

INFORME PROYECTOS— 2023

**MEJORA DEL CONOCIMIENTO DEL COMPORTAMIENTO DE
MATERIALES FRENTE A MICROORGANISMOS: BACTERIAS, HONGOS
Y VIRUS.**

“COMPMIC”

INFORME DE RESULTADOS

Número de proyecto: 22300006

Expediente: IMAMCA/2023/2

Duración: Del 01/01/2023 al 31/12/2023

Coordinado en AIDIMME por: Paula Martí Ciria

AIDIMME
INSTITUTO TECNOLÓGICO



GENERALITAT
VALENCIANA

iVACE
INSTITUTO VALENCIANO DE
COMPETITIVIDAD EMPRESARIAL

AIDIMME
INSTITUTO TECNOLÓGICO

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS MARCADOS.....	3
3. ALCANCE	3
4. ACTIVIDADES REALIZADAS	4
5. DESARROLLO DEL PROYECTO Y RESULTADOS.....	4
A. REGULACIÓN DE BIOCIDAS Y PRODUCTOS DESINFECTANTES.	4
B. ESTUDIO Y SELECCIÓN DE MATERIAL CON PROPIEDADES BIOCIDAS.....	6
C. OBTENCIÓN DE BIOCIDAS NATURALES.	10
D. FORMULACIÓN DE DESINFECTANTES.....	28
E. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS BIOPRODUCTOS OBTENIDOS	35
F. COMPORTAMIENTO DE MATERIALES DESINFECTANTES FRENTE A VIRUS.....	47
G. PARÁMETROS QUE INTERVIENEN EN LA VARIABILIDAD DE LA EFICACIA DESINFECTANTE.	54
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60

1. Introducción

En los últimos años se ha incrementado el estudio, control e investigación de la **eficacia biocida**, tanto para **bacterias** como para **hongos** y **virus**. En el caso de los virus y, en menor proporción de hongos y bacterias, los resultados pueden no llegar a ser todo lo fiables que se desea, dificultando la formulación de productos con una elevada eficacia biocida, obligando a una reformulación y experimentación costosa en dinero y tiempo e, incluso, a cierta inseguridad cuando el producto se coloca en el mercado. La eficacia de cualquier producto biocida depende no solo de su efectividad real, sino de otros factores ajenos, como son, la correcta distribución sobre el sustrato elegido, la carga de microorganismos presentes en el medio, así como las condiciones ambientales en las que se vea expuesta la superficie a desinfectar.

Hoy en día, los científicos buscan encontrar soluciones industrialmente viables y sostenibles para abordar la contaminación microbiana, mantener la salud pública y prevenir la prevalencia de patógenos y pandemias. Así bien, la búsqueda e inclusión de sustancias activas provenientes de **residuos biomásicos** para la fabricación de **desinfectantes** no solo aporta una dimensión sostenible a la investigación, sino que también busca mejorar el conocimiento del comportamiento de estos compuestos frente a agentes patógenos.

Existen diversas técnicas de descontaminación microbiana, incluyendo métodos físicos y químicos como la esterilización y la desinfección. Dado que cada microorganismo muestra una resistencia variable a la destrucción, es crucial emplear los medios físicos o químicos más adecuados para lograr una eliminación eficaz.

Entre los métodos físicos de descontaminación, se incluyen la utilización de energía solar, el calor húmedo, las radiaciones no ionizantes (infrarroja, microondas y UV) y membranas filtrantes. En cuanto a los métodos químicos, se emplean diversos productos formulados como ácidos, álcalis, alcoholes, halógenos, agentes liberadores de halógenos y compuestos metálicos.

Dentro de los métodos de desinfección químicos, se encuentran los desinfectantes. Estos permanecen húmedos durante el tiempo suficiente para cumplir con los tiempos de contacto necesario para eliminar los patógenos, y no verse afectados por elementos ambientales que puedan interferir. Generalmente, los desinfectantes se caracterizan por poseer un amplio espectro antimicrobiano y tiempos de contacto relativamente cortos. Entre los desinfectantes más extendidos en el mercado para uso doméstico se encuentran los siguientes:

- *Desinfectantes que contienen alcoholes*: actúan interactuando con las proteínas de las capas de los microorganismos y alterando sus bicapas lipídicas. La capacidad de desinfección del alcohol está estrechamente relacionada con el número de carbonos que contiene. La razón es que la volatilidad del alcohol aumenta a medida que aumenta el peso molecular del alcohol. El alcohol al 70%

es un desinfectante eficaz tras 30 segundos con un amplio espectro de bacterias y hongos, y con algunos virus sin envoltura, pero frente al etanol al 100%, estudios muestran que las bacterias gram + pueden desarrollar resistencias.

- *Desinfectantes que contienen cloro:* El cloro es el desinfectante universal, activo frente a múltiples microorganismos. Los más comunes son el cloro gaseoso, el hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio. En un ambiente doméstico, el hipoclorito de sodio es el desinfectante más habitual. Su acción desinfectante se debe a la liberación de iones de hipoclorito (OCl^-) en solución acuosa, que presenta elevada capacidad oxidante y que reacciona con el grupo amino de las proteínas o con lípidos y ácidos nucleicos de los microorganismos [1].
- *Desinfectantes que contienen peróxido de hidrógeno:* es considerado un desinfectante ecológico debido a su división en H_2O y O_2 . Sus propiedades antioxidantes dañan el ADN y otros componentes celulares vitales mediante los radicales hidroxilos. Es eficaz frente a bacterias, hongos y virus, aunque para microorganismos más resistentes como las esporas, es necesario una alta concentración de H_2O_2 . Puede ser aplicado en superficies duras, textiles incluso en el ambiente, pero no es compatible con algunas superficies como por ejemplo algunos tipos de aluminio y algunos epóxidos.
- *Desinfectantes que contienen ácido peracético (PPA):* es un ácido orgánico débil altamente corrosivo formado a partir de ácido acético y peróxido de hidrógeno en agua. Presenta una capacidad de oxidación mayor que el peróxido de hidrógeno, pero menor que el hipoclorito de sodio. PPA tiene la capacidad de eliminar incluso microorganismos más resistentes como lo son las esporas. Se sabe que la humedad ambiente puede afectar a la eficacia de desinfección, siendo los valores óptimos entre un 40 y 80% de humedad relativa en el ambiente [2].
- *Desinfectantes que contienen amonio cuaternario:* su estructura básica consta de cationes NH_4^+ , modificados por radicales alquil o heterocíclicos. Son capaces de eliminar bacterias vegetativas, algunos hongos y virus con envoltura, pero no esporas bacterianas. Estas estructuras en contacto se unen de manera irreversible a los fosfolípidos y proteínas de los microorganismos, provocando cambios en su permeabilidad. Además, estas moléculas también pueden inactivar enzimas y desnaturalizar proteínas esenciales para el desarrollo de los agentes microbianos [3].
- *Desinfectantes que contienen compuestos metálicos* como la plata, inhiben la actividad enzimática de las bacterias interactuando con los grupos sulfhidrilos de las proteínas para formar sulfuros [1].

2. Objetivos marcados

El objetivo general del proyecto es desarrollar formulaciones de limpieza desinfectantes de uso doméstico, cuya composición no contenga o minimice, las sustancias consideradas peligrosas y preocupantes según la legislación, pero cuya eficacia y durabilidad sea elevada para bacterias, hongos y virus.

Los objetivos específicos son:

- Estudiar los diferentes parámetros que intervienen en el análisis de la eficacia de biocidas frente a estos microorganismos y su influencia en el resultado, con la finalidad de plantear un estudio fiable que ayude formular, y reformular, productos con elevada eficacia biocida, con alto espectro de acción y fiables a lo largo de su producción.
- Estudiar la incorporación y compatibilidad de los biocidas, bien naturales, o bien formulados exentos de sustancias catalogadas como peligrosas, con su consiguiente comprobación de su eficacia.

3. Alcance

El proyecto **COMPMIC** pretende estudiar generar y difundir nuevo conocimiento relacionado con el comportamiento de los microorganismos frente a diferentes sustancias activas naturales con el objetivo de contribuir a la búsqueda de **alternativas viables biocidas** para la formulación de **desinfectantes** de uso doméstico.

Entre el público objetivo del proyecto se encontrarían principalmente los fabricantes de jabones, detergentes y otros artículos de limpieza y abrillantamiento, y fabricantes de productos biocidas, fungicidas y pesticidas y otros productos agroquímicos de uso doméstico, especialmente los interesados en promover productos respetuosos con el medio ambiente.

4. Actividades realizadas

El presente proyecto consta de las siguientes actividades principales:

- A. Búsqueda de información sobre regulación de biocidas y normativa de evaluación de desinfectantes en la Unión Europea, así como requerimientos para la comercialización de nuevos biocidas para su uso en desinfectantes tipo TP2.
- B. Estudio bibliográfico e identificación de residuos biomásicos, a ser posible, procedentes de la Comunitat Valenciana como posibles fuentes potenciales de sustancias activas con propiedades desinfectantes, así como otras sustancias inorgánicas naturales.
- C. Diseño de un proceso de obtención de extractos naturales, siempre buscando la viabilidad y sostenibilidad, empleando para ello técnicas sencillas de extracción sólido-líquido y disolventes de baja toxicidad.
- D. Estudio de la compatibilidad de los biocidas naturales en formulaciones de desinfectantes de uso doméstico, con la necesidad del uso de diversos agentes tensioactivos para ayudar a su correcta incorporación y estabilidad en el envase.
- E. Comprobación del comportamiento frente a microorganismo, concretamente bacterias y hongos mediante la evaluación de ensayos para productos desinfectantes y antisépticos.
- F. Profundización en el conocimiento del comportamiento frente a virus, identificando las infraestructuras y materiales necesarios para su ejecución en las instalaciones de AIDIMME como una futura línea de trabajo interesante, debido a la importancia generada en los últimos años.
- G. Estudio de los diferentes parámetros que intervienen en el análisis de la eficacia de biocidas frente a microorganismos y su influencia en el resultado.

5. Desarrollo del proyecto y resultados.

A. Regulación de biocidas y productos desinfectantes.

Los biocidas son sustancias o mezclas que están compuestas por una o más sustancias activas cuyo obtenido es proteger a las personas, animales, materiales o artículos contra microorganismos nocivos, pero a su vez, estos pueden contener sustancias activas químicas dañinas también para las propias personas, animales o el medio ambiente. Es por ello, por lo que su uso y comercialización se encuentra fuertemente regulado dentro del marco de la Unión Europea mediante el Reglamento (UE) nº 528/2012, también conocido como BRP.

Los biocidas se clasifican según el Reglamento (UE) nº 528/2012 en 22 tipos de productos en función de su uso final, referenciados como TP1 a TP22, y agrupados en cuatro grandes grupos principales [4],

Figura 1. Dentro de esta clasificación, los biocidas desinfectantes de uso doméstico se encuentran englobados dentro del GRUPO 1 como tipo TP2 desinfectantes y alguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales.



Figura 1. Esquema de clasificación de biocida desinfectante para uso doméstico según reglamento UE nº528/2012.

La comercialización de productos biocidas requiere la aprobación previa de las sustancias activas por parte de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). Una vez aprobada la sustancia activa, el producto formulado con ella para un uso específico debe ser evaluado en cuanto a su seguridad y eficacia antes de su venta en la Unión Europea. En España, los productos biocidas sólo podrán comercializarse y utilizarse en el territorio nacional si han sido previamente autorizados e inscritos en el registro de biocidas según RD 1054/2002. La autorización y regulación de los biocidas incluye la autorización de sustancias activas a nivel de la UE y de productos a nivel nacional, así como la evaluación del riesgo ambiental por parte de los Estados miembros. Las restricciones de uso y dosificación están determinadas por la Resolución de Autorización e Inscripción en el Registro de Biocidas, emitida por el Ministerio de Sanidad [5].

La página de la ECHA facilita toda la documentación de orientación para la evaluación de los expedientes de las sustancias activas y los procedimientos a seguir de la evaluación del riesgo ambiental.

Por lo que respecta a la evaluación de la eficacia de productos desinfectantes formulados con los biocidas aprobados y registrados en base a los reglamentos citados con anterioridad, esta se determina mediante una serie de normas que se recogen en UNE-EN 14885:2019 de antisépticos y desinfectantes químicos. En esta norma se especifican los ensayos para cualquier tipo de desinfectante, siendo las normas específicas para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes para uso doméstico las

siguientes:

- Para bacterias: UNE-EN 13697:2015+A1 y UNE-EN 1276.
- Para hongos: UNE-EN 13697:2015+A1 y UNE-EN 1650:2020.
- Para virus: PNE-prEN 17914 y UNE-EN 14476:2014+A2.

B. Estudio y selección de material con propiedades biocidas.

Se llevó a cabo un estudio bibliográfico de especies presentes en la Comunitat Valenciana, u otras de origen natural, seleccionando aquellas de mayor interés por ser una fuente potencial de sustancias químicas. Las especies finalmente seleccionadas son:

- *Melia azedarach*
- *Olea europaea*
- *Satureja montana*
- Tierra de diatomeas

La especie ***Melia azedarach* (MA)**, también conocida como Cinamomo, es una especie de árbol originario del Himalaya, aunque actualmente su presencia se ha extendido en calles y jardines en otras partes del mundo como especie ornamental. En la Comunitat Valenciana puede ver en multitud de paseos y parques de las ciudades. Numerosos estudios reportan propiedades desinfectantes, antibacterianas, antifúngicas, insecticida y virucida de extractos obtenidos de todas las partes que aéreas.

Por ejemplo, el extracto de hojas obtenido tras extracción con técnica Soxhlet con etanol 97 % como disolvente a una temperatura entre 60-80°C, y su posterior concentración en rotavapor con vacío a 60°C, rico en sustancias químicas de la familia de los alcaloides, terpenos/esteroles, saponinas, taninos y antocianinas, presentó inhibición para *E. coli* en ensayo de difusión en disco [6].

En otros estudios, [7], la sustancia activa escopoletina aislada de extractos etanólicos de semillas, hojas y frutos de MA, mostró actividad antifúngica frente a los hongos *Aspergillus flavus*, *Fusarium monitiform*, *Microsporum canis* y *Candida albicans*. Otros investigadores, observaron extractos de hojas obtenidos a partir del disolvente acetato de etilo con eficacia antibacteriana frente a las especies *Basillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexeneri*, *Sh. dysenteriae*, *Plesiomonas shigellides* y *Staphylococcus aureus*. También se demostró que el extracto



Figura 2. Ejemplar de *Meliá azedarach*.

de hojas de MA presentó eficacia antiviral frente a al virus del herpes simple, así como y herpes ocular simple.

Otras propiedades como la capacidad insecticida y termiticida también fueron identificadas en esta especie. En el estudio [8], observaron efecto insecticida en compuestos limonoides aislados del extracto de frutos de MA, tras una doble extracción sólido-líquido, primero con hexano para extraer sustancias lipofílicas, y posteriormente con etanol obtener un extracto más rico de sustancias hidrofílicas. Además, extractos etanólicos de ramas y hojas presentaron un efecto termiticida frente a *Heterotermes indicola* [9].

En extractos de sustancias hidrofílicas de distintas partes aéreas de la especie *Melia azedarach* se observa de forma común en los estudios de la bibliografía consultada la presencia mayoritaria de sustancias fenólicas como, ácido gálico, quercetina.

La biomasa de *Melia azedarach* fue recolectada en la ciudad de Valencia en el mes de abril del 2023, posteriormente se secó durante 14 días en exposición solar y finalmente fue triturada en un molino de laboratorio IKA MF empleando un tamiz de 3 mm.

La especie ***Satureja montana* (SM)** es una planta con presencia en la zona del mediterráneo, concretamente en las provincias de Barcelona, Castellón, Girona, Lleida, Tarragona y Valencia. Algunos estudios muestran su actividad antimicrobiana de extractos de las partes aéreas realizados con disolventes de distinta polaridad.

En el estudio [10], comprobaron que extractos acuosos de SM presentaron actividad antibacteriana con ensayos de difusión con disco frente a bacterias Gram + como *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. dysgalactiae*, en bacterias Gram - como *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* y frente al hongo *C. tropicalis*.

En otro estudio [11], también observaron que extractos obtenidos con disolventes éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol presentaron efecto inhibitorio frente a las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

La sustancia mayoritaria en esta especie según la bibliografía consultada, el carvacrol, presenta propiedades antimicrobianas y viricidas. Estudios relacionan a los grupos hidroxilo del carvacrol presente en aceites esenciales de SM con actividad viricida moderada frente a SARS-Cov-2 [12].



Figura 3. Ejemplar de *Satureja montana* en Cullera (Valencia).

Esta misma observación se recoge en el estudio [13] frente a la inhibición de bacterias. La presencia de radicales -OH libres en la sustancia activa carvacrol mejora el comportamiento antibacteriano, debido a su constante deslocalización e intercambio de iones. Además, atribuyen también la hidrofobicidad como un factor importante en la efectividad frente a bacterias. La hidrofobicidad favorece la acumulación del carvacrol en la membrana celular, y es el radical hidroxilo esencial para su interacción con la membrana celular provocando la muerte celular.

Respecto de los hongos, también existen estudios que han testado el compuesto carvacrol frente al hongo *C. albicans* inhibiendo su crecimiento [14].

Propiedades como la capacidad herbicida y antioxidante también han sido estudiadas en esta especie. Se demostró que un aceite esencial de SM, obtenido con un extractor de aceites esenciales tipo albrigi empleando agua destilada, presentó efecto herbicida sobre *P. oleracea* y *C. canadensis*. En cuanto a su capacidad antioxidante, el aceite de SM mostró resultados satisfactorios. Estas propiedades también se relacionan con la presencia de monoterpenos oxigenados como el carvacrol, seguido de p-cimeno y alfa-terpineno [15].

La biomasa de *Satureja montana* fue recolectada en la provincia de Castellón durante la época de floración, septiembre del 2023. Posteriormente se secó durante 14 días en exposición solar y se trituró en un molino de laboratorio IKA MF empleando un tamiz de 3 mm.

La especie *Olea europaea* (O), más conocida como olivo, es un árbol que crece de forma natural por toda la cuenca mediterránea, siendo más abundante en la mitad sud y en la zona de Levante. Además, esta especie es cultivada para la obtención del aceite de oliva, principalmente en la provincia de Valencia, al norte de Alicante y de forma dispersa en Castellón. En general, en la bibliografía se encuentra información sobre productos extractivos de diferentes partes del olivo, *O. europaea* de la región Mediterránea, donde muestran su potencial como biocida, con demostrada capacidad antifúngica, antibacteriana y antioxidante.



Figura 4. Ejemplar de olivo de la cuenca mediterránea.

En el artículo [16], por ejemplo, se realizó una extracción mediante la técnica Soxhlet con metanol como disolvente de extracción, nombrando la posibilidad de emplear otros, entre ellos, etanol. Mostraron la capacidad inhibitoria frente a diferentes microorganismos, entre ellos *S. aureus* y *E. coli*. Otros estudios [17] mostraron que extractos con cantidades importantes de la sustancia fenólica, oleuropeína, inhiben el crecimiento de las bacterias *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*,

empleando la técnica de extracción por maceración, y utilizando como disolvente una mezcla de etanol-agua (80:20).

El olivo es una rica fuente de compuestos flavonoides y fenólicos, siendo el más abundante la denominada oleuropeína, presente en todas las partes del olivo, siendo uno de los componentes cruciales en las plantas debido a su capacidad para eliminar los radicales y las especies activas de oxígeno, como los radicales libres y los radicales hidroxilos [16].

La biomasa de restos de poda de ramas verdes y ramas secas de *Olea europaea* fue recolectada en la Comunitat Valenciana a principios del año 2022, posteriormente se secó durante 15 días en exposición solar y finalmente fue triturada en un molino de laboratorio IKA MF empleando un tamiz de 3 mm.

La **tierra de diatomeas (DT)** son microalgas de fitoplancton unicelulares fosilizadas, compuesta principalmente por sílice y carbonato cálcico. Un ejemplo de composición de DT comercializada es aproximadamente de 27,7% de CaCO_3 , 70,3% de SiO_2 y 0,42% de MgO , 0,11% de P_2O_5 , 0,37% de K_2O , 0,50% FeO_3 y trazas 0,70%. Es un recurso natural, ecológico y abundante y se encuentran estudios que muestran principalmente su eficacia insecticida y antibacteriana.

La eficacia insecticida de DT se comprobó tras periodos de exposición de 3 y 5 días consiguiendo eliminar la especie *S. oryzae* [18].

Estudios recientes emplearon DT como material encapsulador de aceites esenciales, como, por ejemplo, de orégano, y así liberarse de forma controlada, manteniendo la actividad biocida durante tiempos más prolongados. Con la encapsulación resolvieron problemas de volatilidad, inestabilidad en presencia de luz y oxígeno, así como su hidrofobicidad que limitaba sus aplicaciones, presentando igualmente una capacidad antioxidante y antibacteriana, incluso más fuerte que con otros materiales absorbentes más ampliamente usados como los nanotubos halloysita [19].

Se empleó tierra de diatomeas micronizada no calcinada de alta pureza marca Ecoforce, lista para su uso.



Figura 5. Tierra de diatomeas micronizada (izquierda) y micrografía en SEM (derecha).

C. Obtención de biocidas naturales.

C.1 Técnica de extracción sólido-líquido.

Los procesos de extracción están ampliamente extendidos en multitud de sectores, tales como el de la cosmética, farmacéutica, alimentaria, biocombustibles, entre otros. La extracción de uno o varios compuestos con potencial biocida presentes en la biomasa puede realizarse mediante diversas técnicas de extracción, siendo una de las más extendidas la extracción sólido-líquido, concretamente, las técnicas de extracción Soxhlet [20, 21, 22, 23, 24].

La extracción sólido-líquido está basada en la transferencia de masa desde la biomasa (fase sólida) hacia el disolvente de extracción (fase líquida). Durante el proceso de extracción sólido-líquido, la biomasa rompe su situación de equilibrio ocasionado bien por un intercambio de energía térmica y/o mecánica, combinada además con la aportación del disolvente orgánico, que da lugar a la transferencia de masa. En este método es necesaria la utilización de un disolvente orgánico para llevar a cabo la separación selectiva de los compuestos de interés presentes en la biomasa, aprovechando la solubilidad entre los componentes de interés y el disolvente. Es por ello, por lo que la sustancia o sustancias objetivo a extraer marcará la polaridad del disolvente seleccionado.

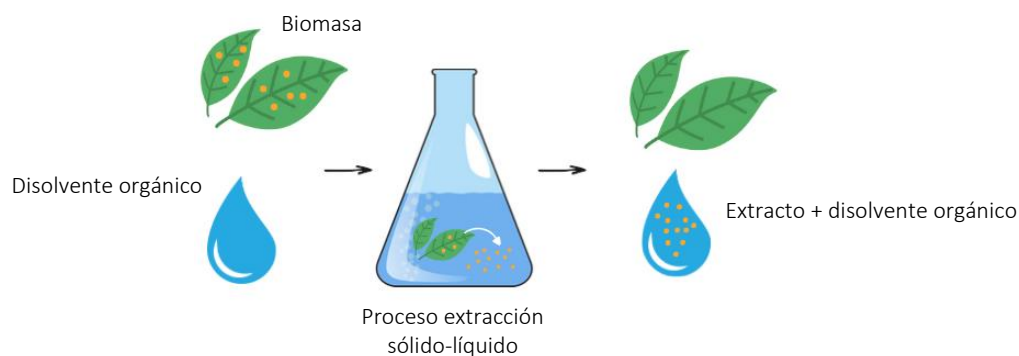


Figura 6. Esquema extracción sólido-líquido.

La eficacia y rendimiento del proceso de extracción, se determina mediante la Ec.1 y dependerá de varios factores. Por ejemplo, la polaridad del disolvente, que marcará la solubilidad de los componentes, su calidad, la ratio material/disolvente empleado, de la propia biomasa, su origen, el contenido en humedad en el momento de la extracción, así como el tamaño de la biomasa. También influirá el propio proceso de extracción seleccionado, el tiempo y la temperatura de trabajo, así como su proceso final de separación del disolvente y componentes de interés.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Masa del extracto final concentrado (g)}}{\text{Masa inicial de la biomasa (g)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

La línea de trabajo actual apuesta por alternativas más respetuosas con el medioambiente, sustituyendo a los disolventes orgánicos comúnmente empleados por su alta eficacia, como es el hexano, tolueno, benceno, cloroformo y éter de petróleo, pero que son catalogados como problemáticos o peligrosos por su elevada toxicidad. Siguiendo esta línea de trabajo de uso de bio-disolventes o disolventes alternativos se encuentra el etanol. Este disolvente se puede obtener por fermentación de materiales ricos en azúcares y presenta una baja toxicidad [25] [26] [27]. La disolvente acetona, clasificado como de baja toxicidad, también se empleó en el proyecto. Algunas de sus propiedades se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Propiedades del etanol [ficha técnica del proveedor].

Nombre	Fórmula	Densidad (g/cm ³)	Punto de ebullición (°C)	Constante dieléctrica (25°C)	Polaridad
Etanol	C ₂ H ₅ OH	0,81	78	24,3	4,2
Acetona	C ₃ H ₆ O	0,79	56	20,7	5,1

C.2 Proceso de obtención del biocida natural (método y equipamiento empleado)

Pretratamiento de la biomasa

La biomasa recolectada se expone durante al menos 14 días a exposición solar para reducir el contenido de humedad en la muestra, y, posteriormente es triturada a 5000 rpm en un molino de laboratorio IKA MF empleando un tamiz de luz 3 mm, Figura 7. Reduciendo el tamaño de la muestra se aumenta considerablemente la superficie específica de contacto con el disolvente, consiguiendo así extraer una mayor cantidad de sustancias y un mayor rendimiento de extracción.



Figura 7. Proceso de trituración de la biomasa.

Extracción de las sustancias biocidas

Para la realización de las extracciones a escala de laboratorio se usa el equipo de extracción sólido-líquido automatizado Soxtec™ CU 8000. La unidad de extracción Soxtec™ 8000 es un instrumento automatizado para la obtención de materia extraíble con disolventes, el cual consta de una unidad de control, situada en la parte superior, con la que se programan las variables del proceso, una unidad de extracción formada por seis posiciones de extracción en serie, y conectada a ésta, un baño de refrigeración



Figura 8. Equipo de extracción Soxtec™ CU 8000 y baño de refrigeración.

Para la extracción en el equipo Soxtec se empleó etanol o acetona de grado analítico, por ser disolventes con baja toxicidad, además de tener una polaridad adecuada para extraer sustancias potencialmente biocidas de interés en la biomasa seleccionada. Las condiciones seleccionadas para llevar a cabo las extracciones se recogen en la Tabla 2, y fueron idénticas en todos los procesos de extracción.

Tabla 2. Condiciones del proceso de extracción.

Tipo disolvente:	Etanol /Acetona
Cantidad disolvente en cubeta de extracción:	70 ml
Temperatura ebullición:	Etanol: 210°C Acetona: 165 °C
Tiempo ebullición:	15 min
Tiempo goteo/condensado:	120 min



Figura 9. Panel de control con las variables de proceso programadas.

En cada extracción se preparan 2 o 3 cartuchos/dedales de celulosa con la biomasa deshidratada y triturada, empleando una balanza de grado analítico y el mismo número de matraces de extracción con 70 ml de disolvente, medidos con una probeta graduada.

Se colocan los cartuchos en posiciones alternas en la cabina del equipo y posteriormente se coloca la bandeja con los vasos de extracción que portan el disolvente.



Figura 10. Preparación de biomasa de frutos de MA en dedal de celulosa y matraces con disolvente de extracción.

Colocados todos los elementos y programado el proceso, se enciende el baño de refrigeración y se inicia la extracción. El equipo realizará el proceso de forma automatizada, avisando con una señal sonora la finalización del ensayo. Finalizado el proceso se obtienen para cada especie biomásica las denominadas fracciones de sustancias hidrofílicas.

Concentración de las sustancias biocidas.

Las fracciones obtenidas del proceso de extracción, que contienen, las sustancias extraídas de la biomasa junto con el disolvente empleado se llevan a un rotavapor Heidolph, Figura 11, con bomba de vacío, para evaporar el disolvente y obtener finalmente un extracto concentrado de sustancias bioactivas.



Figura 11. Equipo rotavapor con bomba de vacío.

Las condiciones del proceso de eliminación del disolvente se recogen en la Tabla 3. En función del disolvente empleado, la temperatura de calentamiento programada del baño será distinta.

Tabla 3. Condiciones del proceso de concentración.

Variable	Valor
Velocidad	30 rpm
Temperatura Etanol	60 °C
Temperatura Acetona	40 °C
Presión trabajo	251 mbar

Una vez finalizado el proceso de evaporación se determinará el rendimiento de obtención de sustancias bioactivas mediante la fórmula descrita anteriormente (Ec.1).

En el presente proyecto se llevó a cabo la obtención de extractos de sustancias concentradas de la biomasa:

- Frutos de la especie *Melia azedarach*.
- Hojas, ramas y flores de la especie *Melia azedarach*.
- Hojas y ramas (restos de poda) de la especie *Olea europaea*.
- Hojas y flores de la especie *Satureja montana*.
- Ramas de la especie *Satureja montana*.

La tierra de diatomeas se obtiene ya micronizada y lista para su uso.

Proceso de extracción de frutos de la especie *Melia azedarach*

El extracto biocida concentrado de **frutos** de la especie ***Melia azedarach***, referenciado como **MA-F**, se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado de *Proceso de obtención del biocida natural (método y equipamiento empleado)*.

Se parte de los frutos deshidratados y triturados, Figura 12, y se preparan dos dedales de celulosa con la biomasa en su interior, Figura 13 y Tabla 4.



Figura 12. Frutos de *M. azedarach* tras exposición solar (izquierda) y frutos triturados (derecha).



Figura 13. Preparación de biomasa de frutos de MA en dedal de celulosa.

Tabla 4 . Masa de biomasa de frutos de Meliá azedarach en dedales de celulosa.

Muestra	Masa (g)
M ₁	13,48
M ₂	12,81

El proceso de extracción del extracto biocida MA-F en el equipo Soxtec se observa en la Figura 14, del cual se obtienen tres fracciones de sustancias hidrofílicas junto con etanol que presenta un color marrón anaranjado característico de los frutos. Estas fracciones se unifican, y se concentran en el rotavapor a vacío, Figura 15.



Colocación de los cartuchos

Colocación de los matraces de extracción

Etapa de condensado

Figura 14. Proceso de extracción de MA-F.

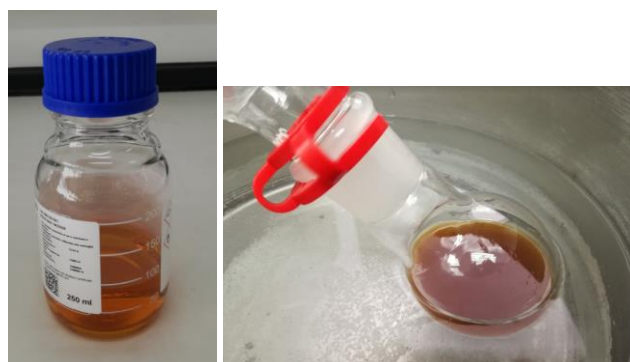


Figura 15. Extracto MA-F sin concentrar (izquierda) y balón de destilación con extracto durante el proceso de concentración (derecha).

Tras finalizar el proceso de concentración se obtiene una cantidad de $m = 7,34$ g de extracto concentrado de sustancias bioactivas MA-F con aspecto marrón viscoso. El rendimiento de extracción, determinado mediante la (Ec.1), fue de 27,92 %.

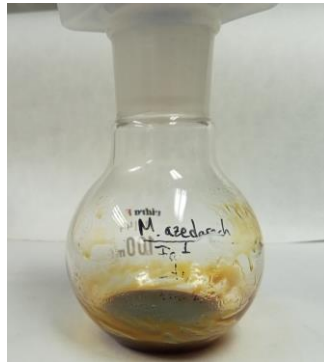


Figura 16. Extracto MA-F concentrado.

Posteriormente, se evaluó la actividad biocida del extracto concentrado MA-F mediante la técnica de difusión en placas sembradas en profundidad determinando los halos de inhibición, descrita más adelante en el apartado E. *Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos.*

Extracto de hojas, ramas y flores de la especie *Melia azedarach*

El extracto biocida concentrado de **hojas, ramas y flores** de la especie *Melia azedarach*, referenciado como **MA-H**, se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento seguido en la extracción de frutos de *Melia azedarach*, MA-F.

Se parte de las hojas, ramas y flores deshidratados y triturados y se preparan tres dedales de celulosa con biomasa en su interior, Figura 17 y Tabla 5.



Figura 17. Hojas, ramas y flores de *Melia azedarach* tras exposición solar, biomasa triturada, y preparación de dedales de celulosa, de izquierda a derecha.

Tabla 5. Masa de hojas, ramas y flores de *Melia azedarach* en dedales de celulosa.

Muestra	Masa (g)
M ₁	6,59
M ₂	6,58
M ₃	6,62

El proceso de extracción del extracto biocida MA-H en el equipo Soxtec se observa en la Figura 18, del cual se obtienen tres fracciones de una mezcla de sustancias hidrofílicas y etanol que presenta un color verde intenso. Estas fracciones se unifican y se concentran en el rotavapor a vacío para separar el etanol de la mezcla, Figura 19.



Figura 18. Proceso de extracción de MA-H.



Figura 19. Extracto MA-H sin concentrar durante el proceso de concentración.

Tras finalizar el proceso de concentración se obtiene una cantidad de $m = 3,58$ g de extracto concentrado de sustancias activas MA-H de color marrón verdoso y con cierta fluidez, Figura 20. El rendimiento de extracción, determinado mediante la (Ec.1), fue de 18,07 %.



Figura 20. Extracto MA-H concentrado.

Posteriormente, se evaluó la actividad biocida del extracto concentrado MA-H mediante la técnica de difusión en placas sembradas en profundidad determinando los halos de

inhibición, descrita más adelante en el apartado *E. Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos*.

Extracto de ramas y hojas (restos de poda) de la especie *Olea europaea*

En la obtención del extracto biocida concentrado de **ramas y hojas (restos de poda)** de la especie *Olea europaea*, referenciado como **O**, se realizaron dos extracciones sobre la misma biomasa. En primer lugar, se realizó una extracción empleando acetona como disolvente, siguiendo el mismo procedimiento que en las extracciones anteriores. Finalizada la primera extracción, y utilizando los mismos cartuchos de biomasa, se realiza una segunda extracción con etanol como disolvente. Con esto, se intentará extraer un abanico mayor de sustancias activas.

Se parte de los restos de poda deshidratados y triturados y se preparan dos dedales de celulosa con la biomasa en su interior, Figura 21 y Tabla 6.



Figura 21. Restos de poda de *Olea europaea* tras exposición solar, proceso de triturado y preparación de dedales de celulosa, de izquierda a derecha.

Tabla 6 . Masa de restos de poda de *Meliá azedarach* en dedales de celulosa.

Muestra	Masa (g)
M ₁	10,30
M ₂	10,32

Finalizadas las dos extracciones, se procede a evaporar el disolvente siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En este caso se realizan dos concentraciones, por una parte, se obtendrá un extracto concentrado de sustancias extraídas con acetona y posteriormente un extracto de sustancias extraídas con etanol, obteniendo dos extractos individuales. Además, para asegurarse un extracto sin presencia de disolventes se introduce en una estufa varios días.

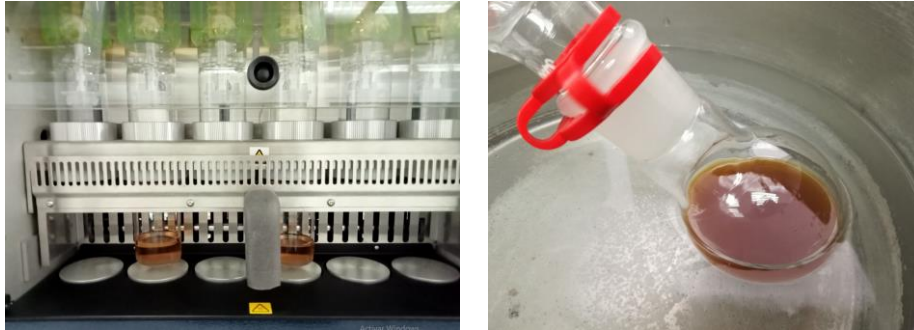


Figura 22. Proceso de la segunda extracción de *O* con etanol como disolvente (izquierda) y proceso de concentración del extracto (derecha).

Tras finalizar el proceso de concentración se obtiene una cantidad de $m = 1,84$ g de extracto concentrado de sustancias extraídas con acetona con aspecto marrón y sólido, y una cantidad de $m = 1,94$ g de extracto concentrado de sustancias extraídas con etanol con aspecto también marrón intenso y sólido. El rendimiento de extracción, determinado mediante la (Ec.1) fue de 17,83 % y 18,76% respectivamente. Finalmente se unifican ambos extractos en un mismo vial, Figura 23.



Figura 23. Extracto *O* concentrado.

La actividad microbiológica del extracto de restos de poda de *Olea europaea* fue ensayado en proyectos anteriores y corroborado su efecto antibacteriano, no siendo evaluado el extracto concentrado en este proyecto.

Extracto de hojas y flores de la especie *Satureja montana*

El extracto biocida concentrado de **hojas y flores** de la especie *Satureja montana*, referenciado como **SM-H**, se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento que el empleado en las extracciones anteriores.

Se parte de la biomasa deshidratada y triturada y se preparan tres dedales de celulosa, Figura 24 y Tabla 7.



Figura 24. Hojas y flores de *Satureja montana* tras exposición solar, tras proceso de trititación y preparación de dedales de celulosa, de izquierda a derecha.

Tabla 7. Masa de hojas y flores de *Satureja montana* en dedales de celulosa.

Muestra	Masa (g)
M ₁	6,12
M ₂	6,02
M ₃	6,08

El proceso de extracción de SM-H en el equipo Soxtec se observa en la Figura 25, del cual se obtiene un total de tres fracciones de una mezcla con aspecto de color verde intenso de sustancias hidrofílicas y etanol. Estas fracciones se unifican, y se concentran en el rotavapor a vacío hasta evaporar todo el etanol de la mezcla, Figura 26.



Colocación de cartuchos de celulosa

Matraces con disolvente de extracción

Etapas de goteo o condensación.

Figura 25. Proceso de extracción de SM-H.



Figura 26. Extracto SM-H sin concentrar (izquierda) y balón de destilación con extracto sin concentrar durante el proceso de concentración (derecha).

Tras finalizar el proceso se obtiene una cantidad de $m = 4,47$ g de extracto concentrado de sustancias bioactivas SM-H de aspecto verde con cierta fluidez. El rendimiento de extracción, determinado mediante la (Ec.1), fue de 24,56 %.



Figura 27. Extracto SM-H concentrado.

Posteriormente, se evaluó la actividad biocida del extracto concentrado SM-H mediante la técnica de difusión en placas sembradas en profundidad determinando los halos de inhibición, descrita más adelante en el apartado *E. Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos*.

Extracto de ramas de la especie *Satureja montana*

El extracto biocida concentrado de **ramas** de la especie *Satureja montana*, referenciado como **SM-R**, se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento que el empleado en las extracciones anteriores.

Se parte de la biomasa deshidratada y triturada y se preparan dos dedales de celulosa, Figura 32 y Tabla 8.



Figura 28. Ramas de *Satureja montana* tras exposición solar, tras proceso de trituración y preparación de dedales de celulosa, de izquierda a derecha.

Tabla 8 . Masa de ramas de *Satureja montana* en dedales de celulosa.

Muestra	Masa (g)
M ₁	6,17
M ₂	6,15

El proceso de extracción de SM-R en el equipo Soxtec se observa en la Figura 29, del cual se obtiene un total de dos fracciones de una mezcla con aspecto de color verde intenso de sustancias hidrofílicas y etanol. Estas fracciones se unifican, y se concentran en el rotavapor a vacío hasta evaporar todo el etanol de la mezcla, Figura 30.



Figura 29. Proceso de extracción de SM-R.



Figura 30. Extracto SM-R sin concentrar (izquierda) y balón de destilación con extracto durante el proceso de concentración (derecha).

Tras finalizar el proceso se obtiene una cantidad de $m = 1,29$ g de extracto concentrado de sustancias bioactivas SM-R de aspecto verde y con cierta fluidez. El rendimiento de extracción, determinado mediante la (Ec.1), fue de 10,46 %.



Figura 31. Extracto SM-H concentrado.

Posteriormente, se evaluó la actividad biocida del extracto concentrado SM-R mediante la técnica de difusión en placas sembradas en profundidad determinando los halos de inhibición, descrita más adelante en el apartado *E. Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos*.

En siguiente tabla se recogen, a modo resumen, los biocidas naturales obtenidos para posteriormente, evaluar su capacidad microbiológica:

Tabla 9. Materiales naturales evaluados mediante técnica de pocillo.

Especie	Referencia	Observaciones
<i>Melia azedarach</i> frutos	MA-F	Extracto concentrado
<i>Melia azedarach</i> hojas, ramas y flores	MA-H	Extracto concentrado
<i>Satureja montana</i> hojas y flores	SM-H	Extracto concentrado
<i>Satureja montana</i> ramas	SM-R	Extracto concentrado
Tierra de diatomeas	DT	Disuelto en agua
<i>Olea europaea</i> restos de poda	O	Extracto concentrado

C.3 Caracterización de los extractos

Los biocidas naturales se analizaron usando la técnica de cromatografía CG-MS modelo Intuvo 9000GC-7000D GC/TQ. La columna empleada fue una columna no-polar HP-5MS y el gas portador Helio, con un caudal de 1,2 ml/min. La temperatura de inyección fue de 250°C. La temperatura del horno inicialmente fue de 40°C aumentando gradualmente 10°C/min hasta alcanzar una temperatura de 300 °C. Para su inyección en cromatógrafo, los extractos concentrados son diluidos con disolvente de grado analítico para poder obtener cromatogramas más limpios, siendo así más fácil la identificación de las sustancias mayoritarias presentes.

Los extractos caracterizados por CG-MS fueron MA-F, MA-H y SM-H por ser los que presentaron propiedades antimicrobianas de mayor interés tras evaluar su capacidad biocida en el apartado E. *Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos.*

Frutos de la especie *Melia azedarach* (MA-F)

Tras análisis cualitativo mediante técnica CG-MS de sustancias hidrófilas presentes en **MA-F**, se obtuvieron una serie de compuestos orgánicos de interés. En la Figura 32 se puede observar el cromatograma de sustancias detectadas, y en la Tabla 10 las sustancias identificadas con un factor de coincidencia mayor del 80%.

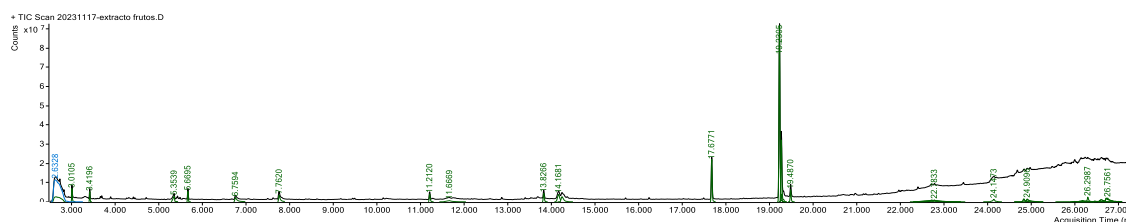


Figura 32. Cromatograma de sustancias detectadas por CG-MS en el extracto MA-F.

Tabla 10. Sustancias detectadas por CG-MS en el extracto MA-F.

TR (min)	Compuesto	CAS	Área
3,01	Butane, 1,2:3,4-diepoxy-, (+/-)-	298-18-0	7479446
5,35	Hexanoic acid	109-94-4	5081017
5,67	Hexanoic acid, ethyl ester	142-62-1	7506943
6,76	Thymine	123-66-0	6151684
7,76	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	65-71-4	8978562
17,68	Hexadecanoic acid, ethyl ester	28564-83-2	9817124
19,23	Linoleic acid ethyl ester	766-51-8	6852033
19,27	Ethyl Oleate	1000364-41-8	7504645
19,49	Octadecanoic acid, ethyl ester	57-48-7	13906526

Se identificaron un total de 7 sustancias siendo las presentes en mayor proporción las descritas a continuación.

La sustancia éster etílico del ácido linoleico ($C_{20}H_{36}O_2$), Figura 33, se clasifica dentro de los acilos grasos, se identificó en el tiempo de retención 19,23 min y presenta un área total del 44,50 % respecto del total de picos identificados.

La sustancia oleato de etilo ($C_{20}H_{38}O_2$), Figura 33, se clasifica dentro de los acilos grasos, se identificó en el tiempo de retención 19,27 min y presenta un área del 16,18% respecto del total de los picos identificados.

La sustancia éster etílico del ácido hexadecanoico ($C_{18}H_{36}O_2$), Figura 33, se clasifica también dentro de los acilos grasos, se identificó en el tiempo de retención 17,68 min y presenta un área del 9,79% respecto del total de los picos identificados.

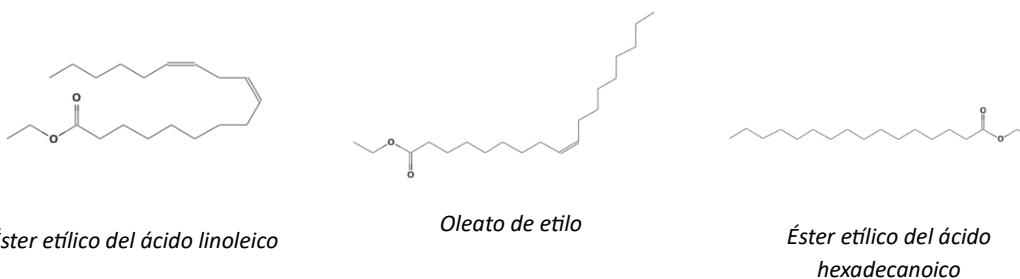


Figura 33. Estructuras químicas de las sustancias mayoritarias en el extracto MA-F.

Hojas, flores y ramas de la especie *Melia azeradach*

Tras análisis cualitativo mediante técnica CG-MS de sustancias hidrófilas presentes en **MA-H**, se obtuvieron una serie de compuestos orgánicos de interés. En la Figura 34 se puede observar el cromatograma de sustancias detectadas, y en la Tabla 11 las sustancias identificadas con un factor de coincidencia mayor del 80%.

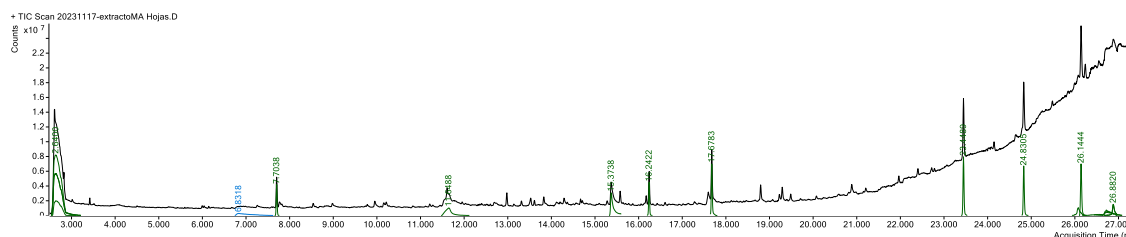


Figura 34. Cromatograma de sustancias detectadas por CG-MS en el extracto MA-H.

Tabla 11. Sustancias detectadas por CG-MS en el extracto MA-H.

TR (min)	Compuesto	CAS	Área
7,70	2-Pyrrolidinone, 1-propyl-	3470-99-3	6030463
11,65	Oxaziridine, 2-methyl-3-propyl- (*)	58751-77-2	10101304
15,37	Hexylamine, N,N-di(allyl)- (*)	1010416-17-0	13597967
16,24	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	502-69-2	6637695
17,68	Hexadecanoic acid, ethyl ester	628-97-7	11402270
23,45	Carbonic acid, eicosyl vinyl ester	1000382-54-3	13293098
24,83	2-Methylhexacosane	1561-02-0	11592501
26,14	Carbonic acid, eicosyl vinyl ester	1000382-54-3	13456731

(*) Estas sustancias presentaron un factor de coincidencia menor del 80% pero se incluyen debido a su presencia en cantidades considerables.

En este extracto se identifican 8 sustancias siendo las presentes en mayor proporción las descritas a continuación.

La sustancia hexilamina, N,N-di(allyl)- ($C_{12}H_{23}N$), Figura 35, identificada a tiempo de retención 15,37 min presenta un área del 15,79% respecto del total de los picos identificados y es un compuesto nitrogenado.

También se identifica la sustancia ácido carbónico, eicosil vinil éster ($C_{23}H_{44}O_3$), Figura 35, a tiempo de retención 23,45 y 26,14 min con un área del 31,06% respecto del total de los picos identificados como éster carbónico

El compuesto 2-metilhexacosano ($C_{27}H_{56}$), Figura 35, identificado a tiempo de retención 24,83 min presenta un área del 13,46% respecto del total de los picos identificados y es clasificado como tipo alcano.

Otra sustancia identificada en proporciones similares es éster etílico del ácido

hexadecanoico ($C_{18}H_{36}O_2$), Figura 35, a tiempo de retención 17,68 min en una proporción del 13,24% respecto del total de los picos identificados. Esta sustancia también fue identificada en el extracto MA-F.

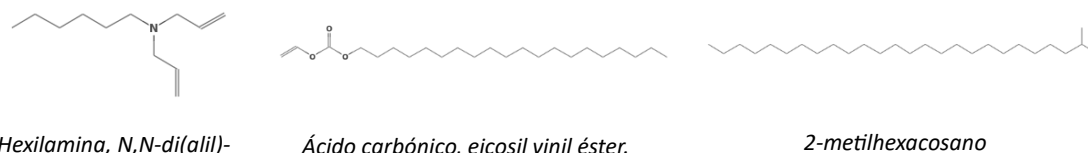


Figura 35. Estructuras químicas de las sustancias mayoritarias en MA-H.

Hojas y flores de la especie *Satureja montana*

Tras análisis cualitativo mediante técnica CG-MS de sustancias hidrófilas presentes en **SM-H**, se obtuvieron una serie de compuestos orgánicos de interés. En la Figura 36 se puede observar el cromatograma de sustancias detectadas, y en la Tabla 12 las sustancias identificadas con un factor de coincidencia mayor del 80%.

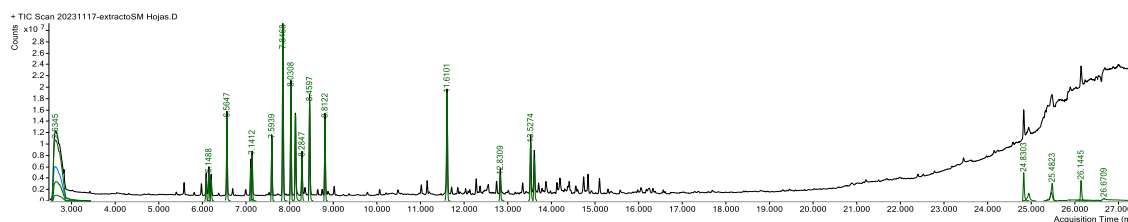


Figura 36. Cromatograma de sustancias detectadas por CG-MS en el extracto SM-H.

Tabla 12. Sustancias detectadas por CG-MS en el extracto SM-H.

TR (min)	Compuesto	CAS	Área
6,09	1,3,5-Cycloheptatriene, 3,7,7-trimethyl-	3479-89-8	5439826
6,15	Spiro[2.4]heptane, 1,5-dimethyl-6-methylene-	62238-24-8	6842989
6,20	Eucalyptol	470-82-6	5075471
6,56	.gamma.-Terpinene	99-85-4	19821516
7,11	Linalyl acetate	115-95-7	8096072
7,14	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	546-79-2	11755458
7,59	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	546-79-2	14669911
7,85	(+)-2-Bornanone	464-49-3	43835624
8,03	4-Oxo-.beta.-isodamascol	1000108-91-1	27284902
8,13	endo-Borneol	507-70-0	22809017
8,28	Terpinen-4-ol	562-74-3	10596961

TR (min)	Compuesto	CAS	Área
8,46	.alpha.-Terpineol	98-55-5	25376285
8,81	5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol	546-79-2	19516639
11,61	Bicyclo[5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl-	242794-76-9	29792387
12,83	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	16729-01-4	6715235
13,53	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	6750-60-3	16063711
13,61	Caryophyllene oxide	1139-30-6	12382544
24,83	Heptacosane	593-49-7	8987355

En este extracto se identifican 18 sustancias, siendo las que están presentes en mayor cantidad las descritas a continuación.

La sustancia (+)-2-bornanona ($C_{10}H_{16}O$), Figura 37, es identificada a tiempo de retención 7,85 min en una proporción del 14,86% respecto del área del total de los picos identificados y se clasifica como monoterpeno bicíclico.

También se identifica la sustancia biciclo[5.2.0]nonano, 2-metilen-4,8,8-trimetil-4-vinil- ($C_{15}H_{24}$), Figura 37, en una proporción del 10,10%, clasificada como sesquiterpeno.

A tiempo de retención 8,03 min se encuentra la sustancia 4-oxo- β -isodamascol ($C_{13}H_{20}O_2$), Figura 37, presente en una proporción del 9,25%.

Otros compuestos identificados en proporciones importantes son los monoterpenos α -terpineol ($C_{10}H_{18}O$), borneol ($C_{10}H_{18}O$) y γ -terpineno ($C_{10}H_{16}$) a tiempo de retención 8,46 min, 8,13 min y 6,56 min, y en proporciones 8,60%, 7,73% y 6,72%, respectivamente.

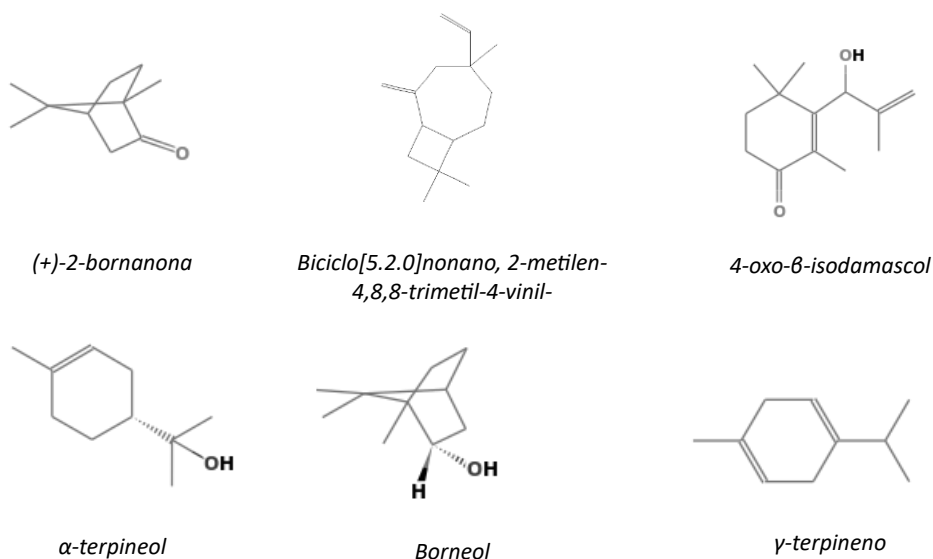


Figura 37. Estructura química de las sustancias mayoritarias en SM-H.

D. Formulación de desinfectantes.

Para llevar a cabo las formulaciones de productos desinfectantes de uso doméstico se emplearon agua, etanol, agentes tensioactivos y biocidas naturales. Se partió de formulaciones de productos desinfectantes simplificadas tomando como referencias formulaciones consultadas en patentes [28] [29] y estudios de la bibliografía [30] que incorporaron aceites esenciales como biocida. Algunas formulaciones de referencia consultadas fueron:

Tabla 13. Ejemplos de formulaciones iniciales tomadas como referencia.

Ejemplo formulación 1

Componente	Cantidad
Aceite esencial	0,02 – 5,00
Disolvente orgánico	2,75 – 30,00
Tensioactivo	0,74 – 10,00
Agua	Hasta 100

Ejemplo formulación 2

Componente	Cantidad
Aceite esencial	0,2
Etanol	85,0
Tensioactivo	0,2
Agua	Hasta 100

Ejemplo formulación 3

Componente	Cantidad
Agua	31,0
Etanol 96°	62,0
Aceite esencial	2,0
Trietanolamina	(ajuste pH)
Glicerina	2,3
Tensioactivo	0,5
Aroma	0,5
Conservante	0,5

Tomando estos ejemplos se desarrollará una formulación base, reduciendo los componentes a las materias primas básicas necesarias para la función desinfectante, y evitando otros como los aromatizantes, conservantes en el envase y glicerina, que pudieran causar interferencias en la actividad antimicrobiana.

D.1 Estudio de compatibilidad de los biocidas naturales

Previamente a la formulación del desinfectante se realizaron pruebas de compatibilidad de los biocidas naturales en matrices acuosas y orgánicas, estudiando su estabilidad en ellas. Los extractos naturales obtenidos en el apartado C. *Obtención de biocidas naturales* o bien adquiridos estudiados para incorporar a formulaciones de desinfectantes son:

1. *Olea europaea* restos de poda (**O**)
2. *Meliá Azedarach* frutos (**MA-F**)
3. *Meliá Azedarach* ramas, hojas y flores (**MA-H**)
4. *Satureja Montana* hojas y flores (**SM-H**)
5. Tierra de diatomeas micronizada (**DT**).

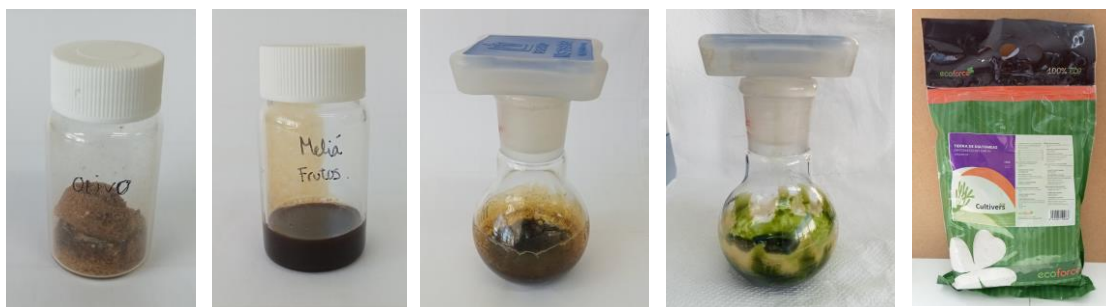


Figura 38. Extractos O, MA-F, MA-H, SM-H y DT, de izquierda a derecha.

Respecto del extracto de ramas de *Satureja montana* se decidió no continuar con el estudio por los malos resultados obtenidos en la evaluación del comportamiento biocida del extracto (Apartado E), además de la poca cantidad obtenida en el proceso de extracción.

En primer lugar, se probó su compatibilidad al ser dispersados en una matriz acuosa. Se iniciaron las compatibilidades con los extractos MA-F, O, MA-H y DT, se mezclaron en proporciones 1:10 de extracto natural en agua desionizada y se homogeneizaron durante 15 minutos en baño de ultrasonidos, Figura 39.

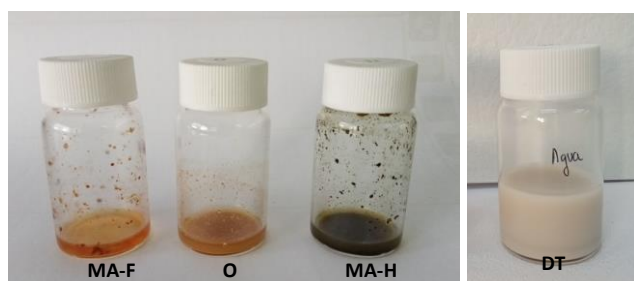


Figura 39. Pruebas de compatibilidad en matriz acuosa con biocidas MA-F, O, MA-H y DT.

Se observó en el extracto **MA-F** una parte soluble agua, adquiriendo esta un color anaranjado con aspecto totalmente transparente, y una parte insoluble que formó aglomerados que quedaron pegados en las paredes del frasco.

En la prueba con el extracto **O** se observó una dispersión del extracto en agua con partículas sólidas en suspensión, que, tras reposo, sedimentaron en el fondo. No se consiguió una correcta incorporación.

En la prueba **MA-H** se observó también una dispersión del extracto en el agua con numerosas partículas sólidas en suspensión y aglomerados que quedaron pegados en las paredes del vial. No se consiguió una buena incorporación.

Respecto de la tierra de diatomeas, una parte se solubilizó en agua, pero con el transcurso del tiempo y en reposo, se observó sedimentación.

La compatibilidad del extracto SM-H no se realizó con agua debido a la poca cantidad de biomasa recogida y además de que experimentalmente se observó que, durante los lavados de los utensilios empleados para la obtención del extracto, era necesario el uso de detergentes para retirar los restos de extracto.

Posteriormente, con las mismas proporciones 1:10 se incorporan los extractos sobre una matriz alcohólica, etanol 96°, los extractos referenciados como MA-F, O, MA-H, SM-H y DT, siguiendo el mismo procedimiento de incorporación, Figura 40.

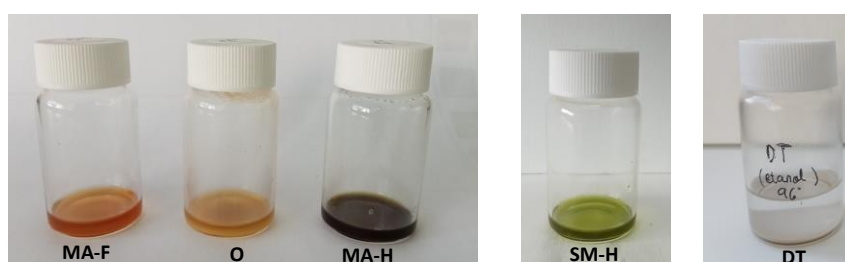


Figura 40. Pruebas de compatibilidad en matriz orgánica con biocidas MA-F, O, MA-H, SM-H y DT.

Empleando una matriz alcohólica se consiguió una buena incorporación en todos los extractos, a excepción de la tierra de diatomeas, que presentó una clara separación de fases. Las mezclas resultantes de los extractos naturales presentaron un tono coloreado característico del extracto natural y su aspecto fue transparente. Como la base de los desinfectantes comerciales es agua, se probó a incorporar estas mezclas compatibles (extracto + etanol) a una matriz acuosa. Para ello se incorporó una pequeña cantidad de las mezclas, 2 o 3 gotas (0,1g), sobre 1g de agua desionizada (proporción 1:10). A estas pruebas de compatibilidad de mezclas formadas por etanol, biocida y agua se las referencia como formulación simplificada.

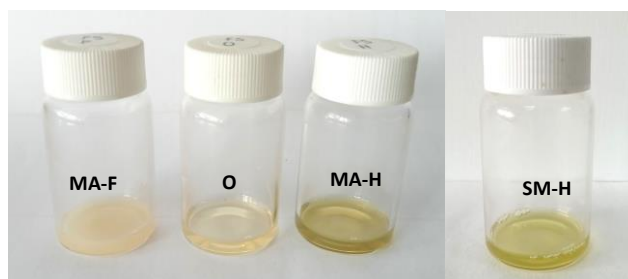


Figura 41. Pruebas de formulación simplificada, mezclas etanol con extractos MA-F, O, MA-H, SM-H sobre matriz acuosa.

Las formulaciones simplificadas de los extractos MA-F, O, MA-H y SM-H, Figura 41, presentaron de forma generalizada un ligero aumento de la turbidez, comparativamente

con las mezclas en etanol Figura 40, que presentaron un aspecto más transparente. En la formulación simplificada MA-F la turbidez fue algo más apreciable visualmente.

Para mejorar la incorporación del extracto en las formulaciones simplificadas (biocida + etanol + agua) se emplearon agentes tensioactivos que mejoren la compatibilidad en la matriz acuosa.

En primer lugar, se probó una solución de n-dodecil sulfonato en agua desionizada (en proporción 2:10). De las formulaciones simplificadas, observadas en la de la Figura 41, se añadieron 0,1 g de la solución preparada y se dispersan durante 2 minutos en el baño de ultrasonidos, Figura 42.

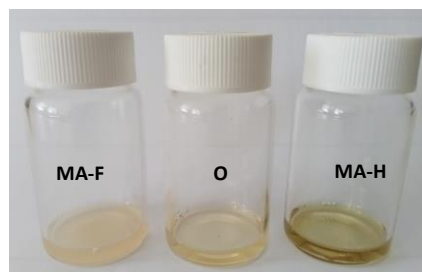


Figura 42. Incorporación de surfactante n-dodecil sulfonato sobre las formulaciones simplificadas de los extractos MA-F, O, MA-H.

La incorporación del aditivo surfactante mejoró la incorporación del extracto MA-F, observando una mayor transparencia en la mezcla. En cambio, en las formulaciones simplificadas de los extractos O y MA-H no se apreciaron cambios significativos, aunque su aspecto de base ya presentaba transparencia.

Por lo tanto, para conseguir mejorar la incorporación de extracto MA-F en la formulación simplificada de un desinfectante, se probaron otros tensioactivos/surfactantes para mejorar su incorporación. En este caso sobre 1,0 g de agua desionizada de aditiva 0,1 g de agente surfactante. Se sonica durante 1 minuto en el baño de ultrasonido. Sobre esta mezcla de agua y surfactante se incorporaron 0,1 g de la mezcla de extracto natural con etanol de la Figura 40. El mejor resultado se obtuvo con el aditivo C, un copolímero de estireno y ácido maleico modificado, observando una mayor transparencia.

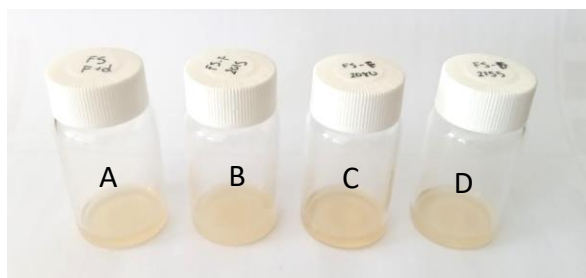


Figura 43. Formulaciones simplificadas de desinfectante con extracto MA-F aditivado con agentes dispersantes A, B, C y D.

El dispersante C presentó buena compatibilidad y resultados en las formulaciones con los biocidas O, MA-F y MA-H. Otro dispersante empleado, monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano, presentó buena compatibilidad y resultados en las formulaciones con biocidas SM-H y DT. Finalmente se obtienen las siguientes posibilidades para la formulación de desinfectantes con los biocidas naturales:

Tabla 14. Tabla resumen de componentes compatibles con los biocidas naturales.

Extracto	Matriz	Agente tensioactivo
<i>Olea europaea</i> O	Etanol	Copolímero de estireno y ácido maleico modificado
<i>Melia azedarach</i> frutos MA-F	Etanol	
<i>Melia azedarach</i> hojas, ramas y flores MA-H	Etanol	
<i>Satureja montana</i> hojas y flores SM-H	Etanol	Monolaurato de polioxietilen(20) sorbitano
Tierra de diatomeas DT	Agua	

D.2 Proceso de formulación de desinfectantes

Tomando como referencia las formulaciones de la bibliografía plasmadas en la Tabla 13, se emplearon para este proyecto dos formulaciones base, una tomada como desinfectante de referencia, la cual únicamente presenta la base de etanol y agua, Tabla 15, y la formulación con biocidas naturales, que presenta además de los componentes citados, los biocidas naturales estudiados, Tabla 16.

Tabla 15. Formulación desinfectante de referencia.

Componente	Cantidad
Agua desionizada	60
Etanol 96°	40

Tabla 16. Formulación desinfectante con biocida natural.

Componente	Cantidad
Biocida natural	1 - 10
Agua desionizada	Hasta 100
Tensioactivo	1
Etanol 96°	40

Se prepararon formulaciones con concentraciones de biocida natural del 1%, 5% y 10% wt, a excepción de las referencias DT y SM-H que se formularon únicamente con 10% de biocida natural. Como se ha comentado con anterioridad, no se aditivaron otros componentes habituales en formulaciones de desinfectantes con la finalidad de evitar posibles interacciones no deseadas que pudiesen interferir en el estudio de la actividad antimicrobiana de los biocidas. En la Tabla 17 se recogen las cantidades empleadas para cada una de las formulaciones llevadas a cabo.

Tabla 17. Formulaciones de desinfectantes con biocidas naturales.

COMPONENTE	REF.	MA-F1	MA-F5	MA-F10	MA-H1	MA-H5	MA-H10	O-1	O-5	O-10
Extracto – Frutos MA	-	1	5	10	-	-	-	-	-	-
Extracto – Hojas, ramas y flores MA	-	-	-	-	1	5	10	-	-	-
Extracto – Olivo	-	-	-	-	-	-	-	1	5	10
Etanol (96°)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Tensioactivo (Copolímero de estireno y ácido maleico modificado)	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Agua desionizada (*)	60	58	54	49	59	55	50	59	55	50

COMPONENTE	DT-10	SM-H10
Tierra de diatomeas	10	-
Extracto- Hojas y flores SM	-	10
Etanol (96°)	-	40
Tensioactivo (Monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano)	1	1
Agua destilada (*)	89	49

*Agua tratada en autoclave para su desinfección.

El proceso de fabricación de los desinfectantes se define a continuación. Sobre un vial se pesaron en una balanza de precisión la cantidad correspondiente de etanol, y posteriormente de biocida natural. Se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5-15 min hasta completa homogeneización. Cada 5 minutos se observó el aspecto del vial para comprobar su homogeneización. Por otra parte, en otro vial se pesó en una balanza de precisión la cantidad correspondiente de agua, y posteriormente se incorporó el aditivo tensioactivo. Se homogeneizó en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto. Posteriormente, sobre el vial que contiene el agua y el agente tensioactivo se incorporó poco a poco con una pipeta pasteur la mezcla de etanol y biocida natural, ayudando a la homogeneización mediante movimientos circulares. Finalmente, se homogeneizó durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos.

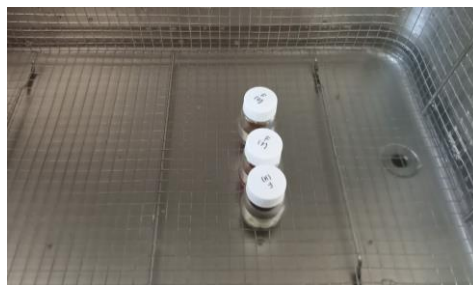


Figura 44. Viales que contienen desinfectantes en baño de ultrasonido.

Los biocidas formulados se observan en la siguiente figura:

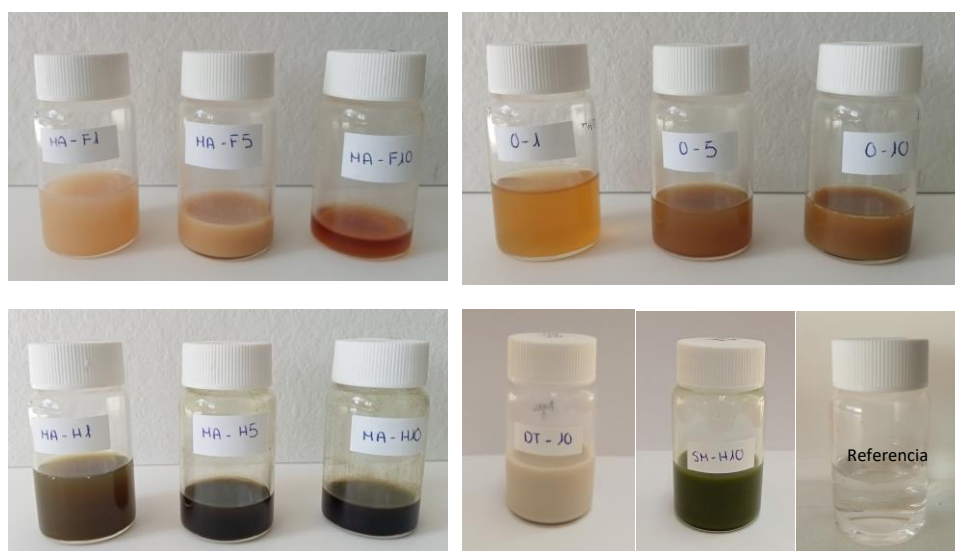


Figura 45. Aspecto de los desinfectantes formulados con el extracto natural MA-F, O, MA-H en proporciones 1,5 y 10% y desinfectantes formulados con biocida adquirido DT en una concentración del 10% y el extracto natural SM-H con una concentración del 10%.

De forma generalizada se obtuvieron desinfectantes con coloraciones propias de los biocidas naturales incorporados, con una correcta incorporación y sin formación de aglomerados. Las formulaciones que presentaron mayor cantidad de biocida, tras varios días, se observó una ligera sedimentación, por lo que previamente a su uso se homogeneizó manualmente. Además, a mayor cantidad de biocida incorporado el desinfectante presentó una coloración más intensa y una menor transparencia. El extracto que presentó mejor aspecto visual corresponde a la referencia O-1, desinfectante con extracto de *Olea europaea* en una concentración del 1%.

Finalmente, se seleccionaron los desinfectantes con una proporción del 10% para evaluar su capacidad desinfectante.

Tabla 18. Formulados para evaluar la capacidad desinfectante.

Especie	Referencia
<i>Melia azedarach</i> frutos	MA-F10
<i>Melia azedarach</i> hojas, ramas y flores	MA-H10
<i>Satureja montana</i> hojas y flores	SM-H10
<i>Olea europaea</i> restos de poda	O-10
Tierra de diatomeas	DT-10
Desinfectante referencia	REF

E. Evaluación microbiológica de los bioproductos obtenidos

Se han llevado a cabo dos técnicas de evaluación de la actividad microbiológica:

- Evaluación de halos de inhibición mediante pocillos en siembra en profundidad para los biocidas naturales, detallados en la Tabla 9.
- Evaluación de la capacidad desinfectante de los formulados, detallados en la Tabla 18.

E.1 Evaluación de halos de inhibición de los biocidas naturales

Se preparó medio agar de triptona y soja (TSA) para ensayos frente a bacterias y medio agar patata dextrosa (PDA) frente a hongos. Se inoculó el medio con una concentración de bacterias y hongos de 10^4 UFC/mL y de 10^5 esporas/mL, respectivamente. Posteriormente, se vertió sobre placas Petri y se dejó solidificar. Se etiquetaron las placas con el extracto que se iba a adicionar. Una vez solidificado se realizaron 3 pocillos en cada placa. Se añadió cada extracto en cada pocillo de su placa correspondiente, incluido el control positivo en el cual se utilizó el biocida comercial Proclin. A continuación, se llevaron a cabo las incubaciones con las bacterias a una temperatura

de 37°C y a 26°C las placas inoculadas con los hongos (*A. brasiliensis*). Pasado el tiempo de incubación (24 horas para bacterias y 3 días para hongos) se midió la presencia/ausencia de los halos de inhibición.

Los materiales naturales para estudiar microbiológicamente mediante la técnica de difusión en pocillo fueron los siguientes:

Resultados

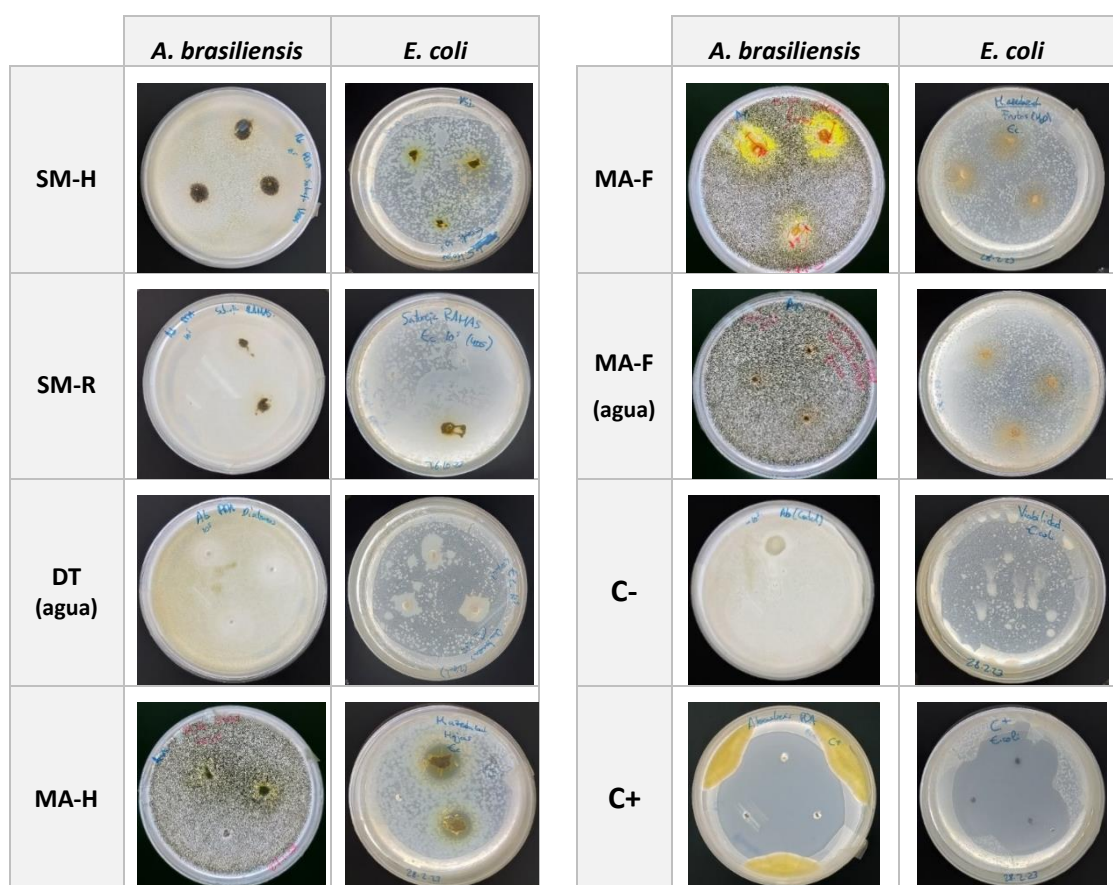
Los extractos que presentaron un mayor halo de inhibición fueron los de *M. azedarach*, por una parte, MA-F y por otra MA-H, y tanto frente a bacterias como al hongo ensayado, exceptuando el extracto de hojas, ya que no fue efectivo frente al hongo *A. brasiliensis*. En el caso del extracto de MA-F, que se probó a disolver en agua, no dio lugar a ningún halo de inhibición. Los ensayos realizados con el extracto de *S. montana* tanto SM-H como SM-R, no fueron efectivos ni frente a la bacteria *E. coli* ni frente al hongo *A. brasiliensis*, por ello se decidió no ensayar frente a *S. aureus*. El extracto de *O. europaea* se ha ensayado con anterioridad y corroborado su efecto antibacteriano en el proyecto AGROFOREF por lo que también se utilizó para formular un desinfectante.

En la Tabla 19 se recogen las medidas de los halos de inhibición y en la Tabla 20 los resultados visuales obtenidos:

Tabla 19 Medidas de los halos de inhibición (cm) de los extractos de *S. montana*, *M. azedarach* y de la preparación de *Diatomeas*. *: Hay un cambio de coloración alrededor del producto en el pocillo. **: Hay más crecimiento bacteriano alrededor del producto. -: No ensayado. C+: control positivo

	Medidas halos de inhibición (cm)		
	<i>A. brasiliensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
SM-H	0*	0	-
SM-R	0	0	-
DT (agua)	0*	0**	-
MA-H	0	0,9 – 1,1	0,8 – 1,1
MA-F	0,3 – 0,6 – 0,6	2,1 – 1,8 – 1,3	1,2 – 1,4 – 1
MA-F (agua)	0	0	0
C +	2 – 2,2 – 2,1	3,6 – 3,6 – 3,6	2 – 2 – 2

Tabla 20 Resultado visual del ensayo de halos de inhibición de los extractos de *S. montana*, *M. azedarach* y solución de diatomeas frente a *A. brasiliensis* y a *E. coli*. C+: control positivo C-: control negativo (ausencia de biocida-viabilidad microorganismos)



E.2 Evaluación de la capacidad desinfectante de los formulados.

Para llevar a cabo la evaluación de la capacidad desinfectante de los materiales desarrollados en el apartado anterior, *D. Formulación de desinfectantes*, se siguió el método de la norma UNE-EN 13697:2015+A1:2020.

Se preparó el material y los reactivos descritos a continuación para evaluar la actividad desinfectante de los productos formulados en el laboratorio de materiales frente a cuatro cepas bacterianas y dos cepas de hongos.

Superficie de ensayo: Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron discos de acero de 2 cm de diámetro, lavados con detergente Decon al 5% en volumen durante 60 minutos (Figura 46) y aclarados con agua destilada durante 10 segundos. Posteriormente, los discos fueron esterilizados con isopropanol al 70% durante 15 minutos y secados por evaporación en cabina de flujo laminar.



Figura 46. Discos de acero de 2 cm siendo esterilizados en Decon al 5% durante 60 minutos.

Se realizaron sobre los discos de acero ensayos de determinación de la concentración microbiocida del desinfectante (Nd), determinación del control de agua (Nc), control del neutralizador (NC), validación del método de dilución-neutralización (NT) y un último ensayo con los discos ensayados de Nd y Nc para determinar las unidades formadoras de colonias que quedan en la superficie de ensayo (Nts).

- Nd: Para la determinación de la concentración microbiocida del desinfectante se utilizaron discos de acero inoculados con cada especie donde, tras secar el inóculo, se colocaron 100µL del desinfectante que se iba a ensayar a la temperatura estipulada para cada especie.

- Nc: Para la determinación del control de agua se utilizaron discos de acero control, inoculados con cada especie donde tras secar el inóculo se colocan 100µL de agua estéril y posteriormente se ensayaron a la temperatura estipulada para cada especie.

- NC: Para la determinación del control del neutralizador se utilizaron discos de acero inoculados con cada especie y secados, introducidos en el neutralizante mezclado con 100µL de agua estéril. Posteriormente se mezclaron y se dejaron en contacto durante 5 minutos. Se realizaron las diluciones, se sembraron y se incubaron durante el tiempo estipulado para cada especie.

- NT: Para la validación del método de dilución-neutralización se utilizaron discos de acero inoculados con cada especie y secados, introducidos en un tubo con el neutralizante mezclado con 100µL de cada desinfectante. Posteriormente se agitó cada tubo y se dejó reposar en contacto durante 5 minutos. Se realizaron las diluciones, se sembraron y se incubaron durante el tiempo estipulado para cada especie.

- Nts: Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que quedaban sobre cada disco se cogieron las superficies de los tubos de los ensayos Nc y Nd y se lavaron con 10mL de agua destilada estéril, posteriormente se colocó cada una en una placa Petri y se cubrió con medio de cultivo, aún en estado líquido, el disco de acero (TSA o agar de extracto de malta MEA, según trabajásemos con bacterias u hongos). Se dejó solidificar y se incubó durante el tiempo estipulado para cada especie y finalmente se contó el número de UFC.

Diluyente: Se preparó el diluyente con la siguiente formulación en agua destilada:

- 1 g/L de Triptona
- 8,5 g/L de NaCl

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se guardó a 4°C.

Neutralizador: Se preparó un agente neutralizante compuesto por la siguiente formulación:

- Peptona 1 g/L
- L-Histidina HCl 1,00 g/L
- Lecitina 3,00 g/L
- Fosfato mono-potásico 3,60 g/L
- Fosfato disódico 7,20 g/L
- Cloruro sódico 4,30 g/L

Se añadió a la mezcla 30 mL/L de Tween 80, se disolvió en agitación y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medios de cultivo: Se prepararon los siguientes medios de cultivo en función de la especie que se fuese a utilizar en el ensayo: TSA, MEA y PDA. Posteriormente, los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Los medios de cultivo TSA y MEA se enfriaron a 45°C. Por un lado, se sirvieron en placas Petri, y por otro se utilizaron para verterlo en placas con las superficies ensayadas Nd y Nc lavadas (Nts).

Sustancia interfiriente. Los ensayos se realizaron en condiciones limpias, para ello se preparó una solución de albúmina bovina en agua destilada a concentración 0,6 g/L. Posteriormente, se esterilizó mediante filtración. La concentración final en el ensayo había de ser de 0,3 g/L de albúmina bovina, debido a que fue preparada añadiendo el inóculo en proporción 1:1.

Especies utilizadas en los ensayos:

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas para la realización de los ensayos:

- *Escherichia coli* CECT 405
- *Enterococcus hirae* CECT 4081
- *Staphylococcus aureus* CECT 239
- *Pseudomonas aeruginosa* CECT 116

Y las siguientes cepas de hongos:

- *Candida albicans* CECT 1394
- *Aspergillus brasiliensis* CECT 2574

Una vez recibidas las cepas, se prepararon soluciones de mantenimiento en glicerol al 33% y se guardaron a -20°C .

Para preparar las soluciones en criotubos de 2mL (Figura 47), se añadieron 500 μL de agua milli-Q y 500 μL de glicerol al 99% y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Al mismo tiempo se inocularon, con la ayuda de un asa de siembra, las cepas bacterianas en 60 mL de caldo de cultivo y la levadura *C. albicans* en 60 mL de malta al 3%. Posteriormente, se dejaron incubando 24 horas a 37°C las cepas bacterianas y 48 horas a 30°C *C. albicans*. En cuanto a *A. brasiliensis* se preparó una solución de esporas con un asa de siembra en 10 mL de solución salina. Posteriormente se añadieron 500 μL de cada solución en los distintos criotubos esterilizados.

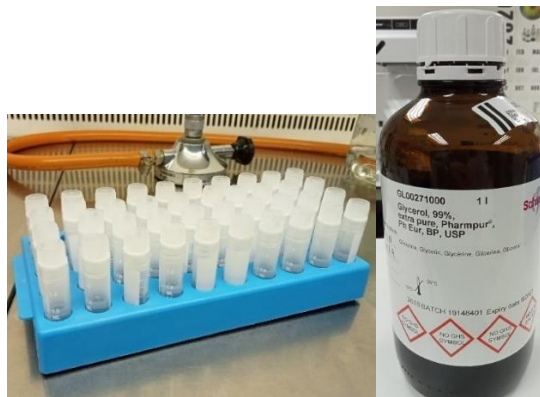


Figura 47. Crio-tubos con agua mili-Q y glicerol esterilizados.

Preparación de los inóculos

Cada inóculo fue preparado en ambiente de esterilidad proporcionado por una cabina de flujo. Para ello se utilizó un asa de siembra con la que se recogió una colonia y se mezcló con 10 mL del diluyente estéril (Figura 48).



Figura 48. Preparación del inóculo en ambiente estéril en 10 mL de diluyente.

El inóculo de *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus* y *C. albicans* se debía preparar a una concentración de entre $1,5-5 \cdot 10^8$ UFC/mL. El inóculo de *P. aeruginosa* se debía preparar

a $1,5-5 \cdot 10^8$ UFC/mL.

Inicialmente se puso a punto la medida de la concentración de las especies bacterianas mediante espectrofotometría. Una absorbancia de 0,18 a una longitud de onda de 625 nm equivale a $1,5-5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Se obtuvieron concentraciones de $7,8 \cdot 10^7$ UFC/mL (*E. coli*), $7,7 \cdot 10^7$ UFC/mL (*E.hirae*) y $3,3 \cdot 10^8$ UFC/mL (*S.aureus*).

En el caso de *P. aeruginosa* se debía conseguir un inóculo a concentración de $1-5 \cdot 10^9$ UFC/mL sin embargo, se alcanzó una concentración de $5,5 \cdot 10^8$ UFC/mL.

El inóculo de *C. albicans* se preparó una vez obtenida una absorbancia de 2,25, dando lugar a una concentración de $8,7 \cdot 10^7$ UFC/mL.

El inóculo de *A. brasiliensis* en condiciones limpias se debía preparar a concentración $1,5-5 \cdot 10^7$ UFC/MI y se obtuvo una concentración de $2,2 \cdot 10^7$ UFC/mL. El recuento de las esporas se llevó a cabo mediante una cámara Thoma.

Una vez preparados los inóculos se prepararon diluciones hasta $1:10^7$ en el caso de *P. aeruginosa*, hasta $1:10^6$ en el caso de *E. coli*, *E. hirae*, *S. aureus* y *C. albicans* y hasta 10^{-5} en el caso de *A. brasiliensis*. Se sembraron 100 μ L de las dos últimas diluciones de cada especie en una placa de TSA cada una, y se dispersó con un asa Digiralsky. Posteriormente se incubaron las placas durante 24-48h las bacterias y 2-4 días los hongos.

Los productos microbiocidas ensayados se detallan en la Tabla 18 y se observan en la Figura 49. Junto con las formulaciones con biocidas naturales también se ensayó una dilución de etanol al 40 %, tomada como de referencia, ya que fue la base de la formulación empleada para preparar los desinfectantes y se quiso comprobar su efectividad sin la adición de los extractos.



Figura 49. Desinfectantes formulados con cada extracto. De izquierda a derecha: *M. azedarach* frutos al 10%, *M. azedarach* hojas, ramas y flores al 10%, desinfectante de *O. europaea* al 10%, desinfectante de *S. montana* al 10%, desinfectante formulado con tierra de diatomeas al 10% y solución de etanol al 40%.

Procedimiento:

Para llevar a cabo el ensayo de la norma UNE-EN 13697:2015+A1:2020 se preparó cada inóculo añadiendo 1 mL de las suspensiones preparadas en el punto anterior y 1 mL de la sustancia interfiriente que fue preparada anteriormente. Se pipeteó 50 μ L de cada

inóculo en la superficie de acero correspondiente para cada producto colocada en el interior de una placa Petri. Posteriormente se dejó secar durante un máximo de 1 hora. Este proceso de secado fue optimizado, para ello se realizó una prueba de secado en estufa a 27°C con las placas cerradas, y en cabina de flujo en ambiente de esterilidad con las placas semiabiertas, finalmente se observó que fue más efectivo el secado en cabina de flujo con las placas semiabiertas, Figura 50.



Figura 50. Inoculación mediante una pipeta de una superficie de acero (izquierda). Secado del inóculo en ambiente estéril proporcionado por la cabina de flujo (derecha).

Una vez seco el inóculo se prepararon, por un lado, superficies de ensayo del producto con concentración microbicida (Nd), por otro las superficies de ensayo de control de agua destilada estéril (Nc), superficies para verificar la ausencia de toxicidad del neutralizador (NC) y finalmente las superficies de ensayo para validar el método de dilución-neutralización (NT).

Se preparó un tubo de 50 mL con 10 mL de agente neutralizante para cada superficie a ensayar (Nd, Nc, NC y NT) con 5g de perlas de vidrio estériles, Figura 51.

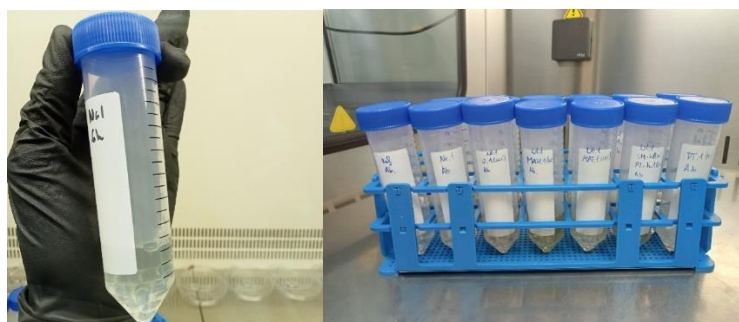


Figura 51. Perlas de vidrio y tubos de 50 mL con 10 mL de agente neutralizante.

Se escogieron las condiciones de ensayo 24°C la temperatura de ensayo a tiempos de contacto de los desinfectantes de 5 minutos para bacterias y 15 minutos para hongos.

Una vez secos los inóculos sobre las superficies, se añadieron 100 µL de cada biocida sobre las superficies que fueron preparadas para evaluar la actividad microbicida (Nd) asegurándose de que esta cubriera el inóculo seco. Asimismo, se añadieron 100 µL de

agua destilada a las superficies que fueron destinadas a determinar el control de agua (Nc). Las superficies Nd y Nc se mantuvieron durante 5 minutos a 24°C cuando se ensayaron frente a bacterias y durante 15 minutos cuando se ensayaron frente a hongos. Pasado este tiempo se introdujo cada superficie con cuidado en un tubo con 10 mL de agente neutralizante. Se agitó en un agitador Vortex durante 1 minuto y se dejó en contacto durante 5 minutos.

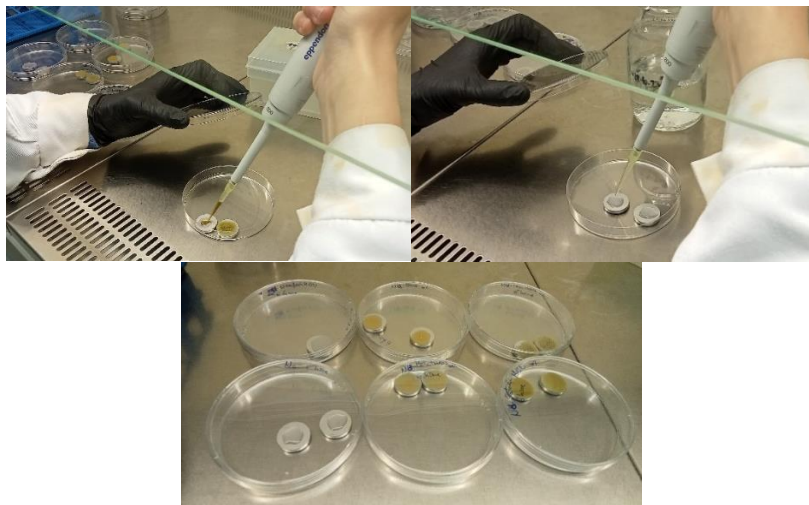


Figura 52. Adición de 100 μ de desinfectante (izquierda) o de agua destilada esteril (derecha) a cada superficie inoculada.

Posteriormente, se realizaron diferentes diluciones. En el caso de los controles Nc de *E.coli*, *E. hirae* y *S. aureus* y *C. albicans* se prepararon diluciones hasta 1:10⁵, en el caso de *P. aeruginosa* hasta 1:10⁶ y en el caso de *A. brasiliensis* hasta 1:10⁴. En cuanto a los ensayos de Nd se prepararon diluciones hasta 1:10² para todas las especies. Se sembraron 100 μ L de las diluciones en TSA con un asa Digrafsky y se incubaron durante 24-48 horas las cepas bacterianas y de 2 a 4 días las cepas de hongos. Pasado ese tiempo se contaron las colonias crecidas.

Posteriormente a la siembra se cogieron las superficies de los tubos y se lavaron con 10mL de agua destilada estéril, seguidamente se colocó cada una en una placa Petri y se vertió suficiente medio de cultivo como para cubrir el disco de acero (TSA o MEA según trabajásemos con bacterias u hongos), finalmente se contó el número de UFC tras la incubación (Nts). Esta debía ser <100 en caso de concentraciones activas (superficies obtenidas de Nd sin crecimiento) y >100 en caso de concentraciones no activas como controles, Figura 53.

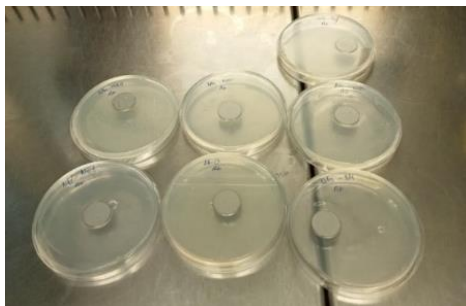


Figura 53. Agar vertido sobre el ensayo de superficies Nts.

Además, por un lado, se añadió 100 μL de cada producto desinfectante en los tubos conteniendo 10 mL del agente neutralizante preparados para cada superficie de ensayo NT. Y por otro lado se añadieron 100 μL de agua destilada estéril a los tubos con 10 mL de agente neutralizante preparados para las superficies NC (Figura 54). Posteriormente se mezcló y se dejó 5 minutos en contacto. Pasado este tiempo se introdujo cada superficie en su tubo correspondiente, se agitó en un agitador Vortex durante 1 minuto y se prepararon las diluciones con diluyente para sembrar en placas Petri. En el caso de *E. coli*, *E. hirae* y *S. aureus* y *C. albicans* se prepararon diluciones hasta 1:10⁵, en el caso de *P. aeruginosa* hasta 1:10⁶ y en el caso de *A. brasiliensis* hasta 1:10⁴. Se sembraron 100 μL de las 4 últimas diluciones en TSA con un asa Digiralsky y se incubaron durante 24-48 horas las cepas bacterianas y de 2 a 4 días en el caso de los hongos. Pasado ese tiempo se contaron las colonias crecidas.



Figura 54. Adición de 10 μL de producto o de agua destilada estéril a los tubos conteniendo 10 mL de agente neutralizante (izquierda). Tubos de 1,5 mL con las diluciones preparadas en diluyente (derecha).

Con los resultados obtenidos se calcula:

$$N = \frac{\text{Log } 0,025 \cdot c}{(n1 + 0,1 \cdot n2) \cdot d}$$

$$Nd \text{ (o } Nc) = \log (c \cdot 10/n \cdot d)$$

y

$$NC, NT = \log(c \cdot 10/n \cdot d)$$

Resultados:

Pasado el tiempo de incubación se contaron las colonias crecidas en las placas incubadas y se obtuvieron los resultados de logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas de cada superficie de ensayo (N, Nc, Nd, NC, NT y Nts). Además, se calculó también el valor de reducción logarítmica R ($R = Nc - Nd$). Este valor debe superar 3 en caso de ensayos frente a hongos y 4 en el caso de ensayos frente a bacterias.

Se observó actividad microbicida con valores de R superiores a 3 en caso de hongos y a 4 en caso de ensayos frente a bacterias, en los extractos *M. azedarach* **MA-F10** y **MA-H10** y en el extracto **SM-H10** de *S. montana* frente a todas las especies, exceptuando *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esto último fue debido a que no se obtuvo validación en los valores logarítmicos del número de UFC recuperados de algunas o todas de las superficies de ensayo control. En el caso de *P. aeruginosa* no se observó crecimiento suficiente en ninguna de las superficies de ensayo Nc, NC ni NT, Tabla 21. En cuanto al ensayo realizado frente a *E. coli* no se obtuvo un valor R efectivo debido a que se recuperaron pocas UFC de las superficies control Nc, Tabla 21 y Tabla 22.

En el formulado **DT-10** se observó un crecimiento notable de colonias en los ensayos frente a las especies *A. brasiliensis* y *E. coli*, no realizando ensayos con el resto de especies.

En el caso del desinfectante formulado con extracto **O-10** de *O. europaea* se observó que frente a *A. brasiliensis* no era efectivo, sin embargo, si fue efectivo frente a *C. albicans*, *S. aureus* y *E. hirae*. Lo mismo ocurrió con el desinfectante de referencia formulado con etanol al 40%, de esta manera se observa que la adición de extractos amplía el rango de efectividad en el desinfectante frente a especies fúngicas, Tabla 21.

Tabla 21 Valores de reducción logarítmica R para los diferentes desinfectantes formulados frente a las 6 especies ensayadas. Los valores remarcados en verdes superan el valor R de 4 en el caso de bacterias y 3 en caso de hongos, por lo que tienen características bactericidas/fungicidas.

	Reducción logarítmica (R)					
	O-10	MA-H10	MA-F10	MA-H10	Referencia-10	DT-10
<i>A. brasiliensis</i>	2,41	5,76	5,75	5,78	2,29	0,52
<i>E.coli</i>	3,93	3,93	3,93	3,93	3,93	-1,19
<i>C.albicans</i>	5,34	5,34	5,34	5,34	5,34	-
<i>S.aureus</i>	5,64	5,64	5,64	5,64	5,64	-
<i>E. hirae</i>	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-

Se obtuvieron los valores del logaritmo decimal del número de UFC recuperadas de las superficies de ensayo controles N, NC y Nc además de los valores de NC-Nc (Tabla 22) y NT-Nc para validar el ensayo. Los valores de N para validar los ensayos frente a bacterias (excepto *P. aeruginosa*) deben encontrarse entre 6,57 y 7,1, frente a *P. aeruginosa* entre 7,57 y 8,1 y frente a hongos entre 5,57 y 6,1. Solo se alcanzan valores de N validados en el caso de *A. brasiliensis* y *S. aureus*. Además, también deberán obtenerse valores de NC-Nc inferiores a 0,3 o -0,3 los cuales se alcanzan para todas las especies excepto *E.coli* y *P.aeruginosa*.

En cuanto a los valores NT-Nc, se supera el máximo permitido para la validación (0,3) en el caso de los ensayos de *E. coli* debido al valor bajo de Nc que se obtuvo. También se superan ligeramente en el ensayo del desinfectante O-10 frente a *S. aureus* y en el ensayo del desinfectante formulado MA-H-10 frente a *E. hirae*.

Tabla 22 Valores del logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas de las superficies de ensayo controles N, NC y Nc además de los valores de NC-Nc.

	<i>A. brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
N	5,68	6,30	6,87	6,16	6,28	7,14
NC	5,67	5,57	5,58	6,54	6,16	-
Nc	5,80	5,44	5,74	6,35	4,03	-
NC-Nc	-0,13	0,13	-0,16	0,19	2,13	-

Finalizados los ensayos experimentales se concluyó lo siguiente:

- Tras la evaluación inicial de los extractos, se observó que extractos de ramas y de hojas de *S. montana* no tenían efecto antimicrobiano. Sin embargo, tras ensayar el desinfectante formulado con un 10% de este extracto, se obtuvieron valores de reducción para todas las especies ensayadas, exceptuando *E. coli* y *P. aeruginosa* que no fueron validadas frente a ninguno de los extractos ensayados.
- Se observó que el extracto de *M. azedarach* tenía efecto antimicrobiano frente a hongos y bacterias, exceptuando el extracto de hojas frente a *A. brasiliensis*. El ensayo del desinfectante formulado con este extracto, tanto de hojas como de frutos al 10%, fue efectivo frente a *A. brasiliensis*, *C. albicans*, *S. aureus* y *E. hirae*.

Las diferencias observadas entre ambas técnicas de evaluación para una misma especie microbiana podrían ser debidas a que los extractos concentrados obtenidos presentaron sustancias insolubles en medio acuoso, comportamiento observado experimentalmente durante la formulación de los desinfectantes, y, por tanto, pudieron verse afectados los resultados por la dificultad de difundirse en el medio acuoso del agar. Este comportamiento se corrigió en la formulación del desinfectante, seguramente con la incorporación de agentes tensioactivos, evitando incompatibilidades entre las sustancias activas y el medio acuoso.

- En cuanto al desinfectante formulado con extracto de *O. europaea* al 10%, se observó que era efectivo frente a las bacterias ensayadas (exceptuando aquellas cuyos ensayos no fueron validados), pero no frente a hongos.
- Respecto al biocida inorgánico tierra de diatomeas, no se observó actividad frente a ninguna de las especies de bacterias y hongos ensayadas.

F. Comportamiento de materiales desinfectantes frente a virus.

En el presente proyecto se ha establecido la conveniencia de poder instaurar una nueva línea de trabajo basado en el trabajo con virus, así como identificar partes del procedimiento que puedan ocasionar variabilidad de los resultados, con la finalidad de reducirlos. El objetivo se basa en poder determinar la actividad antiviral de los diferentes antisépticos y desinfectantes desarrollados en el proyecto COMPMIC. Para ello, se toma como referencia la norma de ensayo UNE-EN 14476: 2014+A2: 2020 denominada como: Antisépticos y desinfectante químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad virucida en medicina. Método de ensayo y requisitos (Fase 2/Etapa 1). También fue necesaria la profundización en el conocimiento del comportamiento de los virus, sobre cómo trabajar con ellos, niveles de seguridad, sus aplicaciones en la investigación y control de enfermedades, realizando el siguiente curso de formación: *Virología aplicada a la investigación en Biomedicina*, a través de la

plataforma on-line de Genotipia.

La norma europea citada anteriormente especifica un ensayo de suspensión para establecer si un antiséptico desinfectante químico posee una actividad virucida en las situaciones como: hospitales, instalaciones médicas e instituciones dentales; en las enfermerías de los colegios, de jardines de infancia y residencias de ancianos. También se incluiría en los puestos de trabajo, en el hogar, así como lavanderías y cocinas que suministran productos directamente a los pacientes.

Además, este ensayo tiene en cuenta las condiciones prácticas de aplicación del producto incluyendo la duración de contacto, la temperatura, los organismos de ensayo y las sustancias interfirientes.

Para la puesta en marcha de un laboratorio de Virología se necesita disponer de las instalaciones adecuadas para trabajar con este tipo de organismos. Para ello, se necesitan conocer la peligrosidad de los agentes biológicos que se emplean como en cualquier tipo de laboratorio de Microbiología con el fin de determinar las medidas y normas de prevención y protección a adoptar. La clasificación de estos agentes se describe en función de su potencial biopeligrosidad. De esta manera, el RD 664/1997 y la Directiva 2000/54/CE clasifican a los agentes biológicos teniendo en cuenta un posible riesgo para los seres humanos, existen pues cuatro grupos de riesgo:

- Grupo de riesgo 1: Aquel que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre.
- Grupo de riesgo 2: Aquel que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.
- Grupo de riesgo 3: Aquel que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz.
- Grupo de riesgo 4: Aquel que causa una enfermedad grave en el hombre, supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaz.

En función de los microorganismos de ensayo que solicita la norma UNE-EN 14476 podemos establecer el grupo de riesgo con el que se trabajaría y establecer las medidas de contención que debería de tener el laboratorio. Así pues, la norma establece las siguientes cepas de virus para ensayo:

Tabla 23. Cepas de virus que recoge la norma UNE-EN 14476.

Virus de ARN sin envoltura	Virus ADN sin envoltura	Virus ADN con envoltura
Poliovirus tipo 1. LSc-2ab (Picornavirus)	Adenovirus tipo 5, cepa Adenoid 75 (ATCC VR-5)	Virus vaccinia modificado Ankara (MVA) (ATCC VR-1508) o cepa Elstree del virus vaccinia (ATCC VR-1549)
Murine norovirus, cepa S99 Berlín	Murine parvovirus, cepa Crawford (ATCC VR-1346)	

Como se observa en la Tabla 23, el ensayo se realiza principalmente frente a tres virus: Poliovirus tipo 1, Adenovirus tipo 5 y Norovirus murino. Los requisitos que establece la norma es que el producto debe demostrar una reducción logarítmica decimal del título viral de al menos 4, o sea que se dé una disminución del título viral en un 99,99 %, para indicar que el producto presenta una *actividad virucida*, indicando que el producto es eficaz para todo tipo de virus, ya que los virus sin envoltura son los más difíciles de tratar con desinfectantes. Del Poliovirus se considera que tiene una mayor resistencia que los dos restantes, por lo que, si el desinfectante no tiene actividad virucida frente a los Poliovirus, se considera que el producto tiene una *actividad virucida de espectro limitado*. La norma también contempla el ensayo con virus con envoltura como son los Vaccinia, por lo que, si el desinfectante logra reducir su título, se consideraría que presenta un *efecto virucida frente a virus con envoltura*.

El principio del ensayo radica en la toma de una muestra a la que se añade a una suspensión de ensayo de virus en una solución de una sustancia interfiriente (es la sustancia que se emplea para simular condiciones limpias o sucias). La mezcla se mantiene a la temperatura y duración de ensayo que establece la norma en función se trate de: (1) tratamiento higiénico de las manos por fricción y lavado higiénico de las manos, (2) desinfección de instrumental, (3) desinfección de superficies y (4) desinfección del material textil. Transcurrida la duración de contacto se toma una alícuota y se suprime la acción virucida mediante un método validado. Se realizan las diluciones pertinentes que se transfieren a cultivos celulares ya sean en suspensión o en monocapa. Se calculan los títulos de infectividad y se evalúan. La reducción de la infectividad del virus se calcula a partir de las diferencias de los logaritmos de los títulos virales antes y después del tratamiento con el producto.

Equipamiento básico laboratorio Virología

Además de ser esencial tener los conocimientos para el trabajo con virus, también se necesitan los conocimientos necesarios para el manejo de cultivos celulares. El cultivo celular es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células in vitro, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Para ello son imprescindibles los siguientes equipos con el fin de poder establecer un laboratorio de Virología competente que pueda trabajar con productos desinfectantes: incubadoras

de CO₂, campanas de flujo laminar, campanas de bioseguridad IIA, centrifugas refrigeradas, baños termostáticos (todos los medios han de atemperarse antes de entrar en contacto con las células), microscopios invertidos para el control morfológico de las células, vortex. A continuación, se muestran el presupuesto orientativo para la adquisición de algunos de los equipos que se necesitarían en las instalaciones de AIDIMME.

Tabla 24. Presupuesto del equipamiento necesario para la puesta a punto de un laboratorio de Virología.

Equipo	Presupuesto
Ultracongelador 110 L ULTRABAJA TEMPERATURA - 40 / -86º C	5.800 €
Microscopio Trinocular. MOTIC. Cabezal: Siedentopf. Ocular: WFPL10X/22mm. Porta-objetivos quintuple. Objetivo: CCIS PL 4X, CCIS fase PL PH10X, LWD PL PH20X y LWD PL PH 40X. Enfoque macro y micrométrico coaxial. Condensador ELWD A.N. 0.30.	5.000 €
Incubador de CO ₂ I CO150med. MEMMERT. 156 l, 18 °C - 50 °C, con control de CO ₂ ajustable desde 0 % - 20 %, humedad limitada por el elemento Peltier, con 1 bandeja para el agua y con 2 estantes en acero inoxidable	8.400 €
Cabina flujo laminar TELSTAR BIO II	10.000 €

El uso de campanas de flujo laminar además de las de bioseguridad, se basa en la propia seguridad del operador además de mantener la esterilidad de los cultivos de celulares. Y es que las bacterias o levaduras (que pueden contaminar un cultivo celular) pueden competir con las células mamíferas por los nutrientes y/o podrían infectar y eliminar las células. Toda manipulación se lleva a cabo, típicamente, en una campana de flujo laminar para evitar la entrada de microorganismos contaminantes. También pueden añadirse antibióticos al medio de cultivo. Entre las manipulaciones más comunes llevadas a cabo en cultivos celulares, se encuentran los cambios de medio, el pase de las células y la transfección.

En cuanto al incubador de CO₂ es vital para mantener las condiciones esenciales para el crecimiento de los cultivos celulares. Además de permitir una atmósfera controlada de CO₂ (4-7 % mediante inyección del gas a partir de botellas presurizadas), debe de controlar la temperatura, así como mantener una humedad relativa elevada (inyectando agua estéril y filtrada) a fin de reducir la evaporación del agua del medio de cultivo. Es importante una recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior. Si además en el circuito de circulación de aire se intercala un filtro HEPA se consiguen eliminar las posibles partículas contaminantes, y se asegura

la esterilidad del ambiente. Se aconseja el uso de diferentes incubadores debido a que los cultivos son muy susceptibles de contaminación entre células transfectadas y no transfectadas.

El uso de nitrógeno líquido también sería necesario para el almacenamiento de las líneas celulares, debido a que existen líneas que pueden entrar en un grado de senescencia tras demasiados pases lo que invalidaría su posterior uso en los ensayos. Ello se debe a que muchas de las líneas celulares son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir se pueden encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones. Por ello, también se necesitaría un ultracongelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para mantener los stocks celulares.

Normalmente las líneas celulares tienen una vida finita. En función del tipo celular, puede ser entre 20 y 100 generaciones (pases). Una vez superado ese límite, las células entran en la etapa senescente y dejan de dividirse. Algunas células (como las de roedores o las tumorales) tienen mecanismos que evitan la senescencia, dando lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Para las líneas celulares finitas, lo más conveniente es trabajar con pases cortos. Por ello es fundamental tener una instalación criogénica que disponga de tanques de nitrógeno líquido (-196°C) para el almacenamiento de stocks de células a diferentes pases.

Las células pueden cultivarse en diferentes recipientes en función de la escala deseada. Cuando se cultivan células para hacer experimentos, se hacen cultivos a pequeña escala. Para ello, las células se multiplican en frascos que tienen una base de 25 a 175 cm^2 . En un recipiente típico de 175 cm^2 , que es el más grande que se utiliza en el laboratorio, pueden obtenerse aproximadamente 10^7 células adheridas y unas 10^8 células en suspensión. Cuando es necesario aumentar la escala del cultivo, se recurre a diversos tipos de recipientes, desde frascos triples y botellas cilíndricas hasta biorreactores. En cualquier caso, es necesario asegurar el correcto intercambio gaseoso y la disponibilidad de nutrientes.

Las líneas celulares que deberían emplearse para cada uno de los virus de ensayo serían las siguientes:

Tabla 25. Tipos de virus y las líneas celulares a emplear.

Virus	Línea celular
Adenovirus	Células HeLa
Poliovirus	Células HeLa
Norovirus	Células Raw 264.7 (ATCC TIB-71)
Parvovirus	Células A9 (ATCC CCL-1.4)
Vaccinia modificado Ankara	Células BHK 21 (ATCC CCL-10)
Vaccinia cepa Elstree	Células Vero (ATCC CCL-81) Células CV-1 (ATCC CCL-70)

Las células HeLa, también muy utilizadas en virología, derivan de una muestra de cáncer cérvico-uterino obtenida en 1951. Esta línea celular se diferencia de otras por su rápido crecimiento e inmortalidad. Son ideales para ensayos a gran escala porque son capaces de duplicar su número en menos de 24 h. Esta alta capacidad proliferativa se debe a que probablemente la integración del virus del HPV (Virus del Papiloma Humano) en su genoma esté cerca del protooncogén c-myc, activándolo. Las HeLa han acumulado numerosas mutaciones que le confieren ventajas para escapar de los controles celulares y, por tanto, proliferar más. Algunas de estas mutaciones permiten que la telomerasa de las células HeLa esté que le permite la inmortalidad. Dadas las mutaciones que posee esta línea celular, esta línea tampoco es la elección idónea para estudiar interacción virus-huésped.

Las células Vero fueron aisladas en 1962 a partir de células epiteliales de riñón de mono verde africano y son muy utilizadas en estudios de infección. No son células tumorales y como son susceptibles a muchos virus, se utilizan como huésped para crecer poliomavirus, sarampión, rubeola, adenovirus y arbovirus. Además, han sido utilizadas para producir vacunas de la polio y la rabia durante 30 años. Pese a las ventajas de esta línea celular para amplificar virus, no son apropiadas para investigar interacciones entre virus y huésped porque carecen de sistema de interferón, que es la primera línea de defensa del sistema inmune innato frente a los virus. Como consecuencia de la falta de interferón, los virus pueden crecer hasta títulos muy altos en estas células.

Procedimiento de ensayo

Se pipetea 1 ml de la sustancia interfiriente en un recipiente de capacidad suficiente para permitir la mezcla apropiada. Se añade 1 ml de la suspensión de ensayo del virus. Se mezcla y se añaden 8 ml de la solución de ensayo del producto. Se mezcla y se deja el tiempo de ensayo necesario. Transcurrido el tiempo de incubación, se toma una alícuota y se resuspende con un medio de mantenimiento enfriado, se realizan diluciones y se calcula el título vital. De esta forma, se determina la reducción logarítmica

de la infectividad del virus a partir de las diferencias de los logaritmos decimales de los títulos virales antes y después del tratamiento con el producto.

La titulación del virus, es decir, la cuantificación del número de virus en un volumen determinado se puede realizar mediante el ensayo en placa, aunque hay otras muchas técnicas, pero es la que indica la norma UNE-EN 14476. Los ensayos de placa se utilizan para cuantificar los virus que lisan las células que infectan. Este ensayo consiste en infectar cultivos en monocapa con diluciones del virus rescatado, normalmente en múltiplos de 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). El primer paso consiste en retirar el medio de cultivo en contacto con las células para añadir la dilución del virus rescatado. Esta dilución se hace en un medio de cultivo con un porcentaje de FBS (suero fetal bovino) menor al que se utiliza para el cultivo de las células, debido al peor crecimiento del virus en medios con alto contenido en suero. Tras una breve incubación (1-2 h), se vuelve a retirar el medio y se cubren los cultivos con agar semisólido. De esta forma se evita que el virus se disperse libremente, permitiendo tan solo la infección de las células contiguas a las ya infectadas durante el periodo de incubación. Transcurridos unos días (esto depende del tipo de virus) se puede ver el desarrollo de zonas circulares transparentes, señal de que el virus ha lisado las células. Esto es lo que se denominan “placas”.

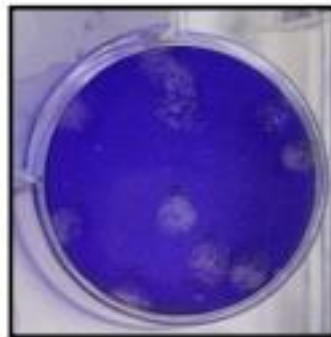


Figura 55. Placas virales de SARS-CoV-2 wild type.

El número de placas depende del número de viriones en el inóculo. Se asume que cada placa se forma a partir de una partícula vírica en la muestra.

Las placas se pueden contar generalmente a simple vista tras retirar el agar semisólido y teñir las células con cristal violeta. El resultado del recuento se expresa como unidades formadoras de placa (PFU) por mililitro. Para calcular el título lo correcto es añadir las diluciones por triplicado y hacer la media de los tres valores. Finalmente, el número medio de placas se divide por el valor de la dilución empleada y por el volumen añadido a cada placa.

Además de la línea celular, la temperatura también cumple un papel crucial en el desarrollo de las células y del virus. Si no se tiene en cuenta el efecto de la temperatura se pueden malinterpretar los resultados obtenidos.

Por otro lado, si se realizan ensayos antivirales, es necesario reducir la concentración de suero del medio (del 10% al 2% o menos). Esto se debe a que el suero interfiere en la capacidad de adhesión del virus a la célula. La confluencia del tapiz celular también debe ser tenida en cuenta. Una confluencia mayor complica la infección del virus; a su vez una confluencia muy baja también dificulta la infección del virus. Unos valores óptimos son un 70-80% de confluencia celular.

Es fundamental tener en cuenta que para evaluar compuestos antivirales y reproducibles todas las células deben proceder del mismo frasco (mismo origen). No se pueden evaluar antivirales sembrando media placa de un bote y media de otro, por ejemplo. En el caso de no tener suficiente cantidad con el contenido de un frasco se podría resuspender el contenido de varios; de este modo, se homogeneizan los resultados al máximo. Por otro lado, si hay que evaluar muchos compuestos simultáneamente y es necesaria más de una placa, se pueden volver a poner las células control sin tratamiento en cada placa. No se pueden comparar resultados entre placas si no se incluyen estos controles. Para concluir que un compuesto tiene actividad antiviral no se puede tener el control sin tratamiento y el tratamiento correspondiente en distintas placas. Como se puede comprobar, siempre hay que minimizar al máximo las distintas variables que se puedan presentar.

G. Parámetros que intervienen en la variabilidad de la eficacia desinfectante.

La eficacia real de un desinfectante puede verse afectada por diversos factores que hay que tener en cuenta en su formulación. El uso final del desinfectante es un factor clave en la formulación, ya que no todos los desinfectantes son eficaces contra todos los microorganismos. Los factores que pueden alterar en cierta medida la eficacia de un producto desinfectante son los siguientes:

Microorganismos: La pared celular de los microorganismos influye en gran medida en la desactivación o eliminación de este. Las bacterias generalmente están rodeadas por dos capas protectoras, una membrana interna y una pared externa, constituida principalmente por peptidoglicanos. En el caso de las Gram+, los peptidoglicanos constituyen aproximadamente el 20% de la pared celular, y en el caso de las Gram- aproximadamente el 10%. Algunas bacterias también pueden contener una tercera capa protectora, la capacidad de formar endosporas, volviéndose más resistentes y pudiendo sobrevivir incluso sin nutrientes o bajo estrés extremo, o incluso la capacidad de formar biopelículas, protegiéndose frente a factores estresantes químicos, biológicos y mecánicos. Respecto los virus, generalmente están cubiertos por una cubierta proteica, llamada cápside, y algunos presentan una capa adicional denominada envoltura constituida por proteínas y lípidos. Los virus presentan estructuras muy variables. En cuanto a los hongos, estos tienen una pared celular rígida, formada principalmente por quitina y glucanos.

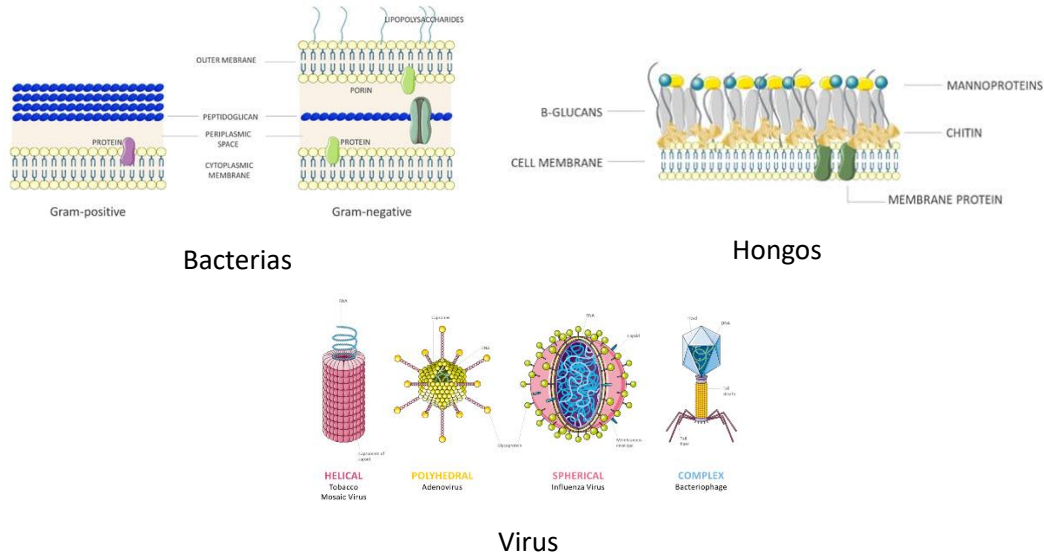


Figura 56. Estructura de la pared celular de los diferentes microorganismos [32].

Además, los microorganismos pueden perdurar activos sobre las superficies inanimadas durante largos periodos de tiempo, incluso meses, como *S. aureus*, incluso *MRSA*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, multiplicándose durante ese periodo de tiempo. Hongos patógenos como *C. albicans*, puede sobrevivir incluso 4 meses. En cuanto a los virus, los relacionados con el tracto respiratorio, como el SARS pueden persistir durante algunos días, y los que afectar al tracto gastrointestinal, como el astrovirus o el rotavirus pueden persistir durante aproximadamente 2 meses [32].

El tipo de microorganismo, así como su concentración es un factor importante en la efectividad biocida.

Sustancia activa antimicrobiana: la eficacia dependerá por una parte de la propia naturaleza de la sustancia activa y por otra de las propiedades del tipo de microorganismo a combatir (formación de esporas, biopelículas...) Los desinfectantes actúan sobre un espectro de microorganismos amplio, pero no pueden actuar eficazmente sobre todas las clases de microorganismos.

Formulación del desinfectante: La dilución o concentración de la sustancia activa en la formulación del desinfectante proporciona información interesante sobre la posibilidad de reducción del tiempo de exposición. Además, los aditivos presentes en la formulación pueden interactuar con la sustancia activa alterando su eficacia. La compatibilidad de la sustancia activa con los diferentes componentes de la formulación es otro factor de estudio.

pH: las formas ionizadas de las sustancias activas biocidas disociables son más eficaces debido a que pasan mejor a través de las membranas biológicas. Un cambio de pH en el desinfectante puede afectar a la estabilidad del desinfectante y al cambio en las interacciones entre el microbicida y la célula microbiana. Se sabe que los agentes

aniónicos, como los hipocloritos, son más activos a pH ácidos debido a que al aumento de grado de disociación, y los agentes catiónicos, como los compuestos de amonio cuaternario, son más activos a pH alcalino debido a que ya que el aumento de grado de ionización produce un aumento de la unión en las superficies bacterianas.

Tiempo de exposición: generalmente, la eficacia antimicrobiana aumenta a mayores tiempos de exposición, aunque no existe una correlación directa entre el tiempo de contacto y la actividad antibacteriana.

Respecto del soporte: la presencia de residuos orgánicos (presencia de materiales extraños) en la superficie a desinfectar afecta a la capacidad desinfectante. Los microorganismos son eliminados por contacto directo con la solución desinfectante. Es por ello por lo que las superficies con piezas que presenten recovecos de acceso más complicado presentarán mayor dificultad para desinfectar que una superficie plana.

Temperatura: aplicar el desinfectante a temperaturas más elevadas puede aumentar la acción desinfectante, consiguiendo duplicar la tasa de muerte la subida de 10°C para algunos desinfectantes. En cuanto a la temperatura ambiente también es un factor que influye en la supervivencia de los microorganismos debido a que afecta a las proteínas, enzimas vitales y al genoma de los microorganismos. En algunos casos las elevadas temperaturas pueden acelerar la evaporación de los productos químicos y también degradarlos [31].

En la actualidad se muestra una clara preocupación por obtener resultados fiables que pongan en el mercado productos desinfectantes con formulaciones óptimas, evitando concentraciones de sustancias activas mayores de las necesarias y reduciendo posibles efectos adversos al medio ambiente y a la salud humana. Por lo que respecto a la variabilidad de resultados cuando se ensaya un producto desinfectante, estudios científicos evidencian la existencia de variabilidad en los resultados obtenidos por diferentes laboratorios independientes [33].

En el estudio de la bibliografía [34] indica que la reproducibilidad de los resultados de eficacia desinfectante varía según la propia efectividad del agente antimicrobiano utilizado. Se observa una mayor reproducibilidad en agentes muy eficaces o ineficaces, mientras que los moderadamente eficaces muestran menor reproducibilidad entre laboratorios. Además, se encontró que los métodos de superficie seca son más reproducibles que los ensayos sobre biofilms. En otra investigación, [35], se evaluó la reproducibilidad de métodos estandarizados para evaluar la eficacia de desinfectantes contra bacterias como *P. aeruginosa* en superficies duras y no porosas. Se encontró buena repetibilidad dentro de cada laboratorio, pero baja reproducibilidad entre laboratorios. El tipo de sustrato de ensayo también afecta los resultados, con diferencias según las normas utilizadas, como mayor reducción de colonias en normas que emplean vidrio (ASTM E2197-02) como sustrato en comparación con discos de acero inoxidable (CEN EB 13697).

La concentración y los tiempos de exposición se muestran como factores importantes

para la desinfección, sobre todo en el caso de biopelículas. Se sabe que el rango de eficacia de un desinfectante es mayor en células aisladas, seguida de las células adheridas a la superficie y por último las biopelículas [36]. Y estos factores varían notablemente en función del tipo de desinfectante. Por ejemplo, toallitas de uso médico con hipoclorito sódico y peróxido de hidrógeno son menos afectadas por reducciones en tiempo y concentración, mientras que aquellas con amonio cuaternario ven disminuida su eficacia frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* al reducir la concentración y tiempo de contacto [37].

En los virus, los métodos que evalúan la eficacia virucida se ve alterada por el tiempo de exposición y el entorno. Por ejemplo, los virus con envoltura son más sensibles a desinfectantes que los que no tienen envoltura. Los virus con mayor sensibilidad frente a desinfectantes son los que presentan envoltura y un alto contenido en lípidos, como, por ejemplo, el coronavirus. Los virus presentes en suspensiones son más sencillos de eliminar que los presentes en superficies secas [38]. Además, la relación entre el tipo de suspensión viral y el volumen de desinfectante empleado en la realización de la norma afecta los resultados. Algunas normativas como ASTM E1053-97 y CEN/TC 216 tienen diferencias en estas ratios, siendo el de CEN/TC 216 más realista. También muestran que los métodos de evaluación en superficies son más representativos que los ensayos en suspensión [39].

La norma de evaluación virucida UNE EN 14476 establece una serie de variables como cepas de virus, tiempos de contacto y sustancias interferentes para garantizar condiciones reproducibles. Un estudio señala la revisión de algunos parámetros de la norma, como tiempos de contacto precisos y eliminación de cualquier citotoxicidad potencial antes de la inoculación para evitar confusiones en la evaluación de la actividad del producto. Además, destaca la importancia de considerar las condiciones en las que se realiza cada prueba, como si son en suspensión o en superficie, la presencia o no de sustancias interferentes y el criterio de evaluación virucida, para obtener resultados comparables y cercanos a las condiciones reales de aplicación [40]. Por lo que respecta al propio procedimiento de la norma, se detectan ciertos parámetros que se deben tener en cuenta para disminuir la variabilidad de resultados. Estos son la temperatura, la línea celular de los virus, así como la concentración de suero empleada, la confluencia celular y siempre comparar resultados de una misma placa.

En los ensayos realizados a los desinfectantes en el presente proyecto bajo la norma de ensayo UNE-EN 13697, se obtienen resultados con baja variabilidad, posiblemente, al haber estudiado los formulados con mayor concentración de biocida natural, 10% wt, que presentaron alta eficacia desinfectante, tal y como otros estudios también concluyeron [34]. Sí se observa variabilidad en los controles realizados para validar el ensayo con la bacteria *E. coli*, pudiendo ser el motivo de esta variabilidad, que la mezcla de agua estéril con el diluyente estuvo durante un tiempo algo más prolongado que el resto de las mezclas.

De forma generalizada, las normas de evaluación se destacan como herramientas para

mejorar la salud pública y se encuentran sujetas a una revisión continua.

Será por tanto de gran importancia definir qué agentes antimicrobianos funcionan mejor y en qué entornos concretos, transmitiendo al consumidor esta información y así ser empleados de forma óptima.

6. Resumen y conclusiones.

En primer lugar, se estudió la capacidad biocida de una serie de extractos concentrados obtenidos a partir de restos de jardinería y de poda agrícola procedente de la Comunitat Valenciana, y otros materiales adquiridos de origen inorgánico. Para la extracción de las sustancias activas presentes en la biomasa se empleó la técnica de extracción sólido-líquido Soxhlet, de fácil escalado, y disolventes de baja toxicidad. De estos extractos se evaluaron los halos de inhibición mediante ensayos de difusión en placas sembradas en profundidad frente a las especies *Aspergillus brasiliensis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El extracto referenciado como MA-F presentó una interesante capacidad inhibitoria frente a todas las especies ensayadas. La caracterización de los extractos naturales mediante cromatografía CG-MS identificaron la presencia de numerosos compuestos, principalmente acilos grasos, compuestos nitrogenados, monoterpenos, ésteres carbónicos e hidrocarburos saturados.

Posteriormente, se desarrollaron formulaciones de desinfectantes de uso doméstico a los que se incorporaron los compuestos naturales, bien adquiridos u obtenidos mediante extracciones sólido-líquido. Los desinfectantes se formularon con etanol, agua, agentes tensioactivos y los biocidas naturales, aditivados a diferentes proporciones, consiguiendo formulaciones estables empleando hasta un 10% de biocida.

Para el desarrollo del proyecto fue necesario el uso de la norma UNE-EN 13697 :2015+A1 de antisépticos y desinfectantes químicos, trabajando con las especies *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante esta norma se evaluó la capacidad desinfectante de las formulaciones aditivadas con un 10% de biocida natural. Se observó que la incorporación de los extractos naturales referenciados como MA-F, MA-H y SM-H, mejoraron el espectro de actividad antimicrobiano frente a un desinfectante de referencia, en condiciones limpias, a una temperatura de 24°C y tras 5 y 15 minutos de tiempo de contacto para bacterias y hongos, respectivamente.

Se concluye que los desechos de biomasa son una fuente de sustancias activas con potencial biocida, y una alternativa sostenible para la formulación de productos de desinfección para el hogar.

En cuanto a la eficacia de los desinfectantes, esta se ve influenciada por múltiples variables, siendo las más notorias, la concentración de la sustancia activa, los tiempos de exposición empleados, así como el tipo de microorganismo. La variabilidad de los

resultados puede verse influenciada por la efectividad del agente antimicrobiano y los métodos de evaluación utilizados. Es esencial considerar las condiciones de prueba, como la presencia de sustancias interferentes y el criterio de evaluación, para obtener resultados comparables con la realidad.

Bibliografía

- [1] L. González Bosoquet, «Antisépticos y desinfectantes,» *Offarm: farmacia y sociedad*, vol. 22, nº 3, pp. 64-70, 2003.
- [2] A. M. Elkhatat, «Recent trends of microbial decontamination for occupational, industrial and domestic applications,» *Bulletin of the National Research Centre*, vol. 46, nº 75, 2022.
- [3] «Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo,» [En línea]. Available: <https://www.insst.es/>. [Último acceso: 27 10 2023].
- [4] «European Chemicals Agency ECHA,» [En línea]. Available: <https://www.echa.europa.eu/es/web/guest/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>. [Último acceso: 16 11 2023].
- [5] «European Chemicals Agency ECHA,» [En línea]. Available: <https://echa.europa.eu/es/regulations/biocidal-products-regulation/authorisation-of-biocidal-products>. [Último acceso: 05 11 2023].
- [6] J. N. Rojas Sierra, A. F. Pérez Cordero, J. G. Martínez Avilez y J. U. Mieles Galindo, «Actividad antibacteriana de extracto de hojas de Melia azedarach,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIV, nº 1, pp. 224-232, 2012.
- [7] M. Garima, J. Sunil y S. Vikas, «Melia azedarach: a review,» *International Journal of Medicinal Chemistry & Analysis*, vol. 3, nº 2, 2013.
- [8] M. C. Carpinella, M. T. Defago, G. Valladares y S. M. Palacios, «Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from Melia azedarach (Meliaceae) with Potential Use for Pest,» *J Agric Food Chem*, vol. 51, nº 2, pp. 369-374, 2003.
- [9] F. Manzoor, M. Pervez, M. M. Adeyemi y S. A. Malik, «Effects of Three Plant Extracts on the Repellency, Toxicity and Tunneling of Subterranean Termite Heterotermes Indicola (Wasmann),» *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, vol. 1, nº 7.
- [10] F. Gomes, M. I. Dias, Á. Lima, L. Barros, M. E. Rodrigues y I. C. F. R. Ferreira, «Satureja montana L. and Origanum majorana L. Decoctions: Antimicrobial Activity, Mode of Action and Phenolic Characterization,» *Antibiotics*, vol. 9, nº 6, p. 294, 2020.
- [11] G. S. Četković, J. M. Čanadanović-Brunet, V. T. Tumbas, S. L. Markov y D. D. Cvetković, «Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of Satureja montana L. subsp. kitaibelii Extracts,» *Int J Mol Sci*, vol. 8, nº 10, pp. 1013-1027, 2007.
- [12] S. Č. Zeljković, E. Schadich, P. Džubák, M. Hajdúch y P. Tarkowski, «Antiviral Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils and Their Monoterpenes Against SARS-Cov-2,» *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, 2022.
- [13] A. B. Arfa, S. Combes, L. Preziosi-Belloy y N. Gonta, «Antimicrobial activity of

- carvacrol related to its chemical structure,» *Lett Appl Microbiol*, vol. 43, nº 2, pp. 149-154, 2006.
- [14] C. Niu, C. Wang, Y. Yang, H. Chen, Y. Zhuge, J. Li, M. Chu, C. Ren y C. Zhang , «Carvacrol Induces *Candida albicans* Apoptosis Associated With Ca²⁺/Calcineurin Pathway,» *Cell Infect Microbiol*, vol. 30, nº 10, p. 192, 2020.
- [15] D. García Rellán, Artist, *ECOLOGÍA QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ESPECIES PERENNES DE *Satureja L. EN LA PENÍNSULA IBÉRICA**. [Art]. Universitat Politècnica de València, 2013.
- [16] H. VURDU, O. E. ÖZKAN, G. ZENGİN, M. AKÇA, M. C. BALOĞLU, Ç. OLGUN, E. M. ALTUNER, S. ATEŞ y A. AKTÜMSEK, «DNA Protection, Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Activities of Heartwood and Sapwood Extracts from Juniper and Olive Woods,» *RSC Advances*, vol. 5, 2015.
- [17] O. Ghomari, F. Sounn, Y. Massaoudi, J. Ghanam, L. Batsoule, D. Kaitouni, M. Merzouki y M. Benlemlih, «Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity,» *Biotechnology Reports*, vol. 23, p. e00347, 2019.
- [18] Z. Nour, «Insecticidal effectiveness of certain bio-insecticides, inert dusts and modified atmospheres against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored wheat,» *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, vol. 48, nº 1, pp. 165-176, 2013.
- [19] A. A. Oun, A. Y. Bae, G. H. Shin, M. K. Park y J. T. Kim, «Comparative study of oregano essential oil encapsulated in halloysite nanotubes and diatomaceous earth as antimicrobial and antioxidant composites,» *Applied Clay Science*, vol. 224, 2022.
- [20] R. A. Uzel, «Effect of extraction method and extraction solvent on recovery of phenolic compounds from olive leaves in Kemalpaşa-Izmir (Turkey): Oleuropein recovery as a case example.,» *Separation Science and Technology*, nº 53, pp. 1-9, 2018.
- [21] K. Stamatopoulos, E. Katsoyannos, A. Chatzilazarou y S. J. Konteles, «Improvement of oleuropein extractability by optimising steam blanching process as pre-treatment of olive leaf extraction via response surface methodology,» *Food Chemistry*, vol. 133, pp. 344-351, 2012.
- [22] M. Irakli, P. Chatzopoulou y L. Ekat, «Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities,» *Industrial Crops and Products*, vol. 124, pp. 382-388, 2018.
- [23] M. Boulaaba, M. Snoussi, M. Saada, K. Mkadmini, A. Smaoui, C. Abdelly y R. Ksouri, «Antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Tamarix gallica* extracts.,» *Industrial crops and products*, vol. 76, pp. 1114-1122, 2015.
- [24] R. Ksouri, H. Falleh, W. Megdiche, N. Trabelsi, B. Mhamdi, K. Chaieb, A. Bakrouf, C.

- Magné y C. Abdelly, «Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, pp. 2083-2091, 2009.
- [25] M. Pateiro, J. A. Gomez-Salazar, M. Jaime-Patlán, M. E. Sosa-Morales y J. M. Lorenzo, «Plant Extracts Obtained with Green Solvents as Natural Antioxidants in Fresh Meat Products,» *Antioxidants*, vol. 10, nº 2, p. 181, 2021.
- [26] F. Chemat, M. A. Vian, H. K. Ravi, B. Khadhraoui, S. Hilali, S. Perino y A. S. Fabiano Tixier, «Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects,» *Molecules*, vol. 24, nº 16, p. 3007, 2019.
- [27] D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. MaElroy, S. Abou-Shehada y P. J. Dunn, «CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents,» *Royal Society of Chemistry*, vol. 18, nº 288, 2016.
- [28] S. S. Death y L. Weiss, «Essential oils based cleaning and disinfecting compositions». United States Patente US-7465697-B1, 16 12 2008.
- [29] F. W. Kemp, «Soap and detergent cleaning compositions containing eucalyptus oil». United States Patente US4251383A, 17 2 1981.
- [30] A. R. Chowdary, I. J. Padmaja, S. K. Addepalli y P. Vijayalakshmi, «Comparative evaluation of antimicrobial activity of newer herbal disinfectant formulations on hospital microbial flora,» *International Journal of Health Sciences*, vol. 6, nº 58, pp. 1908-1920, 2022.
- [31] A. Kramer, I. Schwebke y G. Kampf, «How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review,» *BMC Infectious Diseases*, vol. 6, nº 130, 2006.
- [32] A. Artasensi, S. Mazzotta y L. Fumagalli, «Back to Basics: Choosing the Appropriate Surface Disinfectant,» *Antibiotics*, vol. 10, nº 613, 2021.
- [33] A. Parker, M. Hamilton y D. Goeres, «Reproducibility of antimicrobial test methods,» *Scientific reports*, vol. 8, 2018.
- [34] J. Hilgren, M. Srikanth, M. Brutofsky, K. W. Mainquist, P. Prew, W. King, R. D. Jones, L. A. Hellickson, J. Luedtke, K. Restrepo, F. H. Brill y P. Quinn, «Reproducibility problem with a proposed standard method to measure disinfection efficacy,» *Environmental Science*, 2022.
- [35] A. Kim, Y. Kim y S. Ha, «Comparison Study on Efficacies of Disinfectants and Sanitizers Among Methods for Quantitative Surface Test,» *Environmental Science*, 2010.
- [36] H. Kim, J. Ryu y L. R. Beuchat, «Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, Dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm,» *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, pp. 1256-1265, 2007.
- [37] Y. Hong, P. Teska y O. Oliver, «Effects of contact time and concentration on bactericidal efficacy of 3 disinfectants on hard nonporous surfaces,» *American*

Journal of Infection Control, vol. 45, pp. 1284-1285, 2017.

- [38] P. Tarka y A. Nitsch-Osuch, «Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants According to European Union Standards,» *Viruses*, vol. 13, nº 4, p. 534, 2021.
- [39] G. Morace, K. Bellamy, P. Maris y J. Steinmann, «Evaluation of the Virucidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics: The European Point of View,» *Infection control and hospital epidemiology*, vol. 30, nº 3, 2009.
- [40] C. Geller, S. Fontanay y C. Finance, «A new Sephadex™-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model,» *Journal of Virological Methods*, vol. 159, nº 2, 2009.

AIDIMME

INSTITUTO TECNOLÓGICO

Domicilio fiscal —

C/ Benjamín Franklin 13. (Parque Tecnológico)
46980 Paterna. Valencia (España)
Tlf. 961 366 070 | Fax 961 366 185

Domicilio social —

Leonardo Da Vinci, 38 (Parque Tecnológico)
46980 Paterna. Valencia (España)
Tlf. 961 318 559 - Fax 960 915 446

aidimme@aidimme.es

www.aidimme.es