

## 7. ANEXOS.

### 1. Espectrometría de masas.

A continuación se describen las características técnicas de la técnica así como el método empleado.

La columna utilizada es Phenomenex ZB-5MS de dimensiones 30m x 0.25mm x 0.25 µm. La temperatura del inyector es 250°C con un Split 1:10. El flujo total de Helio es de 14 mL/min. Se emplea la siguiente rampa de temperatura:

1. 50°C durante 1 min.
2. Aumentar la temperatura a 10°C/min hasta alcanzar los 160°C.
3. Aumentar la temperatura 20°C/min hasta alcanzar los 200°C.
4. Aumentar la temperatura 40°C/min hasta alcanzar los 300°C.
5. Mantener a 300°C durante 3 min y 30 segundos.

El detector es un masas con fuente de ionización eléctrica. La temperatura de la fuente de iones y de la interfase es de 200°C. El voltaje del detector es variable según la calibración del equipo pero está siempre entre 0.8-1 kV.

Se hace un análisis entre 35 y 300 unidades de masa.

Los tiempos de retención para los analitos se muestran en la Tabla 1.

Analito	Tiempo de retención (min)
Limoneno (P.I.)	6,9
Carvacrol	10,9
Timol	10,9
Cinamaldehído	10,7

Tabla 1. Tiempos de retención para los distintos analitos.

El hecho de que Carvacrol y Timol presenten un tiempo retención similar no presenta ningún problema ya que los analitos siempre se analizan por separado.

## 2. Preparación del medio de cultivo bacteriano y las concentraciones de partículas en bacterias.

### 2.1. Preparación del caldo de cultivo TSB.

En una botella de 0,5 L se pesan 15 gramos de TSB y se adicionan 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se autoclava dicha botella a 121 °C y posteriormente se almacena en nevera.

## 2.2. Concentraciones de partículas en bacterias.

A continuación en las Tablas 2-9 se detallan las preparaciones de las concentraciones tanto de niosomas como de NPs con PLGA encapsulando los distintos EO, para trabajar en los ensayos microbiológicos.

Tabla 2. Preparación de concentraciones de niosomas vacíos.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,05 mg/mL</b>	400 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3581 $\mu$ L TSB
<b>0,1 mg/mL</b>	800 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3181 $\mu$ L TSB
<b>0,2 mg/mL</b>	1600 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2381 $\mu$ L TSB
<b>CONTROL +</b>	11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3981 $\mu$ L TSB

Tabla 3. Preparación de concentraciones de Carvacrol en niosomas.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,0010 mg/mL</b>	1666 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2314 $\mu$ L TSB
<b>0,0015 mg/mL</b>	2500 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 1481 $\mu$ L TSB

Tabla 4. Preparación de concentraciones de Timol en niosomas.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,0010 mg/mL</b>	2162 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 1819 $\mu$ L TSB
<b>0,0015 mg/mL</b>	3243 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 738 $\mu$ L TSB

Tabla 5. Preparación de concentraciones de Cinamaldehído en niosomas.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,0010 mg/mL</b>	2000 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 1981 $\mu$ L TSB
<b>0,0015 mg/mL</b>	3000 $\mu$ L Niosomas + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 981 $\mu$ L TSB

Tabla 6. Preparación de concentraciones de PLGA vacías.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,25 mg/mL</b>	345 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3636 $\mu$ L TSB
<b>0,5 mg/mL</b>	690 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3291 $\mu$ L TSB
<b>1 mg/mL</b>	1379 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2602 $\mu$ L TSB
<b>2 mg/mL</b>	2759 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 1222 $\mu$ L TSB
<b>2,4 mg/mL</b>	3310 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 671 $\mu$ L TSB
<b>CONTROL +</b>	11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3981 $\mu$ L TSB

Tabla 7. Preparación de concentraciones de Carvacrol en PLGA.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,05 mg/mL</b>	1540 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2441 $\mu$ L TSB
<b>0,1 mg/mL</b>	3070 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 911 $\mu$ L TSB

Tabla 8. Preparación de concentraciones de Timol en PLGA ..

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,05 mg/mL</b>	363 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3618 $\mu$ L TSB
<b>0,1 mg/mL</b>	727 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3254 $\mu$ L TSB
<b>0,2 mg/mL</b>	1454 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2527 $\mu$ L TSB

Tabla 9. Preparación de concentraciones de Cinamaldehido en PLGA.

Concentración	Cantidad a añadir
<b>0,05 mg/mL</b>	689 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 3292 $\mu$ L TSB
<b>0,1 mg/mL</b>	1379 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 2602 $\mu$ L TSB
<b>0,2 mg/mL</b>	2768 $\mu$ L PLGA + 11 $\mu$ L bacterias (10E7) + 8 $\mu$ L estreptomicina + 1223 $\mu$ L TSB

### 2.3. Preparación de placas de agar y TSA.

En una botella de 0,5 L se pesan 20 gramos de TSA y se adicionan 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se autoclava dicha botella a 121 °C. A continuación cuando la botella aun está caliente, se adicionan 500  $\mu$ L de Estreptomicina y se va depositando el agar en placas. Una vez que se ha secado el agar, se guardan las placas en cámara fría quedando dispuestas para su uso.