por cada 1000 mg de NP derivatizada es:

$$\% \text{ de ácido sórbico}/1000 \text{ mg de NP} = \frac{5,27 \text{ mg}}{750 \text{ mg}} \cdot 100 = 0,7\%$$

Cada *film* tiene un volumen de $2 \cdot 10^{-4}$ L. Los *films* al 1% de NP contiene 0,2 mg de NP y los del 5% tienen 1 mg. Con el peso molecular se obtiene la concentración de SA presente:

- Para 1%: $6,24 \cdot 10^{-5}$ M
- Para 5%: $3,1 \cdot 10^{-4}$ M

Al tratarse de concentraciones muy pequeñas se prepara una solución madre de $5 \cdot 10^{-3}$ M. Cada pocillo contiene 350 μ L de solución bacteriana y el volumen final es de 1000 μ L. Mediante la siguiente ecuación se determinan los μ L necesarios de solución madre para llegar a las concentraciones deseadas.

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

Siendo los resultados:

- Para 1%: 12,5 μL
- Para 5%: 62 μL

8.1.2. Cálculo de la concentración de βCD al 1 y 5%

Se exportan los datos de la curva TGA de NP- βCD . El primer pico de pérdida de masa, que corresponde al espaciador, es 1,67% y la segunda pérdida es del 6,52%. Por lo que el % de masa de βCD es del 4,85%.

Sabiendo el volumen de los *films* y la cantidad de NP- βCD para el 1 y 5% se calcula la concentración de βCD del mismo modo que con el SA, siendo:

- Para 1%: $4,27 \cdot 10^{-5}$ M
- Para el 5%: $2,14 \cdot 10^{-4}$ M

Se prepara una solución madre de $5 \cdot 10^{-4}$ M, y se calcula el volumen necesario para obtener las concentraciones requeridas de la misma manera que con el SA:

- Para 1%: 85 μL
- Para 5%: 428 μL

8.1.3. Cálculo de la concentración de NP al 1 y 5%

El % de masa de NP es el 100% menos los % de masa de SA y βCD , siendo un 94,45%. La concentración de NP al 1 y 5% se halla de igual manera que en los otros dos casos, siendo:

- Para 1%: 0,012 M
- Para 5%: 0,06 M

La solución madre de NP tiene una concentración de 0,1 M. Se determinan los μL mediante los mismos cálculos, obteniendo:

- Para 1%: 120 μL
- Para 5%: 600 μL

En todos los casos se añade solución salina hasta llegar a los 1000 μL .

8.2. ESPECTROS FTIR DE LOS FILMS

A continuación, se muestran los espectros FTIR de los *films* de PVA sumergido en SA (**Figura A1**), los *films* de NP al 1 y 5% (**Figura A2**), los *films* de NP- β CD cargados con SA al 1 y 5% (**Figura A3**), y, por último, los *films* de NP- β CD sumergidos en SA (**Figura A4**), y los espectros de SA, NP, NP- β CD cargados con SA y de NP- β CD para hacer las respectivas comparaciones mencionadas en la **Sección 3.5**.

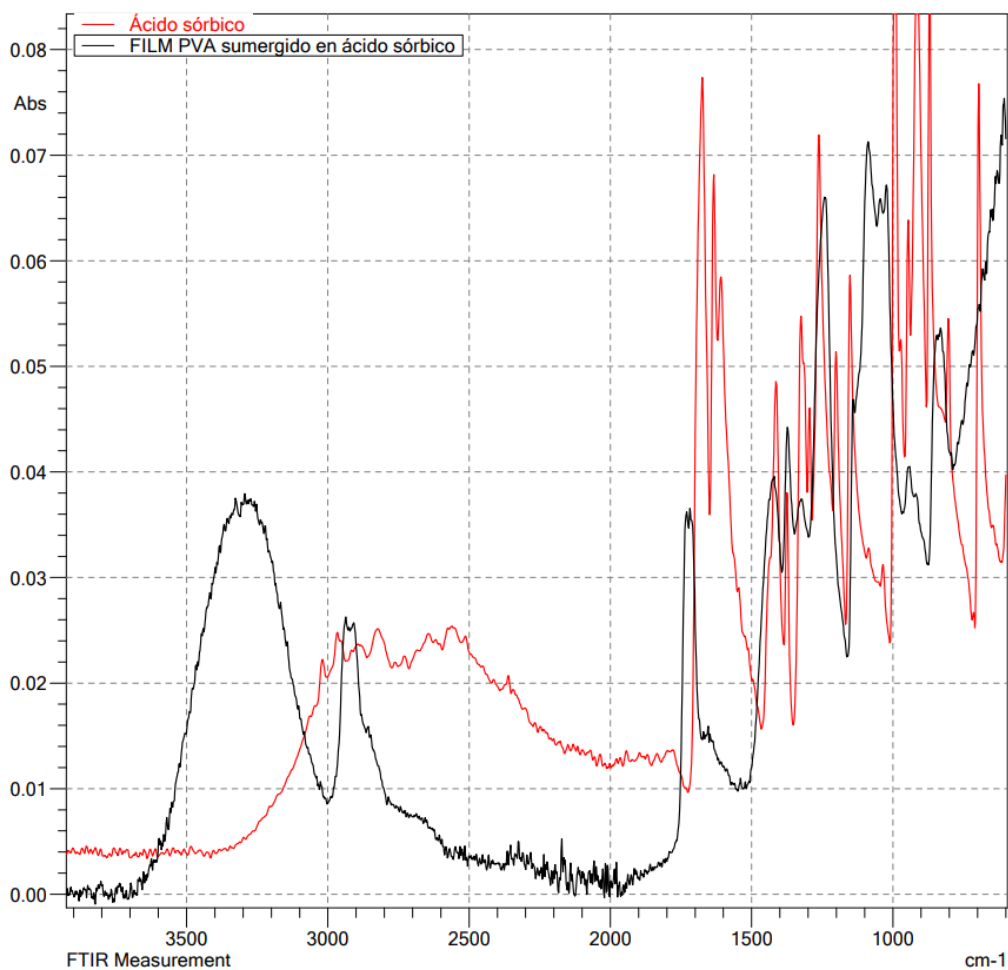


Figura A1. Espectros FTIR de ácido sórbico (arriba, rojo) y del *film* de PVA sumergido en ácido sórbico (abajo, negro).

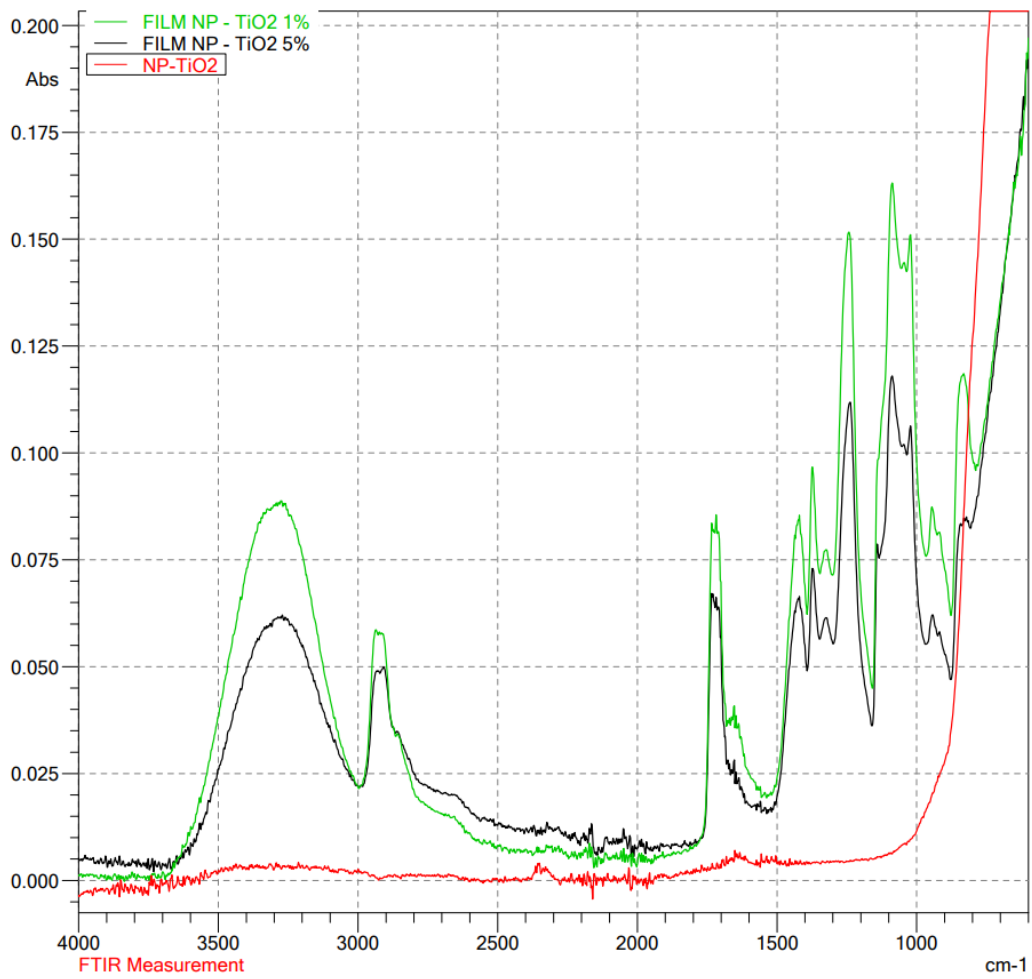


Figura A2. Espectros FTIR del *film* de NP al 1% (arriba, verde), del *film* de NP al 5% (medio, negro) y de NP de TiO₂ (abajo, rojo).

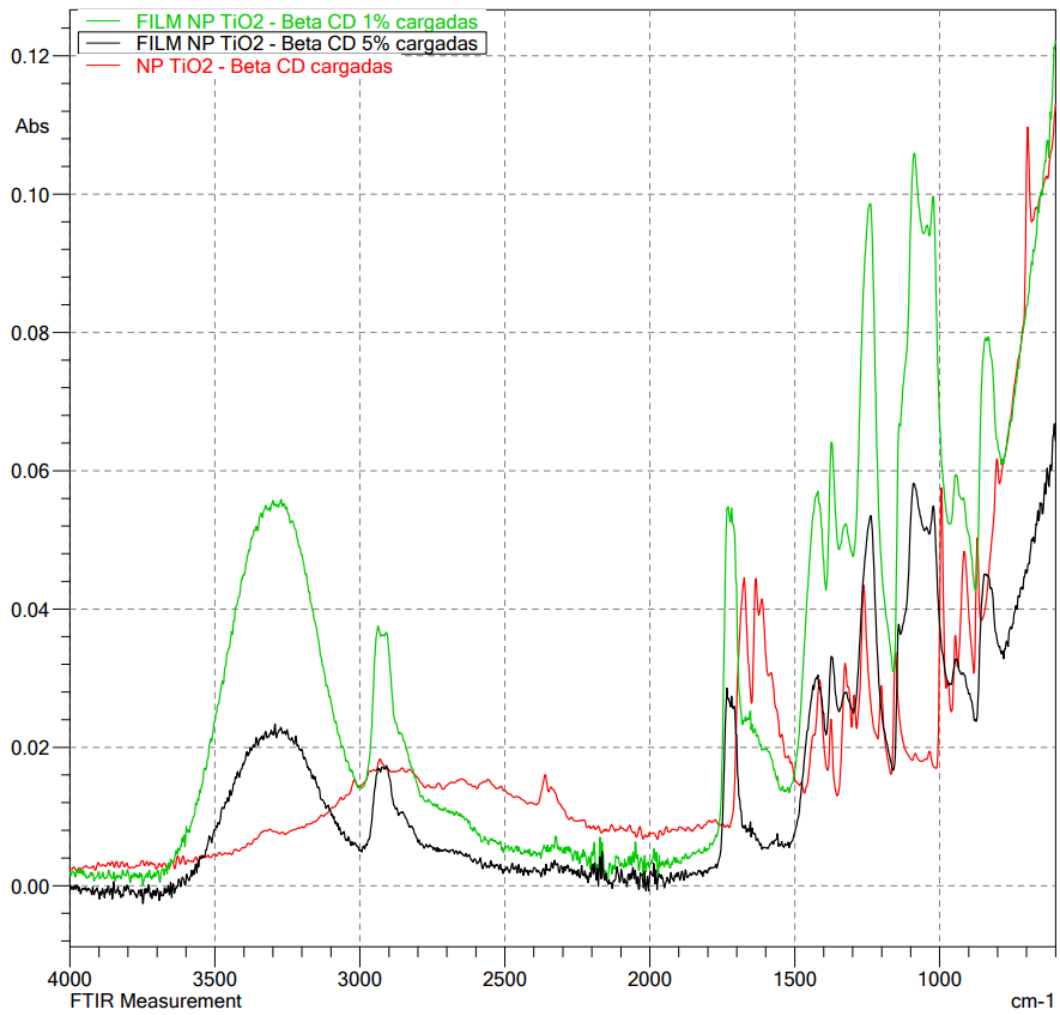


Figura A3. Espectros FTIR del *film* de NP-βCD cargadas al 1% (arriba, verde), del *film* de NP-βCD cargadas al 5% (medio, negro) y de NP-βCD cargadas (abajo, rojo).

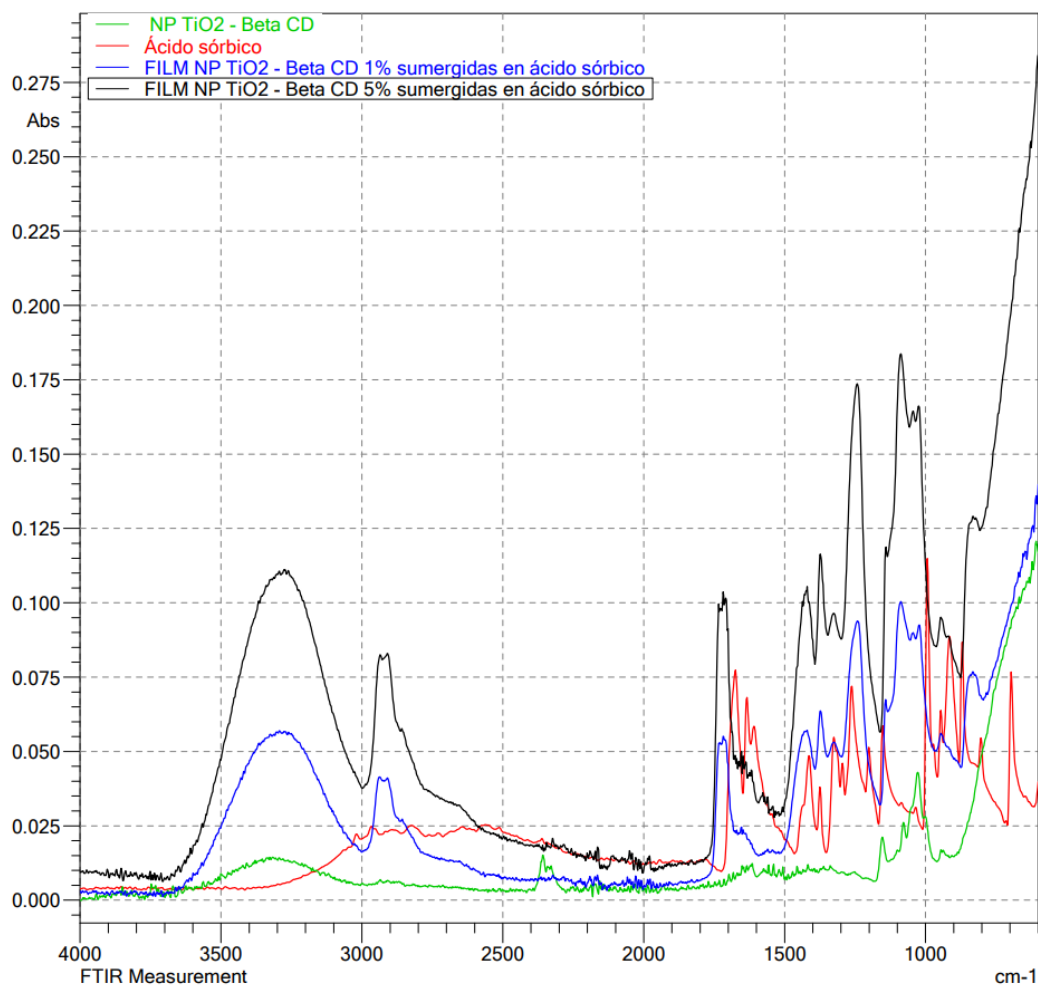


Figura A4. Espectros FTIR del *film* de NP-βCD al 5% sumergido en SA (arriba, negro), del *film* de NP-βCD al 1% sumergido en SA (medio, azul), de NP-βCD (medio, verde) y de ácido sórbico (abajo, rojo).

8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

8.3.1 Eficacia bactericida de los *films* en *E. coli* y *S. aureus*

Análisis estadístico en E. coli:

En la **Tabla A1** se muestran las unidades formadoras de colonias obtenidas tras las 4 horas de irradiación. Con estos datos se realizaron el test de normalidad y el test de ANOVA (test de significancia) de una vía con los que se obtuvo la gráfica de la **Figura 17**.

Tabla A1. Las UFC obtenidas de *E. coli* tras 4 horas de irradiación de los distintos *films* de PVA.

MUESTRA	UFC
NO IRRADIADO	321000
	234000
	244000
IRRADIADO	231000
	171000
	153000
<i>FILM</i> PVA	135000
	161000
	131000
<i>FILM</i> PVA SUMERGIDO EN SA	116000
	98000
	151000
<i>FILM</i> NP 1%	38000
	20000
	71000
<i>FILM</i> NP 5%	21000
	17000
	0
<i>FILM</i> NP-BCD 1% SUMERGIDO EN SA	0
	0
	0
<i>FILM</i> NP-BCD 5% SUMERGIDO EN SA	0
	0
	0
<i>FILM</i> NP-BCD CARGADO CON SA 1%	63000
	37000
	44000
<i>FILM</i> NP-BCD CARGADO CON SA 5%	21000
	25000
	20000

Test de normalidad:

Shapiro-Wilk test										
W	0.8349	0.9119	0.8480	0.9668	0.9720	0.8867	Invalid input data	Invalid input data	0.9337	0.8929
P value	0.2010	0.4243	0.2351	0.6503	0.6788	0.3444			0.5026	0.3631
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes			Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns			ns	ns

Figura A5. Resultados del test de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk.

Test de ANOVA (test de significancia):

ANOVA summary	
F	41.92
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes
R squared	0.9497

Figura A6. Resultados del test de comparación de datos respecto a las bacterias no irradiadas.

Análisis estadístico en S. aureus:

La **Tabla A2** muestra las unidades formadoras de colonias obtenidas tras las 4 horas de irradiación. Con estos datos se realizaron el test de normalidad y el test de ANOVA (test de significancia) con los que se obtuvo la gráfica de la **Figura 18**.

Tabla A2. Las UFC obtenidas de *S. aureus* tras 4 horas de irradiación de los distintos *films* de PVA.

MUESTRA	UFC
NO IRRADIADO	463000
	487000
	467000
IRRADIADO	382000
	326000
	341000
<i>FILM</i> PVA	299000
	203000
	341000
<i>FILM</i> PVA SUMERGIDO EN SA	187000
	15300
	65000
<i>FILM</i> NP 1%	20000
	34000
	15000
<i>FILM</i> NP 5%	21000
	4000
	9000
<i>FILM</i> NP-BCD 1% SUMERGIDO EN SA	0
	0
	0
<i>FILM</i> NP-BCD 5% SUMERGIDO EN SA	0
	3000
	0
<i>FILM</i> NP-BCD CARGADO CON SA 1%	44000
	51000
	50000
<i>FILM</i> NP-BCD CARGADO CON SA 5%	32000
	38000
	29000

Test de normalidad:

Shapiro-Wilk test										
W	0.8710	0.9330	0.9514	0.9387	0.9304	0.9465	Invalid input data	0.7500	0.8547	0.9643
P value	0.2983	0.4998	0.5756	0.5222	0.4902	0.5542			0.2530	0.6369
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes			Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns			ns	ns

Figura A7. Resultados del test de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk.

Test de ANOVA (test de significancia):

ANOVA summary	
F	86.11
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes
R squared	0.9748

Figura A8. Resultados del test de comparación de datos respecto a las bacterias no irradiadas.

8.3.2 Eficacia bactericida de las soluciones en *E. coli* y *S. aureus*

Análisis estadístico en E. coli:

La **Tabla A3** recoge las unidades formadoras de colonias obtenidas tras las 4 horas de irradiación. Con estos datos se realizaron el test de normalidad y el test de ANOVA (test de significancia) con los que se obtuvo la gráfica de la **Figura 19**.

Tabla A3. Las UFC obtenidas de *E. coli* tras 4 horas de irradiación de las distintas soluciones.

MUESTRA	UFC
NO IRRADIADO	219000
	310000
	258000
IRRADIADO	171000
	191000
	188000
NP 1%	0
	0
	0
NP 5%	0
	0
	0
BCD 1%	144000
	163000
	186000
BCD 5%	211000
	200000
	210000
SA 1%	3000
	1000
	6000
SA 5%	0
	0
	0

Test de normalidad:

Shapiro-Wilk test								
W	0.9932	0.8596	Invalid input data	Invalid input data	0.9970	0.8176	0.9868	Invalid input data
P value	0.8428	0.2665			0.8951	0.1572	0.7804	
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes			Yes	Yes	Yes	
P value summary	ns	ns			ns	ns	ns	

Figura A9. Resultados del test de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk.

Test de ANOVA (test de significancia):

ANOVA summary	
F	112.5
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes
R squared	0.9801

Figura A10. Resultados del test de comparación de datos respecto a las bacterias no irradiadas.

Análisis estadístico en S. aureus:

En la **Tabla A4** se muestran las unidades formadoras de colonias obtenidas tras las 4 horas de irradiación. Con estos datos se realizaron el test de normalidad y el test de ANOVA (test de significancia) con los que se obtuvo la gráfica de la **Figura 20**.

Tabla A4. Las UFC obtenidas de *S. aureus* tras 4 horas de irradiación de las distintas soluciones.

MUESTRA	UFC
NO IRRADIADO	400000
	315000
	321000
IRRADIADO	200000
	155000
	152000
NP 1%	0
	0
	0
	0
NP 5%	0
	0
	0
BCD 1%	106000
	121000
	111000
BCD 5%	171000
	185000
	137000
SA 1%	5000
	8000
	7000
SA 5%	0
	0
	0

Test de normalidad:

Shapiro-Wilk test								
W	0.8027	0.7967	Invalid input data	Invalid input data	0.9643	0.9453	0.9643	Invalid input data
P value	0.1209	0.1066			0.6369	0.5491	0.6369	
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes			Yes	Yes	Yes	
P value summary	ns	ns			ns	ns	ns	

Figura A11. Resultados del test de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk.

Test de ANOVA (test de significancia):

ANOVA summary	
F	101.6
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)	Yes
R squared	0.9780

Figura A12. Resultados del test de comparación de datos respecto a las bacterias no irradiadas.