

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE SISTEMAS MICROESTRUCTURADOS DE SÍLICE COMO SOPORTE CON FUNCIÓN ANTIMICROBIANA SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: BLANCA ABRIL GISBERT

TUTOR/A: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER
TUTOR/A EXPERIMENTAL: MARÍA RUIZ RICO

Curso Académico:

VALENCIA, JULIO 2015



Título: Desarrollo de sistemas microestructurados de sílice como soporte con función antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*.

El ácido caprílico es un ácido graso saturado caracterizado como un antimicrobiano natural. Los antibióticos convencionales pueden provocar resistencia antimicrobiana, debido a ello, los consumidores están demandando el desarrollo de alternativas naturales que no supongan un problema de seguridad alimentaria. El objetivo de este trabajo fue el estudio de una nueva alternativa, el uso de partículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con el compuesto antimicrobiano llevando a cabo la determinación de la concentración mínima bactericida y su comparación con el compuesto libre sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* de colección. Los resultados mostraron que las partículas ancladas con el ácido caprílico habían tenido un correcto proceso de funcionalización, ya que se mantenía la estructura propia de la partícula, pero en cuanto a la inhibición del microorganismo ensayado, *S. aureus*, no resultó letal comparándolo con el compuesto libre. Estos resultados ponen en valor, el uso de ácido caprílico libre como antibacteriano y la búsqueda de otras alternativas al uso de sustancias antibióticas para mejorar el potencial de inhibición antimicrobiana.

Palabras clave: Partículas mesoporosas de sílice, agente antimicrobiano, concentración mínima bactericida, ácido caprílico.

Title: Development of microstructured systems of silica as a support with antimicrobial function on *Staphylococcus aureus*.

Caprylic acid is a saturated fatty acid characterized as a natural antimicrobial compound. Conventional antibiotics can produce resistant antimicrobial, and therefore, consumers demand the development of natural alternatives, which do not produce a food safety problem. The aim of this work was the study of a new alternative, the use of Mesoporous Silica Particles functionalized with the antimicrobial compound, carrying out the test of determination of the minimum bactericidal concentration and its comparison with the free compound on a collection strain of *Staphylococcus aureus*. The result showed particles functionalized with caprylic acid had proper functionalization process, because the structure of the particle was maintained, but the inhibition of the microorganism *S. aureus* was notlethal compared with the free compound. These results highlight the value the use of free caprylic acid as antimicrobial compound and the research for other alternatives to improve its potential of antimicrobial inhibition.

Key words: Mesoporous silica particles, antimicrobial agent, minimum bactericidal concentration, caprylic acid.

Títol: Desenvolupament de sistemes d'elements de sílice com a suport amb funció antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*.

L'àcid caprílic és un àcid gras saturat caracteritzat com un antimicrobià natural. Els antibiòtics convencionals poden provocar resistència antimicrobià, a causa d'això, els consumidors estan demandant el desenvolupament d'alternatives naturals que no suposin un problema de seguretat alimentària. L'objectiu d'aquest treball va ser l'estudi d'una nova alternativa, l'ús de partícules mesoporoses de sílice funcionalitzades, ancorades amb el compost antimicrobià duent a terme l'assaig de determinació de la concentració mínima bactericida i la seva comparació amb el compost lliure sobre un cep de *Staphylococcus aureus* de col·lecció Els resultats van mostrar que les partícules ancorats amb àcid caprílic tenia un correcte procés de funcionalització, manté l'estructura de la partícula, però pel que fa a la inhibició del microorganisme provat, *S. aureus*, no era letals en comparació amb compost lliure. Aquests resultats posen en valor, l'ús d'àcid caprílic lliure com propietats antibacterianes i la recerca d'alternatives a l'ús de substàncies antibiòtiques per millorar el potencial d'inhibició antimicrobians.

Paraules clau: partícules mesoporoses d'agent antimicrobià, sílice, àcid caprílic, concentració mínima bactericida.

Alumno: Dña. Blanca Abril Gisbert

Tutor acadèmic: Dña. Ana Jiménez Belenguer

Tutor experimental: Dña. María Ruiz Rico

Valencia, Julio de 2015

Índice general

I. Introducción	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1. Caracteres morfológicos y bioquímicos	1
1.1.2. Toxiinfecciones alimentarias asociadas	2
1.2. <i>Métodos para inhibir el crecimiento microbiano empleados en la industria alimentaria</i>	3
1.2.1. Métodos clásicos	3
1.2.2. Nuevas metodologías.....	4
1.3. <i>Ácidos grasos libres</i>	5
1.3.1. Características.....	5
1.3.2. Funciones.....	6
1.3.3. Actividad antimicrobiana	7
1.3.4. Mecanismo de acción	7
1.3.5. Aplicaciones	9
1.4. <i>Ácido caprílico</i>	10
1.4.1. Características.....	10
1.4.2. Actividad antimicrobiana	10
1.5. <i>Materiales mesoporosos de sílice</i>	12
1.5.1. Características.....	12
1.5.2. Aplicaciones	13
1.6. <i>Justificación de interés</i>	14
II. Objetivo y plan de trabajo	15
2.1. <i>Objetivo</i>	15
2.2. <i>Plan de trabajo</i>	15
III. Materiales y Métodos	16
3.1. <i>Síntesis del sólido mesoporoso</i>	16
3.2. <i>Anclado de ácido caprílico sobre soporte mesoporoso</i>	16
3.3. <i>Caracterización de los sólidos mesoporosos</i>	17
3.3.1. Difracción Rayos X	17

3.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	17
3.3.3. Potencial zeta	18
3.3.4. Análisis termogravimétrico	18
3.4. <i>Ensayos microbiológicos</i>	18
3.4.1. Medios de cultivo	18
3.4.2. Capas bacterianas y preparación de inóculo	19
3.4.3. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana	19
3.4.4. Siembra en placa	20
3.4.5. Microscopía de fluorescencia	21
3.5. <i>Análisis estadístico</i>	21
IV. Resultados y discusión	22
4.1. <i>Caracterización de los sólidos mesoporosos</i>	22
4.2. <i>Estudio de la actividad antimicrobiana de ácido caprílico libre</i>	26
4.2.1. Estudio cualitativo del efecto de ácido caprílico sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i> mediante fluorocromos	27
4.3. <i>Estudio de la actividad antimicrobiana de ácido caprílico anclado</i>	28
V. Conclusiones	30
VI. Bibliografía	31
VII. Anexos	i
7.1. <i>Anexo I. Composición de los medios de cultivo y suplementos</i>	i
7.2. <i>Anexo II. Recuentos microbianos</i>	ii

ÍNDICE DE TABLAS

1. Introducción	
Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas del ácido caprílico.	10
Tabla 1.2. Caracterización de los materiales mesoporosos de sílice según diámetro de poro.	12
4. Resultados y discusión	
Tabla 4.1. Tamaño de las partículas MCM-41 calcinada y MCM-41 anclada con ácido caprílico obtenidas mediante TEM y Potencial zeta. .	24
7. Anexos	
Tabla 7.1. Composición (g/L) del Agar Plate Count (PCA).	i
Tabla 7.2. Composición (g/L) del caldo Tryptic Soy (TSB).	i
Tabla 7.3. Composición (g/L) del Agar Base Baird Parker.	i
Tabla 7.4. Composición (g ó mL /L) del suplemento de emulsión estéril de yema de huevo y telurito potásico.	i
Tabla 7.5. Recuentos (log UFC/mL) de <i>S. aureus</i> en ácido caprílico libre	ii
Tabla 7.6. Recuentos (log UFC/mL) de <i>S. aureus</i> en ácido caprílico anclado.	ii

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción	
Figura 1.1. Estructura de los AGLs. (A) AGL insaturado, ácido oleico (C18:1), (B) AGL saturado, ácido palmítico (C16:0)	5
Figura 1.2. Ácido oleico (18:1) con enlace en Cis, comparado con el enlace en Trans del ácido elaidínico, isómero del ácido oleico (Lehninger, 1986)	6
Figura 1.3. Esquema de los mecanismos de acción antibacteriana de los AGLs (Debois y Smith, 2010)	8
Figura 1.4. Estructura del ácido caprílico	10
Figura 1.5. Mecanismo de síntesis del MCM-41 (Yang et al., 2013)	13
3. Material y métodos	
Figura 3.1. Funcionalización de MCM-41 con cloruro de octanoílo.....	17
4. Resultados y discusión	
Figura 4.1. Difractograma de Rayos X de las micropartículas MCM-41 (A) antes de la calcinación, (B) después de la calcinación y (C) tras el anclado del ácido caprílico.	22
Figura 4.2. TEM imagen de la micropartícula MCM-41 calcinada A (izquierda) y MCM-41 anclada con el ácido caprílico B (derecha).	23
Figura 4.3. Termogramas de MCM-41 funcionalizada con APTES (parte superior) y MCM-41 funcionalizada con ácido caprílico (parte inferior). La línea negra representa la pérdida de peso y la línea roja es la primera derivada de la línea negra y muestra los principales cambios de energía... ..	25
Figura 4.4. Inhibición (%) del crecimiento de <i>S.aureus</i> tras exposición a diferentes concentraciones (mM) de ácido caprílico libre. Las mismas letras en las barras indican miembros de un grupo homogéneo ($p < 0.001$) (Promedio y desviación estándar, $n = 3$)	26

Figura 4.5. Imágenes de microscopía de fluorescencia de *S.aureus* no tratada, control (C) y tratado con ácido caprílico libre durante 24 h (AC)27

Figura 4.6. Inhibición (%) del crecimiento de *S.aureus* tras exposición a diferentes concentraciones (mg/mL) de ácido caprílico anclado sobre micropartículas MCM-41. Las mismas letras en las barras indican miembros de un grupo homogéneo ($p < 0.001$) (Promedio y desviación estándar, $n = 3$).....28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus se clasifica en primer lugar según su dominio como bacteria, en cuanto al phylum *Firmicutes*, su clase es *Bacilli*, orden *Bacillales* perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus* y cepa *Staphylococcus aureus*.

1.1.1. Caracteres morfológicos y bioquímicos

El género *Staphylococcus* engloba un grupo de bacterias anaerobias facultativas, cocos Gram-positivos. En cuanto a su morfología son cocos inmóviles con aspecto característico en forma de racimo de uva con un diámetro aproximadamente de 0,5 a 1,5 micrómetros. Se caracterizan porque su pared celular está compuesta de peptidoglicano y ácidos teicoicos (Doyle, Beuchat y Montville, 1997). Son productoras de enterotoxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente. Poseen un metabolismo respiratorio y fermentativo. Sus principales productos del metabolismo aerobio de la glucosa son el acetato y el dióxido de carbono. Su poder fermentativo es alto, degradando con facilidad muchos azúcares como glucosa, sacarosa, fructosa o manosa, entre otros, para dar lugar a ácidos como el ácido láctico. Son oxidasa negativo y catalasa positivo (Pascual, 2005).

Tras siembra en placa se caracteriza por formar colonias lisas, brillantes, circulares y translúcidas. De manera individual, las colonias son de un tamaño entre 6 y 8 mm de diámetro en medios no selectivos. El pigmento de las colonias es variable, primordialmente producen pigmentos naranjas y amarillos debido a los carotenoides localizados en su membrana celular (Adams y Moss, 1997).

El crecimiento de la bacteria depende de diferentes parámetros como la temperatura, pH, cloruro sódico, y la actividad de agua. En cuanto a la temperatura, su temperatura óptima está comprendida entre 30 y 37 °C. Crecen entre 46 °C y 6 °C, siendo la temperatura máxima y mínima tolerada, respectivamente. Además hay que destacar que resiste a la congelación (-20°C) tanto la propia bacteria como sus enterotoxinas. Su pH óptimo está comprendido entre 6 y 7. Este género de bacteria tolera concentraciones elevadas de cloruro sódico entre 0% y 20%. Respecto a la actividad de agua es un microorganismo resistente a un ambiente reducido en agua activa, resiste a la desecación con límites de actividad de agua entre 0,83 y 0,99 (Pascual, 2005).

S. aureus es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la

industria alimentaria. El principal reservorio son los animales y humanos, formando parte de la microbiota en la piel, cabello, fosas nasales y garganta (Hayes, 1993).

Esta especie es la causante de un gran número de intoxicaciones alimentarias en el hombre, así como de infecciones en la piel y mucosas. Existe una alta tasa de portadores humanos, en la que los manipuladores de alimentos juegan un papel muy importante (Gilbert, 1983). Los animales son el reservorio en el que se encuentra la bacteria situándose principalmente en las amígdalas del cerdo, así como en la leche procedente de vacas sanas, y más frecuente en vacas con mastitis.

Entre las infecciones más comunes producidas por *S. aureus* destacan infecciones de la piel y mucosas como foliculitis y forúnculos; infecciones metastásicas como meningitis, artritis; síndrome de la piel escaldada; síndrome del shock tóxico; enterocolitis estafilocócica consecuencia de tratamientos prolongados con antibióticos y toxiinfección alimentaria de infección aguda como consecuencia de la ingestión de toxinas preformadas en los alimentos conocida como estafiloenterotoxemia o entafiloenterotoxiosis.

1.1.2. Toxiinfecciones alimentarias asociadas a *Staphylococcus aureus*

La estafiloenterotoxiosis, estafiloenterotoxemia o intoxicación estafilocócica, es una intoxicación de origen alimentario producida por la ingestión de un alimento, el cual ha sido contaminado con alguna de las cepas tóxicas de *S. aureus* y se ha multiplicado produciendo enterotoxinas.

Lo más destacado de esta bacteria es la capacidad para producir las enterotoxinas. Éstas son sustancias termorresistentes (resisten 100 °C), solubles en agua, débilmente antigénicas y están formadas por un grupo heterogéneo de proteínas globulares y cadenas sencillas de polipéptidos. Su peso molecular oscila entre 26.000 y 29.000 Da. Actualmente se reconocen nueve enterotoxinas serológicamente distintas: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, F y G (Bergdoll, 1983; Reiser, 1984). Las cepas de *S. aureus* de tipo A, de origen humano son las más frecuentemente asociadas a los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica, seguidas de las cepas de tipo D.

La intoxicación estafilocócica es un síndrome gastrointestinal caracterizado por su aparición brusca, que se manifiesta con náuseas intensas y vómitos, acompañados de dolor abdominal, diarrea, calambres, cefalea. La duración de la enfermedad es de 24-48 h seguida de una recuperación rápida. No se trata de una enfermedad grave, siendo mortal excepcionalmente (Bergdoll, 1979). El tratamiento de estafiloenterotoxiosis se basa en la administración de gentamicina y cefalosporina.

El periodo de incubación y la gravedad de la estafiloenterotoxiosis dependen de la cantidad de alimento contaminado consumido, la concentración de enterotoxina en el alimento, la cantidad de enterotoxina ingerida con el alimento y la susceptibilidad de la persona afectada. Se transmite a través de portadores asintomáticos de *S. aureus* que manipulan los alimentos o cuando las condiciones de conservación no son las adecuadas, es decir, cuando los alimentos no se han mantenido a temperaturas superiores a 60 °C antes de su consumo o inferiores a 7,2 °C para ser conservados.

Los alimentos implicados en la intoxicación estafilocócica son principalmente productos lácteos (leche pasteurizada, quesos, mantequilla), carnes y productos cárnicos, pescados, huevos cocidos, ensaladillas, y cremas pasteleras. La temperatura óptima de crecimiento de *S. aureus* se sitúa por encima de 6 °C, sin embargo, si los alimentos son contaminados durante su preparación, no se refrigeran y se mantienen a temperatura ambiente, *S. aureus* prolifera rápidamente y produce la enterotoxina (Pascual, 2005).

La dosis tóxica mínima de la intoxicación estafilocócica es inferior a 1 microgramo, nivel que alcanza cuando la población de *S. aureus* supera 10⁵ unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (UFC/g). (Bennett, 1986)

1.2. MÉTODOS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICROBIANO EMPLEADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.2.1. Métodos clásicos

Entre los métodos clásicos para inhibir el crecimiento microbiano podemos distinguir entre tratamientos físicos, principalmente el tratamiento térmico, y métodos químicos como los conservantes alimentarios.

Dentro del término tratamiento térmico se engloban todos los procedimientos que tienen como fin la destrucción de los microorganismos mediante aplicación de calor. Para ello, se debe tener en cuenta el microorganismo, espora o enzima objeto y su termorresistencia, así como el pH, las propiedades termo-físicas y la carga microbiana inicial del alimento.

En cuanto a los diferentes métodos térmicos podemos distinguir entre pasteurización y esterilización. Estos dos procesos térmicos destruyen la actividad microbiana y enzimática pero producen ciertos daños en los alimentos como cambios de las propiedades organolépticas de los mismos. En general, se ve afectado el color como consecuencia de la degradación de la mayoría de pigmentos (oximioglobina y mioglobina de carnes, clorofila, carotenos y antocianinas de vegetales), así como la textura, por coagulación y la pérdida de la capacidad de retención de agua de las proteínas y gelatinización del almidón. Del mismo modo, se ve afectado el valor

nutritivo de los alimentos, ya que se producen pérdidas de vitaminas principalmente. (Holdsworth, 1987). Por todo ello, la industria alimentaria trata de llevar a cabo tratamientos térmicos con aplicación de temperaturas más elevadas con la consecuente reducción en los tiempos de proceso, de forma que el producto retenga al máximo sus cualidades organolépticas y nutritivas.

Otro de los métodos clásicos antimicrobianos es el uso de aditivos, dentro de esta definición existen diferentes grupos de aditivos entre ellos los conservantes, los cuales evitan el deterioro de los alimentos debido a la acción de los microorganismos y alteraciones químicas y bioquímicas.

Las condiciones que deben cumplir para poder permitir el uso son: inocuidad, solubilidad, efectividad en el pH del alimento así como que no produzca olor y sabor extraños a niveles efectivos. Los principales aditivos conservantes son: sal, sulfitos, nitratos y nitritos, benzoatos y sorbatos y ácido propiónico,

Actualmente se está intentado restringir el uso de los conservantes químicos tradicionales debido a los efectos negativos que pueden llegar a producir como por ejemplo la formación de nitrosaminas y derivados, es decir, compuestos cancerígenos, que destruyen la vitamina B1 y pueden producen síntomas como dolor cabeza, alergias o asma.

1.2.2. Nuevas metodologías

Hasta este momento la aplicación de tratamientos térmicos intensos y el uso de conservantes químicos han sido las metodologías mayoritariamente empleadas por la industria para asegurar la inocuidad de los alimentos y alargar su vida útil. Debido a que el consumidor prefiere alimentos frescos o mínimamente procesados, que mantengan todas sus características y sin aditivos químicos estas metodologías están siendo sustituidas por otras que cumplan las expectativas del consumidor (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Ross *et al.*, 2003). Dentro de las nuevas metodologías podemos diferenciar entre tratamientos físicos y tratamientos químicos.

Entre las técnicas físicas desarrolladas se incluye la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH). Este tratamiento es capaz de inactivar microorganismos patógenos y/o alterantes (Alpas *et al.*, 1999; Chen y Hoover, 2003; Pina-Pérez *et al.*, 2009; Saucedo-Reyes *et al.*, 2009) mediante la combinación de altas presiones junto a enzimas como la lactoperoxidasa y la lisoenzima. Este tratamiento ha mostrado buenos resultados, ya que las enzimas actúan desestabilizando la membrana celular para que posteriormente la aplicación de APH sea más eficaz (Vannini *et al.*, 2004).

Otro tratamiento físico destacado en los últimos años es la aplicación de ozono, el cual fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 2001 como “un agente antimicrobiano para el tratamiento, almacenamiento y procesado de alimentos tanto en fase gaseosa como

acuosa”. Por otra parte, la radiación ultravioleta (UV) junto con agentes antimicrobianos, tales como ácido cítrico, peróxido de hidrógeno y dicarbonato de dimetilo han mostrado la potenciación del efecto antimicrobiano (Parikh *et. al.*, 2012).

Otras metodologías empleadas para la inhibición de microorganismos son el uso de dióxido de carbono supercrítico y el uso de ultrasonidos, técnicas con mayor complejidad, así como recubrimientos comestibles y envasado en atmósfera modificada.

Entre los compuestos antimicrobianos naturales destacan los metabolitos de plantas, como los aceites esenciales o ciertos ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, ciertas enzimas y proteínas animales como la lisozima así como compuestos de origen microbiano como las bacteriocinas, entre las que destaca la nisina

1.3. ÁCIDOS GRASOS LIBRES

1.3.1. Características

Los ácidos grasos libres (AGLs) son moléculas formadas por una cadena de átomos de carbono unida a átomos de hidrógeno. El número de átomos de carbono varía en función de cada molécula, encontrándose en los sistemas biológicos normalmente AGLs pares de 10 a 28 átomos de carbono. Todos los ácidos grasos poseen una cadena hidrocarbonada larga, la cual es insoluble en agua, con un grupo carboxílico (-COOH) terminal hidrofílico, y en el otro extremo un grupo metilo hidrófobo (-CH₃). Por ello, los ácidos grasos son moléculas anfipáticas. La cadena hidrocarbonada puede ser saturada donde todos los átomos de carbono de la molécula se encuentran unidos por enlaces simples (C-C), como el ácido palmítico, o puede tener uno o varios dobles enlaces (C=C) formándose así ácidos grasos insaturados como en el caso del ácido oleico (Figura 1.1.).

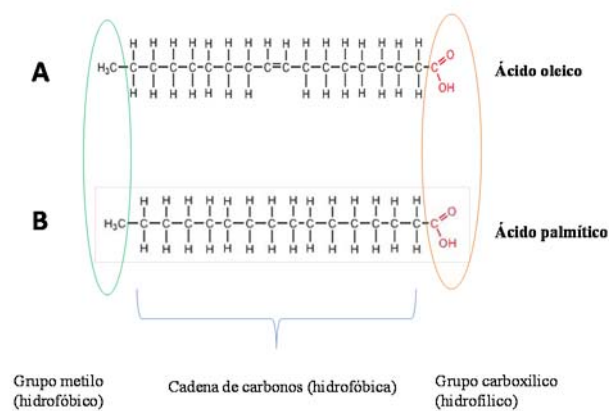


Figura 1.1. Estructura de los AGLs. (A) AGL insaturado, ácido oleico (C18:1), (B) AGL saturado, ácido palmítico (C16:0).

Los ácidos grasos difieren entre sí por la longitud de su cadena pudiendo dividirse en ácidos grasos de cadena corta, cuyo número de átomos de carbono es inferior a 8, ácidos grasos de cadena media compuestos por 8-14 carbonos y ácidos grasos de cadena larga los cuales presentan más de 14 átomos de carbono. Así mismo, los ácidos grasos se pueden clasificar según el número y la posición de sus dobles enlaces, cuando los grupos acilo (átomos de hidrógeno) se encuentran en el mismo lado del doble enlace se conoce como enlace *Cis*, como en el caso del ácido oleico (18:1). Cuando los grupos acilo están en el lado opuesto del doble enlace se denomina enlace *Trans*, como en el caso del ácido elaidínico, el isómero *Trans* del ácido oleico (Figura 1.2).

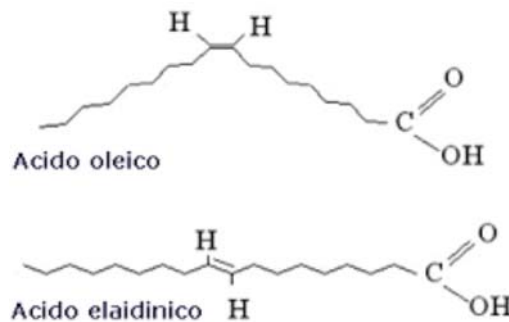


Figura 1.2. Ácido oleico (18:1) con enlace en *Cis*, comparado con el enlace en *Trans* del ácido elaidínico, isómero del ácido oleico (Lehninger, 1986).

El punto de fusión de los ácidos grasos aumenta a medida que el número de átomos de carbono aumenta y disminuye con la presencia de enlaces dobles en la molécula. Los ácidos grasos de cadena corta y media son líquidos a temperatura ambiente mientras que los ácidos grasos de cadena larga se encuentran en estado sólido.

1.3.2. Funciones

Las funciones básicas de los ácidos grasos se pueden clasificar como función energética, estructural y reguladora. La función energética se fundamenta en los triglicéridos, los cuales son la principal fuente de energía metabólica. Sirven de almacenamiento de la energía a largo plazo en forma de lípidos, ya que al ser hidrófobos, tienen la dificultad de ser transportados en medio acuoso por lo que no pueden ser utilizados como combustible metabólico de uso inmediato. Por otra parte, el principal papel estructural de los lípidos es contribuir al mantenimiento de la estructura de la membrana plasmática y de las membranas subcelulares.

Los fosfolípidos, glicolípidos y colesterol son componentes fundamentales de la membrana plasmática. Así mismo, los AG tienen función reguladora ya que son precursores de compuestos con actividad reguladora de diversos procesos vitales como lubricantes de las superficies

corporales, transporte de vitaminas liposolubles y actúan como precursores de hormonas y de otras moléculas de señalización a nivel extracelular e intracelular. (Martínez y García, 2006)

Además de estas funciones esenciales para el organismo los ácidos grasos presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos.

1.3.3. Actividad antimicrobiana

Los ácidos grasos libres y sus monoglicéridos poseen múltiples actividades antimicrobianas para un elevado rango de microorganismos como bacterias, virus y patógenos (Wang y Johnson, 1992; Petschow *et al.*, 1996; Bergsson *et al.*, 1998, 1999, 2001). Estos compuestos presentan gran actividad antimicrobiana frente un amplio espectro de patógenos como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *E. sakazakii*, *Chlamydia trachomatis* y *Helicobacter pylori* (Jang y Rhee, 2009).

La actividad antibacteriana de cada ácido graso está influenciada por su estructura y forma. Dicha actividad es función de la longitud de la cadena de carbonos y la presencia, número, posición y orientación de enlaces dobles. En general, la actividad antimicrobiana de los AGLs aumenta con la longitud de la cadena y el número de enlaces dobles. Los ácidos grasos que presentan sus dobles enlaces en *Cis* tienden a tener mayor actividad antibacteriana que los ácidos grasos libres con dobles enlaces en *Trans* debido a que la estructura de los AGL insaturados *Trans* son semejantes a los ácidos grasos saturados los cuales presentan menor actividad antimicrobiana, para el mismo número de carbonos (Debois y Smith, 2009). En cuanto los ácidos grasos saturados se ha establecido que los AG con cadena hidrocarbonada entre 10 y 12 átomos de carbono son los más activos frente al crecimiento microbiano.

La actividad antimicrobiana de los AGLs más elevada se ha observado frente a bacterias Gram-positivas (Nieman, 1954; Thormar *et al.*, 1987; Nobmann *et al.*, 2009).

1.3.4. Mecanismo de acción de los AGLs

El mecanismo de acción de los AGLs no está suficientemente claro, pero se conoce que el efecto principal de los AGLs frente a las bacterias es la actuación sobre la membrana celular y los diversos procesos esenciales que ocurren dentro de esta membrana. El mecanismo específico por el cual cada AGL afecta a la viabilidad de las células bacterianas dependerá de su estructura y de la bacteria diana (Desbois y Smith, 2010). En la Figura 1.3 se muestran los principales efectos y mecanismos de acción producidos por los AGLs.

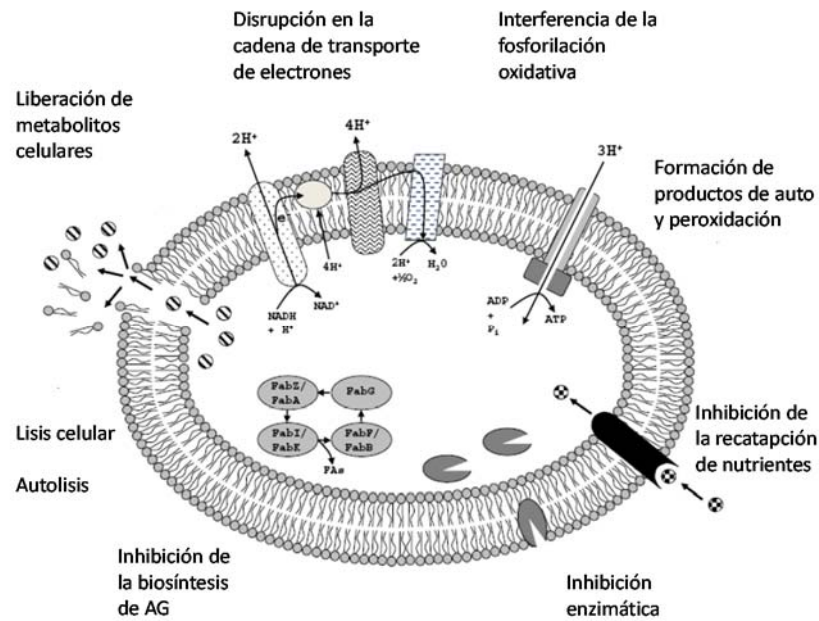


Figura 1.3. Esquema de los mecanismos de acción antibacteriana de los AGLs (Desbois y Smith, 2010).

El carácter anfipático de los AGLs les permite interactuar con la membrana bacteriana creando poros transitorios de tamaño variable. Además, a mayor concentración de AGLs mayor potencia inhibitoria, lo cual permite que los AGLs lleguen a solubilizar la membrana hasta liberar proteínas o secciones grandes de la bicapa lipídica al medio extracelular (Kabara *et al.*, 1972). Este efecto, junto con el aumento de la permeabilidad de la membrana por la inserción de AGLs, podría ser la causa de la pérdida de metabolitos celulares o de la lisis celular completa y autólisis.

La membrana de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas es el lugar donde existe una gran producción de ATP y donde se encuentra la cadena de transporte de electrones. El efecto que producen los AGLs sobre la membrana bacteriana, el cual causa una reducción del ATP, se debe a la interferencia de los AGLs sobre la cadena de transporte de electrones o a la disrupción de la fosforilación oxidativa. Los AGLs saturados de cadena media y larga pueden unirse a los transportadores de la cadena de electrones directamente o insertarse en la membrana interna causando un desplazamiento. Esta acción alteraría su habilidad para transferir electrones, reduciendo el gradiente de protones y el potencial de membrana, dando como resultado una reducción en la producción de ATP (Desbois y Smith, 2010).

Así mismo, se ha observado que la producción de compuestos de degradación secundarios de los AGLs, producidos por peroxidación, tales como H_2O_2 y especies reactivas de oxígeno, o por autooxidación, como oxilipinas y aldehídos de cadena corta (Desbois y Smith, 2010).

Otros estudios han demostrado que la inhibición de enzimas en la membrana o citosol, las cuales son necesarias para el crecimiento y desarrollo de la bacteria, podrían ser responsables de algunos de los efectos antimicrobianos de los AGLs. A su vez, no está claro si los AGLs reducen la absorción de nutrientes mediante la interrupción directa en las proteínas transportadoras de la membrana o como resultado indirecto en la fuerza motriz de protones que requieren para la producción de ATP (Desbois y Smith, 2010).

1.3.5. Aplicaciones

El amplio espectro de actividad y el modo de acción no específico que poseen algunos de los AGLs los hacen atractivos como agentes antibacterianos para diversas aplicaciones en medicina, agricultura, industria alimentaria y la formulación de cosméticos, especialmente cuando el uso de antibióticos convencionales está restringido o prohibido (Desbois y Smith, 2010).

Las propiedades antibacterianas que tienen los AGLs no se han fomentado en gran escala a pesar de tener un elevado potencial antimicrobiano. Una de las razones por las cuales no se ha explotado plenamente es porque los AGLs de cadena larga poliinsaturados son inestables y tienden a unirse de manera inespecífica a las proteínas u otros compuestos perdiendo su actividad antimicrobiana (Kodicek y Worden, 1945), a pesar de ello, dichos compuestos están siendo usados medicina como alternativa a antibióticos en infecciones, caries, acné, o úlceras de estómago causadas por *Helicobacter pylori* (Debois y Smith, 2010).

En cuanto a la ganadería y acuicultura el uso de tratamientos antibióticos tradicionales está causando problemas por la transferencia de resistencia a los antibióticos a humanos, transferencia de patógenos y la contaminación ambiental debida a residuos (Smith *et al.*, 2002). Esto ha dado lugar a la prohibición, por parte de la Unión Europea, del uso de antibióticos convencionales en el ganado destinado a productos alimenticios (UE, 2005). Ante esta problemática surge la alternativa de los AGLs, los cuales reemplazan a los agentes antimicrobianos convencionales. Además, los AGLs aportan otras propiedades beneficiosas tanto al ganado como a los productos alimenticios. Por ejemplo, los AGLs son también activos frente a microorganismos productores de metano, Archaea (metanógenos), en los intestinos de los rumiantes, con lo que se podrían reducir las emisiones de este importante gas de efecto invernadero. El inconveniente de esta aplicación es que no es rentable económicamente, y por ello se está fomentando el cultivo y cosecha de algas unicelulares con fuente de AGLs como alternativa para que sea más rentable a nivel económico (Debois y Smith 2010).

1.4. ÁCIDO CAPRÍLICO

1.4.1. Características

El ácido caprílico o químicamente llamado ácido octanoico, es un ácido graso saturado de cadena media de 8 carbonos (Figura 1.4.). Se encuentra de forma natural en el aceite de coco, almendra y palma, así como en la leche de rumiantes y la leche materna humana (Hulankova *et al.*, 2013).

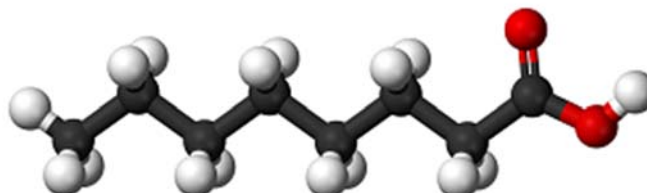


Figura 1.4. Estructura del ácido caprílico.

Las propiedades físico-químicas del ácido caprílico se muestran en la Tabla 1.1. Entre dichas propiedades destaca el intenso aroma y sabor a rancio. Dado su gran poder aromático, la aplicación del ácido caprílico en los alimentos está limitado, especialmente si se necesita elevada concentración para obtener el mismo efecto microbiano (Barbosa *et al.*, 2009).

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas del ácido caprílico.

Ácido caprílico (C8:0)	
<i>Formula molecular</i>	C ₈ H ₁₆ O ₂
<i>Peso molecular</i>	144.21 g/mol
<i>Apariencia</i>	Líquido aceitoso incoloro
<i>Densidad</i>	0.910 g/cm ³
<i>Punto de fusión</i>	16.7 °C
<i>Punto de ebullición</i>	239 °C
<i>Solubilidad en agua</i>	0.068 g/100 ml
<i>Acidez (pK_a)</i>	4.89

1.4.2. Actividad antimicrobiana

En los últimos años, la investigación acerca de la seguridad microbiológica y la vida útil de los alimentos se ha centrado en los antimicrobianos naturales como resultado de la preocupación de los consumidores en materia de aditivos sintéticos. El ácido caprílico se sabe que tiene propiedades antibacterianas contra una amplia gama de bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas (Jang y Rhee, 2009). Además, según el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos

en Aditivos Alimentarios se considera seguro el uso de ácido caprílico como aromatizante (JECFA, 1999) y en los EE.UU está aprobado el uso de ácido caprílico para la aplicación superficial en carne y productos cárnicos RTE (USDA-FSIS, 2012). Por tanto, el estudio de la incorporación de ácido caprílico en alimentos para prevenir o reducir el desarrollo de la población microbiana ha sido estudiado en los últimos años. Se conoce que actúa con mayor potencia sobre las bacterias Gram-positivas que contra las Gram-negativas debido a su variación en la estructura externa y la permeabilidad de la membrana de dichas bacterias.

Como ya se ha nombrado anteriormente, el mecanismo de acción del ácido caprílico no se conoce con exactitud, pero se cree que la diana principal es la membrana celular, donde el ácido caprílico probablemente altera la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Desbois y Smith, 2010).

La eficacia del efecto bactericida del ácido caprílico ha sido estudiada en productos como leche en polvo para lactantes donde la población de *Cronobacter spp* se vio reducida con la combinación de temperatura y el ácido caprílico, ya que el ácido graso se solubiliza mejor a elevadas temperaturas inhibiendo la viabilidad de las células bacterianas por lisis de sus membranas (Jang y Rhee, 2009).

En cuanto a estudios realizados mediante ensayos *in vivo* en animales, se ha demostrado el potencial de este ácido graso como sustituto natural de los antibióticos convencionales. La administración en la dieta de ácido caprílico ha demostrado ser efectiva reduciendo la mortalidad debido a enfermedades del tracto gastrointestinal en conejos (Skrivanová y Marounek, 2006, Skrivánová *et al.*, 2008) y reduciendo la población de *Campylobacter* en pollos de granja (Solís *et al.*, 2010).

El uso del ácido caprílico libre en los productos alimentarios presenta un inconveniente que provoca el rechazo del consumidor debido al efecto negativo de su olor intenso a rancio (Hulankova *et al.*, 2013). Por ello, se ha propuesto la encapsulación del mismo con el objetivo de enmascarar el olor. Un reciente estudio ha desarrollado un nuevo sistema de encapsulación del ácido caprílico basado en nanopartículas mesoporosas de óxido de silicio, obteniéndose un sistema antimicrobiano que mantiene la actividad antimicrobiana del compuesto libre sobre diferentes microorganismos asociados a toxiinfecciones alimentarias como *S.aureus*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*. (Ruiz-Rico *et al.*, 2015).

1.5. MATERIALES MESOPOROSOS DE SÍLICE

1.5.1. Características

Los materiales mesoporosos de sílice son materiales sintéticos que cuentan con gran superficie específica, uniforme, distribución de tamaño de poro relativamente pequeño, y poro bien definido (Park y Pendleton, 2012). Las partículas porosas se caracterizan dependiendo de su diámetro de poro en microporosa, mesoporosa, macroporosa (Corma, 1997), tal y como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Caracterización de los materiales mesoporosos de sílice según diámetro de poro.

MICROPOROSO	$\leq 2 \text{ nm}$
MESOPOROSO	$\leq 2 \text{ nm} \leq d \leq 50 \text{ nm}$
MACROPOROSO	$\geq 50 \text{ nm}$

En cuanto a las características físicas que han permitido su aplicación, en el área de la medicina principalmente, como sistemas de liberación controlada destacan el tamaño ajustable que puede variar desde 50 hasta 1500 nm, la estabilidad química y térmica, el tamaño de poro ordenado que puede ser modificado para regular el cargado y la liberación de compuesto activos, la gran superficie en relación al volumen de partícula y el volumen del poro elevado lo cual produce mayor superficie de contacto (Ravishankar y Jamuna, 2011), y la fácil funcionalización de la superficie exterior de la partícula.

Dentro de los diferentes sólidos mesoporosos de sílice destaca el material MCM-41. MCM-41 (Mobil Composition of Matter) se caracteriza por su sencillez estructural, con estructura de poros hexagonal y unidimensional, por sus propiedades fisicoquímicas y su fácil preparación. Está constituido por tetraedros $[\text{SiO}_4]^{-4}$ unidos entre sí formando mesoporos cilíndricos de 2 a 3 nm ordenados hexagonalmente (Ciesla y Schüth, 1999).

La síntesis de los sólidos MCM-41 se realiza, según aparece en la Figura 1.5. a partir de la polimerización de una fuente de sílice sobre micelas de surfactante. La organización molecular está definida por las interacciones electrostáticas entre el surfactante, cargado positivamente, y las especies silicato, cargadas negativamente. Las micelas de forma cilíndrica interactúan con las especies silicato, que forman la pared, dando lugar a una sílice tubular, ordenada alrededor de la superficie externa de las micelas (Tarn *et al.*, 2012). Una vez completado este proceso, el surfactante CTABr se elimina a través de la calcinación o extracción con disolventes orgánicos. El sólido MCM-41 formado estará listo para ser cargado y/o funcionalizado con diversas moléculas y compuestos activos según los diferentes fines donde se quiera aplicar.

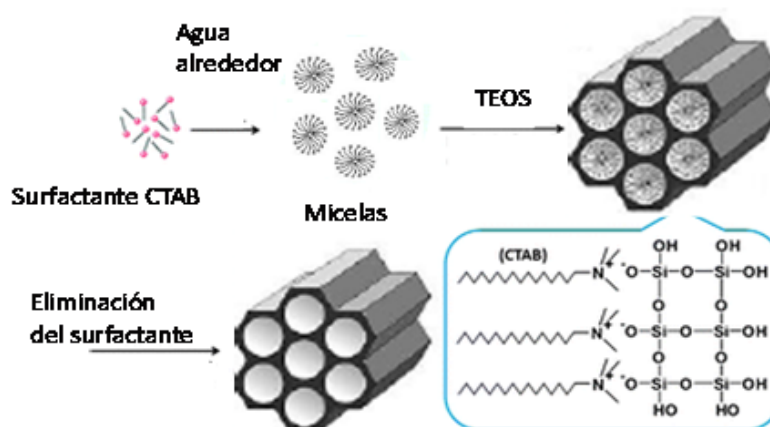


Figura 1.5. Mecanismo de síntesis del MCM-41 (Yang *et al.*, 2013).

1.5.2. Aplicaciones

Los sólidos mesoporosos de sílice están siendo utilizados para diferentes aplicaciones en el ámbito de la investigación, ya que ofrecen una forma innovadora para encapsular y administrar medicamentos y componentes biológicamente activos (Pérez-Esteve *et al.*, 2014). Con el uso de estos materiales se pretende mejorar y reducir las dosis de administración de compuestos bioactivos empleados en la actualidad, frente al desarrollo de nuevos medicamentos.

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas mesoporosos con aplicación en biomedicina para el tratamiento del cáncer, enfermedades degenerativas o regeneración ósea como soportes para la liberación controlada (Argyo *et al.*, 2014). Por otra parte, los materiales mesoporosos pueden ser usados en la industria alimentaria en sectores como los alimentos funcionales o embalaje. Si bien ya se ha establecido que estas partículas desempeñan un papel importante en la administración de fármacos, dichos materiales pueden ser usados para la encapsulación de compuestos bioactivos tales como vitaminas y enzimas para mejorar las características nutricionales y organolépticas de los alimentos (Hudson *et al.*, 2008). Así mismo, los materiales mesoporosos de sílice pueden ser usados como indicadores capaces de identificar determinadas sustancias y/o materiales en los alimentos que pueden ser tóxicos si se ingieren. Existen diversos ejemplos en la bibliografía como los materiales desarrollados por Climent *et al.* (2009) que se usaron como sensores para revelar los niveles de metilmercurio en muestras de agua; soportes desarrollados por Liu *et al.* (2011) usados como etiquetas biológicas con el fin de identificar los residuos de estreptomycin en la leche, miel, y despojos, o la determinación de pesticidas en las frutas y verduras (Zhao *et al.*, 2000).

A pesar del gran interés de las aplicaciones que tienen los materiales mesoporosos de sílice, la inocuidad de los mismos todavía no está claramente establecida. Los numerosos estudios

encontrados en la literatura han evidenciado que hay grandes diferencias en el potencial toxicológico de las partículas mesoporosas de sílice en función de sus diversas propiedades físicoquímicas. Los estudios sugieren que la toxicidad de estas partículas depende principalmente de la morfología (tamaño/forma), la agregación, cargas superficiales, hidrofobicidad, biopersistencia y dosis (Hudson *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo las partículas de sílice inducen toxicidad a nivel celular no se conoce exactamente (Heikkilä, 2010). En general, los estudios de toxicidad han mostrado que las micropartículas presenta escasa toxicidad en función de las nanopartículas, sobre todo las de menor tamaño, y la funcionalización de la superficie de los materiales con moléculas orgánicas incrementa la biocompatibilidad de las mismas (He *et al.*, 2009; Tang y Chen, 2012).

1.5. JUSTIFICACIÓN DE INTERÉS

Los agentes antimicrobianos son compuestos químicos que inactivan e inhiben el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos o aquellos responsables del deterioro. El uso de antimicrobianos tradicionales en medicina y veterinaria para tratar infecciones supone la aparición de riesgos para la salud pública, derivados de la aparición de resistencias a microorganismos, por lo que organizaciones internacionales como la OMS, recomiendan la disminución de estos compuestos en alimentos así como en animales destinados a la producción de alimentos. Dicha recomendación ha desencadenado que en la industria agroalimentaria se fomenta la investigación de tratamientos alternativos a los antimicrobianos tradicionales así como métodos alternativos de administración para reducir la dosis de los tratamientos. Entre los métodos alternativos destacan el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas, animales o microorganismos, entre los cuales el uso de aceites esenciales de plantas o compuestos activos de éstos y ácidos grasos libres tienen cada vez un papel más importante.

Los ácidos grasos libres de cadena media presentan demostrada actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos. La incorporación de ácido caprílico libre en alimentos inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos y aumenta la vida útil de los productos, lo cual garantiza la seguridad e inocuidad de los alimentos (Choi *et al.*, 2013) El inconveniente del uso del ácido caprílico libre es su rechazo sensorial, ya que presenta un intenso olor a rancio que afecta a las propiedades organolépticas de los alimentos. Por ello, en este estudio se plantea una alternativa a la administración del ácido graso libre. El estudio se basa en el anclado del ácido caprílico sobre micropartículas mesoporosas de óxido de silicio con el objetivo de mantener la actividad antimicrobiana del ácido graso evitando el rechazo sensorial asociado a su administración en forma libre.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la influencia de micropartículas de sílice mesoporosas (MCM-41) funcionalizadas con ácido caprílico sobre la viabilidad bacteriana de *Staphylococcus aureus*.

Para alcanzar este objetivo general se plantearon diversos objetivos específicos como la caracterización del sólido MCM-41 sintetizado y funcionalizado mediante distintas técnicas instrumentales, la determinación de la concentración mínima bactericida del ácido caprílico libre y la determinación de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico inmovilizado en el soporte mesoporoso sobre *Staphylococcus aureus*.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión bibliográfica relacionada con el objeto de este estudio
2. Síntesis de las micropartículas mesoporosas MCM-41
3. Anclado del ácido caprílico sobre el soporte MCM-41
4. Caracterización de las micropartículas mesoporosas MCM-41
 - 4.1 Difracción de rayos X
 - 4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)
 - 4.3 Análisis termogravimétrico (TGA)
 - 4.4 Potencial zeta
5. Estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico libre sobre *Staphylococcus aureus*
 - 5.1 Preparación de los medios de cultivo
 - 5.2 Preparación del inóculo
 - 5.3 Determinación de la concentración mínima bactericida mediante el método de macrodilución y el recuento en placa
 - 5.4 Microscopía de fluorescencia
6. Estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico anclado en el soporte MCM-41 sobre *Staphylococcus aureus*
 - 6.1 Preparación de los medios de cultivo
 - 6.2 Preparación del inóculo y suspensión de partículas
 - 6.3 Determinación de la viabilidad celular mediante recuento en placa
7. Tratamiento estadístico de los datos
8. Evaluación de los resultados y elaboración de un informe final

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SÍNTESIS DEL MATERIAL MESOPOROSO

La síntesis del sólido mesoporoso MCM-41 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Pérez-Esteve *et al.* (2015) empleando trietanolamina (TEA) como agente director de la estructura, tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor inorgánico y fuente de sílice y bromuro dehexadeciltrimetilamonio (CTAB) como agente surfactante catiónico. Todos los reactivos y disolventes empleados en las etapas de síntesis y funcionalización fueron suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid, España).

La síntesis de las micropartículas MCM-41 se realizó siguiendo la denominada “ruta de los atranos”. La relación molar entre los reactivos empleados fue la siguiente: 7 TEA: 2 TEOS: 0.52 CTAB: 0.5 NaOH: 180 H₂O.

En un vaso de precipitados de 250 mL se pesaron 52.4 g de TEA y seguidamente se adicionaron 0.98 g de hidróxido sódico (NaOH) disueltos en 2 mL de agua. La mezcla se calentó en una placa calefactora a 120 °C en agitación a 300 rpm. Al alcanzar dicha temperatura, ésta se redujo a 70 °C en la misma placa calefactora, se añadieron 11 mL de TEOS y se aumentó la temperatura hasta 118 °C. A continuación, se añadieron lentamente 9.36 g de CTAB para formar las micelas a partir de las cuales se forma la estructura de sílice. Tras esto, la temperatura se disminuyó de nuevo a 70 °C, se añadieron 180 mL de H₂O destilada, se aumentó la agitación a 700 rpm y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la mezcla se introdujo en un recipiente hermético de teflón y se dejó en estufa a 100 °C durante 20-24 h. Tras esto, se realizaron lavados con agua y etanol hasta pH neutro mediante filtración a vacío para facilitar la eliminación del surfactante. Tras el lavado, el sólido se secó a 72 °C durante 24 h, obteniéndose las partículas **S0**. El sólido **S0** se calcinó a 550 °C durante 5 h, para eliminar los restos de surfactante, dando lugar al sólido **S1**.

3.2. ANCLADO DE ÁCIDO CAPRÍLICO SOBRE SOPORTE MCM-41

La superficie del sólido MCM-41 desnudo (**S1**) fue funcionalizada con ácido caprílico obteniendo así el sólido final (**S2**). En primer lugar, se llevó a cabo la funcionalización del soporte con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), y tras esto, se realizó el anclado del ácido graso entre el grupo carboxílico terminal y el grupo amino previamente inmovilizado, obteniendo un soporte con cadenas hidrocarbonadas con el grupo metilo terminal.

La funcionalización con APTES se realizó mediante la suspensión de 1 g de sólido (**S1**) en 30 mL de acetonitrilo y adición de 2 mL de APTES (8 mmol/g). La mezcla se mantuvo en agitación 5.5 h a temperatura ambiente. Tras esto, la mezcla se filtró a vacío, se lavó con 100 mL de acetonitrilo y se secó a 37 °C.

Tras la obtención del sólido funcionalizado con APTES se llevó a cabo la funcionalización con cloruro de octanoílo. Para ello, 1 g del sólido anterior se suspendió en 40 mL de diclorometano y a esta suspensión se adicionaron 1.47 mL de N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA). Dicha mezcla se enfrió en un baño de hielo hasta 0 °C, y una vez alcanzada la temperatura se adicionaron 1.2 mL de cloruro de octanoílo gota a gota. La suspensión final se mantuvo en agitación 2 h a temperatura ambiente, tras lo cual se filtró a vacío, se lavó con 100 mL de diclorometano y se secó a 37 °C obteniendo el sólido final **S2**. La reacción que tiene lugar se muestra en la Figura 3.1.

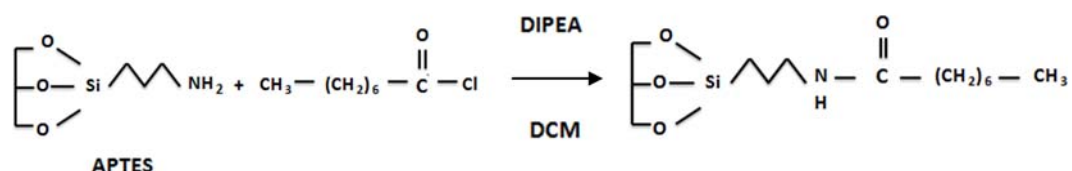


Figura 3.1. Funcionalización de MCM-41 con cloruro de octanoílo.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SÓLIDOS MESOPOROSOS

La caracterización estructural de las micropartículas obtenidas (**S1** y **S2**) se llevó a cabo mediante diferentes técnicas instrumentales: difracción de rayos X, TEM, determinación del potencial zeta y análisis termogravimétrico.

3.3.1. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica analítica no destructiva, importante en la caracterización de materiales cristalinos ya que permite la identificación de los diferentes compuestos a partir de su espectro de difracción. La información que esta técnica nos permite obtener es la geometría de la celda unidad, sus dimensiones, el tipo de retículo, el sistema cristalino y los posibles grupos espaciales. Las determinaciones se llevaron a cabo empleando un difractómetro Bruker AXS D8 Advance (Karlsruhe, Alemania) con radiación CuK α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) en el intervalo de barrido $1.3^\circ < 2\theta < 8.3^\circ$, con pasos de conteaje de $0.04^\circ (2\theta)$ y con un tiempo de 3s/paso.

3.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se llevaron a cabo en un microscopio Philips CM 10 (Koninklijke Philips Electronics N.V, Eindhoven, Países Bajos) con

un voltaje de aceleración de 80 kV. Para la preparación de las muestras, se dispersó una pequeña cantidad de los sólidos en diclorometano mediante sonicación durante 5 min. Una gota de la suspensión se depositó sobre una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro recubierta con una película de carbono. A partir de las imágenes generadas se calculó el tamaño medio de partícula ($n=30$).

3.3.3. Potencial zeta

Las medidas de potencial zeta (ζ) de los sólidos se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) a 25 °C. El potencial zeta se calculó a partir de la movilidad de las partículas empleando el modelo Smoluchowski. Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/mL en tampón Ringer suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) y fueron sonicadas durante 2 min antes de su medida para evitar la formación de agregados. El valor promedio de 5 medidas se estableció como resultado de potencial zeta.

3.3.4. Análisis termogravimétrico

El grado de funcionalización se determinó por análisis termogravimétrico (TGA). Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo TGA / SDTA 851e Mettler Toledo, mediante un programa de calentamiento con una rampa de calentamiento de 10 °C por minuto desde 25 °C hasta 100 °C seguido por una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 60 min bajo una atmósfera de nitrógeno (80 ml/min). Tras esto, el programa continuó con un segmento de calentamiento dinámico desde 100 °C hasta 1000 °C usando una atmósfera oxidante (aire 80 ml/min) y una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 30 min. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la concentración de ácido caprílico anclado con el fin de establecer las concentraciones de trabajo en los ensayos microbiológicos.

3.4. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1. Medios de cultivo

Para el cultivo de la cepa microbiana y la preparación del inóculo se utilizaron los medios generales Plate Count Agar (PCA) y Tryptic Soy Broth (TSB). Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizó tampón Ringer para la preparación de las suspensiones de trabajo. Por último, para el recuento en placa se empleó el medio de cultivo Baird Parker Agar Base suplementado con yema de huevo y telurito potásico, medio de cultivo selectivo para *S. aureus*, para la identificación clara de las colonias y la detección de posible contaminación durante el estudio. Todos los medios de cultivo fueron suministrados por Scharlau, S.A. (Barcelona, España). La composición de los medios de cultivo utilizados se muestra en el Anexo I.

Los medios de cultivo Baird Parker y PCA fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121 °C, tras lo cual fueron enfriados en un baño a 50 °C. En el caso del medio Baird Parker, el

suplemento de emulsión estéril de yema de huevo y telurito potásico fue adicionado en condiciones asépticas (25 mL/500 mL medio) tras el enfriado del medio de cultivo. Ambos medios atemperados fueron distribuidos en placas de Petri estériles en una cabina de flujo.

El medio de cultivo líquido TSB fue preparado disolviendo 30 g del medio en 1 L de agua destilada. Tras esto, se prepararon tubos de ensayo con 10 mL del caldo que fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C.

Para la realización de los ensayos fue necesario preparar tubos de 10 mL y matraces Erlenmeyer de 30 mL de solución Ringer. Dicha solución se preparó disolviendo 2.2 g de cloruro de sodio, 0.105 g de cloruro potásico, 0.12 g de cloruro cálcico y 0.05 g de bicarbonato de sodio en 1 L de agua destilada. Tras disolverse mediante agitación a temperatura ambiente se prepararon los matraces Erlenmeyer y los tubos de ensayo correspondientes, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

Las placas y tubos estériles se conservaron en nevera a 4°C hasta su uso.

3.4.2. Cepas bacterianas y preparación del inóculo

La cepa *S. aureus* (CECT 240) fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Para llevar a cabo el crecimiento de las bacterias y preparar el inóculo se emplearon un medio general (PCA) y caldo de cultivo TSB.

La cepa fue reconstituida siguiendo las instrucciones dadas por la CECT. Para ello, se realizaron 2 pases en medio fresco PCA cada 24 h con el fin de obtener un cultivo en fase exponencial. El cultivo original fue conservado a -80 °C en crioviales con medio nutritivo TSB y 20% de glicerol, con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones.

Para llevar a cabo la preparación del inóculo se tomó una colonia, procedente de una placa de un cultivo puro de 24 h, y se transfirió a un tubo de ensayo con 10 mL de TSB. Este tubo con el cultivo puro se incubó a 37 °C durante 24 h. Tras esto, el inóculo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y el pellet obtenido se resuspendió en un tubo con 10 mL de solución Ringer.

3.4.3. Ensayos de sensibilidad antimicrobiana

Para la realización de los ensayos de ácido caprílico libre en primer lugar se preparó una disolución stock de ácido caprílico en DMSO. Para ello, 650 mg (0.71 mL) de ácido caprílico se disolvieron en 6 mL de DMSO. Diferentes volúmenes de dicha disolución (0.004, 0.02, 0.04, 0.2, 0.4 y 2 mL) fueron adicionados posteriormente a las muestras de incubación para alcanzar las concentraciones objetivo de ácido caprílico 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 mM.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico anclado se adicionaron diferentes cantidades de sólido **S2** a los matraces de incubación para obtener las concentraciones

de ensayo de ácido caprílico anclado (66, 132, 660, 1320, 1980 y 2640 mg/mL). Dichas suspensiones se agitaron y se mantuvieron durante tres ciclos de 5 minutos en un baño de ultrasonidos para favorecer la disolución y evitar la aglomeración de las partículas.

Tanto para los ensayos de actividad antimicrobiana del ácido caprílico libre como anclado al soporte de óxido de silicio se llevó a cabo un procedimiento similar para la preparación de las suspensiones de trabajo. Como se ha comentado anteriormente diferentes volúmenes de la suspensión stock de ácido caprílico libre o diferentes cantidades de soporte funcionalizado fueron adicionados a 30 mL de solución Ringer dispuestos en matraces Erlenmeyer estériles. Tras esto, se adicionaron 100 μ L del inóculo bacteriano previamente lavado en solución Ringer. Las suspensiones se mantuvieron en un agitador orbital a 150 rpm y 37 °C durante 24 h.

En cada ensayo se incluyeron controles negativos de cada una de las condiciones (matraz con ácido caprílico libre o partículas sin inocular) para detectar posibles contaminaciones; y controles positivos (cultivo microbiano sin tratamiento) para establecer el crecimiento microbiano.

3.4.4. Siembra en placa

Con el objetivo de determinar el efecto de las distintas condiciones de estudio sobre el crecimiento del microorganismo, se realizó un recuento directo en placa. Tras el tiempo de incubación de las muestras, se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos con 9 mL de agua destilada estéril. De las distintas diluciones se sembró en superficie 0.1 mL sobre placas del medio selectivo distribuyendo la muestra por toda la superficie con un asa de Drigalsky. Cada una de las siembras en placa se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h.

Transcurrido el periodo de incubación, se procedió al recuento directo en placa sobre aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. A partir de estos datos se calcularon las UFC por mL de muestra. Estos valores fueron transformados logarítmicamente y expresados como log UFC/mL. Los valores de log UFC/mL obtenidos a partir de los recuentos de los controles positivos, se utilizaron para cuantificar la inhibición sobre el crecimiento de los microorganismos de las distintas condiciones de estudio.

3.4.5. Microscopía de fluorescencia

Para valorar la viabilidad de *S. aureus*, un parámetro determinante es la integridad de la membrana celular. Para ello se utilizó la tinción directa con los fluorocromos SYTO®9 y PI (Yoduro de propidio) de las células y posterior visualización mediante microscopía de fluorescencia. Los dos fluorocromos están integrados en el sistema comercial LIVE /DEAD® BacLight™ (Molecular Probes Inc. Eugene Oregon). El SYTO®9 es una molécula de reducido tamaño que penetra en las células con la membrana intacta y se une al DNA emitiendo fluorescencia verde, mientras que el tamaño molecular del yoduro de propidio es suficientemente

grande para penetrar en las células que presenten poros en su membrana (células no viables), desplazando al SYTO®9 y proporcionando fluorescencia roja. La máxima emisión /excitación para estos fluorocromos es de 480-500 nm para el SYTO®9 y 490 - 635 nm para el yoduro de propidio.

Para realizar la tinción en primer lugar se tomó una alícuota de 500 µl de la muestra, conteniendo las células se mezcló con 0.8 µl de la mezcla de los fluorocromos anteriormente nombrados y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Seguidamente, se depositaron 5µl de la muestra teñida en un portaobjetos recubierto de poly-L-lisina (Poly- Prep® slides (Sigma Diagnostic, U.S.A.)), y se taparon con cubreobjetos, incubándose en oscuridad durante 10 minutos. Pasado el periodo de incubación se procedió al recuento directo mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus BX SO (lámpara de mercurio de 100W) con doble filtro de banda (XF 53, Omega) (Olympus OPTical Co., Hamburg Alemania). Se contaron un mínimo de 24 al azar, por duplicado, para cada muestra. Las fotografías en color se obtuvieron mediante una cámara digital Olympus DP10. Para confirmar la correcta valoración de que *S. aureus* perdía integridad de su membrana celular, se realiza una siembra en placa de cada muestra a los tiempos de estudio, es decir, a tiempo 0, 2, 4 y 24 horas y se observa cómo evoluciona la letalidad de nuestro organismo conforme el tiempo. La siembra en placa nos proporciona la confirmación del estudio con fluorocromos.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el objeto de evaluar el efecto del tipo de condición de ensayo y concentración de ácido caprílico sobre el crecimiento microbiano de *S. aureus*, se llevó a cabo un ANOVA simple. El programa estadístico empleado fue Statgraphics Centurion XVI (Statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). El procedimiento LSD (least significance difference) se utilizó para comprobar las diferencias a un nivel de significación $\alpha=0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SÓLIDOS MESOPOROSOS

Los sólidos MCM-41 fueron caracterizados mediante diversas técnicas analíticas con el objetivo de evaluar la eficacia del proceso de síntesis y comprobar el efecto de la calcinación del sólido y del anclado del ácido caprílico en la estructura mesoporosa de los materiales.

Los patrones de difracción de Rayos X de las micropartículas MCM-41 se muestran en la Figura 4.1.

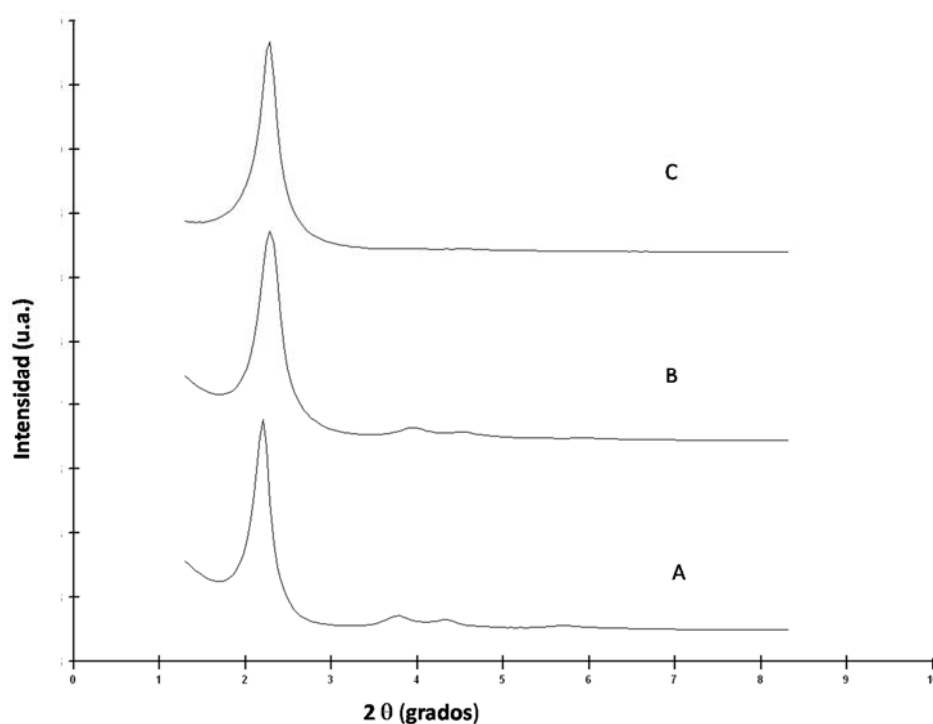


Figura 4.1. Difractograma de Rayos X de las micropartículas MCM-41 (A) antes de la calcinación, (B) después de la calcinación y (C) tras el anclado de ácido caprílico.

En el difractograma de las micropartículas MCM-41 antes del proceso de calcinación (Figura 4.1A) se observa un pico de difracción muy intenso a $2\theta=2.1^\circ$ y tres picos más débiles entre los ángulos 3 y 6 θ , los cuales son característicos de los materiales MCM-41 debido a su estructura hexagonal (Kresge *et al.*, 1992). Estas cuatro reflexiones a ángulos bajos, típicas de una red hexagonal, pueden ser indexadas como las reflexiones de Bragg (100), (110), (200) y (210).

Tras la calcinación (Fig. 4.1B), se observa un desplazamiento del pico (100) y el ensanchamiento de los picos de difracción respecto al MCM-41 sin calcinar. Este fenómeno es indicativo de una contracción de la celda unidad debido a la condensación de silanoles que tiene lugar durante el proceso de calcinación. Así mismo, los patrones obtenidos para el sólido tras el

anclado del ácido caprílico (Fig. 4.1C) indican que el proceso de funcionalización no alteró la estructura ordenada del sólido mesoporoso MCM-41.

Mediante el análisis de microscopía electrónica de transmisión podemos observar que, al igual que indican los resultados de difracción de Rayos X, los poros tienen una morfología hexagonal ordenada, característica de las micropartículas MCM-41, como se puede observar en la Figura 4.2. mediante las rayas negras y blancas que presenta el material. El proceso de anclado de ácido caprílico sobre la superficie del material no produce alteración de la estructura porosa.

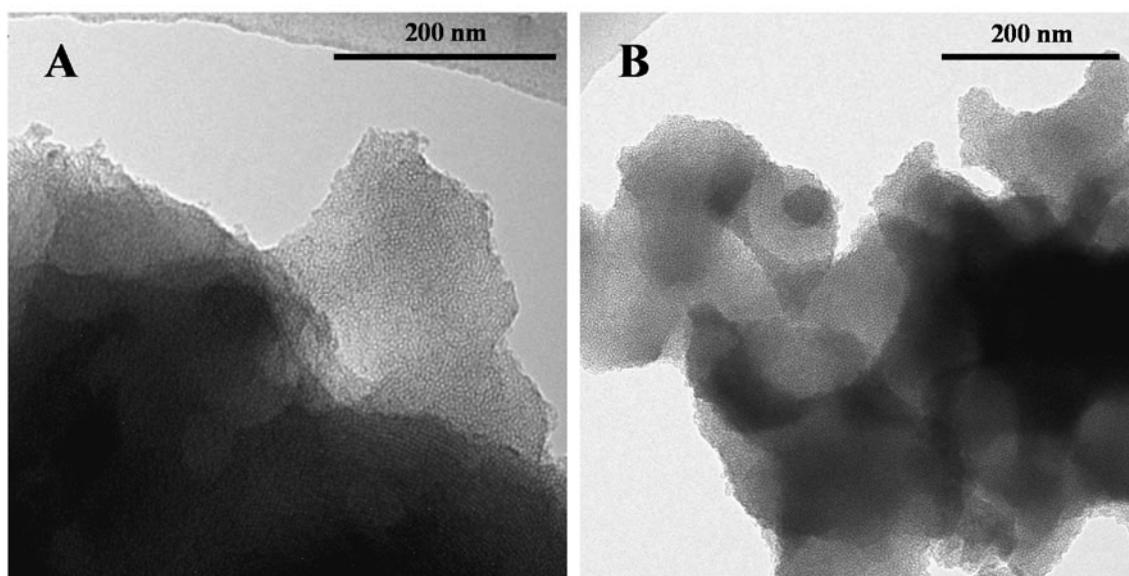


Figura 4.2. Imágenes de TEM de la micropartícula MCM-41 calcinada (A) y MCM-41 funcionalizada con el ácido caprílico (B).

Así mismo, las imágenes de TEM permitieron determinar el tamaño promedio de las partículas. En la Tabla 4.1. se pueden observar los resultados de tamaño de partícula y potencial zeta de las partículas antes y después de la funcionalización. Como se observa en la tabla el tamaño medio de las micropartículas se encuentra en un rango esperado de tamaño micro y no se observan diferencias significativas entre las partículas calcinadas (**S1**) y las partículas funcionalizadas con ácido caprílico (**S2**). Por otra parte, los resultados de potencial zeta muestran el cambio de carga superficial que se produce tras la funcionalización con ácido caprílico. Las partículas MCM-41 desnudas están cargadas negativamente, sin embargo cuando se anclan el ácido caprílico presentan carga positiva debido a los os grupos funcionales del APTES y del ácido caprílico.

Tabla 4.1. Tamaño de partícula y potencial zeta de MCM-41 calcinada y MCM-41 funcionalizada con ácido caprílico.

Partícula	Tamaño (μm)	Potencial zeta (mV)
S1	1,484 \pm 0,538	-21,54 \pm 1,02
S2	1,41 \pm 0,49	1,32 \pm 1,48

El análisis del material funcionalizado demostró la exitosa funcionalización con APTES y ácido caprílico sobre la superficie de las partículas.

Como se observa en la Figura 4.3. la línea negra muestra la curva de la pérdida de peso a lo largo del tiempo y temperatura. La línea roja es la primera derivada de los valores de la línea negra y permite identificar las pérdidas más importantes en forma de picos de pérdida de masa que se generan.

El análisis de los diferentes picos de la muestra permitió identificar la principal pérdida de materia diferenciando 3 fases. La primera fase corresponde a un aumento térmico entre 25-100 °C y refleja la eliminación del disolvente (agua). La gran cantidad de energía aplicada para aumentar el gradiente de temperatura desde 100 hasta 800 °C en la segunda fase ilustra picos que se generan a partir de la pérdida de materia y ponen en relieve la continua degradación del material, la cual corresponde a la pérdida de materia orgánica. Este segundo paso fue la etapa más importante del análisis de TGA ya que permite establecer el grado de funcionalización a través de la descomposición de las poliaminas (Figura 4.3. superior) o poliaminas unidas al ácido caprílico (Figura 4.3. inferior) ancladas a la superficie de las partículas. La última fase concluye con la descomposición de los grupos silanoles del material de óxido de silicio, los cuales se degradan a altas temperaturas entre 800 - 1000 °C.

En la figura de la parte superior, donde el APTES fue el único compuesto orgánico anclada a las partículas, puede deducirse que la concentración de materia orgánica fue de 0.3 g APTES / g SiO₂.

En la figura de la parte inferior, se calculó una cantidad de materia orgánica de 0.51 g/g SiO₂ que corresponde a las aminas y al ácido graso anclado sobre la superficie del material.

La diferencia de materia orgánica entre ambas partículas nos dará lugar a los gramos de ácido caprílico presentes en un gramo de SiO₂, resultando 0.21 g de ácido caprílico. Así mismo, se puede calcular la concentración de ácido caprílico por gramos de sólido funcionalizado teniendo en cuenta el porcentaje de SiO₂ presente en la partícula obteniendo así 0.1322 g de ácido

caprílico por gramo de sólido. La cantidad de ácido caprílico anclado fue empleada en los posteriores ensayos microbiológicos para definir las concentraciones de estudio.

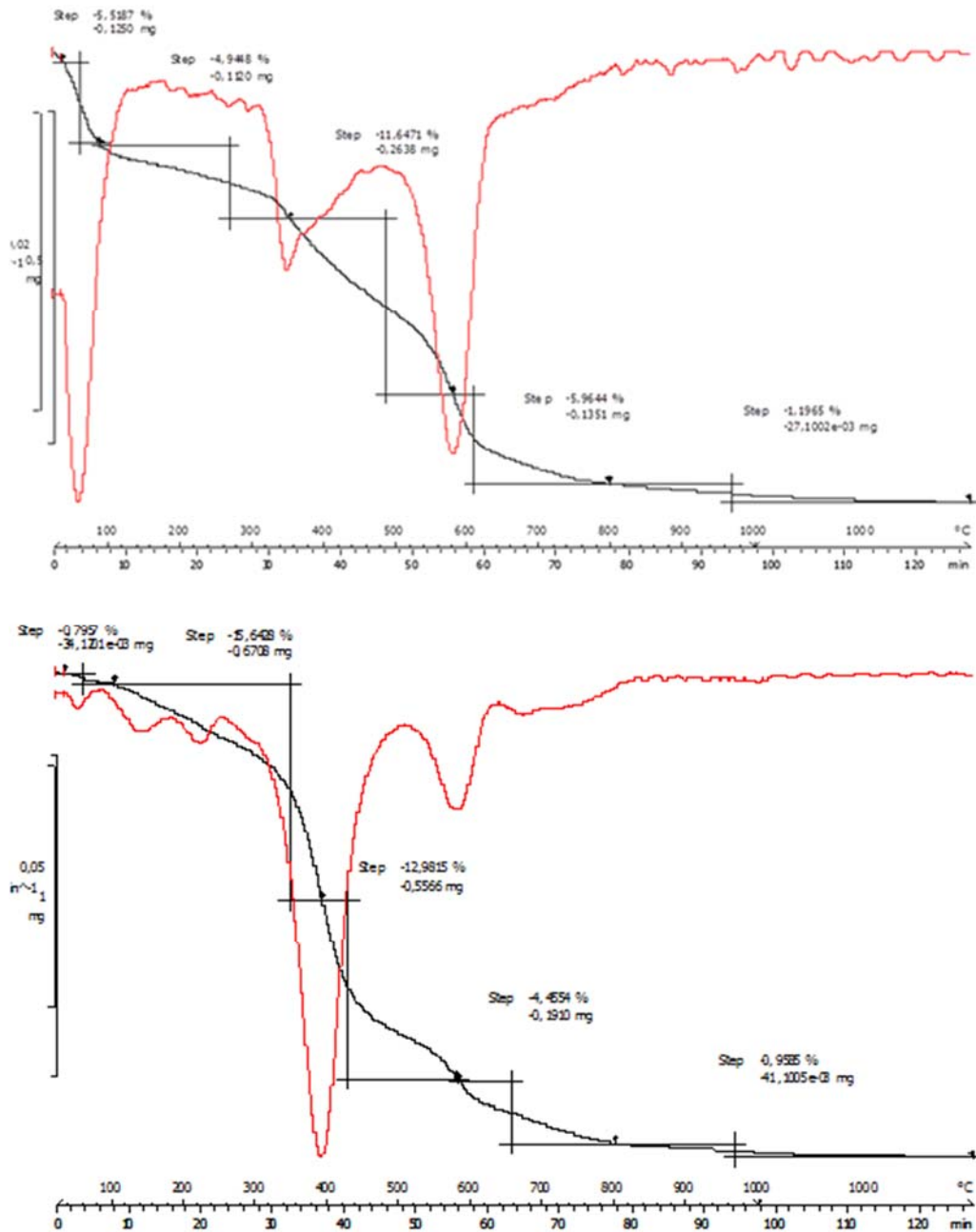


Figura 4.3. Termogramas de MCM-41 funcionalizada con APTES (parte superior) y MCM-41 funcionalizada con ácido caprílico (parte inferior). La línea negra representa la pérdida de peso y la línea roja es la primera derivada de la línea negra y muestra los principales cambios de energía.

4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO CAPRÍLICO LIBRE

Los resultados obtenidos en los recuentos de *S. aureus* en las distintas concentraciones de estudio con ácido caprílico libre se incluyen en el Anexo II.

El efecto inhibitorio del ácido caprílico libre en solución Ringer sobre el crecimiento de *S. aureus* se presenta en la Figura 4.4. Los resultados mostraron inhibición del ácido graso con las diferentes concentraciones de estudio, observándose diferencias significativas entre las mismas. En primer lugar, se observó una inhibición parcial para las concentraciones 0.1, 0.5 y 1 mM, así como inhibición completa para las concentraciones 5, 10 y 50 mM. Se pueden observar cuatro grupos diferenciales de concentraciones, los grupos A, B y C inhiben en un porcentaje muy bajo; sin embargo el grupo D que equivale a las concentraciones 5 mM, 10 mM y 50 mM inhiben en su totalidad.

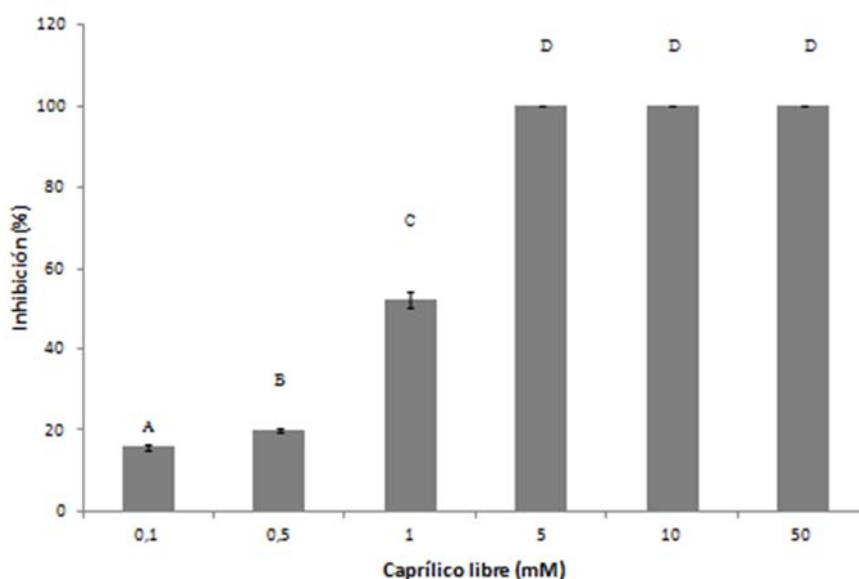


Figura 4.4. Inhibición (%) del crecimiento de *S.aureus* tras exposición a diferentes concentraciones (mM) de ácido caprílico libre. Las mismas letras en las barras indican miembros de un grupo homogéneo ($p < 0.001$) (Promedio y desviación estándar, $n = 3$).

Según se observa en la Figura 4.4, la concentración mínima bactericida (CMB) se encuentra entre 1 mM y 5 mM, ya que tras realizar los sucesivos recuentos esa concentración de ácido caprílico inhibía la totalidad de la población de *S. aureus*. Sin embargo otros estudios (Ruiz-Rico *et al.* 2015; Bergsson *et al.* 2001) coinciden en una concentración mínima inhibitoria entre

10 y 15 mM, superior a la establecida en este estudio. Esto puede ser debido, al efecto matriz, a las condiciones de análisis y a los medios de cultivos empleados.

4.2.1. Estudio cualitativo del efecto de ácido caprílico sobre la viabilidad de *S. aureus* mediante fluorocromos

Mediante el microscopio de fluorescencia, se pudo observar la inhibición del cultivo de *S. aureus* por el efecto del ácido caprílico a medida que transcurría el tiempo. El ensayo realizado mediante los fluorocromos nos permiten realizar la confirmación de la viabilidad bacteriana por diferenciación de células vivas y muertas. El SYTO®9 (color verde) marca sólo las células con membranas intactas mientras que el yoduro de propidio (color rojo) sólo puede penetrar en la célula si su membrana está dañada. Al mismo tiempo se realizó un cultivo en placa del matraz control y del matraz con ácido caprílico a los mismos tiempos que se observó la viabilidad en el microscopio de fluorescencia, es decir, a tiempo 0, 2, 4 y 24 horas para confirmar que nuestro microorganismo iba perdiendo viabilidad y el estudio del efecto del ácido caprílico iba siendo el correcto. En la muestra control se pudo observar la viabilidad del inóculo a lo largo del tiempo (células verdes). Sin embargo, en la muestra tratada con ácido caprílico se observó la transformación de células viables a células no viables (células rojas) con el tiempo de tratamiento. Como se puede observar en la Figura 4.5 a tiempo 0 las células se encontraron vivas (color verde) tanto en la muestra control como la muestra tratada. A lo largo del tiempo las células del inóculo tratado con el ácido graso fueron perdiendo viabilidad lo que se tradujo en una pérdida de la intensidad de la fluorescencia verde, y un aumento de las tonalidades naranja sin llegar al rojo intenso, por lo que se puede considerar que dichas células que no llegaron a un estado subletal (tiempo 4 h). Posteriormente se llegó a observar células rojas lo que indicó la alteración de la membrana celular bacteriana, y por tanto, muerte celular (tiempo 24 h).

Este estudio permitió observar que el ácido caprílico produce efecto antimicrobiano debido a la afectación sobre la membrana plásmatica y pared celular de las bacterias.

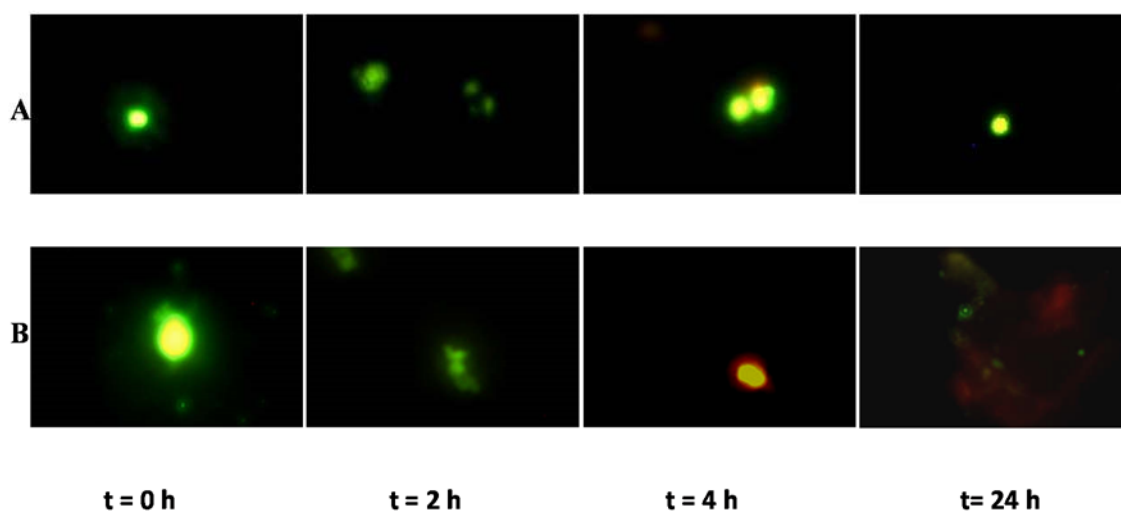


Figura 4.5. Imágenes de microscopía de fluorescencia de *S.aureus* no tratada, control (A) y tratada con ácido caprílico libre durante 24 h (B).

4.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO CAPRÍLICO ANCLADO

En cuanto al estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico anclado a MCM-41 sobre una solución Ringer, el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus*, se muestra en la Figura 4.6. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de la inhibición del ácido caprílico sobre las diferentes concentraciones del ensayo, observándose diferencias significativas. En primer lugar, hay que destacar que no existe una inhibición total en ninguna de las concentraciones de estudio, inhibiendo en todas ellas un porcentaje bajo, representado en la Figura 4.6., es decir, ninguna concentración supera el 50 % de inhibición del microorganismo. Distinguimos 4 grupos, como representan las barras con sus respectivas letras diferenciando los grupos (A, B, C, D) de la Figura 4.6. El grupo A perteneciente a las concentraciones 66, 132, 660 mg ácido caprílico anclado /ml de Ringer, no presenta actividad antimicrobiana a la concentración de ácido caprílico utilizada. Sin embargo, los grupos B, C, D, presentan inhibición frente al microorganismo dependiente de la concentración llegando a un máximo de inhibición del 40 %, en el grupo D.

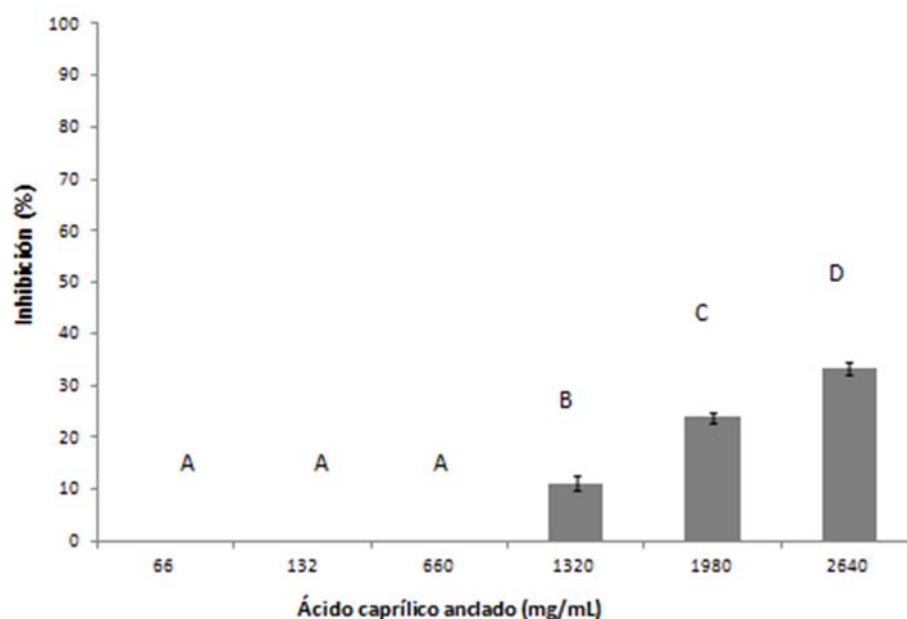


Figura 4.6. Inhibición (%) del crecimiento de *S.aureus* tras exposición a diferentes concentraciones (mg/ml) de ácido caprílico anclado sobre micropartículas MCM-41. Las mismas letras en las barras indican miembros de un grupo homogéneo ($p < 0.001$) (Promedio y desviación estándar, $n = 3$).

Esto puede ser debido a la forma de anclado, el ácido caprílico fue anclado al sólido por su grupo carbonilo, como anteriormente nombramos, el mecanismo de acción del ácido graso no se conoce muy bien pero parece ser que al anclarse por el grupo carbonilo, el ácido caprílico pierde actividad.

En otros estudios como por ejemplo en el encapsulamiento de ácido caprílico (Ruiz- Rico *et al.*, 2015) se observa una disminución de la potencia pero no pierde tanta actividad antimicrobiana como en nuestra situación. Por lo que creemos que una manera de perder actividad antimicrobiana es debido al anclarla por el grupo carbonilo, ya que existen otros estudios en los que otros ácidos grasos han sido anclados mediante otros enlaces y ha provocado que no exista una extrema disminución de la actividad (Pedziwiatr-Werbicka *et al.*, 2014).

5. CONCLUSIONES

1. La caracterización del material de óxido de silicio con ácido caprílico anclado mediante técnicas instrumentales ha permitido comprobar el correcto anclado del ácido graso sobre la superficie del soporte mesoporoso.
2. Los análisis morfológico y estructural, mediante Rayos X y microscopía electrónica de transmisión, sobre el material mesoporoso MCM-41 han permitido comprobar que el anclado del ácido caprílico no afectó a la estructura característica de este tipo de partículas.
3. En todas las condiciones de estudio se redujo el crecimiento microbiano, siendo el tratamiento con ácido caprílico libre el más efectivo, encontrándose que la dosis mínima bactericida se produjo entre 1 mM y 5 mM de ácido caprílico.
4. El mecanismo de acción del ácido caprílico libre fue estudiado mediante el uso de fluorocromos para medir la viabilidad celular, observándose a las 2h de contacto la alteración de la membrana plasmática y la pared celular del microorganismo ocasionándole la pérdida de viabilidad, hecho que se confirmó mediante cultivo en placa.
5. La realización del estudio sobre el anclado del ácido caprílico a la superficie de un material cuya finalidad era enmascarar el olor y que mantuviera la actividad antimicrobiana, tuvo como resultado una reducción de dos órdenes logarítmicos sobre la población microbiana de *S. aureus*, aunque no resultó ser letal para las concentraciones de estudio. Esto podría deberse a la matriz o caldo de cultivo sobre la que se realizó el ensayo o al modo de anclado del ácido graso.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, M.R Y MOSS, M.O.(1997) *Microbiología de los alimentos*. En: Ediciones Acribia, Zaragoza, España. 478 pp.
- ALPAS, H.; KALCHAYANAND, N.; BOZOGLU, F.; SIKES, A.; DUNNE, C.P. Y RAY, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and environmental microbiology* 65 (9): 4248-4251.
- ARGYO C. ET AL., (2014) Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery, *chem. Mater* 26, 435-451.
- BARBOSA, L.N.; RALL, V.L.M.; FERNADES, A.A.H.; USHIMARU, P.L.I.; DA SILVA PROBST, I. Y FERNANDES, A. (2009): Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 725 – 728.
- BENNETT, R. W. (1986). *Detection and quantitation of Gram positive nonsporing pathogens and their toxins*. En: Foodborne Microorganisms and Their Toxins: Developing Methodology. Pierson, M.D., Y Stern (Eds.). Marcel dekker. London.
- BERGDOLL, M.S. (1979). *Staphylococcal intoxications*. En Foodborne Infections and Intoxications. Reimann, H. Y Bryan, F.L. (Eds). Academic Press: New York.
- BERGDOLL, M.S. (1983). *Enterotoxins*. En: Staphylococcus Infections, Vol. 2, Easmon, C. S. F. y Adlam, C. (Eds). Academic Press, London, 559-598 pp.
- BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; KARLSSON, S.M.; STEINGRÍMSSON, Ó. Y THORMAR, H. (1998) In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2290-2294.
- BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRÍMSSON, Ó. Y THORMAR, H. (2001) Killing of Gram- positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 109: 670-678.
- BERGSSON, G.; STEINGRÍMSSON, Ó. Y THORMAR, H. (1999) In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 14 2790-2792.
- CHEN, H. Y HOOVER, D.G. (2003). Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of listeria monocytogenes scott a in whole milk. *Innovative food science and emerging technologies* 4: 25-34.
- CHOI, M.J.; KIM, S.A.; LEE, N.Y. Y RHEE, M.S. (2013). New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating cronobacter sakazakii and salmonella enterica serovar typhimurium in reconstituted infant formula. *International journal of food microbiology*, 166,499–507.
- CIESLA, U. Y SCHÜTH, F. (1999) Microporous and mesoporous materials. *Elsevier*, 27,131-149.
- CORMA, A. (1997) .From microporous to mesoporous molecular sieves materials and their use in catalysis. *Chem. Rev.*, 97, 2373-2419.
- DESBOIS, A.P. Y SMITH, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl microbiol biotechnol*, 85:1629–1642.
- DOYLE, M.; BEUCHAT, L.R. Y MOTVILLE, T.J. (1997) Food microbiology: fundamentals and frontiers. *American society for microbiology*.784 pp.

- GILBERT, R.J. (1983) *Foodborne infections and Intoxications: recent trends and prospects for the future*. En: Food Microbiology. Advances and Prospects. Roberts, T.A. y Skinner, F.A. (Eds.) Academic Press (London y New York).
- HAYES, P.R., (1993). *Microbiología e higiene de los alimentos*. En Ediciones Acribia, Zaragoza, España. 369 pp.
- HE, Q.; ZHANG Z.; GAO Y.; SHI J. Y LI Y. (2009) Intracellular localization and cytotoxicity of spherical mesoporous silica nano- and microparticles. *Small* 5:2722-2729.
- HEIKKILÄ, T.; SANTOS, H.A.; KUMAR, N.; MURZIN, D.Y.; SALONEN, J.; LAAKSONEN, T.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J.Y LEHTO, V. (2010). Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutic* 74, 483-494.
- HOLDSWORTH S. D. (1987). *Conservacion de frutas y hortalizas*. En: Editorial Acribia, Zaragoza, España. 195 pp.
- HUDSON, S.P.; PADERA R.F.; LANGER, R. Y KOHANE, D.S. (2008). The biocompatibility of mesoporous silicates. *Biomaterials* 29, 4045–4055.
- HULANKOVA, R.; BORILOVA, G. Y STEINHAUSEROVA, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat science*, 95, 190-194.
- JANG, H.I.; RHEE, M.S. (2009). Inhibitory effect of caprylic acid and mild heat on cronobacter spp. (enterobacter sakazakii) in reconstituted infant formula and determination of injury by flow cytometry. *International journal of food microbiology*, 133(1-2): 113-120.
- KABARA, J.J. (1979) Toxicological, bacteriocidal and fungicidal properties of fatty acids and some derivatives. *J Am Oil Chem Soc* 56:760A–767A
- KODICEK, E. Y WORDEN, A. N. (1945). The effect of unsaturated fatty acids on Lactobacillus helveticus and other Gram-positive microorganisms. *Biochemical Journal*. 39(1): 78-85.
- KRESGE, C. T.; LEONOWICZ, M. E.; ROTH, W. J.; VARTULI, J. C.; BECK, J. S. 1992. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*. 359(6397): 710–712
- LEHNINGER. A. (1986). *Bioquímica Lehninger*. En: Editorial Omega S.A. Barcelona, España. 1117 pp.
- PARIKH, P.P.; WILLIAMS R. C.; PARAMESWARAKUMAR, M.; EIFERT, J. D. Y MARCY, J.E. (2012) Control of Listeria monocytogenes in recycledchill brine using ultraviolet light and antimicrobial agents. *Journal of food safety* 1745-4565.
- PARK S. Y. Y PENDLETON P. (2012). Mesoporous silica sba-15 for natural antimicrobial delivery. *Powder technology*, 223, 77–82.
- PASCUAL, M. R. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. En: Ediciones Díaz de Santos, S.A., España. 188 pp.
- PEDZIWIATR-WERBICKA, E.; MIŁOWSKA K.; PODLAS M.; MARCINKOWSKA M.; FERENC M.; BRAHMI Y.; KATIR N.; MAJORAL J.P.; FELCZAK A.; BORUSZEWSKA A.; LISOWSKA K.; BRYSZEWSKA M. Y KADIB A. (2014). Oleochemical-tethered sba-15-type silicates

- with tunable nanoscopic order, carboxylic surface, and hydrophobic framework: cellular toxicity, hemolysis, and antibacterial activity. *Chem. Eur. J.*, 20, 9596 – 9606.
- PETSCHOW, B.W.; BATEMA, R.P. Y FORD, L.L. (1996) Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 302-306.
- PINA-PÉREZ, M.C.; SILVA-ANGULO, A.B.; MUGUERZA-MARQUÍNEZ, B.; RODRIGO, D. Y MARTÍNEZ, A. (2009). Synergistic effect of high hydrostatic pressure and natural antimicrobials on inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a liquid whole egg and skim milk mixed beverage. *Foodborne pathogens and disease*, 6(6):649-656.
- MARTÍNEZ J. Y GARCÍA P. (2006). *Nutrición Humana*. En: Universidad Politécnica de Valencia, España. 384 pp.
- RAVISHANKAR, R.V.Y JAMUNA B.A. (2011) Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 197-209.
- RASO, J. Y BARBOSA-CÁNOVAS, G. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(3): 265-285.
- REISER, R. F.; ROBBINS, R.N. Y NOLETO, A.L. (1984). Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. *Infect. Immun.* 54,625-630.
- ROSS, A.I.V.; GRIFFITHS, M.W.; MITTAL, G.S. Y DEETH, H.C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International journal of food microbiology*. 89: 125– 138.
- RUIZ-RICO M.; FUENTES C.; PÉREZ-ESTEVE E.; JIMENEZ-BELENQUER A.; QUILES A.; MARCOS M.D.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ R. Y BARAT J.M. (2015). Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food control* 56, 77- 85.
- SAUCEDO-REYES, D.; MARCO-CELDRÁN, A.; PINA-PÉREZ, MC.; RODRIGO, D. Y MARTÍNEZ, A. (2009). Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative food science & emerging technologies*. 10(2):135- 141.
- SKRIVANOVÁ, E.; MOLATOVÁ, Z.; MAROUNEK, M. (2008). Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Veterinary Microbiology*. 126(4): 372-376.
- SKŘIVANOVÁ, V.; MAROUNEK, M. (2006). A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric fatty acid on performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits. *Animal Feed Science and Technology*. 127 (1-2): 161-168.
- SMITH, D.L.; HARRIS, A.D.; JOHNSON, J.A.; SILBERGELD, E.K. Y MORRIS, J.G. (2002) Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6434–6439
- SOLÍS DE LOS SANTOS, F.; HUME, M.; VENKITANARAYANAN, K.; DONOGHUE, A. M.; HANNING, I.; SLAVIK, M. F.; AGUIAR, V. F.; METCALF, J. H.; REYES-HERRERA, I.; BLORE, P. J. Y DONOGHUE, D. J. (2010). Caprylic Acid reduces enteric campylobacter

- colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. *Journal of Food Protection*. 73(2): 251-257
- TANG, F.; LI, L. Y CHEN D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv mater*. 24:1504–1534.
- TARN D.; ASHLEY C.E.; XUE M.; CARNES E.C.; ZINK J. I. Y BRINKER C. J. (2012) Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: biofunctionality and biocompatibility. *Accounts of chemical research* 792-801.
- VANNINI L.; LANCIOTTI R.; BALDI D. Y GUERZONI M.E. (2004). Interactions between high-pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International journal of food microbiology*, 94,123– 135.
- WANG L-L, JOHNSON EA (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl Environ Microbiol* 58: 624–629.
- YANG R.; GAO D.; HUANG H.; HUANG B.Y CAI H. (2013). Mesoporous silicas prepared by ammonium perchlorate oxidation and their application in the selective adsorption of high explosives. *Microporous and Mesoporous Materials*, 168, 46–50.
- ZHAO X.S.; LU G.Q. Y HU X. (2000). Characterization of the structural and surface properties of chemically modified MCM-41 material. *Microporous and Mesoporous Materials*, 4, 37–47.

7. ANEXOS

Anexo I. Composición de los medios de cultivo y suplementos empleados en las determinaciones microbiológicas.

Tabla 7.1. Composición (g/L) del Agar *Plate Count* (PCA).

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Ph	7.0 ± 0.2

Tabla 7.2. Composición (g/L) del caldo *Tryptic Soy* (TSB).

Peptona de caseína (digerido pancreático de caseína)	17,0
Peptona de soja (digerido péptico de harina de soja)	3,0
Glucosa (dextrosa)	2,5
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2,5
Ph	7.3 ± 0.2

Tabla 7.3. Composición (g/L) del Agar Base *Baird Parker*.

Triptona	10,00
Piruvato sódico	10,00
Glicocola	12,00
Extracto de carne	5,00
Cloruro de litio	5,00
Extracto de levadura	1,00
Agar	17,00
pH	7,0 ± 0,2

Tabla 7.4. Composición (g ó mL /L) del suplemento de emulsión estéril de yema de huevo y telurito potásico.

Yema de huevo ^a	200
Telurito potásico ^b	2,1
Cloruro potásico ^b	4,25
Agua estéril ^a	800

^amL/L; ^b g/L

Anexo II. Recuentos microbianos en las diferentes condiciones de estudio.

Tabla 7.5. Recuentos (log UFC/mL) de *S. aureus* en ácido caprílico libre.

CONCENTRACIÓN	MUESTRA	LOG UFC /ml	DS
0,1	A	5,45	0,01
0,1	B	5,40	0,00
0,5	A	5,14	0,00
0,5	B	5,17	0,00
1	A	4,77	0,01
1	B	1,39	0,02
5	A	0,00	0,00
5	B	0,00	0,00
10	A	0,00	0,00
10	B	0,00	0,00
50	A	0,00	0,00
50	B	0,00	0,00

Tabla 7.6. Recuentos (log UFC/mL) de *S. aureus* en ácido caprílico anclado.

CONCENTRACIÓN	MUESTRA	LOG UFC /ml	DS
66	A	7,03	0,00
66	B	7,14	0,00
132	A	7,32	0,00
132	B	7,32	0,00
660	A	7,02	0,00
660	B	7,00	0,00
1320	A	4,84	0,03
1320	B	5,79	1,25
1980	A	5,66	0,07
1980	B	5,78	0,18
2640	A	4,25	0,06
2640	B	4,35	0,01