

EVALUACIÓN DEL ÓXIDO DE TITANIO PARA EVITAR LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

Universitat Autònoma de Barcelona

Carolina Ripollès Àvila

Dirigido por: José Juan Rodríguez Jerez

Índice

Listado de abreviaturas	4
1. Introducción	5
1.1. Contexto	5
1.2. Hipótesis y objetivos	6
2. Materiales y métodos	7
2.1. Materiales	7
2.2. Métodos	8
2.2.1. Ensayos	8
2.2.2. Procedimiento	8
3. Resultados y discusión	11
3.1. Resultados	11
3.1.1. Primer ensayo	11
3.1.2. Segundo ensayo	12
3.1.3. Tercer ensayo	13
3.1.4. Cuarto ensayo	14
3.1.5. Quinto ensayo	15
3.1.6. Sexto ensayo	15
3.2. Discusión general	16
4. Conclusiones	18
5. Bibliografía	19
Anexo I: Ensayos	21

Listado de abreviaturas

BPW. Agua de peptona tamponada

NaCl. Cloruro sódico

TiO₂. Óxido de titanio

TSA. Agar con triptona y soja

UV. Radiación ultravioleta

1. Introducción

1.1. Contexto

La evolución del conocimiento en los últimos 50 años, nos ha llevado a la conclusión de que las bacterias no sólo se encuentran en forma individual sino que pueden formar biofilms (Costerton *et al.*, 1999). Éstos son bio-películas microbianas que crecen adheridas a superficies e inmersas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan (Rodríguez *et al.*, 2010).

Está contrastado, que la formación de biofilms es una estrategia adaptativa por parte de los microorganismos, ya que presentan 4 características (Rodríguez *et al.*, 2010): (I) Protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) Incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) Facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación, (IV) Posibilita la transferencia de material genético (DNA). Esta estrategia comporta que los métodos corrientes de limpieza y desinfección utilizados habitualmente en la industria alimentaria, puedan ser ineficaces (Donlan, 2002).

Por lo tanto, dado que la presencia de biofilms en la Industria Alimentaria es un gran problema, tanto tecnológico como de Salud Pública, es importante evitar la formación de éstos en las superficies que estén en contacto con alimentos o, si ya se han constituido, destruirlos.

Se han desarrollado diversos materiales con biocidas, pero es necesario demostrar su inocuidad, por el riesgo toxicológico de la migración de los biocidas. Una variante que podría

obtener buenos resultados es la utilización de TiO_2 , que bajo radiación UV y con humedad ambiental, permite un reacción fotocatalítica generando pares de protones y electrones excitados (Figura 1). Estos protones rompen una molécula de agua formando hidrógeno y un radical hidróxido. Los electrones reaccionan con la molécula de oxígeno formando radicales superóxido. Estas especies radioactivas son capaces de atacar y romper la

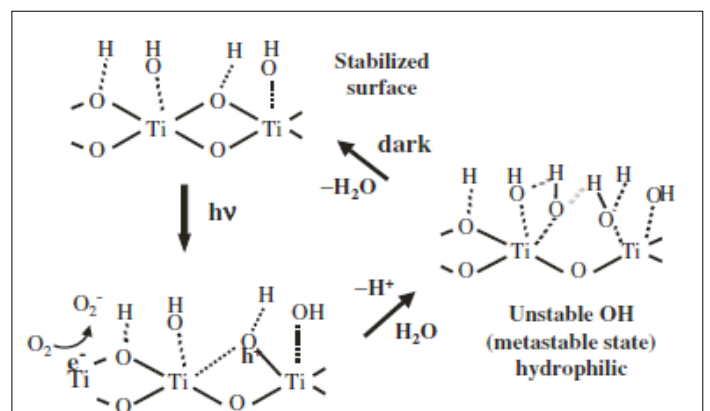


Figura 1. Cambios reversibles en los grupos hidroxilo en una película de TiO_2 bajo radiación UV y oscuridad (Hashimoto *et al.*, 2005).

membrana externa de la célula bacteriana, siendo capaz de inactivar microorganismos libres o agrupados en biofilms. Se han probado otros óxidos con la misma finalidad, pero se ha contrastado que el TiO_2 es la sustancia que tiene mayor eficacia, estabilidad y un coste más bajo (Hashimoto *et al*, 2005).

1.2. Hipótesis y objetivos

La hipótesis central del proyecto es:

- El TiO_2 , sometido a radiación ultravioleta, es capaz de controlar el crecimiento microbiano en superficies plásticas.

Los objetivos generales y específicos empleados para la realización del proyecto son:

- 1) Establecer una relación entre el TiO_2 y la eliminación de bacterias, de forma que se consiga un control sobre el crecimiento microbiano.
- 2) Aplicación de la ISO 27447:2009 y 22196:2007 para evaluar la eficacia antimicrobiana.
- 3) Estudiar las condiciones del ensayo y las concentraciones de biocida para conseguir evitar la formación de biofilms.

2. Materiales y métodos

El ensayo se basa en la determinación de la actividad fotocatalítica antibacteriana en superficies tratadas con TiO_2 y sometidas a luz UV. En el ensayo se incluyen controles, tanto de materiales no tratados, como sin TiO_2 y que son necesarias para determinar dicha actividad. Paralelamente al estudio, se han utilizado muestras para verificar si la recuperación del inóculo era efectiva.

2.1. Materiales

Para la realización de este ensayo se han utilizado los siguientes medios:

- Diluyente: se prepara con 1 litro de agua destilada, 1 g de triptona¹ y 8.5 g de NaCl ¹. Llevar a pH 7 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar en autoclave a $121\pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dispensar 9.9 ml y 9 ml en tubos estériles. Dejarlo en refrigeración entre $5-10^\circ\text{C}$.

- Neutralizante: preparado como el anterior pero con la adición de 30 g de Tween 80¹. Llevar a pH 7 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar en autoclave a $121\pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dispensar 10 ml en frascos estériles junto a 5 g de perlas previamente autoclavadas. Dejarlo en refrigeración entre $5-10^\circ\text{C}$.

- Placas y tubos de TSA²: 1 litro de agua destilada y 40 g de TSA. Llevar a pH 7 ± 0.2 a 25°C . Esterilizar en autoclave a $121\pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 min. Dispensar 10 ml en tubos e inclinarlos y 8 ml en placas de Petri. Dejarlo en refrigeración entre $5-10^\circ\text{C}$.

- Agua de peptona tamponada (BPW)³: tubos de 10 ml.

Como material utilizado y que tiene que estar estéril: dos bandejas de cristal, portaobjetos, papel de filtro, agua, asas, puntas para la pipeta, pinzas y film plástico para cubrir la superficie de las muestras.

¹ Panreac. Barcelona. España.

² Oxoid. UK.

³ BioMérieux S.A. Marcy L'Etoile. Francia.

La bacteria utilizada para este ensayo ha sido la cepa *Escherichia coli* CECT 515.

El recuento de bacterias se ha realizado con el sistema TEMPO (BioMérieux S.A. Marcy L'Etoile. Francia), después de calibrar el equipo, en comparación con el mismo en placa por cultivo tradicional, para la realización de los recuentos.

2.2. Métodos

2.2.1. Ensayos

Se ha colaborado en la puesta a punto de la norma ISO-27447:2009, lo que ha supuesto una dedicación del 40% de mi tiempo disponible.

A continuación se realizaron 6 series de ensayos, de acuerdo a la norma citada, que se encuentran expuestos en el *Anexo I*. Esto ha supuesto el análisis de un total de 6-24 muestras/semana.

2.2.2. Procedimiento

1) Previamente al ensayo se transfirieron, mediante siembra en estría, las bacterias almacenadas en tubo inclinado de TSA a placa de TSA, incubando a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. El siguiente paso fue la preparación del inóculo. Para ello, se diluyeron colonias bacterianas obtenidas a partir de placas de TSA a un tubo BPW, con el objetivo de conseguir un recuento entre 6.7×10^5 cél/ml y 2.6×10^6 cél/ml que equivale a <0.1 unidades Mc Farland. De este tubo se transfirió 1 ml a un tubo con 9 ml de diluyente, de forma que se obtiene una suspensión bacteriana de ensayo que es la que se utilizará para inocular.

2) Las muestras se colocaron en dos bandejas de cristal previamente autoclavadas, de forma que una se destinó al tratamiento en oscuridad y la otra en UV. Para ello, primeramente hay que colocar un papel de filtro en la parte inferior de la bandeja de forma que cubra toda la superficie y añadir 5 ml/muestra de agua estéril en el papel de filtro, para crear unas condiciones húmedas. Antes de colocar las muestras se intercalaron unos portaobjetos superpuestos con el fin de evitar el contacto entre la pieza que se va a evaluar y el papel de filtro. Las muestras se colocaron sobre los portaobjetos, con la superficie tratada hacia arriba.

3) Con una pipeta, se dispensaron 0.15 ml/muestra de la suspensión bacteriana de ensayo. A continuación, se colocó una película de plástico, cubriendo la gota dispensada en cada muestra. Posteriormente y con la ayuda de una punta de pipeta, se apretó ligeramente la película plástica, de forma que la suspensión bacteriana pueda extenderse bajo toda la superficie plástica, teniendo cuidado de que ésta no pueda sobrepasar la película de plástico.

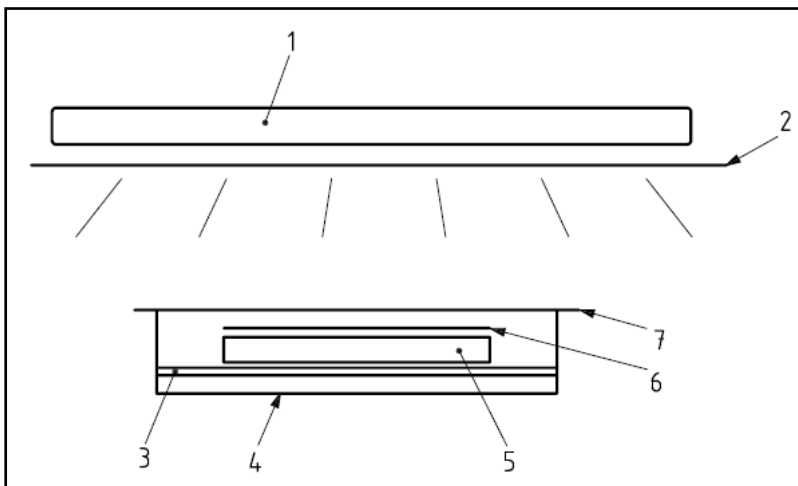
4) A continuación, se colocó un film plástico que cubrió toda la bandeja, para mantener las condiciones húmedas.

5) Para poder hacer los tratamientos con radiación UV y los controles oportunos, se montó una cámara donde se instalaron las muestras que iban a ser sometidas a UV (ensayo) o a oscuridad (control).

5.1) En el caso de someter las muestras a UV, se realizó un diseño donde poder hacer el tratamiento. El diseño constaba de una caja de cartón donde se cortaron linealmente los extremos, para poder colocar una plancha perforada que nos delimitaba la intensidad del tratamiento. La parte superior de la caja se cortó, de forma que pudiese albergar la lámpara UV.

5.2) En el caso de someter las muestras a oscuridad, la bandeja se envolvió con una bolsa negra y se colocó en el interior de una caja de cartón cerrada. Esta cámara se introdujo en un armario cerrado, de forma que no pudiese penetrar nada de luz.

6) Cada una de las bandejas se colocaron en su respectiva caja. En el caso de someter las muestras a luz UV, se instaló una lámina perforada y ajustó la lámpara UV a 360 nm. El tiempo de tratamiento fue de 4 h, de acuerdo con las condiciones determinadas por la norma para el ensayo rápido.



A continuación, se muestra como debe quedar el montaje (Figura 2).

Figura 2. Esquema global del montaje. Los números representan:

1. Lámpara UV
2. Plancha de acero perforada
3. Portaobjetos
4. Papel de filtro
5. Muestra
6. Film protector
7. Film para mantener condiciones húmedas

7) Para conocer exactamente el número de bacterias que se inocularon, se realizó el correspondiente control. Para ello se inocularon 0.1 ml de la suspensión bacteriana de ensayo a un tubo de diluyente con 9.9 ml y se agitó en vortex (dilución -2). Se traspasó 1 ml de la última dilución a un tubo con diluyente de 9 ml y se homogeneizó en vortex (dilución -3). Al igual que en el resto de ensayos, los recuentos se realizaron con el sistema Tempo. Para ello, se hidrató un vial de recuento total con 3 ml de agua estéril. Una vez hidratado, se añadió 1 ml de la dilución -3 y se procedió al llenado de las tarjetas correspondientes. Posteriormente se introdujeron los registros en el ordenador para el seguimiento de las muestras. Se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 40-48 h.

8) Una vez pasadas las 4 h de tratamiento se procedió al recuento de células viables. Para ello, se tomaron las bandejas donde se encontraban las muestras y se colocaron en la zona de trabajo. Se despegó el film plástico de la superficie de la muestra y se colocó junto con la muestra en un frasco con neutralizante y perlas de vidrio, para proceder a la recuperación bacteriana. El conjunto se agitó en vortex durante 1.5 minutos

Entonces, se tomaron 0.1 ml y se añadieron a un tubo con 9.9 ml de diluyente (dilución -2) y se homogeneizó en vortex. Se tomaron 0.1 ml de la última solución y se inocularon a otro tubo con 9.9 ml de diluyente (dilución -4), agitando posteriormente en vortex. Una vez realizados estos pasos, se pasó a la siembra del medio para el sistema Tempo, que se realizó del mismo modo que en el control de inóculo. Para cada muestra se sembraron 2 diluciones (-2 y -4).

9) Finalmente se procedió a la lectura de las tarjetas en TEMPO y se realizaron los cálculos para determinar el valor de la actividad fotocatalítica antibacteriana.

3. Resultados y discusión

3.1. Resultados

3.1.1. Primer ensayo

Este ensayo se ha realizado por duplicado para obtener unos resultados más objetivos. Éstos se van a expresar en la siguiente tabla:

Primeros resultados			Segundos resultados		
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica
Polímero acrílico con TiO ₂ (placa de petri)	UV	2,05	Polímero acrílico con TiO ₂ (placa de petri)	UV	2,95
Polímero acrílico con TiO ₂ (bandeja cristal)	UV	2,01	Polímero acrílico con TiO ₂ (bandeja cristal)	UV	2,81
Control polímero acrílico (placa de petri)	UV	1,65	Control polímero acrílico (placa de petri)	UV	2,25
Control polímero acrílico (bandeja cristal)	UV	1,87	Control polímero acrílico (bandeja cristal)	UV	2,29
Cerámica tratada (placa de petri)	UV	2,29	Cerámica tratada (placa de petri)	UV	2,48
Cerámica tratada (bandeja cristal)	UV	2,16	Cerámica tratada (bandeja cristal)	UV	3,75
Control cerámica (placa de petri)	UV	0,98	Control cerámica (placa de petri)	UV	0,55
Control cerámica (bandeja cristal)	UV	1,15	Control cerámica (bandeja cristal)	UV	0,81

Los resultados muestran que no hay una gran diferencia entre la reducción logarítmica obtenida por las muestras depositadas en placa de Petri o en bandeja de cristal, de forma que el material donde se colocarán las muestras para someterlas al tratamiento será la bandeja de cristal, ya que es más cómodo de utilizar y no se gasta tanto material.

Por otra parte, también se puede observar que la diferencia entre el polímero acrílico con TiO₂ y su respectivo control no llega a 0,5 log, indicando que el control en tratamiento UV también tiene un cierto efecto en la reducción de la carga microbiana. En cambio, en el caso de la cerámica tratada, la diferencia es mucho mayor, indicando que ésta tiene una mayor

efectividad en la reducción de la carga microbiana.

3.1.2. Segundo ensayo

Los resultados obtenidos en este ensayo se van a expresar en la siguiente tabla. En este caso también se han duplicado para una mejor comparación de los resultados.

Primeros resultados			Segundos resultados		
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,97	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,96
Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	1,94	Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	1,73
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,87	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,7
Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,06	Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,11
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	2,74	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	1,88
Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	0,17	Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	2,17
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	2,12	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	2,16
Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	1,74	Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	2,04

Como se quiere observar si hay una cierta actividad fotocatalítica antibacteriana, se han realizado los cálculos correspondientes a la norma de referencia y se han obtenido los siguientes resultados referentes a dicha actividad:

Material	R _L *	ΔR*
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	1,198	0,797

*donde R_L es el valor de la actividad fotocatalítica antibacteriana después de la irradiación con UV a una intensidad L y donde ΔR es el valor de la actividad fotocatalítica antibacteriana después de la irradiación con UV.

Se puede observar, tal y como se muestra en el valor obtenido de R_L, que las muestras tratadas por UV tienen una reducción considerable de la carga microbiana, pero que a su vez, esta

carga microbiana se ve reducida también en oscuridad, es por esto que ΔR se reduce. Este dato nos indica que el propio material ejerce un efecto en la reducción de las bacterias.

3.1.3. Tercer ensayo

Los resultados obtenidos en este ensayo se van a expresar en la siguiente tabla. En este caso también se han duplicado para una mejor comparación de los resultados.

Primeros resultados			Segundos resultados		
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	2,12	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,99
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	2,15	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	UV	1,74
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	UV	4,23	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	UV	4,48
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	UV	4,23	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	UV	4,48
Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,19	Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,13
Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,05	Control Pintura de recubrimiento alimentario	UV	2,22
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	1,95	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	2,08
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	1,74	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	Oscuridad	2,01
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	Oscuridad	4,23	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	Oscuridad	4,48
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	Oscuridad	4,23	Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	Oscuridad	4,48
Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	2,05	Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	1,95
Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	2,03	Control Pintura de recubrimiento alimentario	Oscuridad	2,10

Como se quiere observar si hay una cierta actividad fotocatalítica antibacteriana, se han realizado cálculos y se han obtenido los siguientes resultados referentes a dicha actividad:

Material	R _L	ΔR
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂	-0,225	-0,158
Pintura de recubrimiento alimentario con TiO ₂ + aditivo antimicrobiano	2,217	-0,129

En el caso de la pintura de recubrimiento alimentario con TiO₂ se puede observar que el material, tanto si es expuesto a UV como en oscuridad, la reducción logarítmica que se obtiene es muy similar. Por este motivo, el

cálculo de R_L y ΔR es negativo, mostrando que no hay actividad fotocatalítica antibacteriana. Por otra parte, en los resultados obtenidos en la pintura con TiO₂ y un aditivo antimicrobiano, se puede ver como hay una elevada reducción de la carga microbiana, pero tanto en los controles como en aquellas muestras tratadas con TiO₂, indicando que es el aditivo antimicrobiano el que juega el papel fundamental en la reducción de la carga microbiana. Esto también se demuestra en el cálculo de R_L y ΔR.

3.1.4. Cuarto ensayo

Como este ensayo es solo para verificar la efectividad del TiO₂, no se ha realizado una segunda tanda de análisis.

Primeros resultados			
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Media
Portaobjetos recubierto con TiO ₂	UV	0,36	0,27
Portaobjetos recubierto con TiO ₂	UV	0,32	
Portaobjetos recubierto con TiO ₂	UV	0,13	
Control portaobjetos recubierto con agua	UV	0,25	0,31
Control portaobjetos recubierto con agua	UV	-0,01	
Control portaobjetos recubierto con agua	UV	0,71	

Los resultados obtenidos indican que no se genera prácticamente una reducción en la carga microbiana. Por este motivo, se quiere observar si cambiando la forma en la que se inoculan las bacterias, en el mismo material, podría tener algún efecto directo en la reducción de éstos.

3.1.5. Quinto ensayo

Como en el caso anterior, este ensayo tiene la finalidad de comprobar la eficacia del TiO₂, por lo que tampoco se ha realizado una segunda tanda de análisis.

Primeros resultados			
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Media
Portaobjetos recubierto con TiO ₂ + film + inoculo + film	UV	2,01	1,82
Portaobjetos recubierto con TiO ₂ + film + inoculo + film	UV	1,59	
Portaobjetos recubierto con TiO ₂ + film + inoculo + film	UV	1,86	
Control portaobjetos recubierto con agua + film + inoculo + film	UV	2,15	1,95
Control portaobjetos recubierto con agua + film + inoculo + film	UV	1,88	
Control portaobjetos recubierto con agua + film + inoculo + film	UV	1,81	

Con el cambio en la forma de inoculación, se puede observar que hay una mayor reducción en la carga microbiana. Por otra parte, como la reducción en los portaobjetos tratados con TiO₂ como en la de los controles es muy similar, incluso superando esta reducción los controles, se piensa que ha podido haber una deshidratación.

3.1.6. Sexto ensayo

En este ensayo tampoco que ha realizado una segunda tanda con los mismos análisis, ya que solo se quería comparar *grosso modo* qué TiO₂ tenía mejores resultados. A continuación se muestra la tabla con los resultados obtenidos.

Primeros resultados			
Material	Tratamiento expuesto	Reducción logarítmica	Media
TiO ₂ (D>20µm) + inóculo en superficie	UV	1,4	1,275
TiO ₂ (D>20µm) + inóculo en superficie	UV	1,15	
TiO ₂ (D<20µm) + inóculo en superficie	UV	1,58	1,79
TiO ₂ (D<20µm) + inóculo en superficie	UV	2	
Control agua + inóculo en superficie	UV	1	1,095
Control agua + inóculo en superficie	UV	1,19	
TiO ₂ (D>20µm) + inóculo en film	UV	1,4	1,475
TiO ₂ (D>20µm) + inóculo en film	UV	1,55	
TiO ₂ (D<20µm) + inóculo en film	UV	1,58	1,58
TiO ₂ (D<20µm) + inóculo en film	UV	1,58	
Control agua + inóculo en film	UV	1,38	1,34
Control agua + inóculo en film	UV	1,3	

En este caso, los resultados muestran como el TiO₂ con un diámetro de partícula más pequeño de 20 µm tiene más efecto que el TiO₂ con mayor diámetro. Por otra parte, inoculando en superficie o mediante un film que ejerce de material conductor, no hay mucha diferencia.

3.2. Discusión general

Hay una gran cantidad de bibliografía que indica las posibilidades de la actividad fotocatalítica de diferentes materiales. Esta actividad se basa en el empleo de diferentes óxidos metálicos, pero ha despertado un especial interés el óxido de titanio, considerado el óxido con mayor potencial económico y tecnológico (Hashimoto *et al*, 2005). Sin embargo, la manera en como se aplica este óxido y el diámetro de la partícula empleada juegan un papel esencial (Fujishima *et al*, 2006).

En este sentido, nuestros resultados han demostrado que existe una actividad antimicrobiana propia de la radiación UV empleada, que es difícil de separar de la actividad debida a la fotoactivación de óxido de titanio. Nuestros resultados nos indican que, en algunas ocasiones, las reducciones de la carga microbiológica inoculada, sobre los materiales estudiados, no era significativamente diferente a la producida por la propia radiación UV.

No obstante, la eficacia observada está alrededor de 1 log y esta es dependiente del material estudiado. Así, para la pintura de recubrimiento alimentario, la eficacia detectada fue de 0,80

log, pero con el vidrio, la eficacia fue nula.

Por este motivo, se planteó la posibilidad de añadir un aditivo antimicrobiano que pudiese potenciar la actividad biocida del óxido de titanio. Sin embargo, al añadir un aditivo que pueda potenciar la acción antimicrobiana, el efecto fotocatalítico queda enmascarado por la acción principal de la sustancia añadida. En este caso, la reducción de la carga microbiana fue superior a los 4 logs (100%), mientras que la acción fotocatalítica fue nula. Estos resultados nos indican que debe existir una reacción entre el óxido de titanio y otros compuestos bioactivos, lo que permite poner de manifiesto la acción antimicrobiana del aditivo principal y anular la acción fotocatalítica.

Por otra parte, el tamaño de partícula juega un papel importante (Fujishima *et al*, 2006). Nuestros resultados demuestran que al tener un diámetro de partícula entre los 10 y 20 μm ., la eficacia aumentaba, respecto a los tamaños superiores (40-60 μm). No obstante, seguimos detectando una gran influencia de la radiación UV, así como una gran variabilidad en los resultados obtenidos. Uno de los factores que se han identificado, con una gran influencia en los resultados, es la deshidratación de las muestras de ensayo. El sistema obliga a crear unas condiciones relativamente complejas, donde hay que integrar unos soportes, una lámpara, la muestra inoculada, más los controles y todo ello incluido en una caja que impida la acción de cualquier tipo de radiación lumínica. Esto puede afectar a los niveles de humedad de la muestra y de los controles, lo que puede distorsionar algo el resultado.

El efecto del diámetro de partícula ya ha sido descrito, por cuanto las nanopartículas demuestran una eficacia mayor en varios estudios publicados recientemente (Dědková *et al*, 2014). No obstante, debido a que la EFSA no se ha mostrado partidaria de las nanopartículas, hasta que se demuestre su total inocuidad para los consumidores, parece interesante el poder realizar estudios científicos que nos permitan conocer los factores que afectan a la fotoactivación, a fin de poder aplicar esta tecnología de acuerdo con la legislación vigente.

4. Conclusiones

1. El óxido de titanio es una sustancia que manifiesta actividad fotocatalítica, aunque esta actividad es dependiente del tamaño de partícula y de las condiciones del ensayo.
2. Es necesario mejorar las condiciones del ensayo para poder reducir la variabilidad de las muestras y controlar la deshidratación que se produce durante el período de evaluación.
3. El tipo de material puede jugar algún papel en la eficacia fotocatalítica de los óxidos metálicos, aunque es necesario estudiarlo con más detalle para confirmar esta conclusión.
4. Al utilizar sustancias con actividad fotocatalítica, es importante el controlar la presencia de otras sustancias biocidas, puesto que su presencia puede anular completamente la acción de los óxidos metálicos.

5. Bibliografía

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 21 de mayo de 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-22

Dědková K., Matějová K., Lang J., Peikertová P., Kutláková K.M., Neuwirthová L., Frydryšek K., Kukutschová J. 18 de abril 2014. Antibacterial activity of kaolinite/nanoTiO₂ composites in relation to irradiation time. *Journal of photochemistry and Photobiology*. 135C:17-22.

Donlan, R.M. 9 de setiembre de 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Disponible en: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm]

Fujishima A., Zhang X. 2006. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*. 9:750-760.

Gamage, J., Zhang, Z. 28 de junio de 2010. Applications of Photocatalytic Disinfection. *The Scientific World Journal*. (en prensa)

González Rivas, F. 2005. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad desinfectante *in situ* de productos limpiadores comerciales. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Hashimoto, K., Irie, H., Fujishima, A. 2005. TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. *Japanese Journal of Applied Physics*. 44:8269-8285

Peña, S.T. 12 de mayo de 2010. Los biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. Disponible en: [<http://www.vigilanciasanitaria.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>]

Ranjit K. N., Zain, F.M., Kadhum, H.A. 2009. Photocatalysis- A Novel Approach for Solving Various Environmental and Disinfection Problems: A Brief Review. *Journal of Applied Sciences Research*. (en prensa)

Rodríguez, L.D., Sáez, A.C., Barón, A.M., Peña, S.T. 2010. Informe AESAN en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista Comité Científico*. 12:37-59

Salas Vázquez, D.I. 2007. Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies

alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Fujishima A., Zhang X. 2006. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. *Comptes Rendus Chimie*. 9:750-760.

Anexo I: Ensayos

1. Primer ensayo

Este primer ensayo no se realizó para comprobar si se detectaba actividad fotocatalítica antibacteriana, sino para observar si existía reducción logarítmica al someter las muestras a radiación UV. Es por ello que no se han sometido muestras a controles en oscuridad.

Los materiales evaluados en este primer ensayo fueron una cerámica tratada y un polímero acrílico. Para hacer las muestras de este último material hubo que preparar 2 muestras tratadas con el 1% de TiO₂ y 2 muestras no tratadas, las cuales hacían de control. Se emplearon moldes de 4x4 cm para dispensar las muestras. Se preparó un volumen de 7 ml/muestra. Se dejó secar 48 h a una temperatura de 30±2°C. El total de muestras que se prepararon fue de 8, de las cuales 4 estaban tratadas con el 1% de TiO₂ y las otras 4 no, ya que ejercían el papel de controles. Estas muestras fueron las necesarias para hacer 2 ensayos por semana.

Se realizó exactamente el mismo procedimiento indicado en el punto 2.2.1, con las diferencias de que no se sometió ninguna muestra a la oscuridad y que se colocó una muestra tratada y una control en la bandeja y las restantes en dos placas de Petri diferentes para verificar qué sistema sería mejor para utilizar en el ensayo.

2. Segundo ensayo

Este segundo ensayo se ha realizado para observar si hay una cierta actividad fotocatalítica antibacteriana. Es por ello que se han sometido muestras a UV y a oscuridad.

El material evaluado es diferente. En este caso se ha utilizado pintura de recubrimiento alimentario. La preparación consistió en hacer 4 muestras del material con 1% de TiO₂ y 4 muestras control. Se utilizaron moldes de 4x4 cm para dispensar las muestras. El volumen también fue de 7 ml/muestra. Se dejó secar durante 48 h a una temperatura de 30±2°C. Se tuvo en cuenta que al poder hacer dos ensayos durante la semana, se debían preparar 16 muestras, de las cuales 8 estaban tratadas al 1% con TiO₂ y las 8 restantes fueron los controles del ensayo.

Se realizó el mismo procedimiento indicado en el punto 2.2.1 para evaluar la actividad fotocatalítica antibacteriana.

3. Tercer ensayo

Este tercer ensayo tuvo la misma finalidad que el anterior. El material evaluado fue el mismo: pintura de recubrimiento alimentario, sumándole también muestras de esta pintura con adición de un aditivo antimicrobiano.

La preparación consistió en hacer 4 muestras de pintura de recubrimiento alimentario con el 1% de TiO₂ y 4 muestras control de este mismo material. Además, se prepararon 4 muestras del mismo material con el 1% de TiO₂ y con 5% de un aditivo antimicrobiano. Se utilizaron moldes de 4x4 cm para dispensar las muestras y el volumen fue de 7 ml/muestra. Se dejó secar durante 48 h, en este caso, a una temperatura de 60±2 °C, para forzar la reacción entre TiO₂ y el aditivo antimicrobiano.

Como en los casos anteriores, se realizó el procedimiento indicado en el punto 2.2.1 para evaluar la actividad fotocatalítica antibacteriana.

4. Cuarto ensayo

Este cuarto ensayo se diseñó con la finalidad de observar si el TiO₂ tenía algún efecto directo en la reducción logarítmica bacteriana, ya que hasta este momento no se obtienen los resultados esperados. Es por ello que tampoco se van a someter muestras a la oscuridad.

En este caso se prepararon 3 portaobjetos recubiertos con una solución de TiO₂ al 1% y 3 muestras recubiertas con agua que actuaron como controles. Se añadieron 0,5 ml/muestra de recubrimiento y se dejó secar durante 24 h a 30±2 °C.

5. Quinto ensayo

Al igual que en el ensayo anterior, se diseñó con la finalidad de observar si el TiO₂ tenía algún efecto directo en la reducción logarítmica de las bacterias, ya que con el ensayo anterior no se obtuvieron buenos resultados, de forma que se quería comprobar si era efectiva la

inoculación de otra forma distinta.

La preparación se realizó de la misma forma que en el caso anterior. Se recubrieron 3 portaobjetos con una solución de TiO_2 al 1% y otros 3 portaobjetos sólo con agua (controles). Se añadieron 0,5 ml/muestra de recubrimiento. Se dejó secar durante 24 h a 30 ± 2 °C. En este caso, no se inoculó la superficie tratada o control, sino que se depositó en la superficie un film plástico donde se dispensó el inóculo y este se volvió a tapar con otro film plástico. Con este ensayo simulamos que el material analizado tenía una capa semi-conductora y otra aislante.

6. Sexto ensayo

En este ensayo se quería comprobar si, en las superficies de acero inoxidable, el TiO_2 induce alguna reducción logarítmica en el recuento de bacterias. Además, se evaluó la influencia del tamaño de partícula del TiO_2 .

La preparación se realizó tomando 12 discos de acero inoxidable. 4 de ellos se recubrieron con una solución de TiO_2 al 1% (20-40 μm), 4 se recubrieron con otra solución de TiO_2 al 1% (10-20 μm). Los 4 discos restantes se recubrieron con agua, ejerciendo un papel de control. Se añadieron 0,2 ml/muestra de recubrimiento, ya que son unas superficies más pequeñas. Se dejaron secar durante 24 h a 30 ± 2 °C. En este caso, 6 discos se trataron como en el ensayo 4 (inóculo directamente en la superficie tratada). Las otras 6 se trataron como en el ensayo 5 (inóculo encima de una película plástica que se encuentra en contacto con la superficie tratada, simulando que esta película hace de capa semi-conductora).