

## 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.

Juan Miguel Pardo Fanlo

## 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 EOs, 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 µL Niosomas + 11 µL bacterias (10E7) + 8 µL estreptomicina + 3581 µL TSB
<b>0,1 mg/mL</b>	800 µL Niosomas + 11 µL bacterias (10E7) + 8 µL estreptomicina + 3181 µL TSB
<b>0,2 mg/mL</b>	1600 µL Niosomas + 11 µL bacterias (10E7) + 8 µL estreptomicina + 2381 µL TSB
<b>CONTROL +</b>	11 µL bacterias (10E7) + 8 µL estreptomicina + 3981 µL TSB

Tabla 3. Preparación de concentraciones de Carvacrol en niosomas.

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

Tabla 4. Preparación de concentraciones de Timol en niosomas.

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

Tabla 5. Preparación de concentraciones de Cinamaldehído en niosomas.

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

Tabla 6. Preparación de concentraciones de PLGA vacías.

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

Tabla 7. Preparación de concentraciones de Carvacrol en PLGA.

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

Juan Miguel Pardo Fanlo

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

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

Tabla 9. Preparación de concentraciones de Cinamaldehido en PLGA.

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