

ENTREGABLE PROYECTOS— 2024-2025

**DESARROLLO DE SUPERFICIES ACTIVAS FRENTE A
MICROORGANISMOS PATÓGENOS NOSOCOMIALES MEDIANTE
BIOCIDAS SINÉRGICOS “SYNERGY”**

Entregable: 2.2. Informe publicable de resultados.

Programa: Proyectos de I+D en colaboración con empresas

Número de proyecto: 22400047

Expediente: IMDEEA/2024/70

Duración: Del 01/06/2024 al 30/09/2025

Coordinado en AIDIMME por: IBIZA PALACIOS, DRA. MARIA DE SALES

ÍNDICE

1.	<u>SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS BIOCIDAS NATURALES Y BIOCIDAS INORGÁNICOS.</u>	<u>4</u>
1.1.	<u>SELECCIÓN DE LOS EXTRACTOS NATURALES</u>	<u>4</u>
1.2.	<u>SELECCIÓN DE BIOCIDAS INORGÁNICOS</u>	<u>11</u>
1.3.	<u>PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS NATURALES</u>	<u>12</u>
2.	<u>SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS NOSOCOMIALES.....</u>	<u>19</u>
3.	<u>ENCAPSULACIÓN DE BIOCIDAS DE ORIGEN NATURAL.</u>	<u>20</u>
4.	<u>BÚSQUEDA DE SINERGIAS Y FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTOS</u>	<u>23</u>
4.1.	<u>MATERIAL</u>	<u>23</u>
A.	COMPUESTOS PARA FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTOS	23
B.	COMPUESTOS CON PROPIEDADES BIOCIDAS EMPLEADOS PARA ESTUDIO DE PROPIEDADES SINÉRGICAS	25
4.2.	<u>EQUIPOS Y MÉTODOS.....</u>	<u>25</u>
4.3.	<u>DESARROLLO EXPERIMENTAL</u>	<u>29</u>
A.	PRUEBAS PREVIAS DE COMPATIBILIDAD	29
B.	FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTO EN CAPA LIGERO CONTROL.	29
C.	FORMULACIÓN DE RECUBRIMIENTO EN CAPA LIGERO ACTIVO FRENTE A MICROORGANISMOS NOSOCOMIALES.	37
5.	<u>APLICACIÓN Y OPTIMIZACIÓN SOBRE SUPERFICIES METÁLICAS Y LIGNOCELULÓSICAS</u>	<u>41</u>
6.	<u>CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS APLICACIONES DESARROLLADAS</u>	<u>49</u>
7.	<u>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE BIOCIDAS SELECCIONADOS.</u>	<u>61</u>
7.1.	<u>PREPARACIÓN DEL ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA BIOCIDA (MIC Y MBC).....</u>	<u>64</u>
7.2.	<u>ENSAYOS SINERGIAS</u>	<u>66</u>
8.	<u>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE BIOCIDAS SELECCIONADOS.</u>	<u>67</u>
	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>69</u>

INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS DEL PROYECTO

En la actualidad, las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) constituyen una de las problemáticas más significativas a nivel global en el ámbito de la salud pública. Estas infecciones, que se manifiestan generalmente tras un periodo superior a 72 horas desde el ingreso del paciente en un centro hospitalario, presentan una alta incidencia en las unidades de cuidados intensivos (UCIs), donde los pacientes son especialmente vulnerables. Las IRAS son causadas por más de 40 especies de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus, cuya proliferación se ve agravada por la creciente resistencia a múltiples antibióticos, lo que limita las opciones terapéuticas disponibles. Esta situación genera un impacto negativo directo sobre la mortalidad hospitalaria y conlleva un significativo aumento de los costes sanitarios asociados.

Uno de los principales focos de transmisión de estos microorganismos son los fómites, es decir, las superficies y objetos presentes en el entorno hospitalario que pueden actuar como vectores pasivos. Ejemplos comunes incluyen manillas, barandillas, carritos, ventanas y paredes, los cuales poseen una elevada capacidad de albergar y transferir patógenos entre individuos, ya sea personal sanitario o pacientes.

En respuesta a esta problemática, resulta imperativo desarrollar recubrimientos antimicrobianos innovadores y eficientes que permitan reducir la carga microbiana en dichas superficies.

El objetivo general del proyecto radica en el desarrollo de superficies con propiedades antimicrobianas frente a microorganismos patógenos nosocomiales, responsables de lo que denominamos infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS), mediante biocidas sinérgicos, para su uso en entornos hospitalarios. Los microorganismos patógenos nosocomiales causantes de este tipo de infecciones pueden ser virus, bacterias u hongos.

El proyecto se enfocará en el desarrollo de fórmulas de base acuosa polimérica que puedan aplicarse y reaplicarse de forma fácil e in situ sobre superficies ya terminadas y en uso, con el fin de proporcionar protección y mantenimiento contra la propagación de microorganismos patógenos. Estas fórmulas serán especialmente diseñadas para su aplicación en fómites del mobiliario clínico, tanto soportes metálicos como lignocelulósicos.

Para abordar esta problemática, se emplearán biocidas naturales procedentes de extractos de plantas de la Comunitat Valenciana en sinergia con biocidas sintéticos de tipología inorgánica basada en cationes Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Bi^{2+} , entre otros, de forma individual o combinada. Esto permitirá desarrollar nuevos recubrimientos biocidas más

sostenibles, con una eficaz acción frente a microorganismos patógenos nosocomiales, contribuyendo así a la prevención y control de las IRAS en entornos sanitarios.

Los objetivos específicos son:

Selección de especies herbáceas o leñosas de la Comunidad Valenciana con mayor capacidad biocida, bien estudiados en proyectos anteriores como [CARTONSAFE](#), [AGROFOREF](#), [FORESPINT](#) y [COMPMIC](#), o bien nuevas especies biomásicas de interés, así como la obtención de los extractos concentrados de las sustancias activas biocidas mediante procesos de extracción sólido-liquido. Búsqueda y selección de biocidas sintéticos del mercado con estas mismas propiedades.

Encapsulación de los principios activos de origen natural mediante técnicas de coacervación compleja, entre otras, para estabilizarlos en el interior de la matriz polimérica y controlar su liberación prolongada en el tiempo.

Estudio y selección de microorganismos nosocomiales (mayoritariamente bacterias) que se caractericen por ser un Grupo de Riesgo 2 para poder ser evaluados en el laboratorio de Microbiología.

Desarrollo de formulaciones de recubrimientos poliméricos acuosos a partir de las mezclas de los biocidas naturales y sintéticos seleccionados, con el fin de encontrar actividades sinérgicas entre sus perfiles antimicrobianos.

Aplicación de las formulaciones desarrolladas en superficies ya acabadas, metálicas y lignocelulósicas, procedentes de mobiliario clínico utilizado en UCIs, y su caracterización físico-química del recubrimiento aplicado.

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los biocidas seleccionados frente a los microorganismos nosocomiales, así como la determinación del perfil antimicrobiano de los nuevos recubrimientos formulados con las mezclas sinérgicas entre biocidas inorgánicos sintéticos y naturales.

Difusión de forma efectiva el proyecto y sus resultados.

Transferencia y promoción de los resultados a empresas de la Comunitat Valenciana, escogiendo los canales más adecuados para que la transferencia tenga el mayor impacto posible.

1. Selección y preparación de los biocidas naturales y biocidas inorgánicos.

1.1. Selección de los extractos naturales

Se valoraron y seleccionaron aquellos extractos naturales que resultados prometedores frente a bacterias principalmente en proyectos anteriores (FUNGISTOP, AGROFOREF, FORESPINT o COMPIC).

Extractos naturales obtenidos en AIDIMME a partir de residuos biomásicos empleando técnicas de extracción sólido-líquido con etanol de grado analítico como disolvente en equipo automatizado Soxtec 8000 y posteriormente concentrados en rotavapor a vacío. Se seleccionaron aquellos extractos que presentaron una mayor inhibición de las bacterias y hongos estudiados. A continuación, se muestran las caracterizaciones tanto químicas como microbiológicas de los extractos seleccionados que se obtuvieron en los proyectos citados.

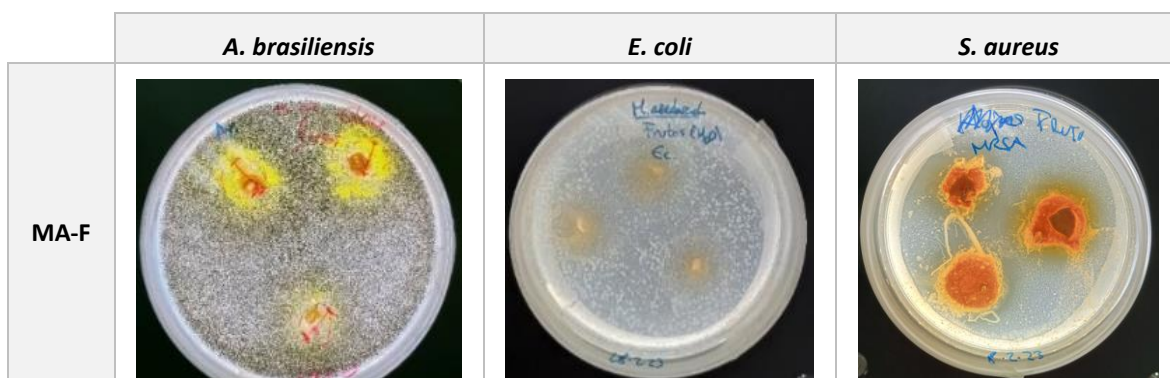
- Especie: **MA-F**. Se estudió en el proyecto COMPMIC. En ensayos de pocillo en siembra se observaron halos de inhibición frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y frente al hongo *A. brasiliensis*.

El extracto se analizó mediante técnica de pocillo en siembra determinando las medidas de los halos de inhibición.

Tabla 1. Medidas de los halos de inhibición (cm) de MA-F. C+: control positivo.

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

Tabla 2. Resultado visual del ensayo de halos de inhibición del extracto de MA-F frente a *A. brasiliensis*, *E. coli* y *S. aureus*.



El extracto se analizó mediante cromatografía de gases masas modelo Intuvo 9000GC-7000D GC/TQ.

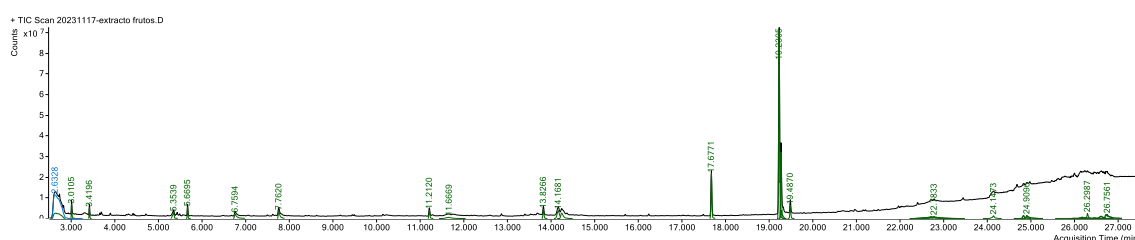


Figura 1. Cromatograma de extracto de MA-F.

Tabla 3. Compuestos identificados mediante CG-MS en el extracto de MA-F.

RT	Compuesto	%	CAS	Área	% Área
3,01	Butane, 1,2:3,4-diepoxy-, (+/-)-	95	298-18-0	7479446	2,20
3,42	Ethyl formate	71	109-94-4	5081017	1,50
5,35	Hexanoic acid	96	142-62-1	7506943	2,21
5,67	Hexanoic acid, ethyl ester	90	123-66-0	6151684	1,81
6,76	Thymine	87	65-71-4	8978562	2,64
7,76	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	89	28564-83-2	9817124	2,89
11,21	Benzene, 1-chloro-2-methoxy-	66	766-51-8	6852033	2,02
13,83	5-Ethyl-1,3-dioxane-5-methanol, tert-butylidimethylsilyl ether	70	1000364-41-8	7504645	2,21
14,17	Fructose	65	57-48-7	13906526	4,10
14,25	Fructose	66	57-48-7	10940810	3,22
17,68	Hexadecanoic acid, ethyl ester	87	628-97-7	33239309	9,79

RT	Compuesto	%	CAS	Área	% Área
19,23	Linoleic acid ethyl ester	93	544-35-4	151112968	44,50
19,27	Ethyl Oleate	90	111-62-6	54936078	16,18
19,28	Bitolylene diisocyanate	61	91-97-4	6269811	1,85
19,49	Octadecanoic acid, ethyl ester	84	111-61-5	9814403	2,89

Las sustancias identificadas mediante esta técnica que están presente de forma mayoritaria se clasifican como acilos grasos y fueron en primer lugar, el éster etílico del ácido linoleico ($C_{20}H_{36}O_2$) en el tiempo de retención 19,23 min con un área total del 44,50 % respecto del total de picos identificados. En segundo lugar, la sustancia oleato de etilo ($C_{20}H_{38}O_2$) en el tiempo de retención 19,27 min con un área del 16,18% respecto del total de los picos identificados. Y en tercer lugar, éster etílico del ácido hexadecanoico ($C_{18}H_{36}O_2$) identificado en el tiempo de retención 17,68 min y presenta un área del 9,79% respecto del total de los picos identificados.

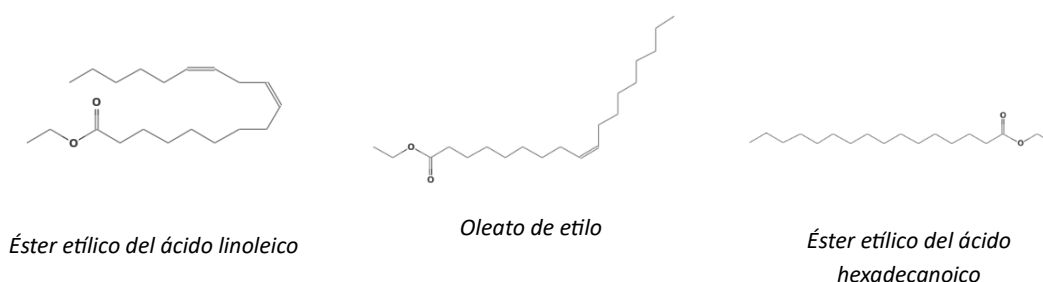


Figura 2. Estructuras químicas de las sustancias mayoritarias en el extracto MA-F.

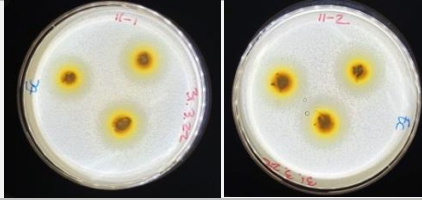
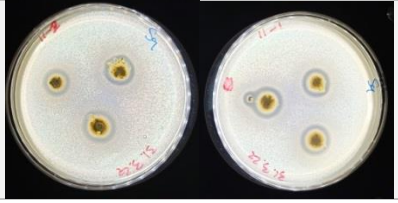
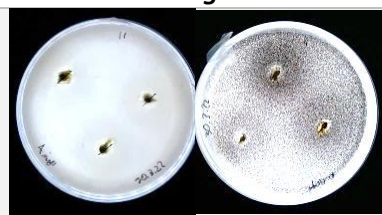
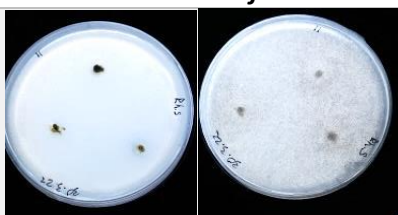
- Especie: **T**. Se estudió en el proyecto AGROFOREF. En ensayos de pocillo en siembra se observaron halos de inhibición frente a las bacterias *E. coli* y *S. aureus* principalmente.

El extracto se analizó mediante técnica de pocillo en siembra determinando las medidas de los halos de inhibición.

Tabla 4. Resultados microbiológicos de la muestra T mediante la técnica de difusión en pocillos.

Muestra (halo cm)	HONGOS				BACTERIAS	
	A. niger 48 h	A. niger 120 h	Rh. s. 48 h	Rh. s. 120 h	S. aureus	E. coli
(T)	0,8	-	0,5	-	1,6	2,2

Tabla 5. Medidas de los halos de inhibición (cm) de restos de madera de T. C+: control positivo.

24 h	E. coli		S. aureus	
T				
120 h	A. niger		Rh. stolonifer	
T				

De la caracterización mediante la técnica CG-MS se identificó lo siguiente:

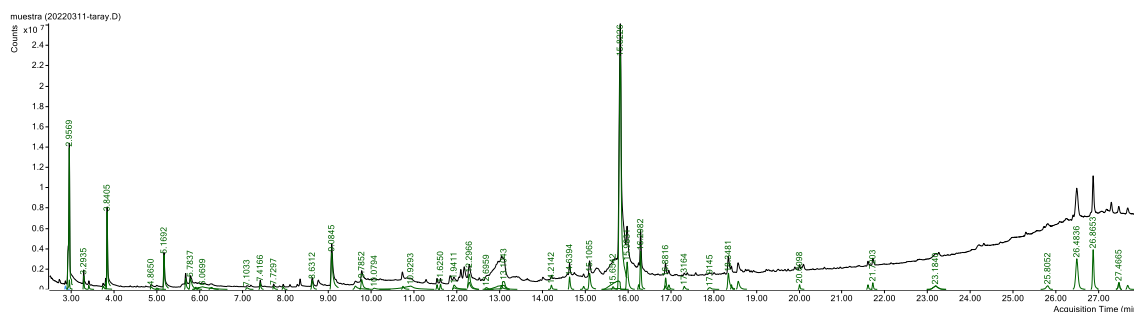


Figura 3. Cromatograma de extracto de madera de T.

Tabla 6. Compuestos identificados mediante CG-MS en el extracto de madera de T.

RT	Compuesto	%	CAS	Área	% Área
2,86	Butane, 1,2:3,4-diepoxy-, (.+/-.)-	95	298-18-0	511073	0,17
2,96	Propane, 2,2-diethoxy-	98	126-84-1	26224538	8,66
2,96	1,2-Propanediol, 3-benzyloxy-1,2-diacetyl-	74	13754-10-4	1598158	0,53
3,29	3-Penten-2-one, 4-methyl-	97	141-79-7	1664201	0,55
3,41	Nanofin	77	504-03-0	601100	0,20
3,75	Furfural	99	98-01-1	1102245	0,36
3,81	3-Hexen-2-one	98	763-93-9	949462	0,31
3,84	2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	98	123-42-2	11720812	3,87
4,86	2-Heptanol, acetate	76	5921-82-4	782186	0,26
5,00	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-	75	10493-98-8	508844	0,17
5,17	1,3-Dioxolane-4-methanol, 2,2-dimethyl-	99	100-79-8	6827993	2,26
5,67	1,3-Dioxane, 2,2-dimethyl-5-hydroxy-	93	1000381-75-6	2138425	0,71
5,78	1-[(Trimethylsilyl)oxy]propan-2-ol	78	1000333-03-7	3964736	1,31
5,91	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	72	556-67-2	773226	0,26
6,07	Monoethanolamine	95	141-43-5	4625237	1,53
6,29	Diethyl sulfate	76	64-67-5	863873	0,29
7,10	2(3H)-Furanone, 5-ethoxydihydro-	70	932-85-4	538828	0,18
7,42	Hexane, 1,1-diethoxy-	96	3658-93-3	1121933	0,37
7,73	2-Carbethoxy-N-methylpyrrolidine	95	30727-23-2	584335	0,19
7,95	.alpha.-Pyrrolidinobuthiophenone	76	1000457-51-6	500521	0,17
8,63	2,2,6,6-Tetramethyltetrahydro-1,3,5,7-tetraoxaazulene	75	1000191-49-8	2224823	0,73
9,08	Succinic acid, di(2-fluoroethyl) ester	72	1000390-88-6	12218808	4,04
9,64	5-Hydroxymethylfurfural	70	67-47-0	2047552	0,68
9,79	1,3-Dioxolane-4,5-dimethanol, 2,2-dimethyl-, (4R-trans)-	86	73346-74-4	3402539	1,12
10,08	1,2-Benzenediol, 3-methoxy-	93	934-00-9	676522	0,22
10,75	2-Methoxy-4-vinylphenol	90	7786-61-0	913416	0,30
10,93	1,2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)]-	85	2319-57-5	6906123	2,28
11,54	Nonane, 1,1-diethoxy-	88	54815-13-3	730646	0,24
11,63	1,3-Dioxolane-4-methanol, 2,2-dimethyl-, acetate	73	14739-11-8	889317	0,29
11,94	Vanillin	90	121-33-5	2315989	0,76
11,94	Phosphoric acid, 2-chloroethenyl dimethyl ester	71	17027-41-7	808925	0,27

RT	Compuesto	%	CAS	Área	% Área
12,30	2-Acetoxyisobutyryl chloride	73	40635-66-3	3105880	1,03
12,30	1,3-Dioxolane-4-methanol, 2,2-dimethyl-, acetate	71	14739-11-8	6613123	2,18
12,70	Acetamide, 2,2'-thiobis-	70	14618-65-6	742249	0,25
13,05	Ethanone, 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-	88	6100-74-9	1291562	0,43
13,08	1-Butanamine	81	109-73-9	5723269	1,89
13,10	3-Pentanone	87	96-22-0	4547154	1,50
14,21	1H-Benzocyclohepten-7-ol, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-1,1,4a,7-tetramethyl-, cis-	79	6892-80-4	878791	0,29
14,64	D-Mannitol, 1,2:5,6-bis-O-(1-methylethylidene)-	83	1707-77-3	2524857	0,83
14,97	3,4-Dihydroxyphenylglycol, 4TMS derivative	71	56114-62-6	654761	0,22
15,11	Benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-	86	134-96-3	4888748	1,61
15,65	3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzyl alcohol	81	530-56-3	763158	0,25
15,78	Ethanol, 2-(1-methylethoxy)-, acetate	79	19234-20-9	11050452	3,65
15,79	Leu-Leu, N,N'-dimethyl-N-methoxycarbonyl-, methyl ester	71	1000454-83-8	1072359	0,35
15,82	3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzeneethanol	84	20824-45-7	91120942	30,10
15,98	(E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol	93	32811-40-8	8078395	2,67
16,25	Ethanol, 2-[4-vinyl-2-methoxy-6-methyl]phenoxy-	72	1000132-26-4	920494	0,30
16,30	Benzoic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-, hydrazide	95	1443-76-1	7515919	2,48
16,87	Neophytadiene	88	504-96-1	711513	0,24
16,88	1-Propanone, 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-	89	5650-43-1	2433935	0,80
16,96	.beta.-Hydroxypropiosyringone	75	136196-47-9	1101340	0,36
17,32	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, acetate, [R-[R*,R*-(E)]]-	78	10236-16-5	722110	0,24
17,91	Danielone	75	90426-22-5	778107	0,26
18,35	Benzeneacetic acid, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-, methyl ester	94	151292-83-0	5371153	1,77
18,42	Hexadecanoic acid, ethyl ester	93	628-97-7	734666	0,24
18,58	trans-Sinapyl alcohol	90	20675-96-1	2961629	0,98

RT	Compuesto	%	CAS	Área	% Área
20,01	Linoleic acid ethyl ester	90	544-35-4	880677	0,29
21,61	2,10-Phenanthrenediol, 4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydro-4b,8,8-trimethyl-1-(1-methylethyl)-, [4bS-(4b.alpha.,8a.beta.,10.beta.)]-	75	6811-52-5	851950	0,28
21,72	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	90	96168-15-9	1189800	0,39
23,18	Eicosane	90	112-95-8	2551812	0,84
23,18	Heneicosane	90	629-94-7	2526464	0,83
25,81	2(1H)-Naphthalenone, 7-ethynyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-1,4a-dimethyl-, (1.alpha.,4a.beta.,7.beta.,8a.alpha.)-	79	55220-87-6	1669788	0,55
26,48	.gamma.-Sitostenone	83	84924-96-9	12137404	4,01
26,87	4H-1,3,2-Dioxaborin, 6-ethenyl-2-ethyl-4-methyl-4-(2-methylpropyl)-	70	74630-05-0	9471172	3,13
27,47	Stigmasta-3,5-diene	84	4970-37-0	1624822	0,54
27,47	.beta.-Sitosterol acetate	83	915-05-9	1684537	0,56
27,67	1,6-Dimethyl-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyrimidine	77	26955-13-5	1130538	0,37

En el tiempo de retención 15,82 minutos se identifica 3,5-dimetoxi-4-hidroxibencenoetanol ($C_{10}H_{14}O_4$) clasificado como sustancia fenólica. Esta sustancia presenta gran similitud con el denominado alcohol sinaléptico ($C_9H_{12}O_4$) que proviene de la unidad monolignol siringilo (uno de los tres monómeros básicos que forman la lignina), al que tiene unido un grupo éter metílico. La estructura química identificada en el extracto en gran cantidad, corresponde a parte de esa estructura polimérica de la lignina que, durante el proceso de extracción con etanol, se ha roto, y posteriormente se ha unido un grupo OH a un grupo metilo.

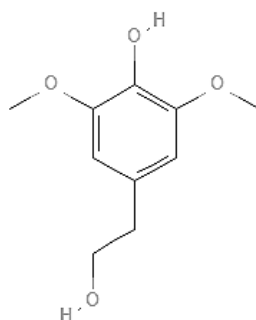


Figura 4. Estructura química 3,5-dimetoxi-4-hidroxibencenoetanol.

Más adelante, en el apartado de Encapsulación de biocidas se recogen tanto los biocidas anteriores seleccionados y obtenidos en AIDIMME mediante procesos de extracción sólido-líquido detallados más adelante, como otros de nueva adquisición.

1.2. Selección de biocidas inorgánicos

Se estudió la adquisición de biocidas inorgánicos sintéticos del mercado, empleados habitualmente en recubrimientos poliméricos. Se seleccionaron aquellos que están más extendidos en el mercado, como son los basados en iones plata y zinc.

- B. Es una solución comercial para incorporar a matrices poliméricas. Está basado en arcilla funcionalizadas con plata iónica. Una ventaja clave de su tecnología es que la plata está anclada a la arcilla, lo que permite su liberación controlada, así como una protección más duradera. Además, el ion plata es un amplio espectro y tiene eficacia frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, hongos y virus [1] [2]. Fue proporcionado por la empresa Laurentia Technologies.
- Z. Este compuesto, aunque menos común que la plata iónica, también se emplea para aportar propiedades antimicrobianas a recubrimientos poliméricos. En este caso es la liberación del ion elemento Zn^{2+} el que interfiere con los procesos metabólicos de los microorganismos. Es eficaz frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y particularmente frente a microorganismos patógenos [3]. Fue proporcionado por la empresa Laurentia Technologies.
- A. Su tecnología está basada en iones Ag^+ . Está formulado especialmente para su incorporación en sistemas poliméricos acuosos. No se encontraron artículos científicos que evidencian la incorporación de este producto comercial con actividades antimicrobianas en recubrimientos poliméricos, pero sí en otros materiales como la lana. Fue proporcionado por la empresa Laurentia Technologies SLL.

1.3. Preparación de los extractos naturales

En este apartado se llevaron a cabo las extracciones sólido-líquido mediante la técnica de extracción Soxhlet, para la obtención de los biocidas ya estudiados previamente y seleccionados. Además, se definieron nuevos procesos de obtención empleando otros vehículos orgánicos de las mismas especies con la finalidad de aislar componentes de distinta polaridad.

Pretratamiento de la biomasa

A la biomasa recolectada se le reduce el contenido de humedad en la muestra, y, posteriormente es triturada, Figura 5. 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 5. 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 6. Equipo de extracción Soxtec TM CU 8000 y baño de refrigeración.

Para la extracción en el equipo Soxtec se empleó etanol 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.



Figura 7. Preparación de biomasa de MA-F en dedal de celulosa y matraces con disolvente de extracción.

Colocados todos los elementos y programado el proceso, se encendió el baño de refrigeración y se inició 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 8, con bomba de vacío, para evaporar el disolvente y obtener finalmente un extracto concentrado de sustancias bioactivas.



Figura 8. Equipo rotavapor con bomba de vacío.

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

- MA-F.
- T.



Figura 9. Biomasa de MA-F (izquierda) y T (derecha).

Proceso de extracción de MA

El extracto biocida concentrado de **MA-F**, se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Se partió de la materia vegetal deshidratada y triturada, Figura 10, y se prepararon dos dedales de celulosa con la biomasa en su interior, Figura 11.



Figura 10. MA-F triturada.



Figura 11. Preparación de biomasa MA-F en dedal de celulosa.

El proceso de extracción del extracto biocida MA-F en el equipo Soxtec se observa en la Figura 12, del cual se obtuvieron tres fracciones de sustancias hidrofílicas junto con etanol que presenta un color marrón anaranjado característico de este material vegetal. Estas fracciones se unificaron, y se concentraron en el rotavapor a vacío, Figura 13.



Colocación de los cartuchos



Colocación de los matraces de extracción



Etapa de condensado

Figura 12. Proceso de extracción de MA-F.

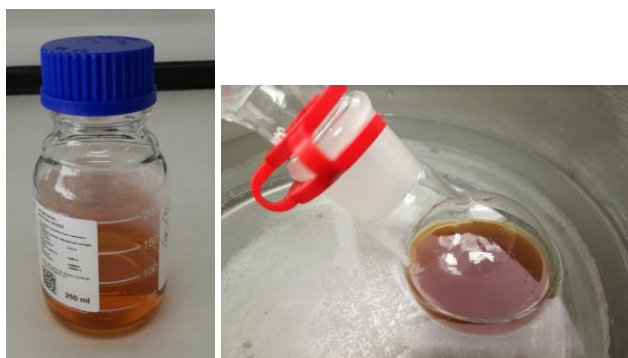


Figura 13. Extracto MA-F sin concentrar (izquierda) y balón de destilación con extracto durante el proceso de concentración (derecha).

Tras finalizar el proceso de concentración se obtuvo el extracto concentrado de sustancias bioactivas MA-F.

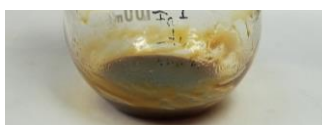


Figura 14. Extracto MA-F concentrado.

En la siguiente tabla se recogen los extractos obtenidos mediante la extracción sólido-líquido y etanol como vehículo:

Tabla 7 T y MA extraídos con etanol.

T	Extracto etanólico de madera de T.	
MA	Extracto etanólico de MA-F	

Asimismo, se extrajeron compuestos de _MA-F y de T. con un vehículo orgánico como disolvente de extra como es el aceite de girasol como disolvente de extracción. Se extraerán otro abanico de compuestos extractivos, en este caso con una menor polaridad.

Siguiendo procedimientos descritos en otros estudios científicos [5], se empleó como método de extracción la maceración junto con ultrasonidos. Posteriormente, se separó la biomasa del extractivo mediante filtración a vacío. El mismo procedimiento se empleó para la biomasa de MA-F.

En la Figura 15 y Figura 16 se muestran imágenes del proceso de extracción y los extractos en base aceite de girasol finalmente obtenidos.

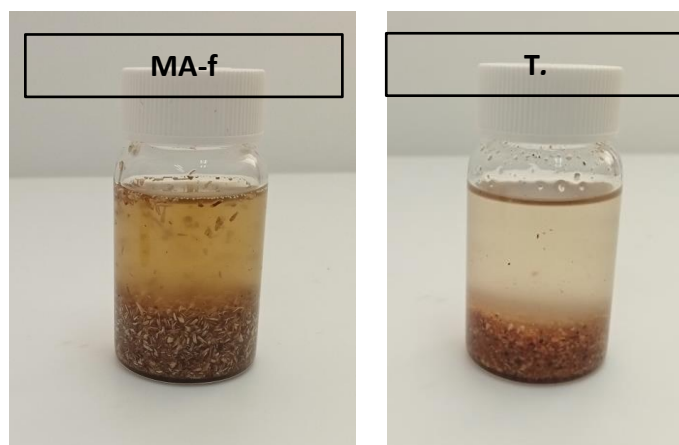
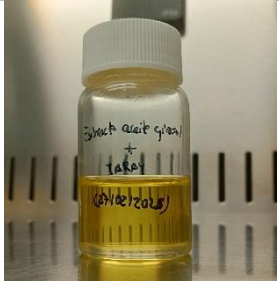
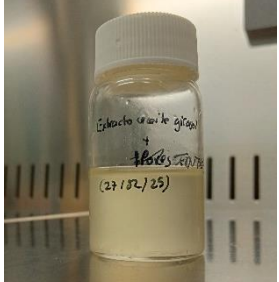


Figura 15. Extractivos no polares antes de proceso de filtración.



Figura 16. Proceso de filtrado de extractivos de T y MA en aceite de girasol.

Tabla 8 T y MA extraídos con aceite de girasol.

T	Extracto aceite de girasol + T	
MA	Extracto aceite de girasol + MA-F	

El aceite esencial de SM fue adquirido por la empresa Esencias Martinez Lozano S.A. y todos los biocidas restantes por Laurentia Technologies, S.L.L.

2. Selección de microorganismos nosocomiales.

La resistencia a los compuestos antimicrobianos constituye una amenaza crítica para la salud pública global, comprometiendo la eficacia terapéutica de los antibióticos y dificultando el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. En 2019, se estimaron 1,27 millones de muertes atribuibles directamente a bacterias resistentes a los antibióticos, y aproximadamente 5 millones de muertes adicionales asociadas, lo que evidencia la alta carga de enfermedad generada por estos patógenos. Por ejemplo, la resistencia a compuestos antimicrobianos representa una barrera para el control de la tuberculosis, especialmente en su forma multirresistente.

En respuesta a esta amenaza, la OMS desarrolló en 2017 la primera Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios (BPPL) para guiar la priorización de inversiones en investigación y desarrollo (I+D) de nuevos agentes antibacterianos. Desde entonces, la BPPL ha servido como herramienta clave para priorizar la innovación terapéutica y las estrategias de control.

Durante los últimos años, el desarrollo de antibióticos ha producido nueve nuevos agentes activos contra patógenos críticos del BPPL 2017. Sin embargo, ya se han detectado cepas resistentes a casi todos ellos. De aquí surge la BPPL en 2024 [6].

Con todo esto, inicialmente en el proyecto SYNERGY, se realizó, mediante búsqueda bibliográfica, y especialmente basándonos en esta última lista BPPL, una selección de microorganismos nosocomiales objetivo para ensayar los biocidas que se querían incorporar en los recubrimientos. Dentro de esta lista se categorizan las prioridades como, crítica, alta y media para su estudio en investigación y desarrollo, y para la implementación de medidas de salud pública. Además, la mayor parte de las especies bacterianas que se seleccionaron pertenecen al grupo ESKAPE, en el cual se encuentran especies causantes de infecciones nosocomiales que hacen peligrar la vida de individuos con inmunodeficiencia y que poseen mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos [7]. Las especies bacterianas seleccionadas son *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Todas estas especies mencionadas pertenecen, además, al grupo de riesgo microbiológico 2, de entre los 4 grupos de riesgo. La descripción de cada especie se muestra a continuación:

- ***Enterococcus faecium*** es una cepa 70/90 aislada de heces humanas, multirresistente a diversos antibióticos entre los cuales se encuentra la Vancomicina [8]. Es una especie categorizada con prioridad alta en la BPPL 2024.

- ***Acinetobacter baumannii***. Especie resistente entre otros antibióticos a los de tipo carbapenémicos aislada de piel humana. Esta bacteria se encuentra en la categoría de prioridad alta en la lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS.
 - ***Klebsiella pneumoniae***. Especie resistente entre otros antibióticos a los de tipo carbapenémicos. Especies categorizadas con prioridad crítica en la lista de la BPPL 2024.
 - ***Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA)**. Especie categorizada con prioridad alta en la lista de la OMS de 2024. Esta especie tiene diversas resistencias a antibióticos, aunque no estén en la lista de especies de patógenos bacterianos prioritarios de la BPPL 2024, también suponen un problema de salud.
 - ***Pseudomonas aeruginosa***. Inicialmente aislada de una infección de oído, es resistente a múltiples antibióticos, entre los cuales se encuentran la clindamicina y la vancomicina.
- También se seleccionó una especie de levadura presente en la lista de patógenos fúngicos prioritarios de la OMS de 2022.
- ***Candida auris***. Muestra de oído. Japón. Multirresistente. Presente en la lista de patógenos fúngicos prioritarios de la OMS de 2022 con prioridad Crítica.

3. Encapsulación de biocidas de origen natural.

En este apartado se llevó a cabo el proceso de estabilización de los biocidas naturales obtenidos en el presente entregable, con la finalidad de garantizar su adecuada incorporación en la matriz polimérica, así como una liberación controlada.

Se enviaron los extractos de *MA* y *T* y el aceite esencial de *SM* para encapsular mediante diferentes técnicas a la empresa Laurentia Technologies SLL.

Los espectros de infrarrojos empleando un FTIR Perkin Elmer de los extractos obtenidos en AIDIMME se recogen en a continuación:

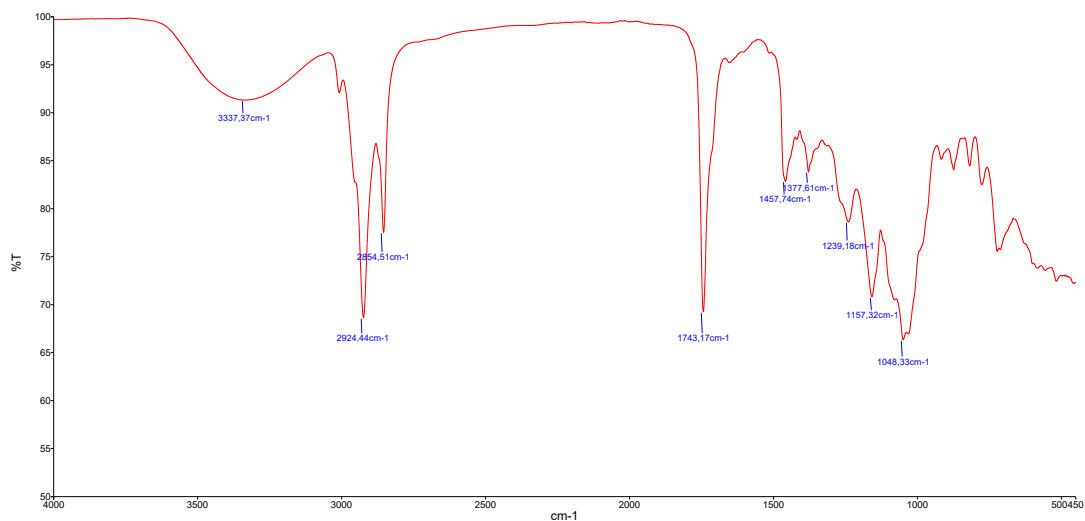


Figura 17. Espectro FTIR de extracto concentrado de MA-F.

Se observó un pico muy intenso a 1743 cm⁻¹ característico de los grupos carbonilo (C=O) probablemente de un éster. Los picos a 1239 cm⁻¹, 1157 cm⁻¹ y 1048 cm⁻¹ son característicos de estiramientos de grupos C-O probablemente relacionados con grupos éster (R-COO-R'). Las bandas correspondientes a 1457 cm⁻¹ y 1377 cm⁻¹ se relacionan con grupos alcanos C-H. Por último, la banda ancha registrada a 3377 cm⁻¹ puede ser debido a trazas de etanol o presencia de grupos N-H.

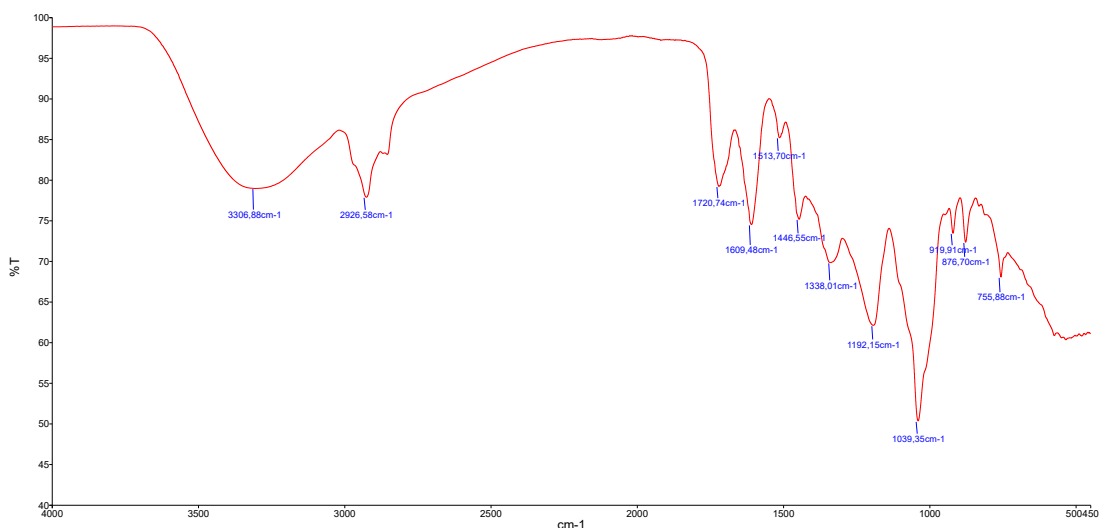


Figura 18. Espectro FTIR de extracto concentrado de madera de T.

Se observó un pico muy intenso a 1720 cm⁻¹ característico de los grupos carbonilo (C=O) probablemente de un éster. Los picos a 1192 cm⁻¹ y 1039 cm⁻¹ son característicos de

estiramientos de grupos C-O probablemente relacionados con grupos éster (R-COO-R'). La banda observada a 3306 cm^{-1} se relaciona con O-H que pueden ser característicos bien de grupos alcohol, o bien del ácido carboxílico. También se observaron bandas a 1446 cm^{-1} y 1338 cm^{-1} que se relacionan con grupos alcanos C-H. El pico 1609 cm^{-1} con vibraciones de C=C o una contribución de deformaciones de O-H en ácidos. Por último, las bandas 755 cm^{-1} y 875 cm^{-1} posiblemente están relacionadas con deformaciones C-H de estructuras aromáticas.

En la siguiente tabla se muestran los encapsulados a partir de activos naturales facilitados para su incorporación en el estudio de actividades sinérgicas:

Tabla 9 Extractos encapsulados en Laurentia Technologies SLL, mediante diferentes técnicas descritas en la tabla.

Código	Descripción
Q-M	Dispersión de cápsulas de q conteniendo M
PG-L	Dispersión de cápsulas de Pectina/gelatina conteniendo L
PG-M	Dispersión de cápsulas de Pectina/gelatina conteniendo M
PG-E	Dispersión de cápsulas de Pectina/gelatina conteniendo E.
Q-L	Dispersión de capsulas de q conteniendo L
ALG-M	Dispersión en H ₂ O de microcápsulas de alginato-calcio con el extracto MA encapsulado (concentración de MA 5 %). Cantidad de muestra: 110 gramos.
TD-MA	Extracto MA encapsulado (concentración de MA 33,3 %) en tierras de diatomea. Cantidad de muestra: 8,9 gramos.
ALG-T	Dispersión en H ₂ O de microcápsulas de alginato-calcio con el extracto T encapsulado (concentración de T 1 %). Cantidad de muestra: 140 gramos.
TD-T	Extracto T encapsulado en tierras de diatomea. Cantidad de muestra: 5 gramos.
PG-SM	Extracto SM encapsulada.

4. Búsqueda de sinergias y formulación de recubrimientos

4.1. Material

Se obtuvieron, por una parte, distintos componentes habituales en el desarrollo de pinturas y barnices, y, por otra parte, una serie de sustancias biocidas, bien obtenidos en las instalaciones de AIDIMME, o bien adquiridos, para el estudio del comportamiento sinérgico.

A. Compuestos para formulación de recubrimientos

Para la **formulación de recubrimientos** fue necesaria la adquisición de distintos componentes. Por una parte, la empresa colaboradora dedicada a la fabricación de pinturas y barnices PINTURAS BLATEM, S.L., facilita una serie de productos para poder formular el nuevo recubrimiento (Figura 19). Estas son:

- Resina Acrílica Blanda (5kg). Matriz polimérica de naturaleza acrílica de baja T_g .
- Resina Acrílica Dura (5kg). Matriz polimérica de naturaleza acrílica de alta T_g .
- Aditivo Antiespumante (250g). Componente para eliminar el aire ocluido en las pinturas, de uso habitual en sus fabricaciones.
- Aditivo Surfactante (250g). Componente para mejorar la incorporación de elementos de diferente polaridad y mejorar la compatibilidad en sistemas acuosos.



Figura 19. Productos para formular recubrimiento facilitados por PINTURAS BLATEM, S.L.

Por otra parte, AIDIMME adquiere, además, una serie de componentes, también habituales en la formulación de recubrimientos para sortear posibles incompatibilidades con la finalidad de mejorar la estabilidad y aspecto final del recubrimiento. Estos aditivos son:

- Imprimación consolidante al silicato (1 kg producto comercial). Matriz polimérica con elevadas propiedades de permeabilidad al vapor de agua (Figura 20).
- Aditivo surfactante DISPERBYK 2080. Agente humectante y dispersante de partículas, para mejorar la estabilización de los biocidas sinérgicos en el sistema
- Aditivo surfactante DISPERBYK 3456. Agente humectante y nivelante, en base silicona, que mejora la estabilidad de la mezcla.
- Aditivo antiespumante BYK 1724. Componente en base silicona para eliminar el aire ocluido en las pinturas, evitando defectos superficiales tras su aplicación.
- Aditivo reológico RHEOBYK 7420CA. Es una solución de urea modificador de la reología, para aumentar la viscosidad y evitar sedimentación de los biocidas empleados.
- Disolvente Dowanol DPM. Aditivo modificador que contribuye a la coalescencia de la matriz polimérica y ayuda a la disminución de la temperatura mínima de formación de película.



Figura 20. Producto comercial imprimación consolidante al silicato.

- B. Compuestos con propiedades biocidas empleados para estudio de propiedades sinérgicas

Para el estudio de actividad sinérgica frente a microorganismos diana se emplearon los compuestos biocidas desarrollados o adquiridos.

4.2. Equipos y métodos

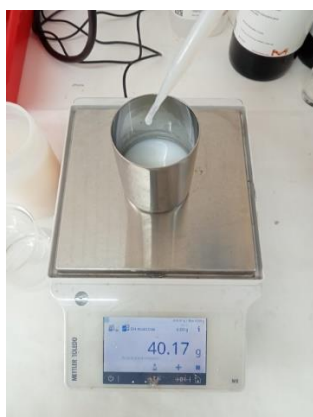
Formación de los nuevos recubrimientos.

Los nuevos recubrimientos ligeros con propiedades sinérgicas se formularon embebiendo en la matriz polimérica los biocidas desarrollados o adquiridos. Para ello se empleó el equipo de dispersión de alta cizalla Dispermat (Figura 21). Los aditivos seleccionados se pesan minuciosamente y se incorporan uno a uno respetando los tiempos de agitación necesarios hasta su correcta incorporación y homogeneización (Figura 22). Los aditivos se incorporarán en el siguiente orden de adición:

Orden	Componente
1	Agua
2	Surfactante/s
3	Resina/Matriz polimérica
4	Agente coalescente
5	Biocidas
6	Aditivo antiespumante
7	Modificador reológico
8	Aditivo antiespumante



Figura 21. Equipo DISPERMAT utilizado para el desarrollo de los recubrimientos. Arriba a la derecha, zoom del proceso de agitación de una mezcla.



Incorporación de componentes de la formulación por pesada en balanza analítica



Incorporación de aditivos en agitación



Proceso de homogeneización del recubrimiento



Pesada de biocidas

Incorporación de biocidas

Homogeneización de aditivos

Figura 22. Proceso de elaboración de recubrimientos.

Posteriormente, los recubrimientos formulados se aplicaron en soportes control con un cilindro aplicador a 150 μm húmedas. Una vez secas, estas cartulinas de contraste permiten valorar visualmente su aspecto, así como observar su evolución con el tiempo.



Figura 23. Soporte control y aplicador Baker cilíndrico (izquierda), aplicación húmeda (centro) y aplicación tras 24 horas de secado (derecha) sobre soporte control.

Obtención de probetas para ensayos microbiológicos

Con el fin de fabricar probetas para la comprobación de la eficacia antimicrobiana frente a microorganismos a los nosocomiales seleccionados, los recubrimientos aplicados sobre sustratos control, una vez secos, se recortaron en probetas de tamaño (5x5) cm.

Además de los recubrimientos con propiedades sinérgicas, se aplicaron recubrimientos control, es decir, sin la incorporación de biocidas (Figura 24).

Las muestras se estudian mediante el método de ensayo de la norma ISO 22196 (E6.1). El valor R representa la actividad antibacteriana de las superficies tratadas con biocida frente a las muestras control (sin biocida) ensayadas con las especies nosocomiales seleccionadas.

- Según la bibliografía una reducción logarítmica $R < 2$ es considerado como una actividad antimicrobiana insuficiente.
- Una reducción logarítmica $2 < R < 3$ una actividad antimicrobiana significativa.
- Una reducción logarítmica $R > 3$ una actividad antimicrobiana fuerte.

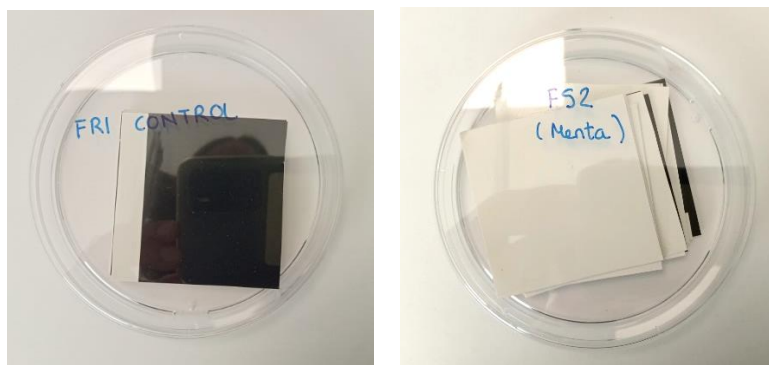


Figura 24. Probetas de tamaño (5x5) cm para ensayos microbiológicos, ejemplo de probetas de recubrimiento control (izquierda) y probetas de recubrimiento con propiedades antimicrobianas)

4.3. Desarrollo experimental

A. Pruebas previas de compatibilidad

Previamente a la formulación de recubrimientos se llevaron a cabo una serie de pruebas preliminares de incorporación de biocidas en sistemas poliméricos.

- Prueba compatibilidad disolución 1% (CH) + B (AG) (99:1)

Se pesó en un vial la disolución de q al 1% y se incorporó el tensioactivo Tween 20. Se homogeneizó 2 minutos en baño de ultrasonido. Posteriormente se añadió sobre la mezcla el biocida comercial inorgánico B y se homogeneizó durante 5 minutos en baño de ultrasonido. El tensioactivo Tween 20 se añadió para mejorar la incorporación del biocida inorgánico en la matriz polimérica acuosa.

La mezcla resultante presentó un aspecto ligeramente turbio, debido a la dispersión del biocida B (AG) en la matriz polimérica de (CH). En reposo, se observa la sedimentación del biocida inorgánico, pero, tras agitar manualmente se vuelve de nuevo una dispersión homogénea.

Tabla 10 Formulación recubrimiento Disolución de CH/B (99:1)

	Cantidad (g)
Q al 1%	9,9081
Tween 20	0,0163
B	0,1032

B. Formulación de recubrimiento en capa ligero control.

Inicialmente se propuso la siguiente Formulación base inicial a partir de la cual se llevarán a cabo los ajustes necesarios hasta obtener un recubrimiento compatible y visualmente correcto. Los componentes, así como los porcentajes aproximados, fueron acordados con técnicos de la empresa colaboradora PINTURAS BLATEM, S.L.

Se llevaron a cabo una batería de formulaciones ajustando la cantidad de los componentes para obtener un recubrimiento aplicado con aspecto y características apropiadas para el uso que se requiere. Se optimizó la cantidad y tipo de dispersante empleado, buscando, por una parte, mejorar la humectación de la película formada con el sustrato, y, por otra parte, ayudar a la estabilización de los biocidas AIDIMME a incorporar. La cantidad de resina se aumentó por problemas de escurrimiento. El antiespumante se redujo para evitar problemas de nivelación debido al aumento de la

tensión superficial del sistema. Además, se incorporó un aditivo reológico buscando siempre una buena nivelación de la película aplicada.

Tabla 11 Estudio de la compatibilidad de los componentes de la formulación. Batería de formulaciones iniciales.

	FI 1		FI 2		FI 3	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	71,82	-	71,77	-	70,93	-
Surfactante BLATEM	0,73	5 min 250 rpm	0,82	5 min 450 rpm	0,82	2 min 450 rpm
Resina Acrílica Blanda BLATEM	27,27	5 min 250 rpm	27,25	5 min 500 rpm	27,25	5 min 500 rpm
Antiespumante BLATEM	0,18	5 min 350 rpm	0,16	20 min 500 rpm	0,16	20 min 500 rpm
Rheobyk 7420CA	-	-	-	-	0,84	15 min 650 rpm
Total	100		100		100	

	FI 4		FI 5		FI 6	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	72,00	-	71,86	-	75,60	-
Surfactante BLATEM	0,80	2 min 550 rpm	0,83	2 min 550 rpm	0,70	2 min 550 rpm
Resina Acrílica Blanda BLATEM	26,54	10 min 550 rpm	26,51	10 min 550 rpm	23,28	10 min 550 rpm
Dowanol DPM	0,50	5 min 550 rpm	0,67	5 min 550 rpm	0,35	5 min 550 rpm
Antiespumante BLATEM	0,16	15 min a 650 rpm + 10 min a 990 rpm	0,13	650 rpm hasta incorporación completa	0,07	650 rpm hasta incorporación completa
Total	100		100		100	

	FI 7		FI 8		FI 9	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	75,60	-	58,78	-	58,22	-
Surfactante BLATEM	0,70	2 min 550 rpm	0,40	2 min 550 rpm	0,39	2 min 550 rpm
Disperbyk 2080	0,13 ¹	5 min 550 rpm	0,38	2 min 550 rpm	0,37	2 min 550 rpm
Disperbyk 3456	-	-	-	-	-	-
Resina Acrílica	23,28	10 min 550	39,67	10 min 550	39,29	10 min 550

¹ Se aditivó al final de la formulación, tras el aditivo Antiespumante BLATEM.

Blanda BLATEM		rpm		rpm		rpm
Dowanol DPM	0,35	5 min 550 rpm	0,77	5 min 550 rpm	0,77	5 min 550 rpm
Antiespumante BLATEM	0,07	650rpm hasta incorporación completa	-	-	0,10	10 min 550 rpm
Rheobyk 7420CA	-	-	-	-	0,86	10 min 550 rpm
Total	100		100		100	

	FI 10		FI 11		FI 12	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	55,48	-	58,24	-	58,08	-
Surfactante BLATEM	0,44	2 min 650 rpm	0,40	2 min 650 rpm	0,40	2 min 650 rpm
Disperbyk 3456	0,47	2 min 650 rpm	0,46	2 min 650 rpm	0,46	2 min 650 rpm
Resina Acrílica Blanda BLATEM	42,82	10 min 650rpm	40	10 min 650rpm	39,87	10 min 650rpm
Dowanol DPM	0,79	5 min 650 rpm	0,80	5 min 650 rpm	0,80	5 min 650 rpm
Antiespumante BLATEM	-	-	0,10	10 min 650rpm	0,10	10 min 650rpm
Rheobyk 7420CA	-	-	-	-	0,33	20 min 550rpm
Total	100		100		100	

	FI 13		FI 14		FI 15	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	57,64	-	57,40	-	57,30	-
Surfactante BLATEM	0,40	2 min 650 rpm	0,80	2 min 550 rpm	0,40	2 min 550 rpm
Disperbyk 3456	0,46	2 min 650 rpm	-	-	0,50	2 min 550 rpm
Resina Acrílica Blanda BLATEM	40,00	10 min 650rpm	40,00	10 min 600 rpm	-	10 min 600 rpm
Dowanol DPM	0,80	5 min 650 rpm	1,10	5 min 600 rpm	40,00	5 min 600 rpm
Antiespumante	0,20	10 min	-	-	1,09	-

BLATEM		650rpm				
Antiespumante Byk 1724	-	-	0,05	5 min 600 rpm		5 min 600 rpm
Rheobyk 7420CA	0,50	15 min 600rpm	0,50	20 min 700 rpm	0,05	5 min 600 rpm
Antiespumante Byk 1724	-	-	0,05	20 min 700 rpm	0,50	20 min 700 rpm
Total	100		99,91		99,89	

	FI 16		FI 17		FI 18	
	%	Procedimiento	%	Procedimiento	%	Procedimiento
Agua desionizada	57,30	-	82,70	-	90,40	-
Surfactante BLATEM	0,40	2 min 550 rpm	0,80	2 min 550 rpm	0,80	2 min 550 rpm
Disperbyk 2080	-	-	-	-	-	-
Disperbyk 3456	0,50	2 min 550 rpm	-	-	-	-
Resina Acrílica Blanda BLATEM	40	10 min 600 rpm	15,00	10 min 600 rpm	7,50	10 min 600 rpm
Dowanol DPM	1,07	5 min 600 rpm	0,40	5 min 600 rpm	0,20	5 min 600 rpm
Antiespumante BLATEM	-	-	-	-	-	-
Antiespumante Byk 1724	0,05	5 min 600 rpm	0,05	5 min 600 rpm	0,05	5 min 600 rpm
Rheobyk 7420CA	0,50	5 min 600 rpm	1,00	20 min 700 rpm	1,00	20 min 700 rpm
Antiespumante Byk 1724	0,08	20 min 700 rpm	0,05	20 min 700 rpm	0,05	20 min 700 rpm
Total	99,90		100		100	

Durante la formulación de la batería de recubrimientos se observó lo siguiente:

En **FI 1** se observó una falta de homogeneización o una ligera incompatibilidad, seguramente del aditivo antiespumante. Quedaron restos en las paredes del recipiente y en el agitador dispersor, así como en dispersión en el recubrimiento.

En **FI 2** se modificó el procedimiento de agitación, aumentando tiempos y velocidad de agitación. Con esta modificación se obtuvo una correcta incorporación de todos los componentes. El recubrimiento resultante de 150 μ m húmedas sobre cartulina de contraste no forma película uniforme. Una vez sece observó el recubrimiento agrietado a lo largo de toda la superficie.

En **FI 3** se incorporó un aditivo reológico (Rheobyk 7420CA) e inicialmente se observó una correcta incorporación del espesante, pero trascurridas 24 horas en reposo se detectó una incompatibilidad entre el sistema emulsión – espesante que generó aparición de ciertos grumos sedimentados. A priori, la compatibilidad del espesante en el sistema fue correcta, pero, sería necesario aumentar la cantidad del mismo.

Con la finalidad de mejorar la filmificación a temperatura ambiente del recubrimiento, se estudió la incorporación del coalescente Dowanol DPM en distintas concentraciones sobre la emulsión acrílica blanda BLATEM. Se realizaron a pequeña escala pruebas rápidas de incorporando el agente coalescente en concentraciones del 0,5%, 1% y 2% directamente sobre la emulsión acrílica blanda y, posteriormente, se aplicaron películas de 200 µm húmedas sobre cartulina de contraste (soporte control). De forma generalizada se observó que el Dowanol DPM es compatible con la emulsión acrílica. La mezcla resultante presentó visualmente una disminución de la viscosidad, así como un aspecto de mezcla homogénea. Tras secado de la aplicación, la mezcla con 2% de Dowanol DPM fue el que presentó una correcta formación de película. Por tanto, el agente coalescente Dowanol DPM se incluyó en siguientes formulaciones.

En **FI 4** se observó de nuevo una mala incorporación del antiespumante.

Se aumentó el tiempo de agitación hasta observar visualmente una completa incorporación del antiespumante en **FI 5**. La aplicación resultante sobre cartulina control no humectó correctamente.

En **FI 6** se disminuyó ligeramente la cantidad de resina polimérica y de coalescente, y, especialmente la del antiespumante. La aplicación resultante presentó de nuevo una mala humectación sobre el sustrato control.

La incorporación del aditivo dispersante/humectante Disperbyk 2080 en **FI 7** mejoró ligeramente la humectación del recubrimiento sobre el sustrato control.

Con la finalidad de mejorar la humectación, así como la nivelación del recubrimiento, se aumentó la cantidad de resina polimérica en **FI 8** y se comprobó que la aplicación sobre sustrato control presentó una correcta humectación.

En **FI 9** se incorporó de nuevo al agente reológico Rheobyk 7420CA para aumentar la viscosidad del sistema. La aplicación resultante sobre sustrato control de la **FI 9** presentó una pérdida de brillo notable.

Se estudió la incorporación de otro aditivo dispersante/humectante Disperbyk 3456 en **FI 10** y **FI 11**. Los recubrimientos resultantes presentaron un aspecto similar al uso del aditivo Disperbyk 2080, no se observaron diferencias significativas.

La incorporación del aditivo reológico Rheobyk 7420CA mejora la nivelación del recubrimiento en **FI 12**. Se observó la necesidad de asegurarse de la correcta incorporación de aditivo espesante. Fue necesario aumentar tiempos de agitación al finalizar la formulación.

El aumento del aditivo antiespumante en **FI 13** genera un escurrimiento en los bordes.

Se estudió otro aditivo antiespumante **FI 14** presentando un mejor aspecto tanto en la incorporación de la mezcla en el envase como en su aplicación sobre cartulina de contraste. Se decidió cambiar el antiespumante facilitad por PINTURAS BLATEM, S.L. por el aditivo BYK 1724, debido a su mejor compatibilidad en nuestro sistema.

Se formularon otras dos variaciones **FI 15** y **FI 16** variando el surfactante/dispersante en fórmula. Estas dos formulaciones también presentaron un aspecto correcto tanto en el envase como en su aplicación sobre cartulina de contraste.

Finalmente, las formulaciones FI 14, FI 15 y FI16 presentaron un aspecto correcto en el envase, y fueron seleccionadas de entre en total de las formulaciones realizadas anteriormente. A partir de ahora se referenciarán como:

- FI 15 → **FR 1** (Formulación referencia 1).
- FI 16 → **FR 2** (Formulación referencia 2).
- FI 17 → **FR 3** (Formulación referencia 3).

El aspecto de las formulaciones en el envase, así como las aplicaciones resultantes sobre sustratos control se observan a continuación:

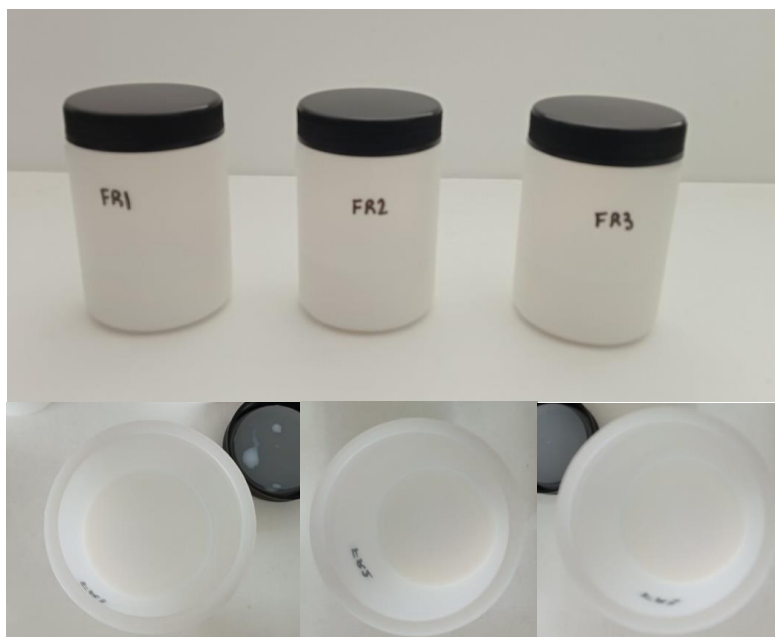


Figura 25. Aspecto de las formulaciones de referencia FR1, FR2 y FR3 en el envase tras su fabricación.

Las formulaciones FR1, FR2 y FR3 presentaron el mismo aspecto blanco lechoso y comportamiento tixotrópico (Figura 25). Las mezclas en reposo adquirieron una mayor viscosidad, idónea para evitar la sedimentación de los biocidas encapsulados que se incorporarán más adelante, pero, por el contrario, al ser agitadas manualmente, adquirirían una baja viscosidad que permitió ser pulverizadas para su aplicación.

Para su control se aplicaron películas de 150 micras sobre cartulinas de contraste.





Figura 26. Aplicaciones sobre cartulina de contraste de las formulaciones FR1, FR2 y FR3, en húmedo (arriba) y en seco (bajo).

Los recubrimientos ya aplicados, también referenciados como recubrimientos en capa ligeros, presentaron un correcto secado, resultando una ligera capa transparente, sin defectos superficiales significativos. La transparencia fue un requisito en este desarrollo para no desvirtuar el aspecto final de los sustratos a ser tratados.

De las tres formulaciones de referencia (FR1, FR2 y FR3) se determinaron algunas propiedades que se consideraron de interés. Se determinó la cantidad de sólidos total, el brillo especular y la resistencia al agua del recubrimiento seco.

Tabla 12 Valores de contenido en sólidos (%), brillo especular en ángulos de incidencia 20/60/85 (º) y comportamiento en contacto directo con agua.

	FR1	FR2	FR3
Contenido en sólidos (%)	20,1	20,7	20,1
Brillo especular (º) (20 / 60 / 85)	33,3 / 72,1 / 93,3	7,0 / 40,3 / 88,3	39,0 / 74,8 / 93,4
Comportamiento en contacto con agua	ok	ok	ok

Los recubrimientos de referencia presentaron entorno a un 20% en contenido en sólidos. En cuanto al brillo especular, atendiendo a la clasificación que recoge la norma *UNE-EN 13300 Pinturas y barnices Pinturas y barnices para paredes y techos interiores. Clasificación*, el recubrimiento FR1 y FR3 se clasificarían como brillantes y el recubrimiento FR2 como satinado.

El comportamiento frente al contacto con agua se evaluó colocando una gota de agua sobre los recubrimientos aplicados en soportes de vidrio. Tras 24 horas de contacto del

recubrimiento con la gota de agua (Figura 27) se observó efectos superficiales tales como blanqueamiento en FR1 y FR3 de forma más notables y en FR2 en menor grado. No se observó formación de ampollas ni hidrólisis del recubrimiento.



Figura 27. Comportamiento en contacto con agua. Aspecto de los recubrimientos tras 24 horas en contacto con una gota de agua.

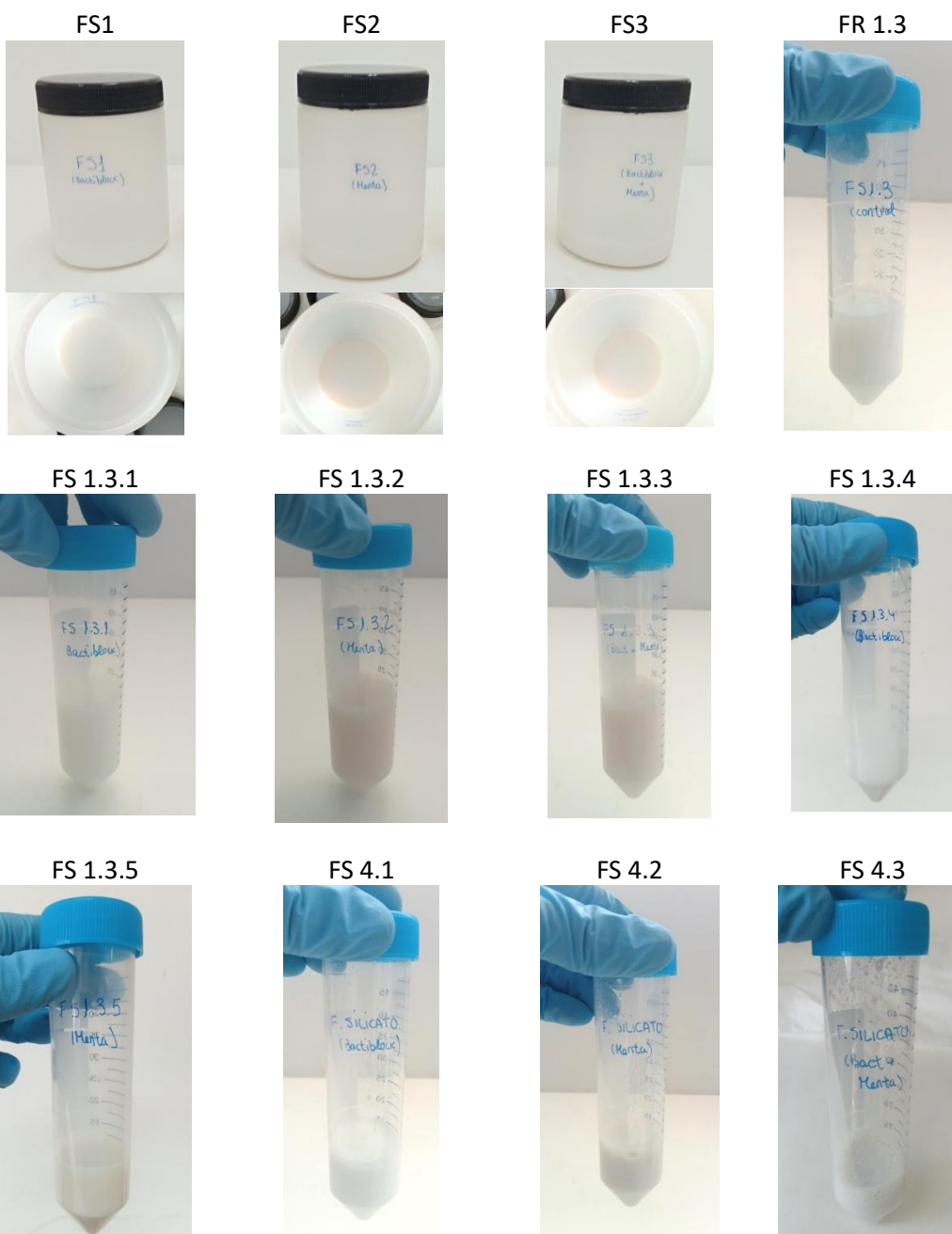
A partir de estas formulaciones se podrán realizar los ajustes necesarios para optimizarlas, permitiendo ligeras variaciones en las proporciones de los componentes e incluso la posible incorporación de nuevos aditivos, con el objetivo de incorporar de forma satisfactoria los biocidas con actividad sinérgicas estudiados y seleccionados anteriormente.

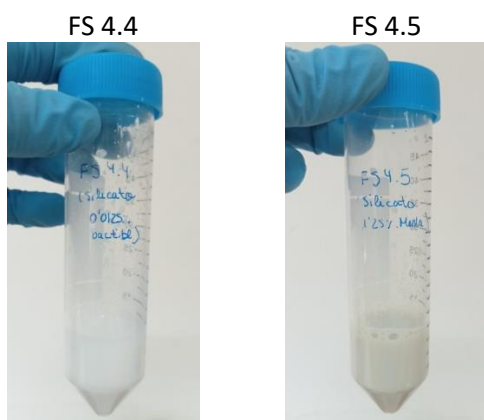
C. Formulación de recubrimiento en capa ligero activo frente a microorganismos nosocomiales.

Sobre las formulaciones de referencia obtenidas anteriormente, o modificaciones/ajustes de estas, se incorporan los materiales biocidas estudiados. Se emplearán los tipos de biocidas y las concentraciones identificadas como sinergias.

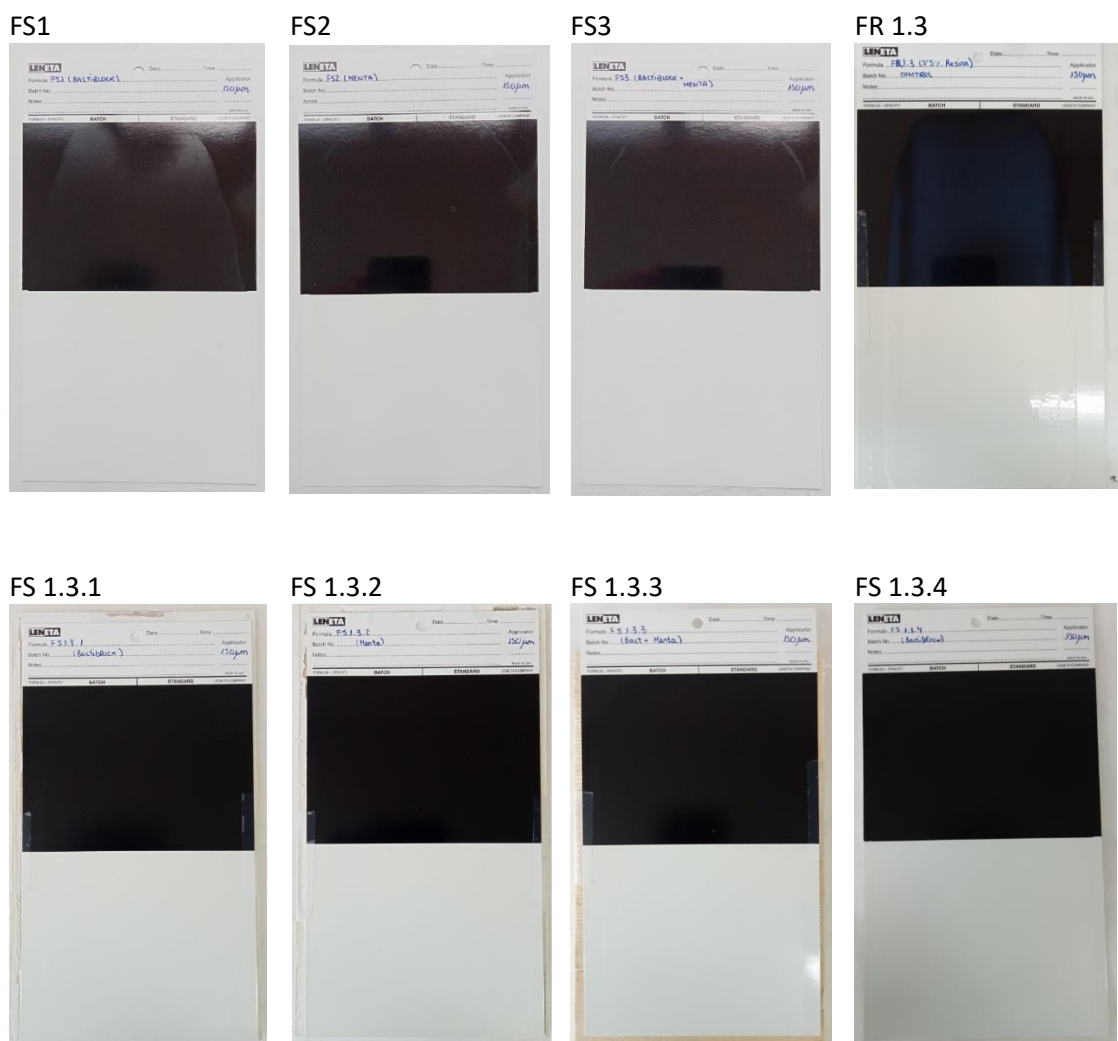
Se decidió trabajar principalmente sobre la formulación de referencia FR1, por una parte, por emplear el surfactante facilitado por la empresa colaboradora, y, por otra parte, por tener un comportamiento similar a las otras formulaciones. Algunas de las optimizaciones o modificaciones realizadas fueron la reducción sustancial de la cantidad de resina polimérica, partiendo de un 40% establecida en la formulación de referencia FR1, a un 7,5% de resina polimérica en la formulación referenciada como FR1.3. También se trabajó con otra base comercial ya formulada, una imprimación consolidante al silicato, FR 4, debido a que posee una alta permeabilidad al vapor de agua, favoreciendo por tanto a la liberación de los principios activos biocidas.

El aspecto de los recubrimientos aplicados sobre sustratos control se muestran a continuación:





El aspecto de los recubrimientos aplicados sobre sustratos control se muestran a continuación:



FS 1.3.5



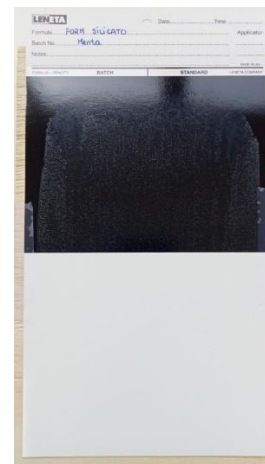
FR4



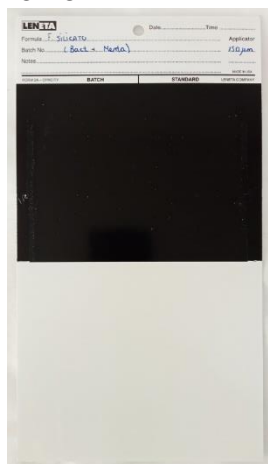
FS 4.1



FS 4.2



FS 4.3



FS 4.4



FS 4.5



Finamente se obtuvieron de forma generalizada recubrimientos compatibles y con buen aspecto. El biocida inorgánico B se incorporó correctamente en todas las formulaciones, en cambio, las formulaciones con Z presentaron una peor homogeneidad observando aglomeración de partículas, dando lugar a recubrimientos rugosos al tacto y con partículas blancas. Este aspecto podría optimizarse en futuros proyectos estudiando otros sistemas de tensioactivos.

Tras evaluación de todas las formulaciones desarrolladas, se seleccionaron las formulaciones **control FR 1.3**, con un 7,5% de resina, y la **formulación** con actividad **sinérgica** entre principios activos Ag-M, **FS 1.3.3**. Se llevó a cabo en un equipo dispersor fabricando 2 lotes de 500 g para su aplicación sobre sustratos metálicos, plásticos y lignocelulósicos en muestras facilitadas por las empresas colaboradoras, así como para la validación de estos tratamientos en capa ligeros en las propias instalaciones de las empresas.



Figura 28. Fabricación a mayor escala de recubrimientos para validación en empresa.

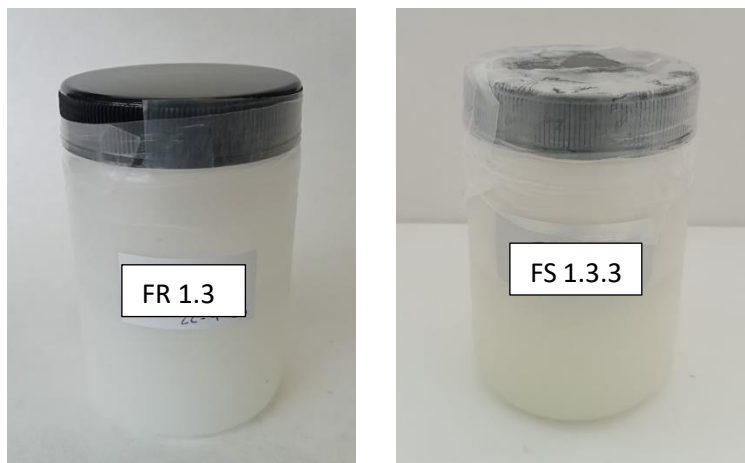


Figura 29. Formulaciones escaladas a nivel de laboratorio, FR 1.3 (izquierda) y FS 1.3.3 (derecha).

5. Aplicación y optimización sobre superficies metálicas y lignocelulósicas

Las empresas PALBOX INDUSTRIAL, S.L., LIBERFUSTA, S.L.U. y MOBERCAS, S.L.L. aportaron prototipos de productos finales ya acabados con el fin de poder ser aplicadas con las nuevas formulaciones de recubrimientos formulados en este E5.1. Se seleccionaron las formulaciones FR 1.3 como tratamiento control sin la presencia de

componentes biocidas, y la FS 1.3.3 formulada con principios activos Ag-M. Estas formulaciones fueron seleccionadas por su buena estabilidad en el envase, por su correcto aspecto una vez aplicada en seco sobre cartulinas de contraste, y por su excelente actividad sinérgica. Ambas formulaciones serán representativas del resto de formulaciones desarrolladas.

En la siguiente figura se recoge tres muestras de tableros que emplean para fabricación de puertas la empresa colaboradora LIBERFUSTA, S.L.U.



Figura 30. Muestras de tableros acabados para puertas suministrados por LIBERTUSTA, S.L.U.

PALBOX, S.L. suministró varias muestras que forman parte del mobiliario sanitario que fabrican, entre ellas, un mando de camilla hospitalaria, una pieza metálica que forma parte de las barandillas de las camillas y muestras de polipiel que emplean como acabado de sus camillas.



Figura 31. Muestras suministradas por MOBERCAS, S.L. Mando de camilla hospitalaria (izquierda), barandilla de camilla hospitalaria (centro) y polipiel de camillas hospitalarias (derecha).

La empresa PALBOX, S.L. facilitó varios perfiles empleados en mobiliario destinado a entornos sanitarios, así como manivelas y pestillos.



Figura 32. Muestras suministradas por PALBOX, S.L. Perfiles de mobiliario hospitalario (arriba), manivelas (bajo izquierda) y pestillo (bajo derecha).

Las muestras facilitadas por las empresas colaboradoras corresponden a superficies consideradas fómites, y por ello son objeto de tratamiento con el producto desarrollado en el marco de este proyecto.



Figura 33. Métodos de pulverización empleados para aplicar el tratamiento sinérgico.

Las muestras facilitadas fueron tratadas empleando los tres métodos de pulverización observados en la imagen anterior.

- Pistola de pulverización con aire comprimido.
- Frascos pulverizadores para una aplicación más sencilla, sin requerir sistemas de aplicación más profesionales.

Previamente, algunos sustratos, concretamente los de naturaleza lignocelulósica se lijaron previamente para mejorar la adherencia sobre el mismo. Se protege una parte de la muestra con cinta de carroceros, la que no se trató con la nueva solución, con la finalidad de comparar el aspecto de la parte tratada y no tratada de la muestra. Posteriormente se aplicaron las formulaciones desarrolladas, mediante pulverizado, obteniendo finalmente superficies a nivel de laboratorio tratadas que presentan eficiencia contra microorganismos nosocomiales.

Las muestras de la empresa LIBERFUSTA, S.L.U se observan a continuación:

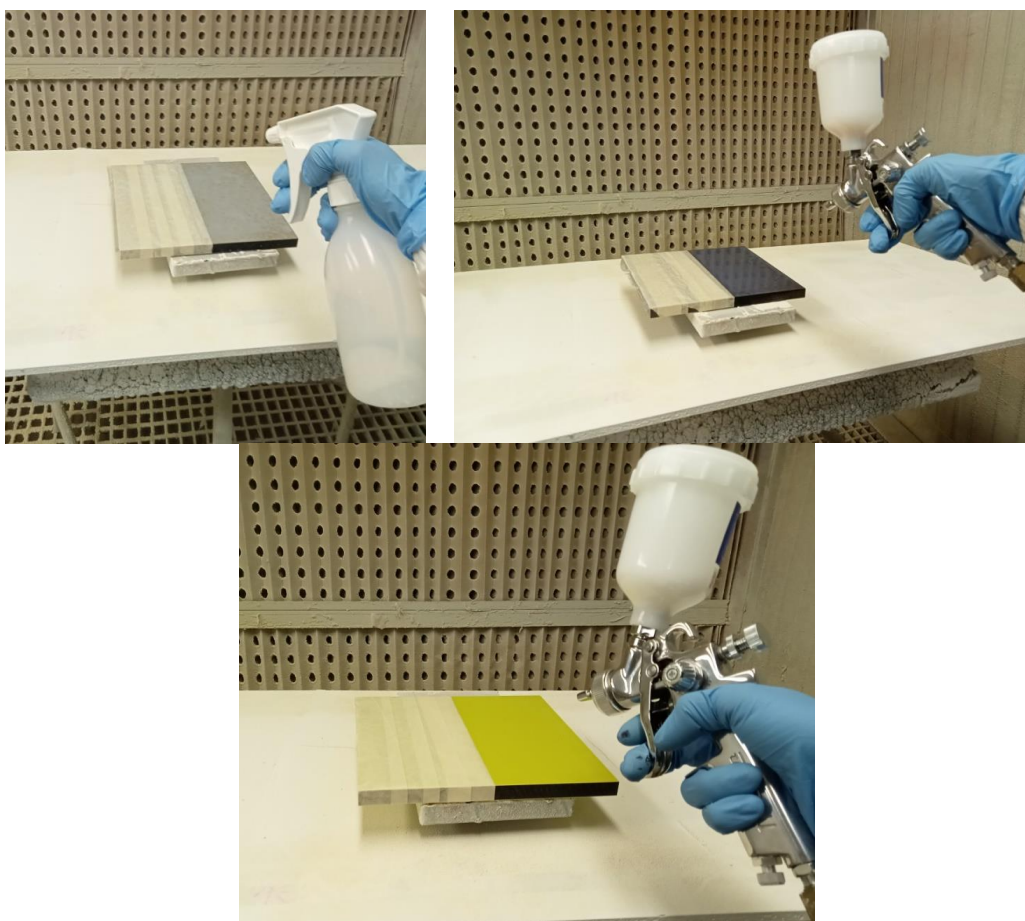


Figura 34. Proceso de aplicación del tratamiento en capa sinérgico de las muestras facilitadas por la empresa colaboradora LIBERFUSTA, S.L.U.

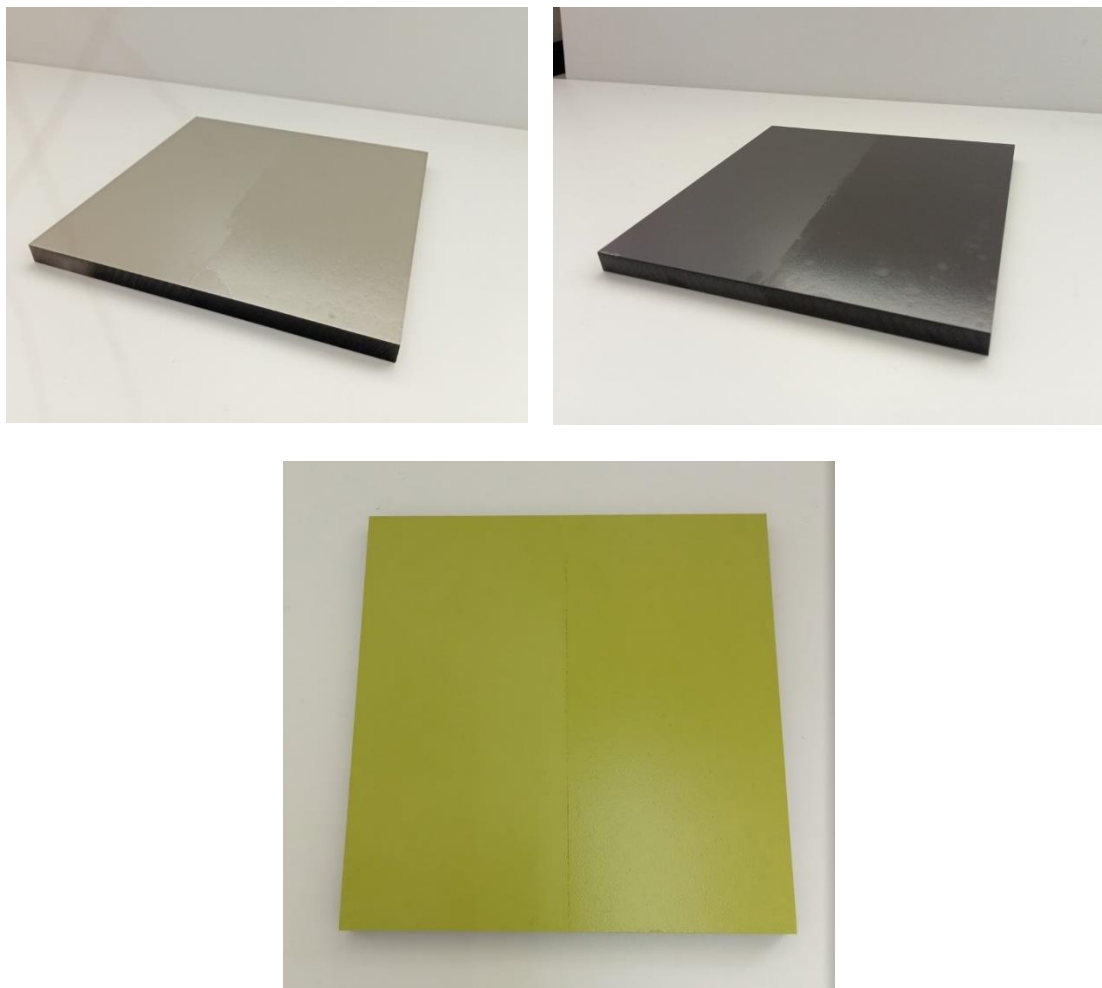


Figura 35. Muestras de la empresa colaboradora LIBERFUSTA, S.L.U. tratadas con FS 1.3.3

Inicialmente, se observó problemas de nivelación del producto en superficie. Pero modificando la fórmula y aumentando ligeramente la viscosidad, se ha conseguido una mejor humectación y nivelación en la superficie.

La aplicación a pistola con aire comprimido presentó visualmente una correcta deposición del tratamiento aplicando de forma uniforme el producto sobre la superficie, observando una buena nivelación y un aspecto final correcto, sin defectos significativos. En cambio, la aplicación mediante pulverizado manual presentó algunos defectos superficiales debido a su pulverizado no uniforme, quedando zonas con mayor cantidad aplicada. Deberá emplearse un aerosol que permita aplicar el tratamiento mediante pequeñas gotas uniformes. Se aplicaron aproximadamente 60 g/m² húmedos de producto, aunque la cantidad requerida para cumplir su función podría optimizarse mediante comprobaciones de cantidades aplicadas y durabilidad con el tiempo. Visualmente no presentó cambios de coloración apreciables al ojo humano, en cambio,

si modificó el brillo especular del acabado. Dicho esto, aún con mejoras en el método de aplicación empleado, el acabado una vez seco se consideró correcto.

Las muestras de la empresa MOBERCAS, S.L. se observan a continuación:

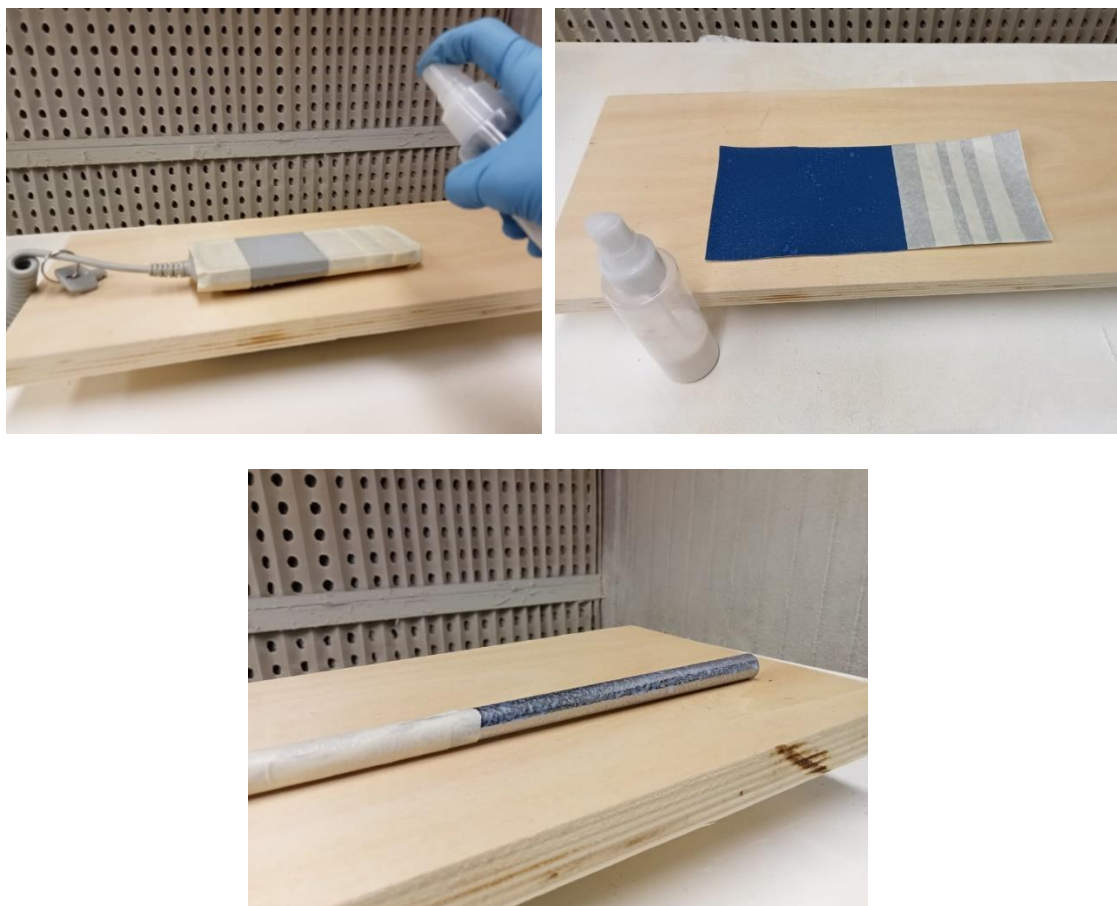


Figura 36. Proceso de aplicación del tratamiento en capa sinérgico de las muestras facilitadas por la empresa colaboradora MOBERCAS, S.L.

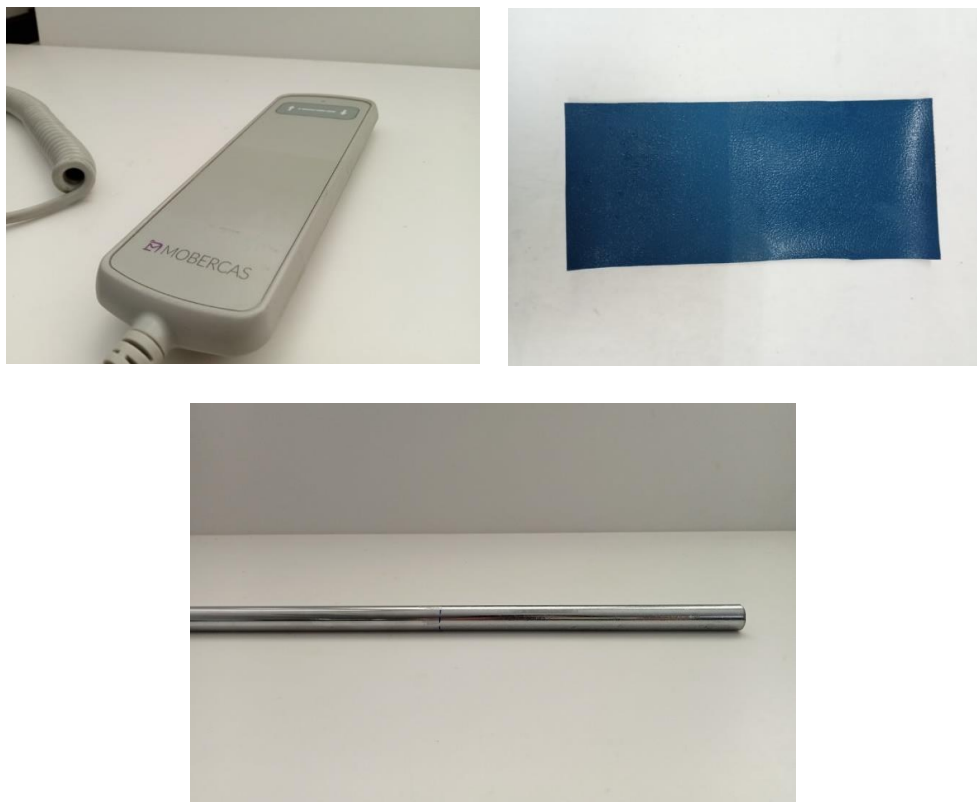


Figura 37. Muestras de la empresa colaboradora MOBERCAS, S.L. tratadas con FS 1.3.3

Las muestras de la empresa MOBERCAS, S.L. fueron aplicadas mediante pulverizador manual. El tratamiento aplicado sobre sustrato polimérico como es el mando presentó un acabado muy bueno, una deposición homogénea no se observó cambios de coloración perceptibles al ojo humano, aunque sí un ligero cambios de brillo especular superficial. La aplicación sobre la pieza metálica resultó no alterar el acabado, observando el mismo brillo y coloración de la pieza. Sí se detectó necesidad de mejorar el método de aplicación mejorando la nivelación del producto húmedo. Esto podría mejorarse mediante la incorporación de humectantes en la formulación. Por último, la aplicación sobre el sustrato de polipiel se evaluó, principalmente para estudiar el posible daño ocasionado por salpicaduras al tratar las partes metálicas de sus camillas. Tras aplicación del tratamiento sobre la polipiel se detectó principalmente una pegajosidad permanente que no desaparece tras días de secado.

Las muestras de la empresa PALBOX, S.L. se observan a continuación:

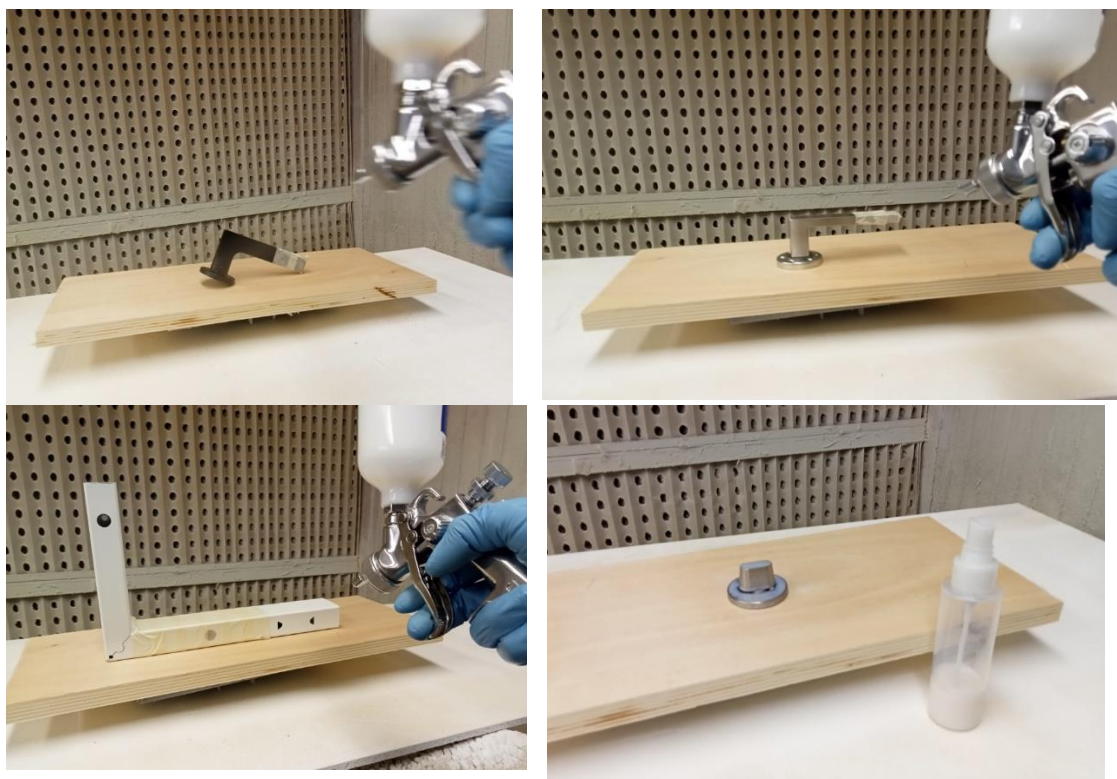


Figura 38. Proceso de aplicación del tratamiento en capa sinérgico de las muestras facilitadas por la empresa colaboradora PALBOX, S.L.





Figura 39. Muestras de la empresa colaboradora PALBOX, S.L. tratadas con FS 1.3.3

Los tratamientos se aplicaron empleando los métodos de aplicación de pulverizador manual y pistola airless. De forma generalizada, las aplicaciones presentaron visualmente un acabado correcto. Las manivelas y perfiles tratados no modificaron visualmente su coloración tras secado, aunque sí el brillo superficial.

En resumen, se trabajó principalmente con el tratamiento con propiedades sinérgicas referenciado como **FS 1.3.3** formulado con biocida inorgánico basado de plata (B) en sinergia con microcápsulas en base m-q, debido a su buena estabilidad en el envase y adecuada aplicabilidad y correcto aspecto en seco. Los tratamientos ligeros en capa sobre los diferentes acabados resultaron, en general, transparentes, sin alterar la coloración original de los sustratos. En algunos casos, el tratamiento matizó superficies originalmente brillantes y, en otros casos, aportó mayor reflectancia a acabados mates. Este aspecto podrá optimizarse en función del acabado de la propia muestra mediante la incorporación de agentes matizantes, por ejemplo. Los tratamientos se aplicaron pulverizados en capa ligera, siendo el espesor final, así como la cantidad aplicada optimizable mediante estudios que lo relacionen con la durabilidad antimicrobiana y de desgaste en un uso real. También se observó que la humectación y nivelación del recubrimiento varía según el tipo de sustrato (lignocelulósico o metálico), recomendando estudios específicos para mejorar su compatibilidad mediante la incorporación de aditivos funcionales. En general, los tratamientos aplicados en este apartado mostraron un comportamiento satisfactorio, con anclaje correcto, acabado superficial aceptable y margen de mejora mediante ajustes en formulación y aplicación viables.

6. Caracterización físico-química de las aplicaciones desarrolladas

En este apartado se caracterizaron las muestras tratadas anteriormente. Estas muestras fueron tratadas con el recubrimiento FS 1.3.3 formado por la combinación sinérgica con el aditivo By con el biocida natural en base q-m. Los tratamientos se consideraron

representativos del resto de recubrimientos que también obtuvieron resultados esperanzadores en cuanto a comportamientos sinérgicos. El motivo fue por tener todas las formulaciones la misma estructura y base polimérica. También se evaluó propiedades de las formulaciones húmedas FR 3 control y FS 1.3.3.

Las características que se consideraron más críticas se enumeran a continuación:

- Resistencia al frote en húmedo en base a la norma UNE-EN ISO 11998:2007.
- Determinación del brillo especular en base a la norma UNE-EN ISO 2813:2015.
- Diferencias de color en base a la norma ISO 7224-3.
- Adherencia sobre diferentes soportes en base a procedimiento interno.

Resistencia al frote en húmedo.

La resistencia al frote en húmedo de pinturas en base a la norma UNE-EN ISO 11998:2007 establece un método acelerado para evaluar la durabilidad y capacidad de limpieza de estos recubrimientos cuando se exponen a la limpieza repetida, clasificándose mediante la norma UNE-EN 13300 de mayor resistencia (1) a menor resistencia (5) al frote en húmedo.

El ensayo consiste en aplicar una capa uniforme del recubrimiento sobre una superficie estándar, en este caso una lámina de PVC, dejar secar durante 28 días y luego someterla a un frote controlado con un abrasivo húmedo durante 200 ciclos. Finalmente, se determina la pérdida media de espesor de película (L_{dft}).

Este ensayo se realizó de los tratamientos control FR1 y tratamiento sinérgico FS 1.3.3 en las instalaciones de la empresa colaboradora PINTURAS BLATEM, S.L. realizado por técnicos expertos. Los resultados facilitados por la empresa fueron los siguientes:

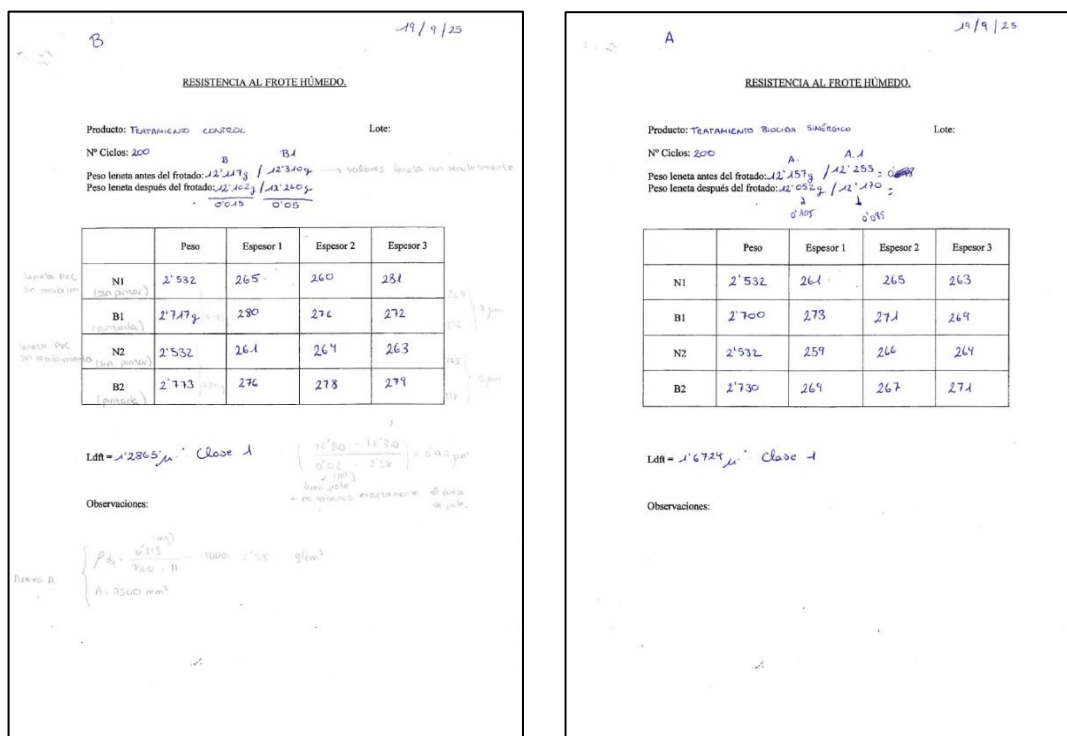


Figura 40. Documentos con resultados experimentales facilitados por PINTURAS BLATEM, S.L. de ensayo de resistencia al frote en húmedo.

Tratamiento control FR 1.3

En la siguiente tabla se recogen valores de pérdida de masa tras 200 ciclos de frotado.

Tabla 13 Valores de pérdida de masa del recubrimiento control FR 1.3 tras 200 ciclos de frote.

	B (g)	B1 (g)
Peso leneta antes del frotado	12,117	12,310
Peso leneta después del frotado	12,102	12,260
Pérdida de masa después del frotado	0,015	0,050



Figura 41. Aplicaciones para ensayo de resistencia al frote en húmedo con recubrimiento control FR 1.3 sometidas a 200 ciclos

A continuación, se recogen datos experimentales que requiere la norma para determinar la densidad de película seca, ρ_{df} , (EN ISO 11998:2007 Anexo A). Posteriormente, con el valor de la densidad de película seca, se determinará L_{dft} .

En la tabla se muestran valores de masa y espesores, por una parte, de láminas de PVC negra (N1 y N2), y por otra parte de láminas de PVC con el tratamiento biocida sinérgico aplicado (B1 y B2). Por diferencia de pesos y diferencia de espesor, y siguiendo los cálculos que indica la norma EN ISO 11998:2007 Anexo A, se determina la densidad de la película seca.

Tabla 14 Valores de masa y espesor de probetas sin recubrimiento y con recubrimiento para determinar la densidad de la película seca.

	Masa (g)	Espesor (μm)		
		Medida 1	Medida 2	Medida 3
N1	2,532	265	260	281
B1	2,717	280	276	272
N2	2,532	280	276	272
B2	2,773	276	278	279



Figura 42. Probetas de área 7500 mm² para el cálculo de la densidad de la película seca. Referencias B1 y B2.

Finalmente, de determina la pérdida media de espesor de película partir de la siguiente ecuación:

$$L_{dft} = \left(\frac{m_1 - m_2}{A \times \rho_{df}} \right)$$

$$L_{dft} = 1,2865 \mu m$$

Atendiendo a los valores de clasificación que recoge la norma UNE-EN 13300 el recubrimiento control FR 1.3 se clasificaría como CLASE 1, presenta una buena resistencia al frote en húmedo.

Tratamiento control FS 1.3.3

En la siguiente tabla se recogen valores de pérdida de masa tras 200 ciclos de frotado para el recubrimiento biocida sinérgico.

Tabla 15 Valores de pérdida de masa del recubrimiento control FS 1.3.3 tras 200 ciclos de frote.

	A (g)	A1 (g)
Peso leneta antes del frotado	12,157	12,255
Peso leneta después del frotado	12,052	12,170
Pérdida de masa después del frotado	0,105	0,085



Figura 43. Aplicaciones para ensayo de resistencia al frote en húmedo con recubrimiento sinérgico FS 1.3.3 sometidas a 200 ciclos

De la misma forma que se ha comentado en el recubrimiento control, la empresa colaboradora recoge los datos experimentales necesarios para llevar a cabo el ensayo. Con estos datos se determina la densidad de película seca, ρ_{df} , (EN ISO 11998:2007 Anexo A). Posteriormente, con el valor de la densidad de película seca, se determinará L_{dft} .

En la tabla se muestran valores de masa y espesores, por una parte, de láminas de PVC negra (N1 y N2), y por otra parte de láminas de PVC con el tratamiento biocida sinérgico aplicado (B1 y B2). Por diferencia de pesos y diferencia de espesor, y siguiendo los cálculos que indica la norma EN ISO 11998:2007 Anexo A, se determina la densidad de la película seca.



Figura 44. Probetas de área 7500 mm² para el cálculo de la densidad de la película seca. Referencias B1 y B2.

Finalmente, de determina la pérdida media de espesor de película partir de la siguiente ecuación:

$$L_{dft} = \left(\frac{m_1 - m_2}{A \times \rho_{df}} \right)$$

$$L_{dft} = 1,6724 \mu m$$

Atendiendo a los valores de clasificación que recoge la norma UNE-EN 13300 el tratamiento biocida sinérgico FS 1.3.3 se clasificaría también como CLASE 1, presentando una correcta resistencia al frote en húmedo.

Por último, hay que comentar que la empresa colaboradora informó sobre la buena aplicabilidad de ambas formulaciones, así como su bien comportamiento. También indicó que en el tratamiento FS 1.3.3 se observó la presencia de algunos cráteres en sus aplicaciones, y recomendó la necesidad de aumentar los tiempos de agitación, con la finalidad de incorporar al sistema adecuadamente el agente antiespumante, motivo, seguramente de la aparición de los defectos superficiales mencionados.

Determinación del brillo especular

Se determinaron los valores de brillo sobre las distintas muestras tratadas in situ en las instalaciones de las empresas antes (sin tratamiento) y después (con tratamiento) de aplicar el tratamiento sinérgico seleccionado FS 1.3.3. La medida realizada sobre el tratamiento se llevó a cabo tras varios procesos de uso habitual y desgaste mediante contacto y limpieza del personal de la empresa colaboradora. La finalidad fue, por una parte, evaluar el cambio de brillo ocasionado por el tratamiento, así como la posible pérdida del recubrimiento tras contacto de los trabajadores.

El brillo especular ha sido medido con brillómetro BYK Gardner en los ángulos de incidencia 20°, 60° y 85°.



Figura 45. Medición de brillo de las diversas superficies tratadas en las instalaciones de las empresas colaboradoras.

Los valores de brillo de las distintas superficies se recogen en la siguiente tabla. Los valores sombreados en gris indican el grado de incidencia seleccionado para realizar las comparaciones entre valores antes y después de aplicar el tratamiento.

Tabla 16 Valores de brillo y sus desviaciones de las diversas superficies tratadas en las instalaciones de las empresas colaboradoras.

			Sin tratamiento			Con tratamiento		
			20°	60°	85°	20°	60°	85°
LIBERFUSTA	Tablero	Valor sd	1,9	13,6	23	1,2	8,3	10
			0,1	0,4	0,7	0	0,4	2,3
PALBOX	Manivela baño	Valor sd	351	305	97,5	106	127	55,2
			1,2	0,1	0,1	4,1	0,1	0,2
MOBERCAS	Polipiel	Valor sd	0,1	0,7	1,4	0,2	2	2,2
			0	0	0	0	0	0
	Cromado	Valor sd	47,7	60,4	20	22,5	32,7	17,2
			2	0,6	1,5	0	0	0
	Mando	Valor sd	1,8	10,1	20,3	1,6	10,2	13,4
			0	0	0,2	0	0	0

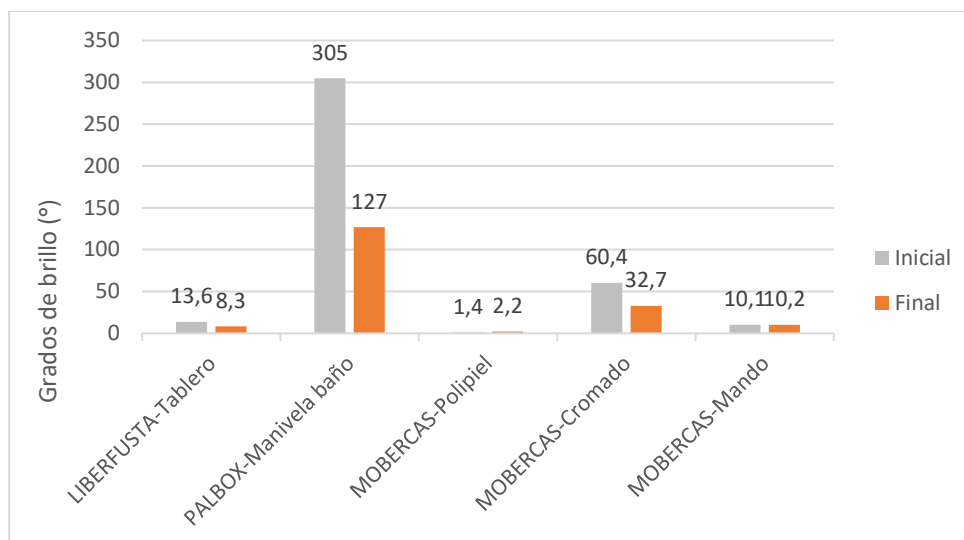


Figura 46. Gráfico comparativo de cambios de brillo de las distintas muestras antes y después del tratamiento.

Tras inspección visual por técnicos de AIDIMME se observó de forma genérica que los recubrimientos permanecen adheridos sobre el sustrato tras contacto y uso continuado de las superficies. Por este motivo, los cambios de brillo registrados se relacionan directamente con variaciones ocasionadas por el propio acabado superficial del tratamiento.

En superficies de alto grado de brillo como es el caso de la manivela de baño de la empresa PALBOX, S.L. registra la mayor pérdida de brillo seguida de la pieza cromada aplicada en MOBERCAS, S.L. En cambio, el tablero de LIBERFUSTA, S.L.U y la superficie polimérica del mando y polipiel no registraron apenas cambios de brillo. Como se comentó anteriormente, el brillo superficial del tratamiento desarrollado está abierto a modificaciones en función de las necesidades que se requieran.

Diferencias de color

Las coordenadas colorimétricas del espacio Ciel*ab se determinan con un colorímetro MINOLTA. Se miden las coordenadas L* a* y b* antes y después de aplicar el tratamiento de capa ligera sinérgico. Los valores indicados corresponden a la media de tres medidas realizadas. Las diferencias de color se representan mediante ΔE , y viene dada mediante la siguiente ecuación.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^2) + (\Delta b^2) + (\Delta a^2)}$$

Tabla 17 Resultados variaciones de coordenadas colorimétricas tras aplicación de tratamiento sinérgico.

Referencia	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE
Tablero verde - LIBERFUSTA	-0,33	-0,55	2,41	2,50
Tablero marrón - LIBERFUSTA	0,03	-0,08	0,82	0,82
Guía metálica blanca - PALBOX	0,22	-0,02	0,86	0,89
Mando camilla - MOBERCAS	-1,56	-0,07	0,83	1,77
Parte metálica brazo camilla - MOBERCAS	-1,37	1,47	1,66	2,60

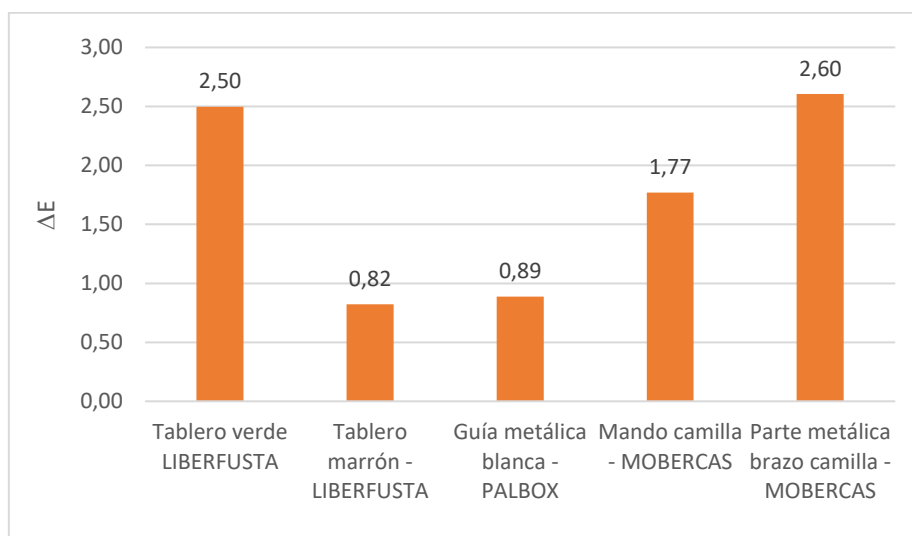


Figura 47. Gráfico de diferencias de color obtenidas en distintos soportes tratados.

Los tratamientos aplicados sobre el soporte lignocelulósico Tablero marrón y sobre el soporte metálico Guía metálica blanca presentaron un $\Delta E < 1$, siendo las diferencias de color imperceptibles al ojo humano. El tratamiento aplicado sobre sustrato polimérico Mando de la camilla registro un $\Delta E = 1,77$ diferencia apreciable al ojo humano. Principalmente se registró una disminución de la coordenada L^* , **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** es decir, el tratamiento oscureció ligeramente el acabado.

En cuanto al tablero verde, aunque visualmente no se observa un cambio de color significativo, se registró un $\Delta E = 2,50$. En este caso, principalmente la diferencia de color es debida al aumento en la coordenada b^* , **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** es decir, se registra un amarilleamiento del acabado.

Por último, el tratamiento aplicado sobre una parte metálica de un brazo de camilla registró un $\Delta E=2,60$. En este caso, se registra una ligera disminución de la coordenada L^* , con el consiguiente ligero oscurecimiento del recubrimiento. También se registró un aumento de las coordenadas colorimétricas a^* y b^* , es decir, un ligero cambio a tonos rojizos y amarillentos.

Aun obteniendo en algunos casos diferencias de color por encima de 1, visualmente, no se observaron cambios muy evidentes.

Resistencia del tratamiento a la adherencia sobre el sustrato

Uno de los objetivos de este desarrollo es la necesidad de poder retirar el tratamiento aplicado una vez finalizado su vida útil para ser de nuevo reaplicado tantas veces como sea necesario.

Para su comprobación, las superficies aplicadas fueron frotadas con un trapo de microfibras empapado en agua, ejerciendo presión manual o ligero rascado, con la finalidad de retirar el tratamiento en capa ligero.

Tras el frote de las superficies se observó que los tratamientos sobre sustrato lignocelulósicos, tableros de la empresa LIBERFUSTA, se consiguió eliminarlos con éxito, volviendo al sustrato inicial y sin dañar la superficie original.



Figura 48. Resistencia a la adherencia de sustratos lignocelulósicos.

El mismo comportamiento se observó en el recubrimiento sobre sustrato polimérico, mando de camilla de la empresa MOBERCAS, S.L. El tratamiento pudo eliminarse de forma satisfactoria tras frote con presión de la superficie. En cambio, el tratamiento aplicado sobre la polipiel en un brazo de una camilla resultó ser más complicado de retirar por completo.



Figura 49. Resistencia a la adherencia de sustratos poliméricos.

El tratamiento aplicado sobre sustratos metálicos también pudo ser eliminado de forma satisfactoria.

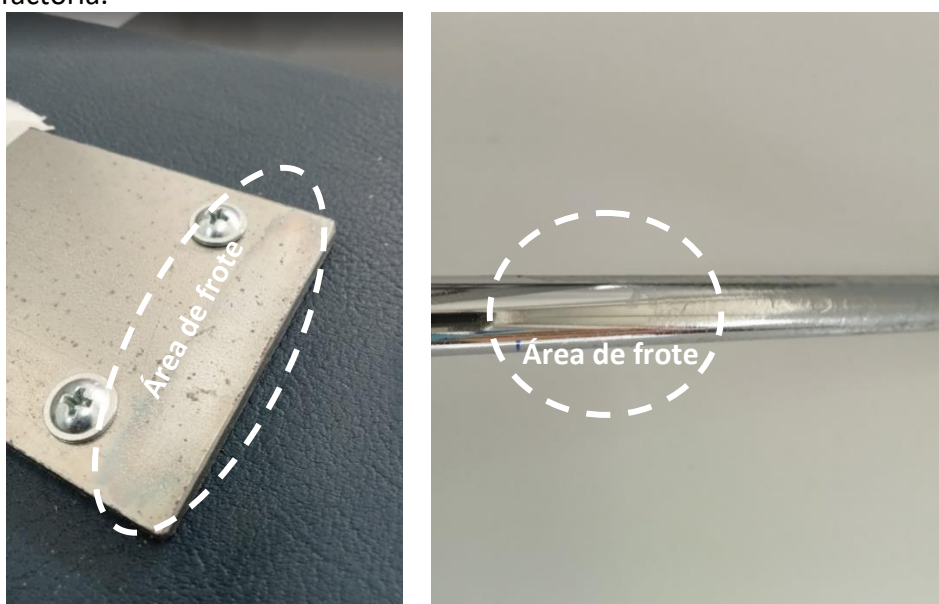


Figura 50. Resistencia a la adherencia del tratamiento sobre soporte metálico.

En sustratos con baja porosidad es posible retirar el tratamiento de forma satisfactoria mediante el frote de la superficie bajo presión manual en menos de 100 ciclos, o mediante un ligero rascado de los mismos. Este comportamiento fue deseado, puesto que se busca desarrollar un recubrimiento que sea posible su eliminación para reaplicarse tantas veces como sea necesario.

7. Estudio microbiológico de biocidas seleccionados.

Para la realización de este paquete de trabajo se reciben los biocidas mostrados en el E4.1.

Tabla 18 Biocidas recibidos y ensayados en el paquete de trabajo 6 en el proyecto SYNERGY.

Código
A
AG- B
Z
CH-1
L
E
M
SM
PG-L

Código
PG-ME
PG-E
Q-L
Q-M
T
MA
ALG-MA
TD-MA
ALG-T
TD-T
PG-SM

Inicialmente se realizaron algunas pruebas preliminares para comprobar si los compuestos recibidos/extraídos tenían cierta capacidad biocida. Se observó que no existía esta capacidad en las extracciones de T y MA realizadas con aceite de girasol.

Para los ensayos de este proyecto se prepararon diferentes materiales, medios y soluciones. Se utilizaron el caldo Mueller Hinton (MH) en el caso de la realización de ensayos de biocidas frente a bacterias y el medio RPMI 1640 en el caso de ensayar levaduras.

Este último medio, se recibió estéril y se utilizó en condiciones estériles de cabina de flujo. Cabe mencionar que este medio de cultivo es líquido y está esterilizado mediante filtrado, contiene HEPES, L-glutamina y es apto para cultivo celular. La formulación de cada uno de sus compuestos se muestra a continuación:

COMPONENTE	g/L		g/L
Sales inorgánicas		Aminoácidos	
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,1	L-Arginina · HCl	0,2
MgSO ₄ (anhidro)	0,04884	L-Asparagina · H ₂ O	0,05
KCl	0,4	Ácido L-aspártico	0,02
NaCl	6	L-Cistina · 2HCl · H ₂ O	0,0652
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	0,8	Ácido L-glutámico	0,02
Vitaminas		L-Glutamina	0,3
D-Biotina	0,0002	Glicina	0,01
Cloruro de colina	0,003	L-Histidina · HCl · H ₂ O	0,015

COMPONENTE	g/L		g/L
Ácido fólico	0,001	Hidroxiprolina	0,02
Mioinositol	0,035	L-Isoleucina	0,05
Niacinamida	0,001	L-Leucina	0,05
p-Aminobenzoic Acid	0,001	L-Lisina · HCl	0,04
Ácido D-pantoténico · ½Ca	0,00025	L-Metionina	0,015
Piridoxina · HCl	0,001	L-Fenilalanina	0,015
Riboflavina	0,0002	L-Prolina	0,02
Tiamina · HCl	0,001	L-Serina	0,03
Vitamina B12	0,000005	L-Treonina	0,02
Otros		L-Triptófano	0,005
D-Glucosa	2	L-Tirosina · 2Na · 2H ₂ O	0,02883
Glutación (reducido)	0,001	L-Valina	0,02
HEPES	4,77	Añadidos	
Rojo de Fenol · Na	0,0053	Bicarbonato de sodio	2

En el caso del caldo MH, también se utilizó un preparado comercial, conteniendo este la siguiente formulación:

- 2,0 g/L de extracto de carne.
- 17,5 g/L de hidrolizado de caseína.
- 1,5 g/L de almidón.

También se preparó tampón fosfato.

Procedimiento preparación inóculo

Se preparó para cada ensayo con cada bacteria, una solución de bacteria en tampón fosfato tomando unas cuantas colonias de la misma morfología con un asa de siembra y transfiriéndolas a un tubo con tampón fosfato.

7.1. Preparación del ensayo de Concentración Mínima Biocida (MIC y MBC)

Se realizaron ensayos de Concentración Mínima Biocida (MBC) de los compuestos frente a diferentes especies seleccionadas en el Paquete4: bacterias son *Enterococcus faecium* CECT 8224, *Staphylococcus aureus* DSM 2569, *Klebsiella pneumoniae* DSM 11618, *Acinetobacter baumannii* DSM 102929, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 111 y frente a la levadura *Candida auris*.

Para la realización de los ensayos MBC, partimos de valores MBC que aparecen en bibliografía. Se partió de las concentraciones indicadas en la tabla para cada biocida, y se fueron diluyendo a la mitad en cada pase.

Una vez realizadas varios MBCs de extractos concentrados se decidió realizar los ensayos en placas de 96 pocillos de 0,5 mL cada uno, en volúmenes de 0,4 mL, utilizando el mismo factor de dilución que en el ensayo con tubos. A la hora de calcular la MBC si el valor contado de UFC/mL es mayor que el 0,1% de la concentración de bacteria este valor sería la Concentración Mínima Inhibitoria (CMB) si este valor es menor que 0,1% de bacteria inicial es Concentración Mínima Biocida (MBC).

A continuación, se añadió 1,5 mL de cada dilución de los biocidas en el tubo de ensayo correspondiente conteniendo 1,5 mL del inóculo. De manera que la concentración final es la mitad de la preparada en 1,5 mL.

En el caso de los MIC/MBC en placas de pocillos, se prepara 0,2 mL de cada dilución de biocida y se añaden 0,2mL del inóculo a ensayar. En el caso de los tubos de mayor volumen, se agitó la mezcla, en el caso de las placas de pocillos se mezclaba con una pipeta. Finalmente se incubó en una cámara de cultivo durante 24 h a 37°C.



Figura 51 Gradilla con tubos de ensayos MIC de compuestos concentrados de e, l, B y q.

A las 24 horas se sembraron 100 μ L de cada dilución en una placa de TSA, incluidos el control positivo y negativo. Se incubó durante 24 horas y trascurrido este tiempo se evaluó el crecimiento de la bacteria o levadura inoculada en cada caso, mediante recuento de las colonias crecidas.



Figura 52 Sembrador asySpiral Dilute utilizado para sembrar las diluciones de los ensayos.

Se obtuvieron diferentes concentraciones mínimas biocidas frente a las diferentes especies nosocomiales por parte de los diferentes biocidas.

7.2. Ensayos sinergias

Se realizaron ensayos iniciales de sinergias en tubos de 5mL. Sin embargo, tras realizar pruebas y comparando con diferentes estudios bibliográficos [1] se decidió realizar ensayos sinérgicos de manera tradicional mediante el método de tablero en placas de 96 pocillos con 0,5mL de volumen cada pocillo.

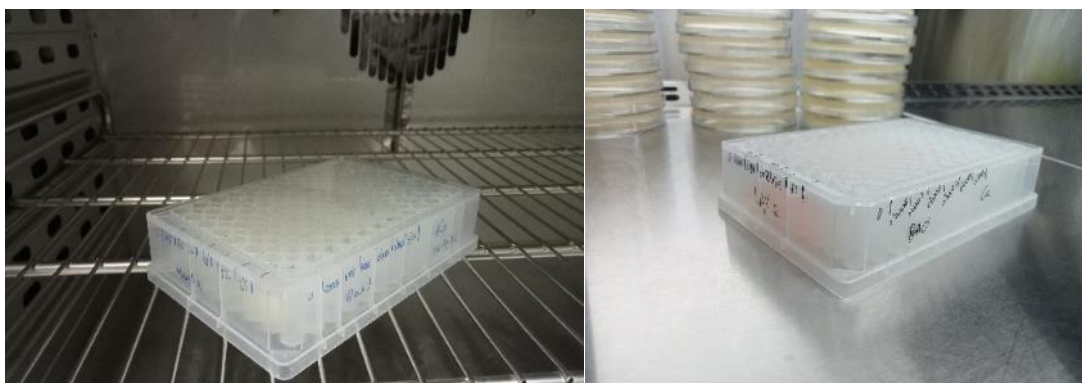


Figura 53 Placas de 96 pocillos preparadas para realizar el ensayo de método de tablero con dos biocidas diferentes frente a diferentes especies bacterianas.

Una vez incubada la placa se siembran 100μL de cada pocillo en una placa Petri de TSA bien etiquetada. Se incubaron 24h en el caso de las bacterias y 48h en caso de las levaduras. Después se evalúa el crecimiento que ha dado lugar en cada pocillo y se calcula el MBC de cada compuesto y el CBF. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la CBF.

$$1. \text{ CBF del biocida A} = \frac{\text{CMB del biocida A con el B}}{\text{CMB del biocida A}}$$

Posteriormente se calcula el Índice de la concentración biocida fraccional, ICBF, para cada combinación de la siguiente manera: ΣCBF (ICBF) = CBF A + CBF B. Y posteriormente los resultados obtenidos se interpretan según los siguientes valores.

- $\Sigma\text{CBF} \leq 0,5$: la combinación es sinérgica.
- $\Sigma\text{CBF} > 0,5 - \leq 4$: la combinación es indiferente.
- $\Sigma\text{CBF} > 4$: la combinación es antagónica.

En el caso de los ensayos frente a MRSA se observan los resultados de manera visual de actividad antibacteriana sinérgica realizada mediante el método de tablero en placas de 96 pocillos entre los biocidas Zy M-q, Zy L-q, Z y E-P, Z y B, Z y extracto de SM encapsulado y B y extracto de SM encapsulado y las concentraciones que han producido estas sinergias.

8. Estudio microbiológico de biocidas seleccionados.

Una vez obtenidas diferentes sinergias in vitro, se aplicaron diferentes recubrimientos a los que se añadieron mezclas de dos biocidas sinérgicos para posteriormente evaluar su capacidad antimicrobiana sinérgica aplicada. Además, se prepararon muestras con cada biocida por separado, y con la concentración biocida frente a la bacteria de ensayo. Los recubrimientos desarrollados en SYNERGY con los biocidas aditivados fueron elaborados en el paquete 5. Estos se ensayaron frente a las diferentes especies nosocomiales del proyecto siguiendo la metodología de ensayo indicada en la norma **ISO 22196:2019 “Measurement of antibacterial activity on plastic and other non-porous surfaces”**. La actividad antimicrobiana se valoró, según bibliografía, en función de la reducción logarítmica de bacterias viables (R).

En cuanto a los resultados, aquellos basados en resina al 40% con B, con M-Q, y con la mezcla de ambos no fueron efectivos frente a *P. aeruginosa*. Aquellos recubrimientos que funcionaron, en cuanto al aumento del contacto de las especies bacterianas con el biocida, fueron los formulados en resina al 7,5%.

Tabla 19 Actividad antimicrobiana en función de la reducción logarítmica de bacterias viables.

Actividad antimicrobiana insuficiente	R<2
Actividad antimicrobiana significativa	2<R<3
Actividad antimicrobiana fuerte	R>3

En cuanto a los resultados de los ensayos de la ISO 22196:2019 de este último recubrimiento mencionado con B y M-Q frente a *P. aeruginosa*, se observó que el recubrimiento con B al con M-Q sí mostró efecto antibacteriano, con un valor de reducción fuerte y en cuanto a los controles el B a mayor concentración también mostró una reducción logarítmica.

En el ensayo de recubrimientos preparados en base silicato, se observó efecto antimicrobiano en recubrimientos con B, sin embargo, la sinergia de B a y M-Q no dio lugar a efecto antimicrobiano frente a *P. aeruginosa*. Todos los recubrimientos a los que se les añadió las combinaciones sinérgicas, dieron lugar a efecto biocida con un valor de reducción de 2,9 y 2,8. En cuanto a los biocidas naturales M-Q, L-Q, E-PG, SM-PG a las concentraciones más altas, a las que se obtuvieron las sinergias, dieron lugar un efecto antibacteriano insuficiente, tal y como se esperaba, ya que no eran las CMB .

Sin embargo, los recubrimientos con los compuestos inorgánicos B por un lado, y Z por otro, mostraron efecto biocida. Inicialmente los recubrimientos con estos biocidas a concentración de sinergias deberían dar lugar a una actividad antibacteriana insuficiente

Por otro lado, sería posible conseguir un recubrimiento con una actividad sinérgica completa entre biocidas, ensayando las concentraciones más bajas de estas sinergias. O mediante la detección de concentraciones MBC directamente en recubrimientos frente a los biocidas Z y B frente a esta bacteria, y posteriormente la evaluación de sinergias de estos mismos con los biocidas naturales aplicados en el recubrimiento.

En cuanto a ensayos frente a *K. pneumoniae*, se observa una reducción fuerte de la población bacteriana en los recubrimientos con la mezcla sinérgica de los biocidas B y extracto de *SM*. En cambio, el recubrimiento con *SM* da lugar a una reducción insuficiente. En este caso no tenemos una sinergia, debido a que el B por sí solo a esta concentración tiene efecto biocida fuerte frente a la bacteria ensayada.

Conclusiones

Se extrajeron soluciones biocidas naturales mediante las metodologías de extracción sólido-líquido en equipo automatizado Soxtec y mediante maceración combinada con ultrasonidos de las especies vegetales **T** y **MA**. Aquellas extraídas en equipo automatizado Soxtec se encapsularon en alginato de calcio y en tierra de diatomea.

Por un lado, se recibieron los biocidas inorgánicos **B**, **A** y **Z**. Por otro se recibieron los biocidas naturales concentrados de **M**, **L**, **E** y extracto de **SM**. Estos últimos fueron encapsulados en Q y PG a concentración de 20% exceptuando el E que solamente se encapsuló con Pectina/Gel a la misma concentración, y el extracto de **SM** que se encapsuló en Pectina/Gel al 30%.

Se seleccionaron las especies *Enterococcus faecium*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* y *C. auris* presentes en su mayor parte a ESKAPE y a la Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios de 2024 y Fúngicos de 2022 de la OMS.

Tras una fase de optimización de formulaciones, se logró desarrollar formulaciones estables de matriz acrílica que actúa como vehículo polimérico compatible con los biocidas sintéticos (como B y Z) y biocidas naturales. Esta matriz permitió la liberación controlada del principio activo a través de la película seca, garantizando así una acción antimicrobiana.

Los recubrimientos obtenidos fueron aplicados sobre sustratos control y secados a temperatura ambiente para posteriormente ser preparados para su estudio microbiológico. En términos generales, las formulaciones mostraron una buena aplicabilidad y aspecto superficial, destacando las desarrolladas con B, que presentaron una mejor nivelación y acabado en comparación con las formuladas con Z. Los biocidas naturales mostraron de forma generalizada una excelente compatibilidad con la matriz acrílica, incorporándose de manera homogénea en todas las formulaciones ensayadas. No obstante, las formulaciones en base silicato presentaron un aspecto rugoso y deficiente nivelación, lo que limitó su idoneidad para aplicaciones finales.

Se lograron formular recubrimientos poliméricos de capa ligera con propiedades biocidas sinérgicas frente a microorganismos patógenos específicos, escalando a mayor cantidad su fabricación, confirmando la viabilidad técnica y funcional de las combinaciones seleccionadas para su futura aplicación en fómites en entorno hospitalario.

Como recubrimiento representativo para su aplicación sobre prototipos de sustratos facilitados por las empresas colaboradoras PALBOX, MOBERCAS y LIBERFUSTA, se seleccionó la formulación sinérgica FS 1.3.3. Esta formulación incorporó el biocida inorgánico B en combinación con microcápsulas con principio activo m encapsuladas en

q mediante técnica de coacervación compleja. Este recubrimiento desarrollado presentó una correcta compatibilidad entre componentes, resultando una capa ligera, transparente y homogénea, validada por la empresa PINTURAS BLATEM. Se redujo la toxicidad potencial para el medio ambiente al mismo tiempo que se introdujo un biocida de origen natural al sistema.

Los tratamientos de capa ligeros aplicados sobre los distintos sustratos resultaron tener un comportamiento superficial adecuado, transparente y sin alterar de forma perceptible la coloración original. En algunos casos, el tratamiento matizó superficies originalmente brillantes y, en otros casos, aportó mayor reflectancia a acabados mates. Ambos efectos podrían optimizarse mediante la incorporación de agentes matizantes o modificadores de brillo, por ejemplo.

Los tratamientos se aplicaron pulverizados en capa ligera, siendo el espesor final, así como la cantidad aplicada optimizable mediante estudios que lo relacionen con la durabilidad antimicrobiana y de desgaste en un uso real. También se observó que la humectación y nivelación del recubrimiento varía según el tipo de sustrato (lignocelulósico o metálico), recomendando estudios específicos para optimizar su acabado. En general, los tratamientos aplicados en este apartado mostraron un comportamiento satisfactorio, con anclaje correcto, acabado superficial aceptable y aplicación viables.

Las aplicaciones llevadas a cabo con pistola pulverizadora con aire comprimido, que permitió obtener recubrimientos uniformes, con buena nivelación y aspecto superficial correcto. La aplicación mediante pulverizador manual, se observó zonas con exceso o déficit de producto aplicado, resultando capas con menor homogeneidad.

De los resultados de caracterización del recubrimiento la formulación aplicada a los sustratos de las empresas evidenció tener una buena durabilidad y capacidad de limpieza de los mismos cuando se sometieron a la limpieza repetida de varios ciclos de frote en húmedo. Los tratamientos biocidas aplicados sobre sustratos con baja porosidad (como fueron los tableros, sustratos metálicos y poliméricos) fue posible retirar el tratamiento de forma satisfactoria mediante el frote continuado de la superficie bajo presión manual, o mediante un ligero rascado de los mismos. Este comportamiento fue deseado, puesto que este proyecto busca desarrollar un recubrimiento que sea posible su eliminación para reaplicarse tantas veces como se necesite, permitiendo así mantener la eficacia antimicrobiana. En cuanto a las propiedades estéticas y ópticas, las diferencias de color observadas entre sustratos tratados y no tratados fueron visualmente no significativas. El parámetro más relevante fue el cambio de brillo registrado, que resultó más notable en superficies brillantes (como es el caso de la manivela de baño y piezas cromadas) y prácticamente imperceptible en sustratos mates (tablero, superficie polimérica del mando y polipiel).

Las formulaciones desarrolladas presentan adecuadas propiedades de aplicación, compatibilidad con biocidas sinérgicos, buena estabilidad y capacidad antimicrobiana efectiva frente a bacterias patógenas específicas, cumpliendo con los objetivos propuestos en esta fase del proyecto.

Los resultados obtenidos suponen un avance en el desarrollo de los compuestos biocidas aplicados a recubrimientos, y la optimización en el uso de compuestos inorgánicos, mediante el uso de compuestos naturales que refuercen la capacidad de los primeros. Es especialmente remarcable la obtención de la sinergia de B con M-Q ensayados frente a la bacteria *P. aeruginosa*. Estos resultados abren una puerta para que en futuros estudios se continúen analizando las sinergias obtenidas frente a MRSA con menor concentración de biocidas aplicadas en el recubrimiento formulado. Así como continuar ensayando sinergias entre todos los biocidas inorgánicos en conjunción con los naturales procedentes de diferentes partes de especies vegetales frente a todas las especies nosocomiales problemáticas mencionadas en la Lista de Patógenos Bacterianos Prioritarios de 2024 y Lista de Patógenos Fúngicos Prioritarios de la OMS de 2022. Se ha de continuar con la aplicabilidad en un entorno real, para poder combatir la problemática creada por parte de estos microorganismos en hospitales y centros sanitarios.

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