

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Estudio de la actividad antimicrobiana  
de micropartículas de sílice sobre  
*Escherichia coli***

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: AINA ESTEVE GAVIÑA

TUTOR/A: ANA I. JIMÉNEZ BELENGUER

COTUTOR/A: MARÍA RUIZ RICO

*Curso Académico:*

2014/2015

**VALENCIA, Septiembre 2015**

Tipo Licencia: Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial–Sin Obra Derivada”



# TÍTULO

---

Estudio de la actividad antimicrobiana de micropartículas de sílice sobre *Escherichia coli*.

## RESUMEN

---

El uso inapropiado de los antibióticos puede favorecer la aparición, propagación y persistencia de los microorganismos, produciéndose como consecuencia una resistencia a los antibióticos que hace necesaria la administración de elevadas dosis de los mismos, lo que genera en ocasiones toxicidad. Por ello aumenta la demanda del desarrollo de sistemas alternativos para prevenir y tratar las enfermedades bacterianas. Por este motivo, en el presente estudio se ha utilizado la nanotecnología para la síntesis de partículas mesoporosas de sílice, que son usadas debido a su carga y/o funcionalización con compuestos antimicrobianos naturales; en nuestro caso se utilizó ácido caprílico por sus elevadas propiedades antimicrobianas. El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana del ácido caprílico, tanto libre como anclado, sobre la viabilidad de *Escherichia coli*. Haciendo uso de la difracción de rayos X, la microscopía electrónica de transmisión, el potencial zeta y el análisis termogravimétrico, se obtuvo la caracterización del material de óxido de sílice con el ácido caprílico anclado, lo que determinó el correcto anclaje de estos materiales sobre la superficie, sin afectar a la estructura hexagonal característica de este material. Se comparó con el ácido caprílico libre sobre el microorganismo indicador, que produjo una reducción del crecimiento bacteriano con una concentración mínima bactericida comprendida entre 1 y 5 mM. Esta reducción se confirmó mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Sin embargo, el ácido caprílico anclado no inhibió completamente a la bacteria en las condiciones del estudio.

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

# TÍTOL

---

Estudi de l'activitat antimicrobiana de micropartícules de sílice sobre *Escherichia coli*.

## RESUM

---

L'ús inadequat dels antibiòtics pot afavorir l'aparició, propagació i persistència dels microorganismes, produint com a conseqüència una resistència als antibiòtics que fa necessària l'administració d'elevades dosis dels mateixos, el que genera en ocasions toxicitat. Per això augmenta la demanda del desenvolupament de sistemes alternatius per prevenir i tractar les malalties bacterianes. Per aquest motiu, en el present estudi utilitzem la nanotecnologia per a la síntesi de partícules mesoporoses de sílice, que són utilitzades degut a la seua càrrega i/o funcionalització amb compostos antimicrobians naturals; en el nostre cas es va utilitzar àcid caprílic per les seues elevades propietats antimicrobianes. L'objectiu va ser avaluar l'activitat antimicrobiana de l'àcid caprílic, tant lliure com ancorat, sobre la viabilitat d'*Escherichia coli*. Fent ús de la difracció de raigs X, la microscòpia electrònica de transmissió, el potencial zeta i l'anàlisi termogravimètric, es va obtenir la caracterització del material d'òxid de sílice amb l'àcid caprílic ancorat, el que va determinar el correcte ancorat d'aquests materials sobre la superfície, sense afectar l'estructura hexagonal característica d'aquest material. Es va comparar amb l'àcid caprílic lliure sobre el microorganisme indicador, que va produir una reducció del creixement bacterià amb una concentració mínima bactericida compresa entre 1 i 5 mM. Aquesta reducció es va confirmar mitjançant l'ús de microscòpia de fluorescència. No obstant això, l'àcid caprílic ancorat no va inhibir completament al bacteri en les condicions de l'estudi.

**Paraules clau:** Partícules mesoporoses de sílice, agent antimicrobià, concentració mínima bactericida, àcid caprílic, *Escherichia coli*.

## TITLE

---

Study of the antimicrobial activity of silica microparticles against *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

---

The inappropriate use of antibiotics can favour the appearance, propagation and persistence of microorganisms, resulting in antibiotic resistance, consequently, the administration of high doses of antibiotic becomes necessary. As this many times produces toxicity, the demand for the development of alternative systems to prevent and treat the bacterial disease is increasing. Because of this, in this study we use the nanotechnology for the synthesis of mesoporous silica materials, which is used owing to its charge and/or functionalism with natural antimicrobial particles; in this case, we used caprilic acid because of its high antimicrobial properties. The aim was to estimate the antimicrobial activity of caprilic acid, both free and anchored against *Escherichia coli* viability. Making use of X-ray Diffractometer, transmission electron microscopy, zeta potential and thermogravimetric analysis, we obtained silica with caprilic acid anchored characterization. It was also able to establish the correct anchorage of this material on the surface, without affecting the typical hexagonal structure of this material. It was compared with the free caprilic acid against the indicator microorganism, which produced the bacterial growth reduce with a minimal bacterial concentration between 1 and 5 mM. This reduction was confirmed through fluorescence microscope use. However the anchored caprilic acid has not completely inhibited the bacteria in this study conditions.

**Key words:** Mesoporous silica material, antimicrobial agent, minimal bacterial concentration, caprilic acid, *Escherichia coli*.

## AGRADECIMIENTOS

---

La investigación siempre es el resultado del trabajo de un grupo de personas. En mi caso han sido muchas a las que les debo mi más sincera gratitud.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora la Dra. Ana I. Jiménez Belenguer que me propusiera este trabajo, que me ha resultado tan interesante. Quiero además agradecerle su dedicación y paciencia a lo largo de este proyecto y, sobre todo, sus buenos consejos.

En segundo lugar me gustaría agradecer a María Ruíz Rico su gran ayuda y todo lo que me ha enseñado tanto en el trabajo experimental como durante la escritura del mismo.

A mi familia por el gran apoyo que siempre me han ofrecido, en especial a mi madre, María, que no ha dejado en ningún momento que me rindiera ni en los peores momentos y me ha ofrecido siempre su ayuda supervisando mi escritura; y a mi hermana Débora que pese a la distancia siempre está cuando la necesito.

En especial a Manu por su infinita paciencia y grandísima ayuda durante el trabajo y durante todo el grado, pero sobre todo por estar siempre a mi lado.

# ÍNDICE

---

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Índice de figuras</b> .....	vii
<b>Índice de tablas</b> .....	vii
<b>1 Introducción</b> .....	1
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.1.1 Características morfológicas y bioquímicas .....	1
1.1.2 Toxiinfecciones alimentarias asociadas .....	1
1.2 Métodos para inhibir el crecimiento microbiano en la industria alimentaria .....	3
1.3 Ácidos grasos libres .....	7
1.3.1 Características .....	7
1.3.2 Funciones .....	8
1.3.3 Aplicaciones .....	9
1.4 Ácido caprílico .....	10
1.5 Materiales mesoporosos de óxido de silicio .....	12
1.5.1 Características .....	12
1.5.2 Aplicaciones .....	13
1.6 Justificación del estudio .....	14
<b>2 Objetivos y plan de trabajo</b> .....	15
2.1 Objetivos .....	15
2.2 Plan de trabajo .....	15
<b>3 Materiales y métodos</b> .....	17
3.1 Síntesis del material mesoporoso de óxido de sílice (MCM-41) microparticulado .....	17
3.2 Anclado de ácido caprílico al soporte MCM-41 .....	18
3.3 Caracterización de los sólidos mesoporosos .....	19
3.3.1 Difracción de rayos X .....	19
3.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión .....	19
3.3.3 Potencial zeta .....	19
3.3.4 Análisis termogravimétrico .....	19
3.4 Ensayos microbiológicos .....	20
3.4.1 Medios de cultivo .....	20
3.4.2 Cepa bacteriana y preparación del inóculo .....	21
3.4.3 Ensayos de sensibilidad antimicrobiana .....	21
3.4.4 Siembra en placa .....	22

3.5	Microscopía de fluorescencia.....	22
3.6	Análisis estadístico .....	23
<b>4</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>24</b>
4.1	Caracterización de sólidos mesoporosos.....	24
4.2	Estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico libre.....	29
4.3	Estudio cualitativo sobre el efecto del ácido caprílico sobre la viabilidad mediante fluorocromos.....	31
4.4	Estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico anclado .....	33
<b>5</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Anexos</b>	
7.1	Anexo I: Composición de medios de cultivo empleados en las determinaciones microbiológicas	
7.2	Anexo II: Recuentos microbianos a las diferentes concentraciones de estudio	

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 3.1.</b> Síntesis de partículas MCM-41.....	18
<b>Figura 4.1.</b> Difractograma de Rayos X de las micropartículas MCM-41.....	24
<b>Figura 4.2.</b> Imágenes de TEM de las micropartículas MCM-41. ....	25
<b>Figura 4.3.</b> Termogramas de MCM-41. ....	27
<b>Figura 4.4.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de E. coli. ....	29
<b>Figura 4.5.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de E. coli.....	32
<b>Figura 4.6.</b> Porcentaje de inhibición del crecimiento de E. coli.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 4.1.</b> Tamaño de partícula mediante TEM y potencial zeta.....	26
<b>Tabla 7. 1.</b> Composición (g/L) del Agar Plate Count (PCA).....	Anexo 7.1
<b>Tabla 7. 2.</b> Composición (g/L) del caldo Tryptic Soy (TSB). ....	Anexo 7.1
<b>Tabla 7. 3.</b> Composición (g/L) del Agar Tryptone Bile X-glucoronide (TBX).....	Anexo 7.1
<b>Tabla 7. 4.</b> Ácido caprílico libre .....	Anexo 7.2
<b>Tabla 7. 5.</b> Ácido caprílico anclado.....	Anexo 7.2



# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* es una proteobacteria perteneciente a la familia de enterobacteriaceae siendo del género *Escherichia*.

### 1.1.1 Características morfológicas y bioquímicas

*Escherichia coli* se encuentra comúnmente en el tracto entérico del ser humano y de animales de sangre caliente, su presencia es un indicador de contaminación fecal, tanto directa como indirecta. En ambientes extraentéricos la vida de este microorganismo es corta y por consiguiente, la presencia del mismo es un claro indicador de una reciente contaminación (Pascual-Anderson, 2005; Buchanan y Doyle, 1997)

Estas bacterias son anaerobios facultativos que se adaptan bien a situaciones sin oxígeno. En cuanto a sus características, de manera general para las diferentes cepas, el rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de la misma se sitúa entre 7 y 50 °C siendo su temperatura óptima de 37 °C. Pueden crecer en presencia de hasta un 6% de NaCl, el pH mediante el cual la bacteria se multiplica es neutro siendo el mínimo para crecer de 4,4 y un máximo de 10. En cuanto a la actividad de agua, estas bacterias crecen con un mínimo de 0,95 siendo 0,995 el valor óptimo (OMS, 2011; Doyle y Schoeni, 1984).

En lo relativo a las características morfológicas y bioquímicas, se trata de bacilos Gram-negativos con un tamaño que oscila entre 1,1-1,5 µm de diámetro y 2,0-6,0 µm de longitud, generalmente son móviles mediante flagelos peritricos no esporulados, y son fermentadores de lactosa produciendo ácido y gas. En agar forman colonias lisas, poco elevadas, convexas, grises con superficie brillante y dispersables en solución salina. El aislamiento de estas colonias se realiza mediante medio de cultivo caldo verde brillante o agar Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX).

### 1.1.2 Toxiinfecciones alimentarias asociadas

Las enfermedades bacterianas de origen alimentario son aquellas enfermedades causadas por la presencia de bacterias infectivas o sus toxinas en un alimento que actúan en tracto gastrointestinal cuando son ingeridas. Estas enfermedades se dividen en infecciones e intoxicaciones alimentarias. Las infecciones alimentarias son enfermedades ocasionadas por la ingestión de bacterias vivas, invadiendo de ese modo el organismo del huésped o liberando toxinas en su tracto gastrointestinal. Por otra parte, las intoxicaciones alimentarias son enfermedades ocasionadas por la absorción intestinal de toxinas sintetizadas por las bacterias al

crecer y multiplicarse sobre un alimento, no es la presencia y crecimiento de las bacterias las que provocan la enfermedad sino las toxinas elaboradas por algunas especies bacterianas (Pascual - Anderson, 2005).

*E. coli* ha sido reconocido como patógeno específico de enfermedades tanto intestinales como extra-intestinales produciendo tanto infecciones como intoxicaciones alimentarias. Existen diversos tipos de *E. coli* enterovirulentos implicados entre los que destacan los expuestos a continuación (Pascual- Anderson, 2005):

- *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC)
- *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC)
- *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC)
- *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC)

*Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) es la causa principal de brotes de diarrea neonatal aguda que se producen en instituciones infantiles con poca higiene, sobretodo en épocas calurosas. Los brotes de diarrea infantil asociados con (EPEC) son poco comunes en países desarrollados y más comunes en países en vía de desarrollo.

La bacteria actúa llegando al organismo del huésped y colonizando todo el intestino causando en él una lesión patológica. La aparición de los síntomas varía entre 6 h y 3 días con un tiempo medio de 24 h. La enfermedad se manifiesta con dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre ligera. En las ocasiones en los que los síntomas se prolongan puede aparecer deshidratación y acidosis.

La mayoría de estos brotes de infección son generados por ingestión de agua mal clorada y carne poco cocinada y/o contaminada.

La enfermedad producida por *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC) afecta tanto a niños como adultos. Estas cepas llegan a la mucosa del colon e invaden las células epiteliales y se multiplican, originando una inflamación y ulceración de dicha mucosa. El periodo de incubación es entre 8 y 24 h, manifestándose con escalofríos, fiebre, disentería profusa, dolor de cabeza, mialgias, calambres abdominales y heces mucosas y sanguinolentas.

Se conocen brotes de esta enfermedad asociados con la ingestión de quesos blandos tipo Brie y Camembert y por ingestión de agua contaminada.

*Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC) es la causante principal de diarrea infantil en los países subdesarrollados y se transmite a partir de alimentos o agua contaminados con heces humanas o fecales.

El mecanismo de patogenicidad comienza tras la ingestión de una tasa elevada de microorganismos. Después de sobrevivir al ambiente del estómago, estos colonizan la capa de mucosa del intestino delgado y elaboran enterotoxinas termolábiles y/o termoestables. Esta bacteria actúa mediante la producción de dos toxinas. Una toxina es termolábil, la cual se inactiva a 60 °C, mientras que la otra toxina es termoestable resistiendo 100 °C durante 30 min. Los síntomas, por lo general, aparecen de forma súbita y explosiva, en este caso no hay fiebre y es muy común la deshidratación. Los síntomas tienen un periodo de incubación de 24 h siendo la duración de éstos entre 3 y 20 días.

*Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC). Es considerado como el patógeno más importante dentro de los tipos de *E.coli* enterovirulentos de origen alimentario.

La cepa más conocida de EHEC es *E.coli* 0157:H7, aunque recientemente se han notificado otros serotipos con el mismo potencial patógeno. El mecanismo de acción de esta cepa no está muy claro, pero se han identificado factores de virulencia importantes. La bacteria, al ser ingerida, se reproduce y habita el tracto gastrointestinal donde produce las toxinas que actúan sobre el colon. Los límites de crecimiento de esta bacteria se sitúan entre 8 °C y 45 °C, pero es capaz de sobrevivir a la congelación durante más de 9 meses a -20 °C. Se transmite a través de la leche, huevos, carne picada de bóvido, cordero y cerdo, ensaladas vegetales crudas, alimentos fermentados y ácidos.

En el Informe anual del Sistema de Información Microbiológica del año 2013 se notificaron un total de 6 aislamientos de *E.coli* enterohemorrágico procedentes de 4 laboratorios de España. Cuatro de los casos se diagnosticaron por aislamiento de heces y dos por detección de la toxina en heces (Instituto de Salud Carlos III, 2015).

## 1.2 MÉTODOS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los métodos tradicionales para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos se basan en tratamientos físicos, principalmente el tratamiento térmico, y métodos químicos como los conservantes alimentarios. El tratamiento térmico provoca pérdida de nutrientes y alteración de las características organolépticas de los alimentos. Por otra parte, los conservantes químicos artificiales son empleados para limitar el número de microorganismos capaces de crecer dentro de los alimentos, pero el creciente rechazo por parte de los consumidores a los riesgos potenciales de salud asociados con algunas de estas sustancias, ha iniciado una investigación de métodos alternativos para inhibir dicho crecimiento. En este sentido encontramos diversos enfoques básicos para la conservación de alimentos (Weiss *et al.* 2009):

1. Manipulación aséptica para impedir la entrada de microorganismos en los alimentos.
2. Eliminación mecánica de microorganismos a través de lavado o filtrado.
3. Destrucción de microorganismos mediante aplicación de calor, presión, irradiación o sustancias químicas desinfectantes.
4. Inhibición del crecimiento de patógenos alimentarios a través de organismos de control ambiental.
5. Inhibición del crecimiento microbiano mediante adición de compuestos antimicrobianos naturales como aceites esenciales o ciertos ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, ciertas enzimas y proteínas animales así como compuestos de origen microbiano como las bacteriocinas.

A continuación se describen algunas de las nuevas metodologías que están siendo desarrolladas como alternativas al uso de tratamientos térmicos y conservantes químicos tradicionales.

### **Altas presiones**

El empleo de altas presiones en alimentos ha cobrado en los últimos años un enorme interés, debido a su acción conservante. Existen dos procedimientos: la presión dinámica y estática. La primera de ellas consigue la inactivación de microorganismos, pero se encuentra todavía en fase de estudio y desarrollo. El segundo procedimiento utilizado es la presión estática donde el producto es sometido a elevados niveles de presión hidrostática (100-1000 MPa) de forma continua durante varios minutos. Esta tecnología, denominada comúnmente altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing, HPP), puede aplicarse directamente en alimentos líquidos o en cualquier producto envasado sumergido en un fluido de presurización. El modo de acción de las altas presiones hidrostáticas consiste en una disminución de síntesis de ADN microbiano, aumento de la permeabilidad de las membranas celulares, desnaturalización de biopolímeros y proteínas, incluida la inactivación de enzimas, por cambios en la estructura intramolecular (>300MPa) en los microorganismos. Estos hechos afectan a la viabilidad de los microorganismos. En condiciones habituales de procesado, no afectan a enlaces covalentes y pueden no alterar ni el aroma ni el sabor de los alimentos pero sin embargo sí que pueden alterar la textura, el color y la apariencia (Herrero y Romero de Ávila, 2006).

### **Radiación Ultravioleta (UV)**

La radiación ultravioleta es empleada en la industria alimentaria por su capacidad de reducción exponencial de microorganismos. En este tratamiento es difícil establecer parámetros respecto a la intensidad que requiere, debido a que no todos los alimentos necesitan la misma dosis de radiación. La radiación UV actúa afectando al ADN de los microorganismos mediante la separación de la doble hélice, de esta forma causa mutaciones en estos evitando la reproducción de los mismos (Haro-Maza y Guerrero- Beltrán, 2013). Este tratamiento es utilizado para inactivar diversos microorganismos incluyendo los virus. Así mismo, diversos autores han probado la combinación de este tratamiento junto a otros. Lopez-Rubira *et al.* (2005) combinaron la radiación ultravioleta con atmósferas modificadas dando lugar a un buen método para la conservación de alimentos.

King y Hung (2012) combinaron la radiación UV-C junto con ozono y agua electrolizada oxigenada con el fin de inhibir *E. coli* O157:H7 en mora azul inhibiendo de 1.96 a 4 órdenes logarítmicos con una radiación de 7KJ/m<sup>2</sup>.

La radiación UV ha sido una respuesta satisfactoria como método de conservación ofreciendo productos microbiológicamente seguros manteniendo las características sensoriales muy similares al alimento en fresco. Los efectos de dicho tratamiento pueden ser observados inmediatamente tras su empleo durante el periodo de almacenamiento del producto (Haro-Maza y Guerrero- Beltrán, 2013).

### **Envases de atmósfera modificada**

El envasado en atmósfera modificada (MAP) es una técnica en la que el aire en el interior de los envases alimentarios es reemplazado por mezclas de gases con diferentes composiciones que aportan diferentes propiedades al envase. Este tipo de envasado presenta una serie de ventajas tales como el aumento significativo de la vida útil de los alimentos frescos y/o procesados, y el mantenimiento de las características organolépticas del producto fresco. Las desventajas del uso de este tipo de envasado es el alto coste en la inversión en los equipos, los gases y materiales de envases, y la necesidad de mantener la temperatura controlada.

### **Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)**

El dióxido de carbono es utilizado en la industria alimentaria para la conservación de los alimentos. Presenta una acción inhibitoria en una amplia gama de bacterias, mohos y levaduras. Al tratarse de un gas, penetra fácilmente a través de los poros inactivando directamente a los microorganismos al privar a las células del suministro adecuado de oxígeno. La eficacia del gas

depende de la temperatura, pH, duración de contacto y actividad de agua que posee el alimento (Haas *et al.* 1989).

### **Bacterias ácido-lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son imprescindibles en la mayoría de las fermentaciones de alimentos, en las que los ácidos y otros metabolitos inhibitorios procedentes de dichas bacterias, son una técnica importante en la conservación de alimentos (Presser *et al.* 1998). Una de las contribuciones más importantes que presentan estos microorganismos es el aumento de la vida útil que adquiere el producto fermentado en comparación con aquel sin fermentar (Abee *et al.*, 1995).

Además, las bacterias ácido-lácticas (BAL) producen bacteriocinas, grupo heterogéneo de proteínas antibacterianas que varían según la actividad, modo de acción, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas (Abee *et al.*, 1995). Estas sustancias son utilizadas como método alternativo a los conservantes químicos artificiales para limitar el número de microorganismos capaces de crecer dentro de los alimentos. Existe una gran variedad de bacteriocinas que son producidas por las BAL, siendo cada una particular en cuanto a los espectros de inhibición, por lo que son utilizadas de diferente forma en la industria alimentaria. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables relacionadas con el productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o degradadores de alimentos (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2003).

### **Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos volátiles obtenidos a partir de plantas. Son considerados como los principales agentes antimicrobianos naturales en alimentos. Los aceites esenciales se han utilizado ampliamente como bactericidas, virucidas o fungicidas en aplicaciones medicinales y cosméticos. Hoy en día se emplean especialmente en la industria farmacéutica y sanitaria, y en la industria agrícola y alimentaria (Bakkali *et al.*, 2008). Pueden actuar como prooxidantes afectando a las membranas celulares internas y a los orgánulos como las mitocondrias de los microorganismos (Bakkali *et al.*, 2008).

La hidrofobicidad de los aceites esenciales les permite la interacción con los lípidos de la membrana celular y las mitocondrias, hace ambas permeables por lo que libera el contenido citoplasmático de la bacteria.

Las condiciones físicas que mejoran la acción de dichos aceites son un pH bajo, una baja temperatura, y niveles bajos de oxígeno (Burt, 2004).

### **Ácidos grasos libres**

Entre las diversas aplicaciones de los ácidos grasos libres, destaca su capacidad antimicrobiana. El modo de acción antibacteriano aún es poco conocido, pero se ha comprobado que su acción principal es sobre la membrana celular, donde los AGL interrumpen la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Además de interferir en la producción de energía celular, los ácidos grasos también pueden inhibir la actividad enzimática alterando la absorción de los nutrientes, y produciendo la autooxidación de productos y la lisis de las células bacterianas. El modo no específico de acción y su seguridad los hacen atractivos como agentes antibacterianos para diversas aplicaciones como la medicina y la conservación de alimentos entre otras (Desbois y Smith, 2010).

### **Proteínas animales**

Diversas proteínas animales como la lisozima o la lactoferrina están siendo estudiadas para su posible uso como compuestos antimicrobianos naturales. La lactoferrina es una glicoproteína que presenta poder antimicrobiano contra bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo*. Puede tanto inhibir como retardar el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella* Thyphimurium, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* entre otras. La capacidad bactericida de la lactoferrina se atribuye a la interacción directa de la molécula o parte de ella con la membrana externa de los microorganismos. Esto provoca la liberación de LPS aumentando la permeabilidad de la membrana y produciendo la liberación del contenido citoplasmático de la bacteria (Ramos- Clamont *et al.*, 2010).

## **1.3 ÁCIDOS GRASOS LIBRES**

### **1.3.1 Características**

Los ácidos grasos libres (AGL) son moléculas formadas por una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en los extremos. El tamaño de la cadena hidrocarbonada varía, estando por lo general formadas por un grupo par de átomos de carbono. Los AGL formados por cadenas de 10 a 28 átomos de carbono son los más abundantes en la naturaleza.

Los AGL presentan un carácter hidrofílico debido al grupo funcional del ácido carboxílico el cual se ioniza cuando se encuentra en disolución con el agua; mientras que la cadena hidrocarbonada es

hidrofóbica, formando así una molécula anfipática. La estructura predominante en la molécula es la cadena hidrocarbonada, apolar, por lo que la solubilidad en agua depende de la longitud de la cadena.

Los ácidos grasos se pueden clasificar en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada, (siendo ácidos grasos de cadena corta aquellos que contienen entre 2 y 6 carbonos, de cadena media entre 8 y 12 carbonos y de cadena larga más de 14 carbonos), la presencia de dobles enlaces en dicha cadena o la posición de los dobles enlaces. Los ácidos grasos saturados no presentan isomería, es decir, contienen enlaces simples y por tanto, poseen una estructura lineal que facilita el empaquetamiento. Así mismo, presentan una elevada temperatura de fusión por lo que son sólidos a temperatura ambiente. Por contra, los ácidos grasos insaturados presentan isomería (*cis - trans*) debido a la presencia de dobles enlaces en su cadena. En la naturaleza predomina la forma *cis* la cual presenta una estructura angular, por lo que pueden tener problemas en el empaquetamiento. Poseen una temperatura de fusión más baja que los saturados por lo que son líquidos a temperatura ambiente. Dichos ácidos son muy reactivos, debido a la presencia de los dobles enlaces.

### 1.3.2 Funciones

Estas moléculas suelen encontrarse unidas a otros compuestos tales como el glicerol, azúcares o grupos fosfatos, para así formar lípidos. Los lípidos son componentes integrales de las estructuras celulares, como las membranas formadas por fosfolípidos. Los ácidos grasos pueden ser liberados de los lípidos mediante acción enzimática y así convertirse en ácidos grasos libres, teniendo diversas actividades biológicas muy potentes (Desbois y Smith, 2010)

Los ácidos grasos poseen múltiples funciones, como su función estructural, energética y reguladora. Cabe destacar su capacidad antibacteriana, siendo capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y patógenos.

#### **Actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de los ácidos grasos depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada así como la presencia, el número, posición y orientación de los dobles enlaces (Desbois y Smith, 2010)

Los AGL insaturados de cadena media o larga son más activos frente a bacterias Gram-positivas que en las Gram-negativas. A su vez la conformación *cis* de estos ácidos tiende a ser más activa contra las bacterias que aquellos que poseen conformación *trans*. Por lo general dichos ácidos grasos tienden a tener mayor poder antimicrobiano que los AGL saturados, siendo éstos últimos más activos cuando las cadenas son de entre 10 y 20 carbonos. La eficacia antimicrobiana tiende a



disminuir a medida que va aumentando o disminuyendo el número de carbonos en la cadena (Desbois y Smith, 2010).

Los mecanismos específicos por los que los AGL causan inhibición del crecimiento bacteriano o su muerte, dependerán de la estructura de estos ácidos, la bacteria diana y los sitios en los que los AGL pueden acceder. El control efectivo del crecimiento bacteriano y la supervivencia podrían implicar múltiples mecanismos, afectados por factores como el pH y la temperatura (Desbois y Smith, 2009).

Los ácidos grasos pueden tanto matar una bacteria directamente (acción bactericida) como inhibir su crecimiento (acción bacteriostática), donde la bacteria permanece viable pero no puede someterse a un proceso de división celular en presencia de estos ácidos (Sheu y Freese, 1972).

Todavía no está claro cómo los ácidos grasos ejercen sus funciones antibacterianas, pero parece ser que la diana principal es la membrana bacteriana. En la membrana interna de las bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas tiene lugar la fase final de producción de energía, ya que es donde se encuentra la cadena de transporte de electrones. Este proceso se puede ver afectado por la acción de los AGL. La interacción de estos ácidos grasos con la membrana interna bacteriana puede generar una interrupción en la cadena de transporte de electrones en la célula bacteriana, reduciendo así la producción de ATP y quedando la bacteria de este modo privada de una fuente de energía.

Por otra parte, la estructura anfipática de los AGL les permite actuar como detergentes que pueden interactuar con la membrana celular creando poros de tamaño variable. De esta forma pueden solubilizar la membrana, generando una pérdida de componentes esenciales para el crecimiento bacteriano, tales como las proteínas, o secciones grandes de la bicapa de lípidos, causando así, la inhibición del crecimiento o la muerte celular (Desbois y Smith, 2010).

Otro efecto antimicrobiano de los AGL es el poder inhibitorio sobre diversas enzimas cruciales para el desarrollo bacteriano. Por otro lado, los ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, pueden inhibir la capacidad para absorber los nutrientes necesarios para que las bacterias permanezcan viables (Desbois y Smith, 2010). Otro posible mecanismo de acción de los AGL es la producción de productos de degradación secundarios de dichos ácidos con función antimicrobiana como peróxido de hidrógeno y especies reactivas de oxígeno, producidos por la peroxidación, o la auto-oxidación produciendo oxilipinas y aldehídos.

### 1.3.3 Aplicaciones

La amplia gama de actividad y el modo no específico de acción que presentan los AGL, los hacen atractivos como agentes antimicrobianos para diferentes aplicaciones tales como la medicina,

agricultura, conservación de alimentos y formulación de cosméticos o nutraceuticos. A pesar del evidente potencial de dichos compuestos, las propiedades antibacterianas no han sido todavía explotadas plenamente. Una de las razones por las que se da este hecho podría ser la longitud de la cadena de poliinsaturaciones que presenta el ácido, que hace que sean inestables y que tiendan a unirse a otros compuestos como las proteínas.

En relación a las aplicaciones biomédicas, actualmente hay un incremento del aumento de la prevalencia de bacterias resistentes a los medicamentos, por lo que es necesario el descubrimiento y desarrollo de alternativas a los antibióticos convencionales. Los AGL son moléculas de defensa en los sistemas inmunes innatos de los organismos multicelulares, pudiendo ser manipulados para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas.

En la actualidad, las mejores perspectivas de explotación en la medicina son para las terapias dirigidas a la mejora de las concentraciones de los AGL naturales en la piel. Otras aplicaciones terapéuticas de estos ácidos grasos en los seres humanos podría ser la prevención de caries dentales, la reducción de las infecciones gastrointestinales infantiles mediante la adición de dichos ácidos a la leche infantil o el tratamiento de úlceras estomacales producidas por *Helicobacter pylori*.

La utilización de los AGL en la agricultura y acuicultura se debe a la creciente preocupación por la resistencia que los patógenos han mostrado hacia los antibióticos, así como por los residuos que los antibióticos puedan generar. Estos han sido utilizados como suplemento en la alimentación animal, ya que aumentan la producción de carne o pescado al reducir las bacterias que se producen en el sistema digestivo. Otra aplicación sería la utilización de dichos ácidos para el tratamiento de mastitis bovina y el control de las infecciones en abejas. Otra posible aplicación de estos ácidos sería su inclusión en alimentos para prevenir e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o responsables del deterioro de alimentos (Desbois y Smith, 2010).

#### 1.4 ÁCIDO CAPRÍLICO

El ácido caprílico es un ácido graso saturado, formado por ocho átomos de carbono, también conocido como ácido octanoico. Se encuentra de forma natural en la leche materna humana, leche de cabra y bovino, aceite de coco y aceite de palma.

El punto de fusión de este ácido graso es 16,7 °C (líquido a temperatura ambiente), disminuyendo su solubilidad a medida que la temperatura se reduce. Se trata de un antimicrobiano natural altamente aromático cuyo olor se describe como rancio (Santos *et al.*, 2011).

El ácido caprílico puede ser utilizado como un suplemento nutricional para la salud. De acuerdo con el código alimentario y las regulaciones de varios países, el presente ácido ha sido reconocido como seguro (GRAS), tras amplios estudios que han revelado su inocuidad para la salud humana (Choi *et al.*, 2013)

Numerosos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana que posee el ácido caprílico contra diversos patógenos, incluyendo virus y bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, y parásitos. El mecanismo de acción del ácido caprílico no se conoce con exactitud pero parece que la actividad antimicrobiana tiene lugar en su estado protonado o ácido, alterando la cadena de transporte de electrones en la membrana bacteriana, siendo esta su principal sitio de acción a pH 7 (Desbois y Smith, 2009).

Nakamura y Zanger (1968) estudiaron el efecto bactericida del ácido octanoico, propiónico y acético sobre el crecimiento *in vitro* de *Shigella* y dos cepas de *E. coli*. Sus descubrimientos indicaron que el ácido caprílico a niveles de dosificación del 0,3% fue muy eficaz contra las tres bacterias, mientras que los dos ácidos restantes requirieron niveles de dosificación más elevados (>1,0%) para una reducción significativa de las bacterias. Richter *et al.*, (1993) demostraron la acción bactericida de este compuesto indicando que una concentración de 1000 ppm de ácido octanoico a pH 2,96 podía reducir *Staphylococcus aureus* y *E. coli* en 6,96 y 7,30 órdenes logarítmicos, respectivamente. Así mismo, el estudio demostró que el ácido octanoico tiene mayor poder bactericida que el ácido decanoico (C10) y el ácido hexanoico (C6). Estudios más recientes han estudiado el efecto del ácido caprílico sobre *E. coli* O157:H7 a pH 5,6 y 6,8. Los resultados indicaron que con una solución de 0,5% de ácido caprílico a pH 5,6 la población de *E. coli* se reducía aproximadamente 6,5 órdenes logarítmicos en un minuto (Burnett *et al.*, 2007).

Con la creciente tendencia a la demanda de los alimentos cada vez más naturales, hay un renovado interés en el uso de los ácidos grasos y sus derivados como alternativa a los agentes antimicrobianos sintéticos. Dada la probada actividad antimicrobiana del ácido caprílico, dicho ácido graso podría ser empleado en la conservación de alimentos y mejora de la alimentación, pudiendo ser utilizado como suplemento nutricional (Choi *et al.*, 2013). El efecto bactericida del ácido caprílico en combinación con tratamientos térmicos suaves fue estudiado en la inactivación de *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en leche infantil reconstituida. Los resultados mostraron que a medida que la temperatura aumentaba, el efecto bactericida se veía incrementado, destruyendo totalmente las células sin recuperación de la viabilidad celular. Después del tratamiento combinado, se observó que la células tenían una estructura deformada, y se produjo una desintegración de la membrana celular con liberación de material celular y por tanto, muerte celular (Choi *et al.*, 2013). Los efectos sinérgicos de ácido caprílico junto con el

tratamiento térmico suave se deben a la mayor solubilidad de estos compuestos con las altas temperaturas, lo que aumenta su capacidad para romper las membranas celulares (Jang y Rhee, 2009; Nair *et al.*, 2004).

La aplicación o administración como suplemento de ácido caprílico presenta una serie de desventajas debido a sus propiedades sensoriales como olor a rancio y sabor desagradable (Hulankova *et al.*, 2013). También puede haber una reducción de la actividad antimicrobiana cuando interacciona con los componentes de los alimentos. Una de las soluciones para abordar estos problemas puede ser el uso de la encapsulación. De esta forma se permite a los AGL mantener sus propiedades y aumentar la estabilidad frente a agentes externos. Así, problemas como la transferencia de masas, la interacción de los constituyentes de los alimentos o la alteración de la funcionalidad debido a los procesos alimentarios físicos y químicos, pueden ser impedidos (Ruiz-Rico *et al.*, 2015).

## 1.5 MATERIALES MESOPOROSOS DE ÓXIDO DE SILICIO

### 1.5.1 Características

Los materiales mesoporosos de óxido de silicio son sólidos que se componen de una estructura porosa con cientos de canales vacíos (mesoporos) capaces de absorber y/o encapsular cantidades relativamente elevadas de moléculas bioactivas. El tamaño de los poros es variable, oscila entre 2 y 50 nm, y presentan gran área superficial ( $1000\text{m}^2/\text{g}$ ) (Slowing *et al.* 2008).

El empleo de partículas mesoporosas en el ámbito de la alimentación se debe a sus características únicas tales como su biocompatibilidad, la estructura ordenada de sus poros con alta capacidad de carga, y gran área superficial fácilmente modificable.

Las partículas porosas de óxido de silicio se clasifican según su tamaño de poro como microporosas (diámetro  $\leq 2$  nm), mesoporosas (diámetro de  $2\text{ nm} \leq d \leq 50$  nm) y macroporosas (diámetro  $\geq 50$  nm) (Corma, 1997).

Las características de estos materiales son ideales para los procesos de absorción de moléculas bioactivas. Uno de los materiales mesoporosos más descrito es el material MCM-41 (Mobil Composition of Matter) que fue sintetizado por primera vez en 1992 junto con los demás miembros de la familia M41S. Estos compuestos se caracterizan por ser materiales cristalinos que poseen canales unidimensionales y tener una composición química modificable mediante la adición de cationes metálicos o variaciones en las condiciones de síntesis (Beltran *et al.*, 2003).

La estructura de este material actúa como una plantilla, ideal para la carga y/o funcionalización de agentes bioactivos dentro o fuera de sus mesoporos, manteniendo su estabilidad y biocompatibilidad (Asefa y Tao, 2012). El área superficial grande y la capacidad de modificar de forma independiente el tamaño del poro permiten la carga de combinaciones diversas.

La superficie de sílice puede ser funcionalizada con grupos orgánicos diferentes, a través de procedimientos de anclado. Así mismo posee un elevado potencial para la absorción selectiva y la liberación de fármacos, siendo utilizado en las nuevas estrategias terapéuticas (Di Pasqua *et al.*, 2008).

La biocompatibilidad e inocuidad de dichos materiales ha sido estudiado en los últimos años pero todavía no está claramente establecida. Los diversos estudios presentes en la literatura han evidenciado que hay grandes diferencias en el potencial toxicológico de las partículas mesoporosas de óxido de silicio en función de sus diversas propiedades fisicoquímicas. Los resultados sugieren que la toxicidad de estas partículas depende principalmente de la morfología (tamaño/forma), el estado de agregación, la carga superficial, hidrofobicidad y dosis (Hudson *et al.*, 2008). En general, los estudios de toxicidad han mostrado que las micropartículas presenta escasa toxicidad en comparación con 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 *et al.*, 2012).

### 1.5.2 Aplicaciones

La utilización de la nanotecnología está cada vez más vigente, transformando los sectores médicos y de bioingeniería, y proporcionando así la utilización de métodos alternativos para la administración de fármacos, compuestos bioactivos, o la regeneración de órganos.

Los materiales mesoporosos resultan de un creciente interés en el campo de la salud. Pueden ser utilizados como portadores de fármacos tras haber comprobado sus buenos resultados *in vivo* en animales. Han sido utilizados como métodos alternativos a la terapia fotodinámica y la quimioterapia para tratamientos de cáncer (Mamaeva *et al.*, 2013). Otra aplicación de las partículas mesoporosas de sílice es para encapsular nutracéuticos, logrando la liberación controlada de los fármacos.

Las tecnologías de nano-fabricación se están adaptando y desarrollando rápidamente para su uso en la industria alimentaria. Cuentan con diversas aplicaciones tales como nuevos materiales de embalaje, nuevos ingredientes alimenticios, así como sensores para detectar patógenos, alérgenos, contaminantes e indicadores de degradación en la calidad de alimentos. Son también

aplicables para la creación de nuevos auxiliares tecnológicos nano-estructurados tales como filtros, membranas y reactores (Weiss *et al.*, 2009).

Así mismo, podrían ser utilizados como catalizadores de la síntesis de nutrientes esenciales, para la encapsulación y liberación controlada de moléculas bioactivas como vitaminas o enzimas para mejorar las características nutricionales y organolépticas de los alimentos, así como sensores para detectar productos tóxicos (Hudson *et al.*, 2008; Climent *et al.*, 2009; Bernardos *et al.*, 2013).

## 1.6 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La importancia de la transmisión de enfermedades por vía alimentaria causada por microorganismos es un problema de salud pública en todo el mundo.

El crecimiento de microorganismos causantes de toxiinfecciones alimentarias en la industria ha provocado que aumente el uso de antimicrobianos para alargar la vida útil de los alimentos y controlar el crecimiento de los microorganismos. El uso inapropiado de estos antimicrobianos ha producido resistencia en diversas bacterias frente a ciertos patógenos, que puede transmitirse en la cadena alimentaria. A su vez pueden ocasionar el acúmulo de residuos tóxicos en dichos animales, lo que obliga a un periodo de seguridad antes de su consumo. Un ejemplo de este fenómeno es la resistencia a las fluoroquinolonas, una de las clases de fármacos antibacterianos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias por *E. coli*. Esta resistencia se encuentra muy extendida a nivel mundial. En los años ochenta cuando aparecieron estos fármacos, la resistencia a ellos era casi inexistente. Hoy en día hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes (OMS, 2014).

La tendencia mundial del sector agroalimentario a garantizar la inocuidad de los productos que se consumen, junto con la demanda del consumidor de obtener productos cada vez más naturales, ha llevado a un interés en la producción de sustancias antimicrobianas naturales. Estos compuestos pueden ser obtenidos de plantas, animales o fuentes minerales, siendo los aceites esenciales presentes en las plantas y los ácidos grasos presentes en la leche los de mayor interés. Una de las posibilidades sería el empleo de la nanotecnología para llevar a cabo la síntesis de materiales con características antimicrobianas contra diversos patógenos. El anclado del ácido caprílico, con propiedades antimicrobianas, a materiales de sílice para la liberación controlada de fármacos o antimicrobianos, sería una alternativa al uso de antibióticos y/o antimicrobianos tradicionales.

## 2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

---

### 2.1 OBJETIVOS

El objeto principal del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del ácido caprílico tanto libre como anclado en sólidos mesoporosos sobre *Escherichia coli*.

Para llevar a cabo dicho objetivo se plantearon los siguientes diversos objetivos específicos:

1. Caracterización del sólido MCM-41 sintetizado y funcionalizado con ácido caprílico mediante diversas técnicas instrumentales.
2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del ácido caprílico libre sobre *Escherichia coli*.
3. Estudio del mecanismo de acción del ácido caprílico mediante ensayo con fluorocromos.
4. Estudio de la influencia de partículas mesoporosas de sílice funcionalizadas con ácido caprílico sobre la viabilidad de *Escherichia coli*.

### 2.2 PLAN DE TRABAJO

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos se siguió el siguiente plan de trabajo.

1. Revisión bibliográfica relacionada con el estudio
2. Síntesis de las micropartículas mesoporosas MCM-41
3. Funcionalización del soporte mesoporoso con ácido caprílico
4. Caracterización de los materiales
  - 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
  - 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
  - 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

---

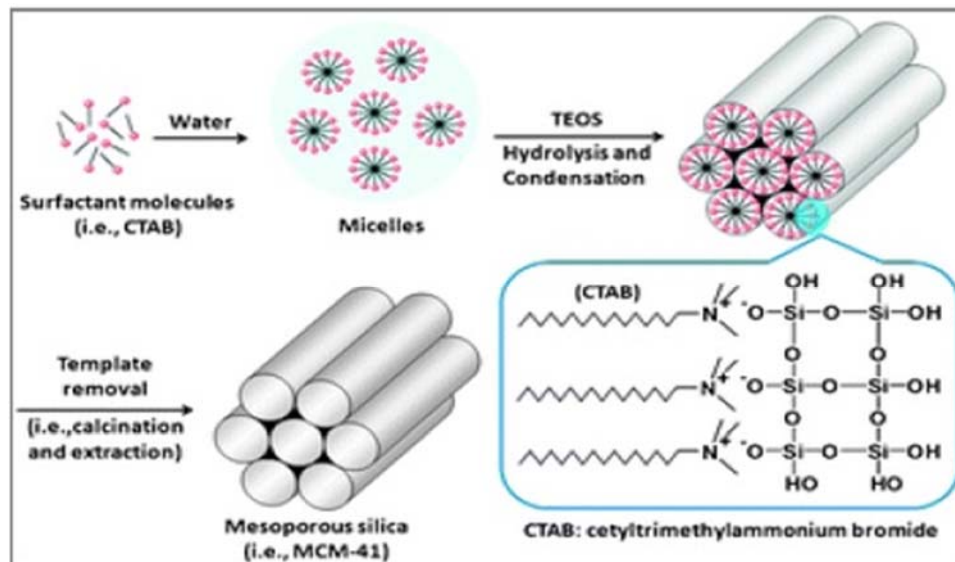
#### 3.1 SÍNTESIS DEL MATERIAL MESOPOROSO DE ÓXIDO DE SÍLICE (MCM-41) MICROPARTICULADO

La síntesis del material mesoporoso se llevó a cabo según el protocolo descrito por Pérez-Esteve *et al.* (2015). Se empleó trietanolamina (TEA) como agente director de la estructura, tetraetilortosilicato (TEOS) como fuente de sílice y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como surfactante (Figura 3.1). 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 micropartículas MCM-41 se realizó siguiendo la denominada "ruta de atranos". La relación molar entre los reactivos empleados fue la siguiente: 7 TEA: 2 TEOS: 0.52 CTAB: 0.5 NaOH: 180 H<sub>2</sub>O.

Para realizar dicha síntesis se pesaron 52,4 g de TEA, compuesto que ayuda a la formación de la estructura ordenada de las partículas, al que se adicionó una disolución de 0,98 g de hidróxido sódico (NaOH) en 2 mL de agua destilada. La mezcla resultante se calentó a 120 °C y 300 rpm, y tras este período se disminuyó la temperatura a 70 °C y se añadieron 22 mL de TEOS. Seguidamente se calentó la mezcla a 118 °C y se adicionaron 9,36 g de CTAB, el cual actúa como surfactante formando micelas sobre el que se forma la estructura de sílice. A continuación, se disminuyó la temperatura a 70 °C y se añadieron 180 mL de agua destilada aumentando la velocidad a 700 rpm, y obteniendo así la formación de un precipitado. Una vez formado este, se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, la suspensión se introdujo en un recipiente de teflón a 100 °C y se mantuvo durante (20-24h) con el fin de obtener la estructura final del material.

Transcurrido dicho tiempo, la suspensión fue filtrada a vacío y el sólido se lavó con agua destilada y etanol hasta pH neutro obteniendo así el sólido **S0**. Dicho material obtenido se secó a 72 °C durante 24 h y se calcinó a 550 °C durante 5 h con el fin de eliminar completamente el CTAB, obteniendo el sólido **S1**.



**Figura 3.1. Síntesis de partículas MCM-41** - Pasos del mecanismo de formación de partículas MCM-41 destacando la formación de micelas, la hidrólisis y reacciones de condensación a través de la adición de TEOS y productos finales después de la eliminación de la plantilla y calcinación (Yang et al. 2011).

### 3.2 ANCLADO DE ÁCIDO CAPRÍLICO AL SOPORTE MCM-41

La superficie del sólido MCM-41 desnudo (**S1**) fue funcionalizada con ácido caprílico obteniendo así el sólido final (**S2**). Para ello, en primer lugar se funcionalizó el soporte con 3-aminopropiltriethoxisilano (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.

En primer lugar, se realizó la funcionalización con APTES con el objetivo de introducir grupos amino al material de óxido de silicio. Para ello, 1 g del sólido MCM-41 calcinado (**S1**) fue suspendido en 30 mL de acetonitrilo y a dicha mezcla se adicionaron 2 mL de APTES. La mezcla se dejó en agitación durante 5,5 h, y a continuación, se filtró la suspensión, se lavó el sólido con 100 mL de acetonitrilo y se secó a 37 °C durante 24 h.

Tras la funcionalización con APTES, 1 g del sólido obtenido anteriormente fue suspendido en 40 mL de diclorometano y a la mezcla se adicionaron 1,47 mL de N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA). Esta suspensión se enfrió en un baño de hielo hasta alcanzar los 0 °C, y a continuación se adicionaron 1,2 mL de cloruro de octanoílo gota a gota. La mezcla final se dejó 2h en agitación a temperatura ambiente, y tras esto, se filtró, lavó con diclorometano (100 mL) y se secó a 37 °C obteniendo el sólido final **S2**.

### 3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SÓLIDOS MESOPOROSOS

La caracterización estructural de las diferentes micropartículas se llevó a cabo mediante las diferentes técnicas instrumentales.

#### 3.3.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica analítica no destructiva que permite la identificación de los diferentes compuestos cristalinos que forman una muestra sólida. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante un difractómetro Bruker AXS D8 Advance (Karlsruhe, Alemania) con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) en el intervalo de barrido  $1.3^\circ < 2\theta < 8.3^\circ$ , con pasos de contaje de  $0.04^\circ (2\theta)$  y con un tiempo de  $3\text{s/paso}$ .

#### 3.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) genera imágenes de dimensiones nanométricas. Las imágenes de TEM se llevaron a cabo en un microscopio Philips CM 10 (Koninklijke Philips Electronics N.V, Eindhoven, Países Bajos) operando con un voltaje de aceleración de 80KV. La preparación de la muestra se realizó mediante la dispersión de una pequeña cantidad de sólido en diclorometano. La suspensión formada se mantuvo en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Seguidamente se colocó una gota de la suspensión sobre una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro rodeada con una película de carbono utilizada como soporte. A partir de las imágenes obtenidas se calculó el tamaño medio de las partículas ( $n=30$ ).

#### 3.3.3 Potencial zeta

El potencial zeta permite la determinación de la carga superficial y la estabilidad de las partículas en una suspensión líquida. Las medidas del potencial zeta de los sólidos se realizaron en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) a  $25^\circ\text{C}$ . 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  $1 \text{ mg/mL}$  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  $10^\circ\text{C}$  por minuto desde  $25^\circ\text{C}$  hasta  $100^\circ\text{C}$  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 AC 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 la reconstitución de las cepas microbianas y la preparación de inóculos se utilizaron los medios generales Plate Count Agar (PCA) y Tryptic Soy Broth (TSB). Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizó un medio de cultivo selectivo, con el objetivo de identificar el microorganismo en base al aspecto de la colonia obtenida y poder detectar cualquier tipo de contaminación en el proceso. El medio de cultivo selectivo utilizado fue Tryptone Bile x-glucuronide (TBX) Agar. Todos los medios de cultivo fueron suministrados por Scharlab (Sharlab S.A., Barcelona, España). La composición de los medios de cultivo utilizados se muestra en el Anexo I.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121 °C, tras lo cual fueron enfriados en un baño a 50 °C y distribuidos en placas Petri estériles en una cámara de flujo, para garantizar la asepsia del proceso.

El medio de cultivo líquido TSB se preparó disolviendo 30 g del medio en 1 L de agua destilada. El caldo TSB se distribuyó en tubos de ensayo dosificando 10 mL en cada tubo y los tubos 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. Antes de ser utilizados en cada ensayo, fueron atemperados a condiciones ambientales.

### 3.4.2 Cepa bacteriana y preparación del inóculo

La cepa de *Escherichia coli* (CECT 1103) utilizada en el presente trabajo fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La reconstitución de la cepa se realizó según las instrucciones dadas por la CECT.

La preparación del inóculo se realizó siguiendo el método de suspensión directa de colonias. A partir de una placa de un cultivo puro de 24 h se tomó una colonia con un asa de siembra y se transfirió a un tubo de 10 mL de medio TSB. El tubo se agitó durante 15-20 s y se mantuvo en incubación 24 h a 37 °C en condiciones aerobias. Tras esto, el inóculo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y el pellet obtenido fue resuspendido 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** (materiales y métodos) 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 10 µL 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

En el presente estudio se realizaron recuentos en placa del microorganismo de estudio con el fin de determinar el efecto de las distintas condiciones de estudio sobre su crecimiento. Para ello, pasado el periodo de incubación de los matraces de trabajo, se prepararon diluciones decimales seriadas en tubos de 9 mL de agua destilada estéril. De cada una de las diluciones se sembró en superficie 0.1 mL sobre las placas de medio selectivo (TBX) y se distribuyó la muestra con un asa de Drigalsky por toda la superficie. Las siembras se realizaron por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Tras el periodo de incubación, se realizó el recuento directo en placa sobre aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. A continuación se calculó el promedio de los recuentos obtenidos para cada condición. Los valores obtenidos fueron transformados logarítmicamente y expresado como log UFC/mL. Los resultados obtenidos del recuento de los controles positivos fueron utilizados para cuantificar el porcentaje de inhibición del microorganismo en las distintas condiciones de estudio.

#### 3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Con el fin de estudiar el efecto cualitativo del ácido caprílico sobre la viabilidad de *E. coli* se realizó un ensayo de microscopía de fluorescencia con fluorocromos para determinar la integridad de la membrana celular a diferentes tiempos de incubación (tiempo 0, 2, 4 y 24 h). 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 tamaño reducido que penetra en las células con la membrana intacta y se une al DNA emitiendo fluorescencia verde, mientras que el yoduro de propidio posee un tamaño molecular más grande por lo que penetra solo en aquellas células que presentan poros de membranas (células no viables) desplazando al SYTO®9 y proporcionando fluorescencia roja. La máxima emisión/excitación para estos fluorocromos es de 480 nm/500 nm para el SYTO®9 y 490 nm/635 nm para el yoduro de propidio.

Para realizar la tinción, se tomó una alícuota de 500 µl de muestra, se mezcló con 0.8 µl de la mezcla de los dos fluorocromos en una relación (1:1) del kit LIVE/DEAD Baclight™ y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se tomaron 5 µl de la muestra teñida y se depositaron en un portaobjetos recubierto de poly-L-lisina (Sigma Diagnostics, U.S.A.), y se taparon con un cubreobjetos, incubándose en oscuridad durante 10 min. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la observación de las células mediante un microscopio de

epifluorescencia Olympus BX 50 equipado con un filtro barrera BA515IF y una cámara Olympus DP71 (Olympus Optional Co, Hamburg, Alemania).

Se consideraron aquellas células que emitían fluorescencia verde como viables, mientras que aquellas que emitían fluorescencia anaranjada o roja como no viables. Así mismo se realizaron recuentos en placa para verificar que los bacilos que emitían fluorescencia verde crecían en placa.

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

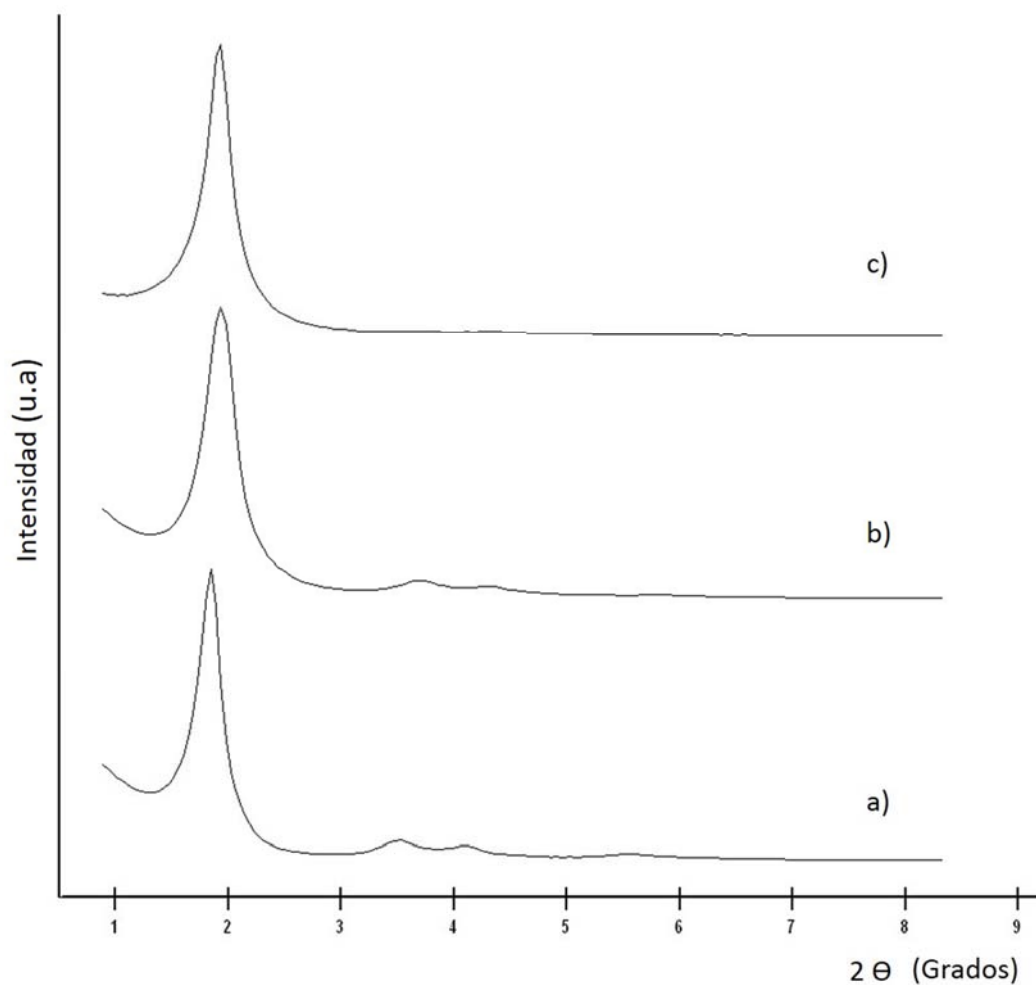
Con el objeto de evaluar el efecto del tipo de condición de ensayo y concentración de ácido caprílico sobre el crecimiento microbiano de *E. coli*, se llevó a cabo un ANOVA simple. El programa estadístico empleado fue Statgraphics Centurion XVI (Statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). El 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 SÓLIDOS MESOPOROSOS.

Tras la síntesis y funcionalización de las micropartículas de sílice MCM-41, los sólidos se caracterizaron mediante las distintas técnicas analíticas con el fin de evaluar la estructura de la partícula sintetizada y funcionalizada con ácido caprílico. La estructura mesoporosa de los sólidos sintetizados fue comprobada mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica (TEM).

Los patrones de difracción de rayos X se muestran en la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Diffractograma de Rayos X de las micropartículas MCM-41 - sin calcinar (a), calcinadas (b) y funcionalizadas con ácido caprílico (c).

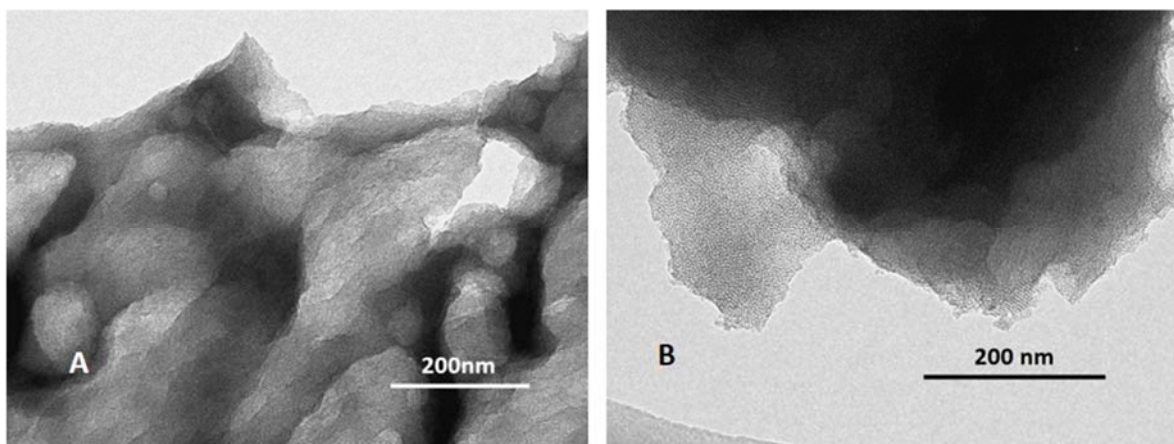


El patrón (a) muestra un pico muy resuelto (100) y tres picos más débiles que corresponden a los planos (110), (200) y (210) característicos de la estructura mesoporosa hexagonal de los materiales de MCM-41 (Heikkilä *et al.*, 2010).

Tras la calcinación (b) se produjo una contracción de la celda unidad debido a la eliminación de CTAB, por lo que el pico (100) se desplazó hacia la derecha y hubo un ensanchamiento en los picos (110) y (200) debido a la condensación de los silanones durante el proceso de calcinación.

La similitud del pico (100) en los difractogramas de los patrones (b) y (c) respecto al (a) indican que los procesos de calcinación y anclado no alteraron la estructura hexagonal típica de las partículas de óxido de silicio mesoporosas. Por tanto, los patrones obtenidos en ambos casos indican que el proceso de síntesis fue correcto y que los procesos de calcinación y funcionalización mantuvieron la estructura del material.

La morfología y el ordenamiento hexagonal de los materiales MCM-41 fueron confirmados tras un análisis morfológico realizado mediante TEM. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 4.2.



**Figura 4.2. Imágenes de TEM de las micropartículas MCM-41 - calcinadas (A) y funcionalizadas con ácido caprílico (B).**

En la imagen (A) se observa la presencia de un sistema ordenado de poros hexagonales y los típicos canales de sílice de este material. Las matrices mesoporosas aparecen como rayas blancas y negras alternas formando la estructura de los poros vacíos. La imagen (B) muestra la misma porosidad y estructura hexagonal que se muestra en la imagen A.

Tanto el análisis morfológico y estructural de las imágenes de TEM y los patrones obtenidos por difracción de rayos X confirman que los procesos de calcinación y funcionalización con ácido caprílico no han afectado a la estructura y porosidad de las partículas.

Así mismo, las imágenes de TEM permitieron determinar el tamaño promedio de las partículas. En la Tabla X se pueden observar los resultados de tamaño de partícula y potencial zeta de las partículas antes y después de la funcionalización.

**Tabla 4.1. Tamaño de partícula mediante TEM y potencial zeta - del material calcinado y funcionalizado con ácido caprílico.**

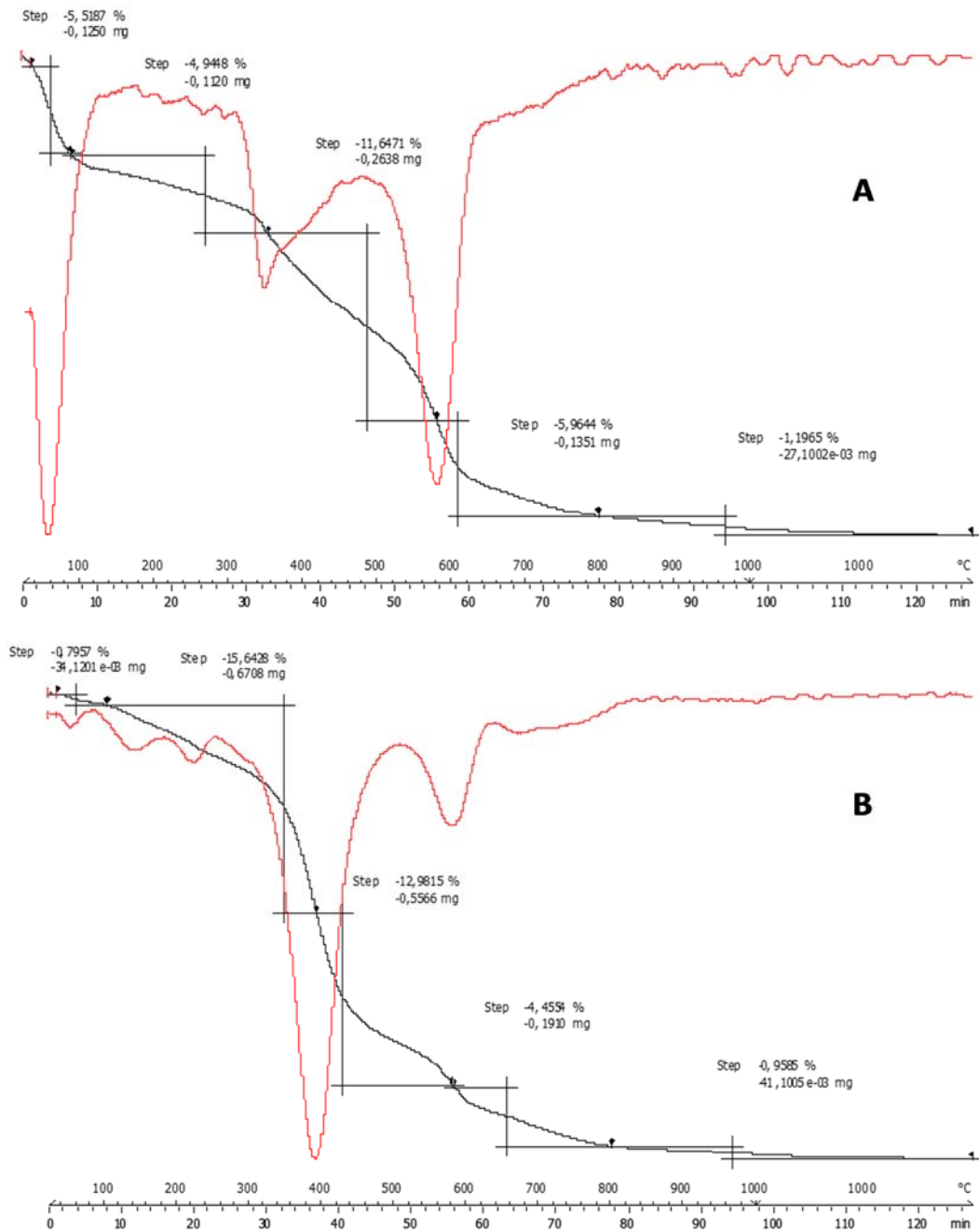
Material	Tamaño partícula (nm)	potencial zeta (mV)
MCM-41 calcinado	1041,90 ± 281,84	- 21,17 ± 0,44
<b>MCM-41 funcionalizado (S2)</b>	1175,05 ± 381,10	2,31 ± 1,21

Los valores obtenidos mediante TEM del tamaño medio de partículas para el sólido MCM-41 se encuentran en el rango estimado de tamaño microparticulado. Tras la funcionalización, el sólido **S2** muestra un tamaño similar al material calcinado sin observarse diferencias significativas entre ambos materiales. Esto indica que el anclado del ácido caprílico no modifica el tamaño de las partículas de forma significativa.

Así mismo, con el fin de determinar la carga superficial y la estabilidad de las partículas en suspensión se llevó a cabo la determinación del potencial zeta. Por lo general, la estabilidad de las partículas en suspensión es mayor cuando el potencial zeta se sitúa fuera del rango comprendido entre los valores (-30 y +30 mV). En este rango las suspensiones tienden a agregarse por lo que las propiedades y funciones de las partículas funcionalizadas pueden verse afectadas. Los valores de potencial zeta promedio obtenidos para el sólido calcinado y el material funcionalizado con ácido caprílico se muestran en la Tabla 4.1. Estos resultados muestran que ambas partículas se sitúan en el rango de inestabilidad, por lo que puede producirse agregación de las mismas. Además, cabe destacar que los valores 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 grupos funcionales del APTES y del ácido caprílico.

### El análisis termogravimétrico

Con el fin de confirmar la funcionalización y cuantificar el ácido caprílico anclado al soporte de óxido de silicio se llevó a cabo el análisis termogravimétrico de los diferentes sólidos. En la Figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis termogravimétrico de los materiales funcionalizados con APTES y ácido caprílico.



**Figura 4.3. Termogramas de MCM-41- funcionalizada con APTES (A) y MCM-41 funcionalizada con APTES y ácido caprílico (B). La línea negra representa la pérdida de peso respecto al tiempo y temperatura y la línea roja muestra la derivada de la pérdida de peso resaltando los principales saltos de energía.**

El análisis de los diferentes picos de la muestra permitió identificar la pérdida principal de la materia en tres pasos. Como se observa en la figura A se produjo en primer lugar una pérdida del 5,52% (5,52 g de materia orgánica/100 g de sólido) al producirse un aumento térmico de 0-100 °C, correspondiente a la eliminando del disolvente. En el segundo paso se muestra la gran cantidad de energía empleada para aumentar la temperatura de 100 a 800 °C. En esta fase aparecen picos que muestran la pérdida de materia poniendo en relieve la continua degradación

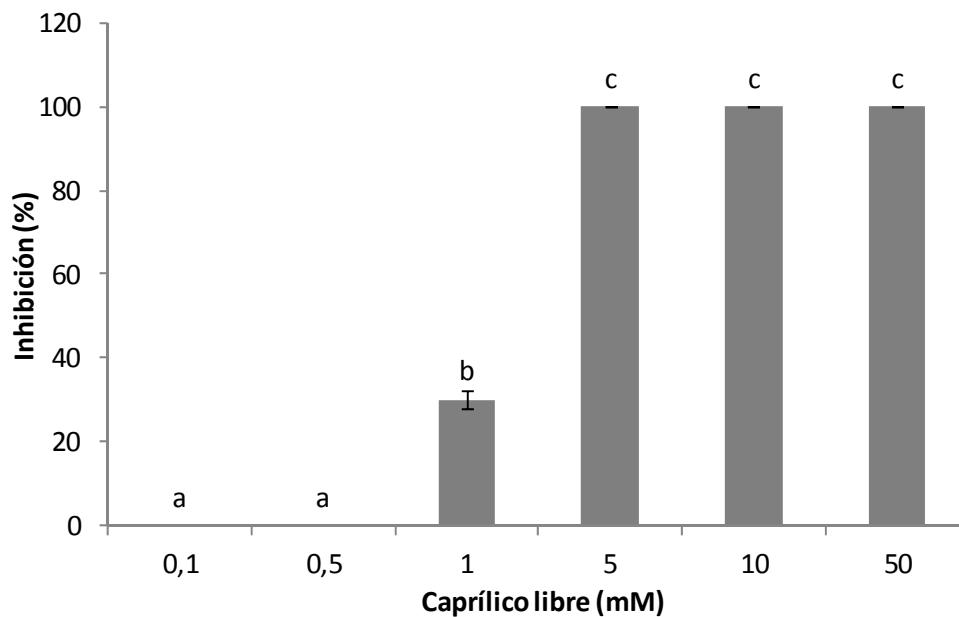
del material, corresponde a la pérdida de materia orgánica (29.27%). Es la etapa más importante del análisis del TGA, la cual permite determinar el grado de funcionalización a través de la descomposición de las aminas unidas a la superficie de las partículas. El último paso constituye la degradación final del material entre 800 y 1000 °C, que se produce en los grupos silanoles presentes en la matriz. Teniendo en cuenta el porcentaje de materia orgánica (MO) y de residuo seco de óxido de silicio, se calculó la cantidad de aminas por gramo de óxido de silicio (g MO/g SiO<sub>2</sub>). Por tanto, teniendo en cuenta que las aminas eran la única molécula orgánica presente en las partículas del análisis de TGA puede deducirse que la concentración de materia orgánica fue de 0,32 g aminas/g SiO<sub>2</sub>.

Respecto a la figura B la funcionalización de las partículas con ácido caprílico dio como resultado un valor de 0,51 g MO/g SiO<sub>2</sub>, que corresponde a las aminas y al ácido graso anclados 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 SiO<sub>2</sub>, 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 SiO<sub>2</sub> presente en la partícula, obteniendo así 0,13 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.

#### 4.2 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO CAPRÍLICO LIBRE

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la actividad antimicrobiana del ácido caprílico en su forma libre sobre una población de *E. coli* en fase exponencial.

Los resultados obtenidos en los recuentos de *E. coli* en las distintas concentraciones de estudio con ácido caprílico libre se incluyen en el Anexo II. El efecto bactericida del ácido caprílico libre sobre el crecimiento de *E. coli* en solución Ringer se muestra en Figura 4.4.



**Figura 4.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* - tras exposición a diferentes concentraciones de ácido caprílico libre.** Las distintas letras de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de las diferentes concentraciones. Los valores obtenidos son promedio y desviación estándar,  $n = 3$ .

Como se observa en la Figura 4.4 el efecto del ácido caprílico libre se divide en tres grupos diferentes de concentraciones. El grupo (a), formado por las concentraciones inferiores de 0,1 y 0,5 mM, presenta un porcentaje de inhibición nulo sobre el inóculo microbiano. El grupo (b) con una concentración mayor de ácido caprílico correspondiente a 1 mM produjo una inhibición parcial de la población bacteriana, mientras que el grupo (c) con mayores concentraciones del ácido graso (5-50 mM) muestra una inhibición total del inóculo bacteriano.

A partir de los resultados obtenidos se puede estimar que la concentración mínima bactericida del ácido caprílico libre se encuentra en un rango de concentraciones entre 1 y 5 mM. Los datos obtenidos de inhibición fueron algo superiores a los reportados por otros autores. Nair *et al.*, (2004) estudiaron el efecto del ácido caprílico libre sobre *Escherichia coli* a concentraciones (0 mM; 25 mM; y 50 mM) sobre leche; a concentración de 25 mM del ácido graso y tras una incubación a 37°C durante 24 h, obtuvieron una reducción de dos ciclos logarítmicos de la

bacteria. Mientras que a temperaturas inferiores (4°C y 8°C) y a 50 mM de ácido caprílico, se produjo una inhibición total de la bacteria.

Por otra parte, Annamalai *et al.* (2004) estudiaron el efecto antibacteriano del ácido caprílico a concentraciones (35 y 50 mM) sobre *Escherichia coli* en fluido rumial a pH (5,6 y 6,8) a 39°C y 24h de incubación, a pH 5.6 en ambas concentraciones obtuvieron una reducción de la bacteria de 2 ciclos logarítmicos mientras que a pH 6,8 y 35 mM no obtuvieron ninguna diferencia significativa sobre la inhibición de la bacteria.

En el caso de Chang *et al.* (2010) estudió la inactivación de *Escherichia coli* bajo el efecto del ácido caprílico libre a distintas concentraciones (25 mM; 50 mM; 75 mM) en semillas de alfalfa, la concentración de 25 mM de ácido caprílico produjo una reducción en 0.75 ciclos logarítmicos tras 12h de tratamiento.

Las diferencias de los resultados obtenidos en este estudio y los reportados por otros autores podrían deberse al empleo de caldo de cultivo, a las distintas temperaturas empleadas, a los distintos pH empleados, a las distintas concentraciones de inóculo o la presencia en los alimentos de compuestos que puedan formar complejos con el ácido caprílico lo que dificulta su actividad antimicrobiana (Kabara *et al.* 1972).

### 4.3 ESTUDIO CUALITATIVO SOBRE EL EFECTO DEL ÁCIDO CAPRÍLICO SOBRE LA VIABILIDAD MEDIANTE FLUOROCROMOS

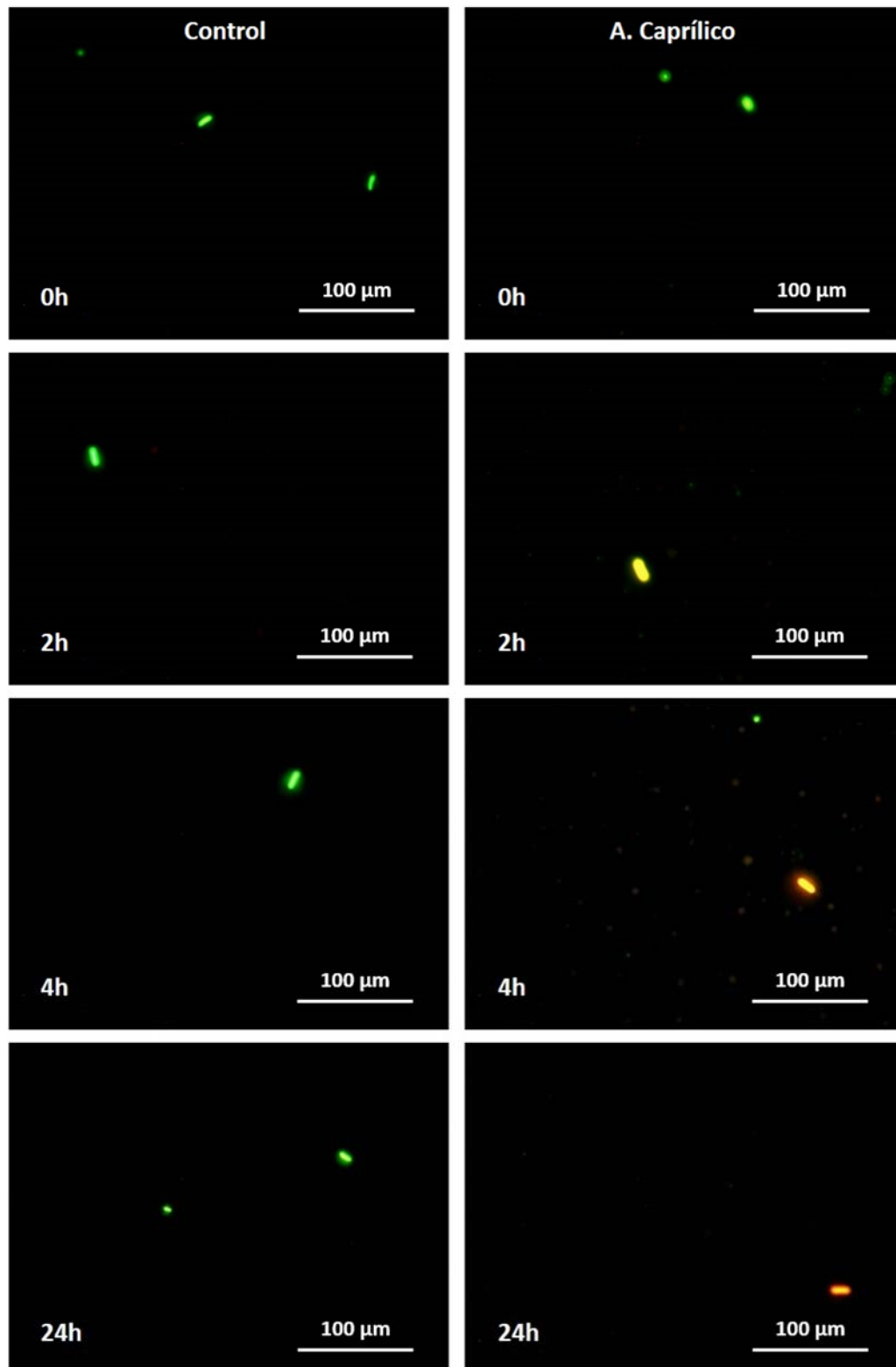
Tras la determinación de la concentración mínima bactericida del ácido graso en su forma libre se llevó a cabo el estudio del efecto del mismo mediante el uso de fluorocromos. Mediante este ensayo se pudo observar la inhibición del cultivo de *E. coli* por el efecto del ácido caprílico a medida que transcurría el tiempo. La emisión de fluorescencia verde es debida al SYTO®9, al penetrar a las células con la membrana intacta y unirse al DNA, mientras que la emisión de fluorescencia roja se debe al yoduro de propidio que penetra en aquellas células no viables debido al daño en la membrana que produce poros de mayor tamaño. En este ensayo se trabajó con una muestra de inóculo control así como una muestra tratada con ácido caprílico y se observó el estado de las células bacterianas en el microscopio de fluorescencia a tiempo 0, 2, 4 y 24 h para confirmar el efecto inhibitorio del ácido graso a lo largo del tiempo (Figura 4.5).

En las imágenes de la Figura 4.5 se muestran los cambios sufridos en la membrana celular por las células de *Escherichia coli* tras la aplicación del ácido caprílico libre en el periodo de tiempo descrito mediante la aplicación de fluorocromos. A la izquierda se muestran las imágenes de células bacterianas control tomadas en los distintos tiempos, las cuales permiten la comparación respecto a las muestras tratadas con ácido caprílico representadas a la derecha de la figura.

En las imágenes de muestra control aparecen las células bacterianas viables emitiendo fluorescencia verde durante los diferentes tiempos de observación. La muestra tratada con ácido caprílico muestra un aspecto similar, es decir, bacilos que emiten fluorescencia verde a tiempo 0. Sin embargo, a tiempo 2 h se observa que la emisión de fluorescencia verde no es tan brillante y aparece un color más anaranjado en la célula. La transición en la viabilidad de la célula hacia tonos más rojos se observa en la imagen de tiempo 4 h. La célula aparece de un color rojizo junto con algunas células dispersas en la disolución que parece que sí mantienen su viabilidad. En la última imagen, tras el tratamiento de 24 h aparece una única célula emitiendo fluorescencia roja, es decir, una célula no viable.

Paralelamente se realizó un cultivo en placa de los controles y de la bacteria tratada con ácido caprílico, comprobándose a las 24 h que la muestra control crecía en placa, mientras que en la muestra tratada con el ácido graso no se observaba crecimiento.

Las imágenes descritas confirman la actividad antimicrobiana del ácido caprílico sobre la membrana de *Escherichia coli*, siendo esta más efectiva conforme aumenta el tiempo de contacto.



**Figura 4.5.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células de *E. coli* - control y tratadas con ácido caprílico libre a diferentes tiempos.

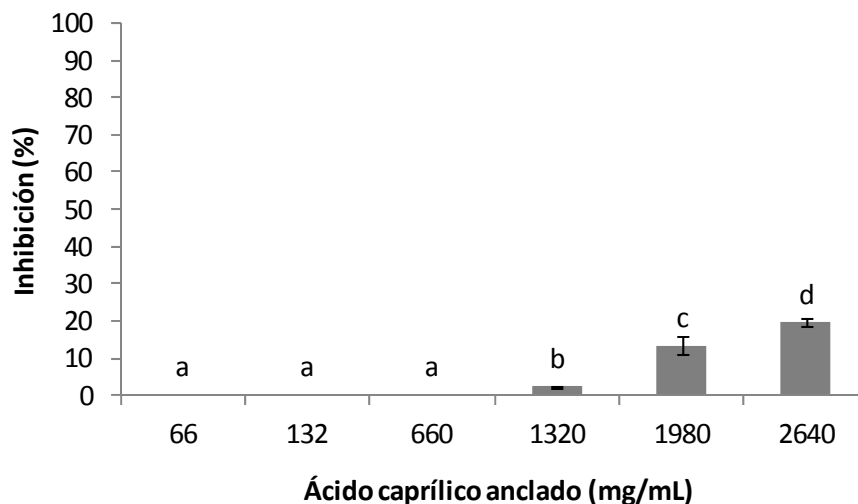
El lugar principal de acción del ácido caprílico parece ser la membrana celular, donde tiene lugar la fase final de producción de energía, que es interrumpida por la acción de estos ácidos,



reduciendo la producción de ATP y quedando de este modo la bacteria privada de energía. Los resultados de viabilidad obtenidos en el presente trabajo coinciden con los descritos en la bibliografía (Desbois y Smith, 2009; Choi, 2013). La emisión de fluorescencia roja confirma la aparición de poros en la membrana celular y por tanto su muerte. Los resultados de este estudio nos confirman los mecanismos antimicrobianos descritos para dicho ácido.

#### 4.4 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO CAPRÍLICO ANCLADO

Tras el estudio de la actividad bactericida del ácido graso en su forma libre se procedió a establecer la actividad antimicrobiana del ácido caprílico anclado como posible alternativa al uso del compuesto libre. Los resultados obtenidos del estudio del ácido caprílico anclado sobre la viabilidad bacteriana de *E. coli* en solución Ringer se muestran en la Figura 4.6.



**Figura 4.6. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* - tras exposición a diferentes concentraciones de ácido caprílico anclado sobre micropartículas MCM-41.** Las distintas letras de las barras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) de las diferentes concentraciones. Los valores obtenidos son promedio y desviación estándar ( $n=3$ ).

Tal y como muestra la Figura 4.6 se observan cuatro grupos diferentes de concentraciones en función de la actividad antimicrobiana que producen. El grupo (a) no presenta inhibición sobre el microorganismo, el segundo grupo, (b), con una mayor concentración de ácido caprílico anclado produjo un mínimo porcentaje de inhibición y los grupos (c) y (d), que corresponden a las concentraciones más altas de ácido caprílico anclado, produjeron una mayor reducción de la población bacteriana. Estos resultados mostraron que el ácido caprílico anclado no fue capaz de inhibir completamente el microorganismo a ninguna de las concentraciones estudiadas, y por tanto, la concentración mínima bactericida sería superior 2640 mg/mL.

Los resultados de inhibición obtenidos por el ácido caprílico anclado muestran una disminución del efecto inhibitorio respecto al ácido caprílico libre. La disminución de la actividad antimicrobiana puede ser debida al mecanismo de anclaje del ácido graso sobre la superficie del soporte de óxido de sílice. Por consiguiente, se observa que al anclarse el ácido caprílico al grupo amina mediante el grupo funcional carboxílico la actividad antimicrobiana se ve muy disminuida. Dicho grupo funcional puede ser el responsable de la actividad antimicrobiana de la molécula en su estado libre, por lo que al bloquearlo el compuesto pierde parte de su actividad.

La primera alternativa a la administración del ácido caprílico libre fue estudiada por Ruiz-Rico *et al.* (2014). Determinaron la capacidad bactericida del ácido caprílico encapsulado sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Los resultados obtenidos fueron que el ácido caprílico libre fue más eficaz sobre las bacterias Gram positivas encontrándose la concentración mínima bactericida en el rango de concentración entre 12-15 mM, mientras que el rango mínimo bactericida para las Gram positivas se encontró entre 18,5 - 20 mM. Tras la encapsulación la actividad antimicrobiana del ácido se mantuvo al igual que las características organolépticas indeseables (olor y sabor a rancio).

Respecto al anclaje, Pedziwiatr-Werbicka *et al.*, (2014) estudiaron la posibilidad de anclaje de los ácidos grasos con materiales mesoporosos tipo SBA-15 recubiertos con nanopartículas inorgánicas al grupo hidrofóbico de la molécula estudiando su potencial tanto antimicrobiano como hematotóxico. El estudio mostró la importancia del tamaño de la partícula mesoporosa junto a la estructura funcionalizada sobre la interacción biológica así como la bioestabilidad de éstos materiales bajo condiciones fisiológicas.

A pesar de las virtudes que presentaron las partículas de sílice desnudas se enfrentaron a algunos problemas relacionados con su estabilidad química y biocompatibilidad. Sin embargo los materiales recubiertos con nanopartículas inorgánicas mejoraron estas características.

Estos materiales con el ácido graso anclado presentaron una actividad antimicrobiana prometedora. Aunque aún queda mucho por investigar para descubrir silicatos orgánicos con mayor estabilidad química, menor toxicidad y una mayor biocompatibilidad y selectividad al interactuar con células vivas.

## 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. La caracterización de los sólidos mesoporosos MCM-41 mediante análisis morfológicos y estructurales, Rayos X y microscopía electrónica de transmisión, determinó que el proceso de síntesis fue correcto y que el cargado de las partículas con ácido caprílico no afectó a la estructura hexagonal característica de este material.
3. El ácido caprílico libre produjo una reducción del crecimiento bacteriano de *E. coli* a las distintas concentraciones en las que fue suministrado, siendo la concentración mínima bactericida comprendida en un rango entre 1 y 5 mM.
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 las micropartículas mesoporosas MCM-41, cuya finalidad era enmascarar el olor y que mantuviera la actividad antimicrobiana, no inhibió completamente el crecimiento del microorganismo a las concentraciones de estudio. Hecho que podría deberse a la matriz o caldo de cultivo sobre el que se realizó el ensayo o al modo de anclado del ácido graso.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

---

- ABEE, T., KROCKEL, L., & HILL, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 169-185.
- ANNAMALAI, T., & al., e. (2004). In vitro inactivation of Escherichia coli O157:H7 in bovine rumen fluid by caprylic acid. *Journal of Food Protection*, 67(5), 884-888.
- ASEFA, T., & TAO, Z. (2012). Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Chemical Research in Toxicology*, 25, 2265-2284.
- BAKKALI, F., & al, e. (2008). Biological effects of essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- BELTRÁN, D. A., FRANCO, A. M., LOMAS, L., HUGO, V., CORONA, L., CÁRDENAS, J., & NEGRÓN, G. (2003). Preparación de materiales mesoporosos tipo TI-MCM-41 y su uso en la apertura nucleófila de epiclohidrina con L-Prolinol. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 47(2), 155-159.
- BERNARDOS, A., & KOURIMSKÁ, L. (2013). Applications of mesoporous silica materials in Food. *Czech J. Food Sci*, 31(2), 99-107.
- BUCHANAN, R. L., & DOYLE, M. P. (1997). Foodborne disease significance of Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic E.coli. *Scientific Status Summary*, 51(10), 69-76.
- BURNETT, S. L., CHOPSKIE, J. H., PODTBURG, T. C., GUTMANN, T. A., GILBRETH, S. E., & BODNARUK, P. W. (2007). Use of octanoic acid as a postlethality treatment to reduce Listeria monocytogenes on ready-to-eat meat and poultry products. *Journal of Food Protection*, 70(2), 392-398.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- CHOI, M. J., KIM, S. A., LEE, N. 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 Typhimutium in reconstituted infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 499-507.
- CLIMENT, E., MARCOS, M. D., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., SANCENÓN, F., SOTO, J., RURACK, K., & AMORÓS, P. (2009). The determination of methylmercury in real samples using organically capped mesoporous inorganic materials capable of signal amplification. *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 8519-8522.
- CORMA, A. (1997). From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis. *Chemical Reviews*, 97(6), 2373-2420.
- DESBOIS, A. P., & SMITH, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1629-1642

- DI PASQUA, A. J., SHARMA, K. K., SHI, Y. L., TOMS, B. B., OUELLETTE, W., DABROWIAK, J. C., & ASEFA, T. (2008). Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 1416-1423.
- DOYLE, M. P., & SCHOENI, J. L. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied Environmental Microbiology*, 48(4), 855-856.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, B. E., GÓMEZ-TREVIÑO, M., & JIMENEZ-SALAS, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4(2).
- HARO-MAZA, J. F., & GUERRERO- BELTRÁN, J. A. (2013). *Efecto de la radiación UV-C en frutas y verduras*. Universidad de las Américas, Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental.
- HAAS, G. J., PRESCOTT, H. E., DUDLEY, E., DIK, R., HINTLIAN, C., & KEANE, L. (1989). Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *J. Food Saf*, 9(4), 253-265.
- HE, Q., ZHANG, Z., GAO, Y., SHI, J., & LI, Y. (2009). Intracellular Localization and Cytotoxicity of Spherical Mesoporous Silica Nano and Microparticles. *Small*, 5(23), 2722-2729.
- HEIKKILÄ, T., SANTOS, H. A., KUMAR, N., MURZIN, D. Y., SALONEN, J., LAAKSONEN, T., . . . LEHTO, V. P. (2010). Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74, 483-494.
- HERRERO, A. M., & ROMERO DE ÁVILA, M. D. (2006). Innovaciones en el proceso de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de medicina*, 50(4), 71-74.
- HUDSON, S. P., PADERA, R. F., LANGER, R., & KOHANE, D. S. (2008). The biocompatibility of mesoporous silicates. *biomaterials*, 29(30), 4045-4055.
- HULANKOVA, R., BORILOVA, G., & 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, 113-120.
- KABARA, J. J., SWIECZKOWSKI, D. M., CONLEY, A. J., & TRUANT, J. P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(1), 23-28.
- KIM, C., & HUNG, Y. (2012). Inactivation of *E.coli* O157:H7 on blueberries by electrolyzed water, ultraviolet light, and ozone. *Journal Of Food Science*, 77(4), 206-211.
- LÓPEZ-RUBIRA, V., CONESA, A., ALLENDE, A., & ATARÉS, F. (2005). Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *Postharvest biology and technology*, 37(2), 174-185.
- PASCUAL-ANDERSON, M. R. (2005). *Enfermedades de origen bacteriano: su prevención* (Vol. 1). Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- MAMAEVA, V., SAHLGREN, C., & LINDÉN, M. (2013). Mesoporous silica nanoparticles in medicine - recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), 689-702.

- NAIR, M. M., VASUDEVAN, P., HOAGLAND, T., & VENKITANARAYANAN, K. (2004). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food Microbiology*, 21, 611-616.
- NAKAMURA, M., & ZANGER, M. J. (1968). Effect of fatty acids on *Shigella*. *Proct. Mont. Acad. Sci*, 28, 51-57.
- OMS (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) *Centro de prensa*, 125. Organización Mundial de la Salud.
- PEDZIWIATR-WERBICKA, E., MILOWSKA, K., PODLAS, M., MARCINKOWSKA, M., FERENC, M., BRAHMI, Y., . . . EL 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.
- PÉREZ-ESTEVE, E., FUENTES, A., COLL, C., ACOSTA, C., BERNARDOS, A., AMORÓS, P., . . . BARAT, J. M. (2015). Modulation of folic acid bioaccessibility by encapsulation in pH- responsive gated mesoporous silica particles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 202, 124-132.
- PRESSER, K. A., ROSS, T., & RATKOWSKY, D. A. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth/ No Growth Interface of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid concentration, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1773-1779.
- RAMOS-CLAMONT, G., RODRÍGUEZ-FRANCO, D., GUZMÁN-PARTIDA, A. M., ACEDO-FÉLIZ, E., & VÁZQUEZ-MORENO, L. (2010). Actividad antibacteriana de lactoferrina bovina y lactoferrina porcina sobre *Escherichia coli* K88. *Revista Científica*, 20(5), 473-479.
- RUIZ-RICO, M., FUENTES, C., PÉREZ-ESTEVE, É., JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I., QUILES, A., MARCOS, M. D., . . . BARAT, J. M. (2015). Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. *Food Control*, 56, 77-85.
- SANTOS, J. R., VILLARINO, B. J., ZOSA, A. R., & DAYRIT, F. M. (2011). Analysis of volatile organic compounds in virgin coconut oil and their sensory attributes. *The Philippine Journal of Science*, 140, 161-171.
- SHEU, C. W., & FREESE, E. (1972). Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol*, 111, 516-524.
- SISTEMA DE INFORMACIÓN MICROBIOLÓGICA. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2013. Madrid, 2015
- SLOWING, I. I., VIVERO-ESCOTO, J. L., WU, C. W., & LIN, V. S. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1278-1288.
- TANG, F., LI, L., & CHEN, D. (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced Materials*, 24(12), 1504-1534.
- YANG, P., GAIB, S., & LIN, J. (2011). Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Journal of Chemical Society Reviews*, 41, 3679-3698.

## 7 ANEXOS

---

### 7.1 ANEXO I: COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO 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 Triptone Bile X-glucoronide (TBX).**

Peptona	20,00
Sales biliares No. 3	1,50
X-β-D-glucurónido	0,075
Agar-agar	10,00
pH	7.2 ± 0.2

## 7.2 ANEXO II: RECUENTOS MICROBIANOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ESTUDIO.

Tabla 7. 4. *Ácido caprílico libre*

Concentración (Mm)	Log UFC	SD
0,1	6,61	0,00
0,5	7,21	0,00
1	4,45	2,01
5	0,00	0,00
10	0,00	0,00
20	0,00	0,00
30	0,00	0,00
40	0,00	0,00
50	0,00	0,00

Tabla 7. 5. *Ácido caprílico anclado*

Concentración Sólido (Mm)	Log UFC/mL	SD
500	7,10357574	0,00
1000	7,09145356	0,00
5000	7,00888814	0,00
10000	6,2191122	0,53
15000	5,38	2,46
20000	5,05	1,16



### 7.3 ANEXO III: RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### One-Way ANOVA - %INHIBICIÓN by Concentración

Dependent variable: %INHIBICIÓN

Factor: Concentración

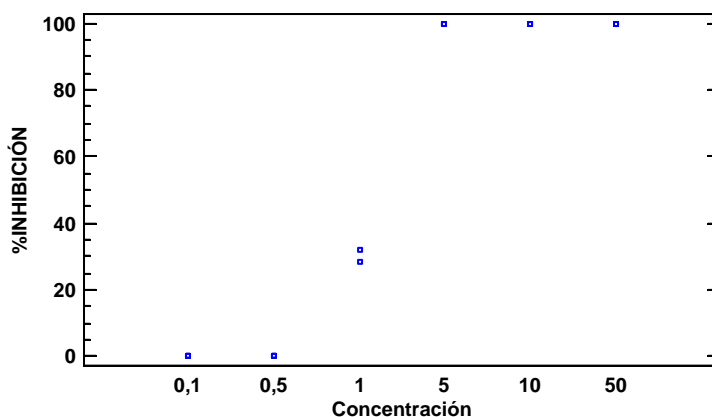
Number of observations: 12

Number of levels: 6

#### The StatAdvisor

This procedure performs a one-way analysis of variance for %INHIBICIÓN. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of %INHIBICIÓN for the 6 different levels of Concentración. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

Scatterplot by Level Code



#### Summary Statistics for %INHIBICIÓN

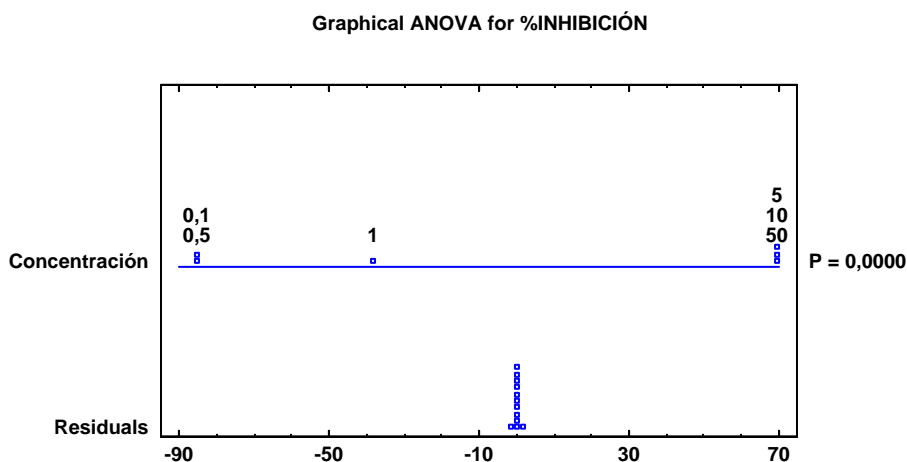
Concentración	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
0,1	2	0	0	%	0	0	0
0,5	2	0	0	%	0	0	0
1	2	30,155	2,43952	8,08993%	28,43	31,88	3,45
5	2	100,0	0	0%	100,0	100,0	0
10	2	100,0	0	0%	100,0	100,0	0
50	2	100,0	0	0%	100,0	100,0	0
Total	12	55,0258	48,1385	87,4835%	0	100,0	100,0

Concentración	Std. skewness	Std. kurtosis
0,1		
0,5		
1		
5		
10		
50		
Total	-0,209998	-1,56542

#### The StatAdvisor

This table shows various statistics for %INHIBICIÓN for each of the 6 levels of Concentración. The one-way analysis of variance is primarily intended to compare the means of the different levels, listed here under the Average column. Select Means Plot from the list of Graphical Options to display the means graphically.

WARNING: There is more than a 3 to 1 difference between the smallest standard deviation and the largest. This may cause problems since the analysis of variance assumes that the standard deviations at all levels are equal. Select Variance Check from the list of Tabular Options to run a formal statistical test for differences among the sigmas. You may want to consider transforming the values of %INHIBICIÓN to remove any dependence of the standard deviation on the mean.



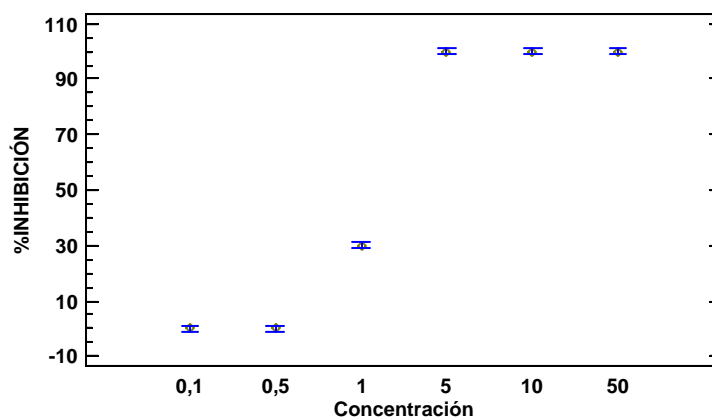
**ANOVA Table for %INHIBICIÓN by Concentración**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	25484,5	5	5096,91	5138,66	0,0000
Within groups	5,95125	6	0,991875		
Total (Corr.)	25490,5	11			

**The StatAdvisor**

The ANOVA table decomposes the variance of %INHIBICIÓN into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 5138,66, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean %INHIBICIÓN from one level of Concentración to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

**Means and 95,0 Percent LSD Intervals**



**Table of Means for %INHIBICIÓN by Concentración with 95,0 percent LSD intervals**

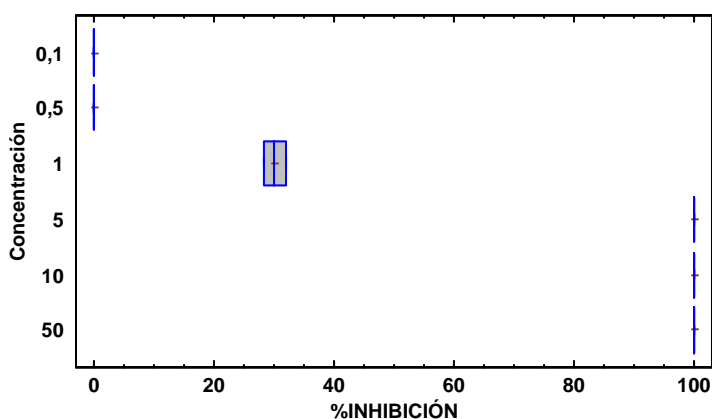
Concentración	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
0,1	2	0	0,704228	-1,21848	1,21848

0,5	2	0	0,704228	-1,21848	1,21848
1	2	30,155	0,704228	28,9365	31,3735
5	2	100,0	0,704228	98,7815	101,218
10	2	100,0	0,704228	98,7815	101,218
50	2	100,0	0,704228	98,7815	101,218
Total	12	55,0258			

### The StatAdvisor

This table shows the mean %INHIBICIÓN for each level of Concentración. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The standard error is formed by dividing the pooled standard deviation by the square root of the number of observations at each level. The table also displays an interval around each mean. The intervals currently displayed are based on Fisher's least significant difference (LSD) procedure. They are constructed in such a way that if two means are the same, their intervals will overlap 95,0% of the time. You can display the intervals graphically by selecting Means Plot from the list of Graphical Options. In the Multiple Range Tests, these intervals are used to determine which means are significantly different from which others.

Box-and-Whisker Plot



### Multiple Range Tests for %INHIBICIÓN by Concentración

Method: 95,0 percent LSD

Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0,5	2	0	x
0,1	2	0	x
1	2	30,155	x
50	2	100,0	x
10	2	100,0	x
5	2	100,0	x

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
0,1 - 0,5		0	2,43696
0,1 - 1	*	-30,155	2,43696
0,1 - 5	*	-100,0	2,43696
0,1 - 10	*	-100,0	2,43696
0,1 - 50	*	-100,0	2,43696
0,5 - 1	*	-30,155	2,43696
0,5 - 5	*	-100,0	2,43696
0,5 - 10	*	-100,0	2,43696
0,5 - 50	*	-100,0	2,43696
1 - 5	*	-69,845	2,43696
1 - 10	*	-69,845	2,43696
1 - 50	*	-69,845	2,43696
5 - 10		0	2,43696
5 - 50		0	2,43696
10 - 50		0	2,43696

\* denotes a statistically significant difference.

**The StatAdvisor**

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 11 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 3 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

**One-Way ANOVA - %INHIBICIÓN by Concentración**

Dependent variable: %INHIBICIÓN

Factor: Concentración

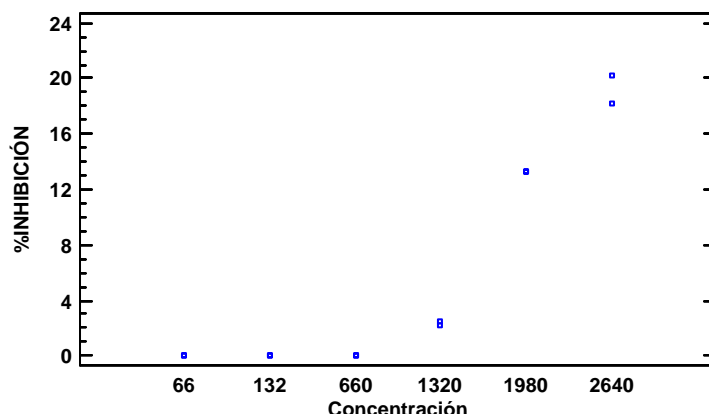
Number of observations: 12

Number of levels: 6

**The StatAdvisor**

This procedure performs a one-way analysis of variance for %INHIBICIÓN. It constructs various tests and graphs to compare the mean values of %INHIBICIÓN for the 6 different levels of Concentración. The F-test in the ANOVA table will test whether there are any significant differences amongst the means. If there are, the Multiple Range Tests will tell you which means are significantly different from which others. If you are worried about the presence of outliers, choose the Kruskal-Wallis Test which compares medians instead of means. The various plots will help you judge the practical significance of the results, as well as allow you to look for possible violations of the assumptions underlying the analysis of variance.

Scatterplot by Level Code



**Summary Statistics for %INHIBICIÓN**

Concentración	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
66	2	0	0	%	0	0	0
132	2	0	0	%	0	0	0
660	2	0	0	%	0	0	0
1320	2	2,33	0,141421	6,06959%	2,23	2,43	0,2
1980	2	13,29	0	0%	13,29	13,29	0
2640	2	19,21	1,41421	7,36186%	18,21	20,21	2,0
Total	12	5,805	7,97609	137,4%	0	20,21	20,21

Concentración	Std. skewness	Std. kurtosis
66		
132		
660		
1320		
1980		
2640		

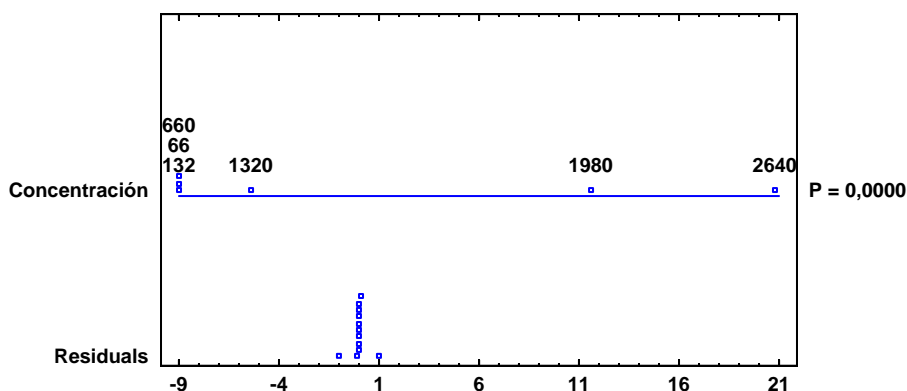
Total	1,36177	-0,646188
-------	---------	-----------

**The StatAdvisor**

This table shows various statistics for %INHIBICIÓN for each of the 6 levels of Concentración. The one-way analysis of variance is primarily intended to compare the means of the different levels, listed here under the Average column. Select Means Plot from the list of Graphical Options to display the means graphically.

WARNING: There is more than a 3 to 1 difference between the smallest standard deviation and the largest. This may cause problems since the analysis of variance assumes that the standard deviations at all levels are equal. Select Variance Check from the list of Tabular Options to run a formal statistical test for differences among the sigmas. You may want to consider transforming the values of %INHIBICIÓN to remove any dependence of the standard deviation on the mean.

**Graphical ANOVA for %INHIBICIÓN**



**ANOVA Table for %INHIBICIÓN by Concentración**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	697,778	5	139,556	414,52	0,0000
Within groups	2,02	6	0,336667		
Total (Corr.)	699,798	11			

**The StatAdvisor**

The ANOVA table decomposes the variance of %INHIBICIÓN into two components: a between-group component and a within-group component. The F-ratio, which in this case equals 414,522, is a ratio of the between-group estimate to the within-group estimate. Since the P-value of the F-test is less than 0,05, there is a statistically significant difference between the mean %INHIBICIÓN from one level of Concentración to another at the 95,0% confidence level. To determine which means are significantly different from which others, select Multiple Range Tests from the list of Tabular Options.

Means and 95,0 Percent LSD Intervals

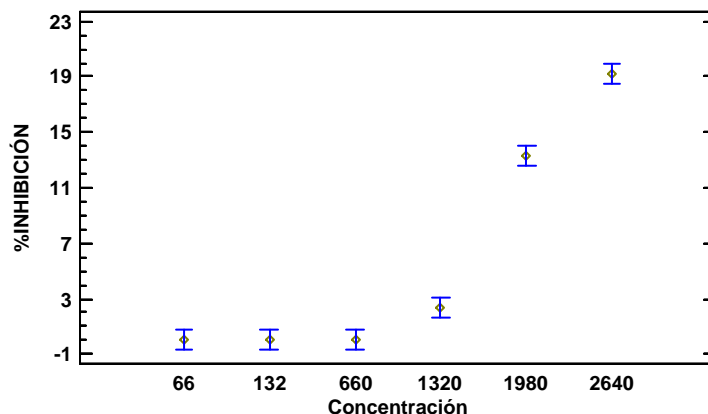


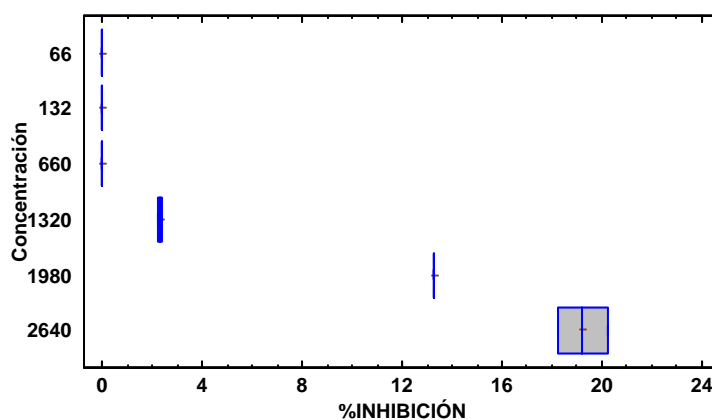
Table of Means for %INHIBICIÓN by Concentración with 95,0 percent LSD intervals

Concentración	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
66	2	0	0,410284	-0,709887	0,709887
132	2	0	0,410284	-0,709887	0,709887
660	2	0	0,410284	-0,709887	0,709887
1320	2	2,33	0,410284	1,62011	3,03989
1980	2	13,29	0,410284	12,5801	13,9999
2640	2	19,21	0,410284	18,5001	19,9199
Total	12	5,805			

**The StatAdvisor**

This table shows the mean %INHIBICIÓN for each level of Concentración. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The standard error is formed by dividing the pooled standard deviation by the square root of the number of observations at each level. The table also displays an interval around each mean. The intervals currently displayed are based on Fisher's least significant difference (LSD) procedure. They are constructed in such a way that if two means are the same, their intervals will overlap 95,0% of the time. You can display the intervals graphically by selecting Means Plot from the list of Graphical Options. In the Multiple Range Tests, these intervals are used to determine which means are significantly different from which others.

Box-and-Whisker Plot



**Multiple Range Tests for %INHIBICIÓN by Concentración**

Method: 95,0 percent LSD

<i>Concentración</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
132	2	0	x
66	2	0	x
660	2	0	x
1320	2	2,33	x
1980	2	13,29	x
2640	2	19,21	x

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
66 - 132		0	1,41977
66 - 660		0	1,41977
66 - 1320	*	-2,33	1,41977
66 - 1980	*	-13,29	1,41977
66 - 2640	*	-19,21	1,41977
132 - 660		0	1,41977
132 - 1320	*	-2,33	1,41977
132 - 1980	*	-13,29	1,41977
132 - 2640	*	-19,21	1,41977
660 - 1320	*	-2,33	1,41977
660 - 1980	*	-13,29	1,41977
660 - 2640	*	-19,21	1,41977
1320 - 1980	*	-10,96	1,41977
1320 - 2640	*	-16,88	1,41977
1980 - 2640	*	-5,92	1,41977

\* denotes a statistically significant difference.

#### **The StatAdvisor**

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 12 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 4 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.