

---

Facultad de Ciencias

**GRADO EN QUÍMICA**  
**TRABAJO FIN DE GRADO**

*SENSORES DE RADIACIÓN  
ULTRAVIOLETA.  
APLICACIONES EN  
COSMÉTICA*

Presentado por:

**D./D<sup>a</sup>. María José Guerrero Dionisio**

**Curso académico 2021/2022**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. Qué es la radiación ultravioleta .....	2
1.2. Tipos de piel y el efecto de la radiación UV sobre ellos .....	3
1.3. Importancia de los filtros solares .....	3
1.4. Sensores para detectar radiación solar .....	4
2. OBJETIVOS .....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
3.1. Materiales .....	8
3.1.1 Materiales y equipos .....	8
3.1.2 Reactivos y disoluciones stock .....	8
3.2. Métodos .....	9
3.2.1 Experimento solubilidad PMA en DMSO .....	9
3.2.2 Efecto de los filtros en disolución .....	9
3.2.2.1 EHS como filtro en disolución .....	9
3.2.2.2 AB como filtro en disolución .....	9
3.2.2.3 EHT como filtro en disolución .....	10
3.2.3 Prueba filtros sobre el sensor .....	10
3.2.3.1 Prueba filtros sobre el sensor en gota seca.....	10
3.2.3.2 Filtros secos sobre TFF y PMA/LA fijado en papel .....	11
3.2.4 Prueba filtros frente a la irradiación de bacterias .....	11
3.2.5 Prueba filtros frente a la irradiación de células .....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
4.1. Experimento solubilidad de PMA en DMSO .....	14
4.2. Efecto de los filtros en disolución .....	15
4.2.1 EHS con PMA/LA .....	15
4.2.2 AB con PMA/LA .....	16
4.2.3 EHT con PMA/LA .....	17
4.3 Prueba filtros sobre sensor .....	18
4.3.1 Gota seca sobre tapadera y sensor en disolución .....	18
4.3.2 Prueba filtros sobre sensor fijado en papel. ....	19
4.4 Uso de PMA/LA como filtro químico .....	20

4.4.1 Bacterias .....	20
4.4.2 Células.....	22
5. CONCLUSIONES .....	24
6. BIBLIOGRAFÍA .....	25

## **RESUMEN**

Hoy en día es muy conocido el efecto nocivo que tiene la radiación ultravioleta procedente del sol sobre la piel humana. Es por ello por lo que cada vez más están apareciendo en el mercado sensores relacionados con la detección de la misma. Este es el caso del sensor en el que se basa este trabajo y que funciona avisándonos del exceso solar mediante un cambio de color de los reactivos que lo componen (el polioxometalato PMA y ácido láctico). Sin embargo, a pesar de estar preparado para detectar los tres tipos de radiación UV (UVA, UVB y UVC) y de que se adapta a todos los colores de piel, este no tiene en cuenta el efecto protector de usar protección solar en forma de crema. En este trabajo, se han llevado a cabo una serie de experimentos con el objetivo de optimizar este sensor mediante la incorporación al mismo de los filtros solares químicos más típicos en cremas solares: salicilato de octilo (EHS), avobenzona (AB) y etilhexil triazona (EHT). De este modo, se ha estudiado la posibilidad de incorporarlos en la mezcla de reactivos que cambian de color o la opción de aplicarlos sobre el propio prototipo del sensor. Los resultados preliminares indican que la forma más correcta de incorporar los filtros solares sería sobre el propio sensor, ya que esto evita interferentes en los reactivos y problemas como la precipitación de los mismos o la utilización de disolventes químicos fuertes en vez de agua. En una segunda aproximación, se ha estudiado también la posibilidad de emplear los reactivos base del sensor como un propio filtro solar que indique que se ha agotado mediante un cambio de color. Para ello, se ha estudiado la protección que ejercen estos reactivos sobre bacterias y células cuando estas se exponen a radiación ultravioleta. Los resultados indican que la mezcla PMA-láctico podría ser empleada como filtro solar.

**PALABRAS CLAVE:** radiación UV, polioxometalatos, filtros químicos solares, sensores.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Qué es la radiación ultravioleta.*

A día de hoy es conocida la importancia que tiene la protección ante la radiación ultravioleta (UV). Ésta se trata de radiación electromagnética con una longitud de onda entre los 100 y 400 nm, lo que coincide con la parte más energética del espectro electromagnético que incide sobre la superficie terrestre, por lo que el sometimiento a la misma ocasiona efectos perjudiciales en la salud.

Se distinguen 3 grupos de radiación ultravioleta: UVA (320-400 nm) que alcanza la superficie terrestre, UVB (280-320 nm), que se retiene entorno al 90% en la atmósfera gracias al ozono y al oxígeno y UVC (100-280 nm) que es retenida totalmente por la atmósfera y no alcanza la superficie terrestre. Una mayor longitud de onda indica que la radiación es menos energética, por lo tanto, la más energética sería la radiación UVC. [1]

La medición constante de la radiación ultravioleta permite conocer su comportamiento, su relación con la biosfera y la salud humana. La radiación UVA al entrar en contacto con la piel provoca un cambio de color a un tono más oscuro, es decir, se broncea, debido a que incide sobre las células pigmentarias que se encuentran justo debajo de la capa externa de la piel, epidermis, y provoca que liberen melanina. [2]

La melanina es una proteína que protege la piel, es abundante en personas de raza negra y escasa en personas de raza blanca. Dicha escasez está relacionada con ser más propensas al desarrollo de enfermedades cutáneas.

Una exposición prolongada y sin protección a radiación solar UVA deja de broncear la piel y pasa a provocar quemaduras solares que a largo plazo pueden provocar problemas graves como cáncer. Hay 3 tipos de quemaduras: de primer, segundo y tercer grado. Las de primer grado enrojecen e irritan la epidermis y las de segundo y tercer grado llegan a capas más profundas provocando otras lesiones más graves como ampollas.

Si las radiaciones UVB y UVC llegan a la superficie ocasionan una serie de daños: [1,3]

- Cáncer de piel y otros trastornos cutáneos.
- Cataratas y trastornos de la vista.
- Envejecimiento prematuro.
- Inhibición del sistema inmunitario.
- Daños en materiales y equipos expuestos a la radiación directa.

## 1.2 *Tipos de piel y el efecto de la radiación UV sobre ellos.*

Existen diferentes tipos de piel, denominados fototipos, cada uno de los cuales requiere unas precauciones a la hora de someterse a radiación solar. Hay 6 fototipos:

- Fototipo 1: Propio de la piel muy clara y extremadamente sensible a la radiación solar. Nunca llega a broncearse, siempre se quema.

- Fototipo 2: Corresponde a la piel muy sensible a la radiación solar, normalmente se quema, pero ocasionalmente llega a broncearse. Esta piel presenta un color rojizo.
- Fototipo 3: Sigue siendo piel muy sensible a la radiación solar, que se puede quemar con regularidad y solo alcanza un ligero bronceado.
- Fototipo 4: Ya la piel no es tan sensible a la radiación solar y no suele quemarse.
- Fototipo 5: Corresponde a piel resistente a radiación solar y casi nunca llega a quemarse, altamente resistente a radiación UVA, su aspecto es bronceado durante todo el año.
- Fototipo 6: Esta piel es muy resistente a la radiación solar, corresponde a la piel de raza negra.

Se recomienda planear las actividades con antelación y evitar la exposición al aire libre en las horas de mayor radiación solar, un tiempo de exposición saludable depende del fototipo y de la intensidad de la radiación UV. [4-5]

### *1.3 Importancia de los filtros solares.*

Los filtros solares son moléculas capaces de absorber la radiación ultravioleta para evitar que la radiación dañina entre en contacto directo con la piel. Estos absorben y esparcen la radiación UV. Su uso protege la piel y previene futuros problemas. [6]

Productos fotoprotectores son indispensables para una práctica responsable de la exposición a la radiación solar. Existen generalmente 3 tipos de filtros solares según su modo de acción:

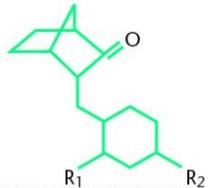
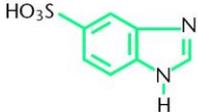
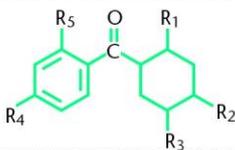
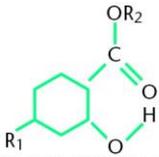
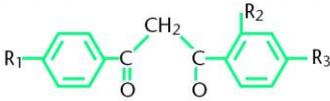
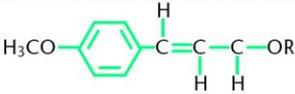
- Físicos: Reflejan la radiación solar. Se utilizan para evitar directamente el bronceado y las quemaduras. Este tipo de filtros se recomiendan en personas altamente sensibles a la radiación solar como en niños, pieles alérgicas u otros problemas cutáneos a los que la radiación solar no beneficia como cicatrices.
- Químicos: Se trata de moléculas orgánicas con grupos cromóforos en la región UV del espectro electromagnético. Actúan absorbiendo la radiación UV y emitiéndola como radiación térmica. Estos filtros requieren 30 minutos para llevar a cabo su función por lo que es necesario emplearlos con antelación a la exposición solar. Son los más utilizados, pero hay riesgo de intolerancia en los casos indicados en las personas a las que se le recomienda usar filtros físicos. En la tabla 1 se indican las estructuras de los grupos cromóforos de los filtros solares actuales.

Estos filtros aportan una protección para las radiaciones UVA y UVB así como una mínima penetración en la piel.

- Biológicos: Se trata de antioxidantes que evitan la formación de radicales libres. Actúan contra el envejecimiento cutáneo y los cánceres de piel, que son efectos a largo plazo de una exposición prolongada al sol. [7-8]

Los filtros solares utilizados en cremas son en su mayoría químicos, en concreto los más comunes son los filtros estudiados salicilato de octilo (EHS), avobenzona (AB) y etilhexil triazona (EHT).

Tabla 1: Estructuras de los grupos cromóforos de los filtros solares actuales. [8]

Filtros químicos	Grupo cromóforo
Acrilatos	
Derivados de los benzimidazoles	
Derivados de las benzofenonas	
Derivados de los salicilatos	
Derivados del dibenzoilmetano	
Ésteres cinamatos	

#### 1.4. Sensores para detectar radiación solar

El daño que produce la radiación UV es observable tanto en personas, vegetales u objetos que se expongan directamente durante un tiempo prolongado a ésta, ya que la piel sufre por la aparición de quemazón acompañado de un aspecto rojizo, las plantas se secan, y los materiales se deterioran rápidamente. Un ejemplo muy común son los toldos que tras estar constantemente expuestos a radiación solar se ve como la tela se debilita y se rompe con facilidad. Por eso controlar la radiación ultravioleta incidente y desarrollar sensores es tan importante.

El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este trabajo ha desarrollado recientemente un sensor colorimétrico en forma de pulsera utilizando papel de filtro como soporte de reactivos y papel para transparencias como filtros solares (*Transparency Film Filters*, TFF, en inglés). La química de este sensor se trata de una disolución del polioxometalato ácido fosfomolibdico (PMA) y ácido láctico que se aplica y se deja secar sobre el papel de filtro a modo de tinta invisible la cual vira a color azul tras un tiempo de exposición a la radiación. Los polioxometalatos (POMs) son compuestos químicos

que consisten normalmente en grupos polianiónicos, formados por dos o tres oxoaniones de metales de transición (Mo, V, W, etc...) unidos mediante átomos de oxígeno para formar estructuras tridimensionales cerradas. De entre todas las aplicaciones que presentan, está la de actuar como materiales electrocromáticos ya que estos cambian de color, generalmente hacia un color intenso, al ser reducidos de forma química o mediante luz en presencia, o no, de donores de electrones. [9] En el caso concreto del sensor mencionado, el PMA, cambia a azul por acción de la luz UV y el donador de electrones ácido láctico. [10]

El prototipo del sensor (Figura 1) consiste por tanto en 4 emoticonos dibujados sobre el papel de filtro con dicha tinta invisible que es la mezcla PMA-láctico, que a medida que aumenta el tiempo de exposición a radiación UV van apareciendo de izquierda a derecha en color azul. Esta aparición gradual se consigue gracias a la utilización de los TFF como filtros solares en diferente número sobre los emoticonos, de manera que el último de estos siempre tendrá más capas de TFF que el primero.[10]

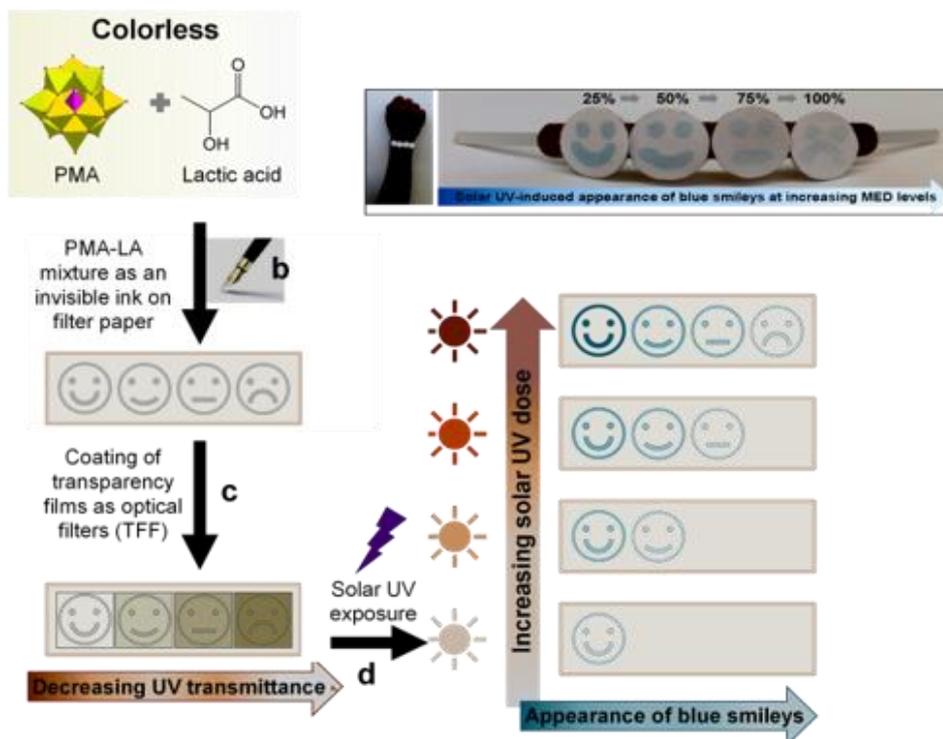


Figura 1. Funcionamiento del sensor solar basado en el empleo de PMA-láctico. [10]

Por otro lado, el sensor es sensible a los tres tipos de radiación UVA, UVB y UVC, ya que a mayor energía de la radiación más rápido actúa el sensor, por lo que la aparición del color azul será más rápida ante intensidades de UV más altas. Por otro lado, los TFF permiten adecuar el sensor a los diferentes fototipos de piel previamente descritos, de modo que, a mayor número de capas de TFF utilizadas en el sensor, mayor será el número del fototipo de piel para el que usar el sensor y mayor también la resistencia de este a la radiación solar (Figura 2).

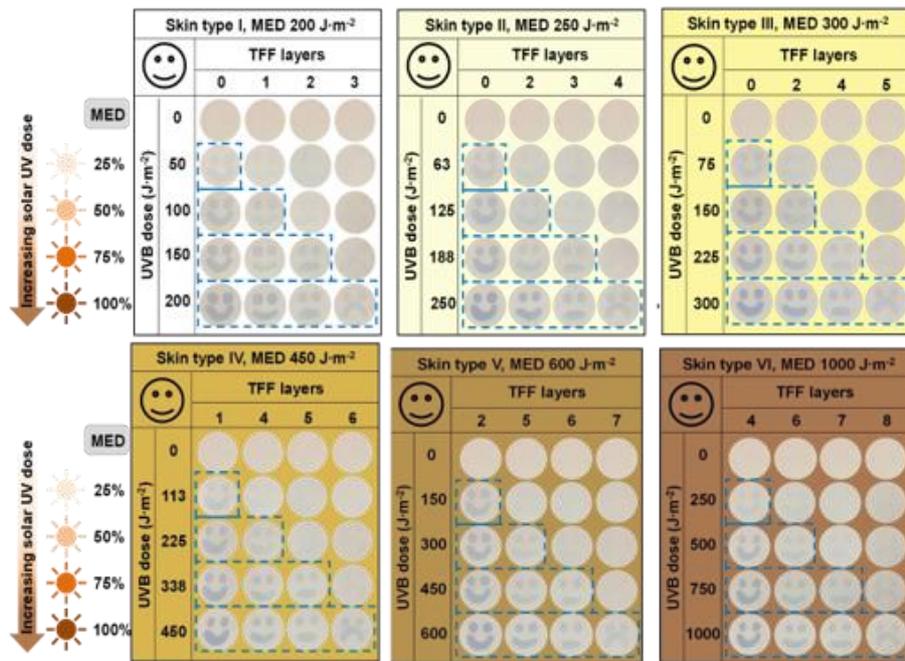


Figura 2. Descripción del sensor para cada uno de los diferentes fenotipos de piel, indicando el diferente número de TFF que se utiliza en cada caso. [10]

A pesar de todo lo mencionado, al igual que otros sensores en el mercado, este presenta una desventaja clara, no tiene en cuenta la utilización de cremas solares que contienen filtros químicos. En este documento se requiere comprobar la compatibilidad y eficiencia de los filtros solares con el sensor, así como estudiar la posibilidad de que estos sean incorporados al mismo. Lo que se pretende, por tanto, sería retrasar la aparición del color azul en el sensor durante el tiempo en el cual los diferentes filtros solares que incorporan estos cosméticos ejercen su papel sobre la piel. Estudiar cómo, cuándo y dónde colocar estos filtros utilizando AB, EHT y EHS como modelo es lo que se describe a continuación en este trabajo.

## 2. OBJETIVOS

En general el objetivo principal de este trabajo es optimizar el sensor de radiación UV ya existente y previamente desarrollado por el mismo grupo de investigación, de manera que se pueda asemejar aún más a una situación real donde se emplea crema solar protectora. Para ello, pretendemos estudiar cómo incorporar al sistema tres filtros solares químicos muy utilizados en cremas comerciales y que ya se han mencionado antes: EHS, AB y EHT. Se persiguen por tanto dos hipótesis para esta incorporación: i) añadir los filtros a la mezcla PMA-láctico en disolución para su posterior fijación en el soporte que utiliza el sensor; ii) fijar los filtros sobre las diferentes capas de TFF que utiliza el sensor. Más detalladamente los objetivos se describen como:

1. Estudiar la posible utilización del sensor tal y como se describe en la actualidad en otro disolvente, ya que los filtros solares podrían requerirlo. Para ello se estudiará la solubilidad y actividad del PMA y de la mezcla PMA-láctico en DMSO.
2. Comprobar posibles interacciones del sistema PMA-láctico o del PMA solo con los filtros, por ejemplo, posibles precipitaciones en disolución.
3. Incorporar los filtros sobre el sensor y no en disolución. Para ello se estudiará si los filtros funcionan sobre la mezcla PMA-láctico en disolución depositándolos en la tapadera de la placa. Posteriormente, se evaluará el efecto sobre un prototipo de sensor a fabricar.
4. Por último, se pretende estudiar la capacidad del sistema PMA-láctico como filtro solar. Para ello se evaluará el efecto protector de la mezcla sobre bacterias y células y se comparará su actividad con la de los filtros solares ya mencionados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales.

##### 3.1.1 Materiales y equipos.

Para pesar los reactivos sólidos se ha utilizado una balanza BOECO Balance BAS 31 plus con sensibilidad de 0.1 mg.

La medida de absorbancias se lleva a cabo mediante espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis), para ello son utilizadas placas de 96 pocillos que son medidas en el equipo Nanoquant Infinite M200 Pro, lo que permite medir la absorbancia puntual o el espectro completo de varias muestras rápidamente e incluso fijar unas condiciones de temperatura determinadas.

A lo largo de este trabajo se han utilizado varios tipos de fuentes de luz UV, se comenzó usando una lámpara para cosmética Jiadi 36Watt Nail Gel Curing UV lamp, formada de 4 bombillas halógenas de 9 Watios y con una longitud de onda máxima de 365 nm (luz UVA). Además, se emplea un esterilizador UV para utensilios cosméticos PHY-6UVS-1 con fuente de luz de 235 nm (UVC).

##### 3.1.2 Reactivos y disoluciones stock.

Los reactivos utilizados en este trabajo han sido el polioxometalato ácido fosfomolibdico, PMA ( $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}$ , CAS: 51429-74-4) y los filtros solares: salicilato de octilo, EHS ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ , CAS: 118-60-5), avobenzona, AB ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_3$ , CAS: 70356-09-1), etilhexil triazona, EHT ( $\text{C}_{48}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_6$ , CAS: 88122-99-0). Además, se emplea ácido láctico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ , CAS: 79-33-4) y dimetil sulfóxido, DMSO, ( $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ , CAS: 67-68-5) como disolvente. Por último, se utiliza MRS para hacer el medio de cultivo de bacterias y MTS para revelar la viabilidad celular. Todos los reactivos mencionados se obtienen de Sigma- Aldrich.

La disolución stock de PMA de 25 mM está formada de 913 mg de PMA en 20 mL de agua destilada y la de 20 mM de 730.4 mg de PMA en 20 mL de agua destilada. La conservación de estas disoluciones es a temperatura ambiente y protegidas de la luz ambiental.

La disolución stock de ácido láctico es de 60 mM y se prepara tomando 0.89  $\mu\text{L}$  de una disolución 13.42 M a la que se añaden 199.11  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Esta disolución se conserva también a temperatura ambiente.

Para la disolución del sensor que corresponde a la mezcla PMA-láctico 1:60, partiendo de una disolución stock de PMA 20 mM se toman 800  $\mu\text{L}$  y el ácido láctico se prepara a partir de stock 13.42 M tomando 4.47  $\mu\text{L}$  se finaliza añadiendo 195.53  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

Los filtros solares se preparan utilizando DMSO como disolvente, ya que su solubilidad en agua es escasa. Sabiendo, por tanto, el dato de solubilidad de cada uno de ellos, para AB ( $s = 50 \text{ mg/mL}$ ), se cogen 6,7 mg y se disuelven en 223  $\mu\text{L}$  de DMSO; para EHT ( $s = 30 \text{ mg/mL}$ ), se toman 1.2 mg y se disuelven en 40  $\mu\text{L}$  de DMSO; para EHS ( $s = 100 \text{ mg/mL}$ ), se toman 98.6  $\mu\text{L}$  que se completan hasta 1 mL con DMSO. Las concentraciones de los filtros en mM son, por tanto: 96.6, 36.45 y 399.5 mM para AB, EHT y EHS, respectivamente. Las disoluciones de los filtros en DMSO se conservan a  $-20^\circ\text{C}$  descongelándolas previamente a su uso.

### **3.2. Métodos.**

#### *3.2.1 Experimento solubilidad de PMA en DMSO.*

Se mezcla una concentración constante de PMA (1 mM) con diferentes concentraciones en volumen de DMSO, siendo estas de 0%, 10%, 25%, 50% y 75% en volumen, y se completan hasta los 200  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Para ello, se toman alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de la disolución 20 mM de PMA que se ponen en pocillos de una placa de 96 pocillos. A continuación, se añade el DMSO y/o agua para completar el volumen de la siguiente forma; la disolución de 0% de DMSO es 190  $\mu\text{L}$  de agua destilada; la de 10% de DMSO se forma a partir de 20  $\mu\text{L}$  de DMSO y 170  $\mu\text{L}$  de agua destilada; para la disolución de 25% se mezclan 50  $\mu\text{L}$  de DMSO y 140  $\mu\text{L}$  de agua destilada; la de 50% se compone de 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y 90  $\mu\text{L}$  de agua destilada; y la disolución de 75% de DMSO está formada de 150  $\mu\text{L}$  de DMSO y 40  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

Se miden las absorbancias a 700 y 820 nm de los diferentes pocillos en el Nanoquant, a 0 y 30 minutos y luego tras irradiar 30 minutos de luz ultravioleta a la muestra con la lámpara de cosmética. Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

Para evaluar el comportamiento del sensor en DMSO, en una placa se preparan 2 pocillos con 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 y 190  $\mu\text{L}$  de DMSO, otros 2 con 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 y 190  $\mu\text{L}$  de agua destilada, y, por último, dos pocillos con 190  $\mu\text{L}$  de DMSO y 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

#### *3.2.2 Efecto de los filtros en disolución*

##### *3.2.2.1 EHS como filtro en disolución.*

Se preparan en la placa de 96 pocillos un gradiente de concentraciones del filtro EHS de 0, 1, 10, 20, 30 y 39.95 mM. Se añaden para ello desde la disolución stock 399.5 mM de EHS, 0, 5, 50.06, 100.13, 150.19 y 190  $\mu\text{L}$  respectivamente. Además, se añade a todos los pocillos 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 previamente preparada y se completan los pocillos con la cantidad de DMSO adecuada para tener un volumen final en todos de 200  $\mu\text{L}$ . Todas las muestras se preparan por duplicado. Se miden absorbancias a 700 y a 820 nm en Nanoquant. Se llevan a cabo 3 medidas, a 0 min, 30 min y tras 30 min de luz ultravioleta con la lámpara de cosmética.

Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

##### *3.2.2.2 AB como filtro en disolución.*

Se prepara en la placa de 96 pocillos un gradiente de concentraciones del filtro AB de 0 mM, 0.5, 2, 4, 6 y 8.38 mM como concentración máxima. Para obtener las diferentes concentraciones se añaden desde la disolución stock 96.6 mM de AB en DMSO 0, 5.37, 21.48, 42.96, 64.44 y 90  $\mu\text{L}$  respectivamente. Además, se añade a todos los pocillos 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60, completándose el volumen de los pocillos hasta 100  $\mu\text{L}$  con DMSO. Todas las muestras se preparan por duplicado. Se miden absorbancias a 700 y a 820 nm en Nanoquant. Se llevan a cabo 3 medidas, a 0 min, 30 min y tras 30 min de luz ultravioleta con la lámpara de cosmética.

Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

### *3.2.2.3 EHT como filtro en disolución.*

Como en el experimento anterior se va a llevar a cabo en una placa de 96 pocillos preparando un gradiente de concentraciones del filtro EHT de 0 mM, 1, 5, 15, 25 y por último 32.8 mM. Para ello se añaden desde la disolución stock 36.45 mM de EHT en DMSO 0, 2.74, 13.7, 14.16, 68.6, 90  $\mu\text{L}$  respectivamente. Los pocillos contienen todos 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 y se van a llevar a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con DMSO. Todas las muestras se preparan por duplicado. Se miden absorbancias a 700 y a 820 nm en Nanoquant. Se llevan a cabo 3 medidas, a 0 min, 30 min y tras 30 min de luz ultravioleta con la lámpara de cosmética.

Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

### *3.2.3 Prueba filtros sobre el sensor.*

#### *3.2.3.1 Prueba filtros sobre el sensor en gota seca*

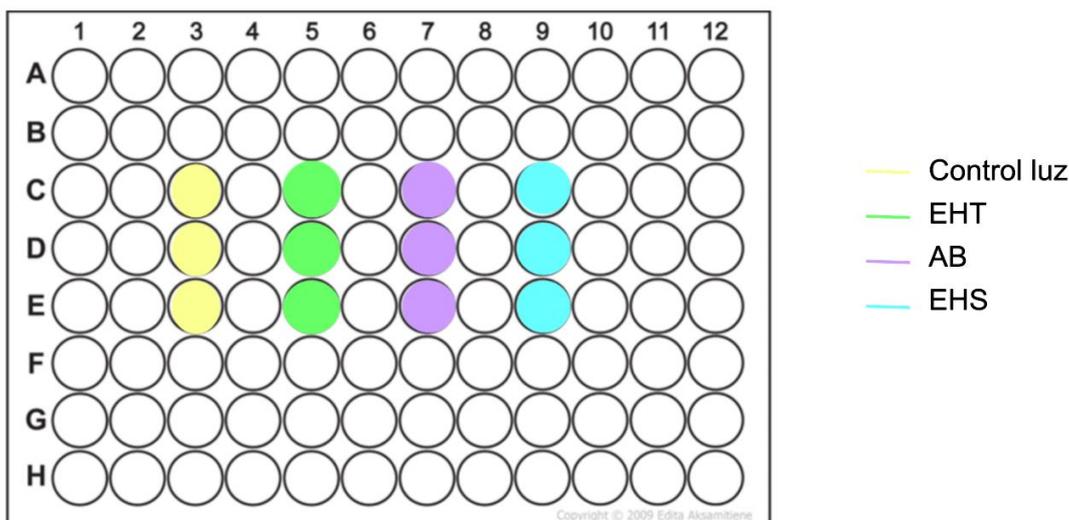
Se toman alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 preparada anteriormente y que se van añadiendo a diferentes pocillos en una placa de 96. En la tapa de la placa, sobre cada pocillo y en diferentes filas, se colocará una gota de 60  $\mu\text{L}$  de DMSO, EHS, AB y EHT según corresponda. También se prepara una fila sin nada en la tapa que se usará como control.

Los filtros están en suspensión en agua destilada. No es posible utilizar DMSO para fijar los filtros puesto que no evapora tan fácilmente como el agua y ocasiona problemas con el material plástico de la tapadera de las placas. Las gotas de suspensión de los filtros están compuestas en el caso de AB por 2.88 mg en 60  $\mu\text{L}$  de agua destilada, y en el caso del filtro EHT 1.44 mg en 60  $\mu\text{L}$  de agua en cada gota. El filtro EHS se añaden los 60  $\mu\text{L}$  directamente ya que es líquido. Las gotas van a ser llevadas a sequedad hasta obtener una capa fina de los filtros en sólido.

La distribución en tapa se lleva a cabo de forma que para cada filtro se miden 3 pocillos y queden lo más centrados posible en la placa y según se indica en el esquema 1, entonces:

- Columna 3: no se coloca nada en la tapa, es el control (color amarillo).
- Columna 5: Se colocan las gotas con la suspensión del filtro EHT (color verde).
- Columna 7: Se colocan las gotas con la suspensión del filtro AB (color morado).
- Columna 9: Se colocan las gotas con la suspensión del filtro EHS (color azul).

La placa se introduce en la lámpara de uñas y se aplican tiempos cortos de luz ultravioleta, midiendo en intervalos de 5 min hasta un tiempo final de 215 min. Las muestras se preparan por triplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.



Esquema 1: Esquema de la tapa de la placa.

### 3.2.3.2 Filtros secos sobre TFF y PMA/LA fijado en papel

Se prepara un prototipo de sensor cuyo soporte se trata de papel de filtro. El trozo de papel tiene unas dimensiones de 12 cm x 8 cm, y en este se marcan 4 filas y 4 columnas. Cada columna corresponde a un filtro, EHS, AB y EHT, dejando una para el control. Por su parte, cada fila corresponde al sensor adaptado a un color de piel diferente, lo que se consigue cubriendo el papel de filtro con diferentes capas de papel de acetato para transparencias, TFF (transparency film filters en inglés) tal y como se describe en *W. Zou et al.* [3]

Se añade sobre las diferentes posiciones del papel de filtro una gota de 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla PMA-láctico 1:60 y se deja secar.

A continuación, se colocan las diferentes capas de TFF y seguidamente sobre ellas, el filtro correspondiente de forma que cubra la gota de la mezcla PMA-láctico seca y fijada en el papel de filtro. Los filtros se colocan como en los experimentos anteriores, para el AB se prepara una suspensión de 20 mg en 240  $\mu\text{L}$ , de la que se colocan 4 gotas de 60  $\mu\text{L}$ . Para el EHT se ponen 10 mg en 240  $\mu\text{L}$ , también se preparan 4 gotas de 60  $\mu\text{L}$  de EHS.

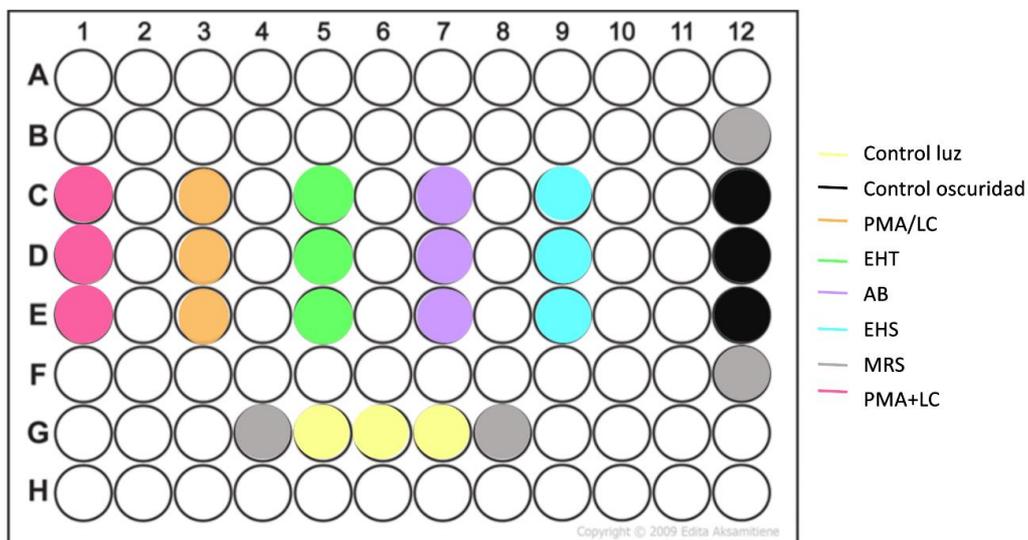
Este prototipo se introduce en la lámpara de uñas y se aplican tiempos cortos de luz ultravioleta, tomando fotografías en intervalos de 5 min hasta un tiempo final de 95. El experimento finaliza cuando todas las gotas viran a color azul.

### 3.2.4 Prueba filtros frente a la irradiación de bacterias.

La bacteria elegida para llevar a cabo el experimento es *Lactobacillus fermentum* LC40. En primer lugar, se preparan 200 mL de medio MRS dividido en dos botes de 100 mL, un bote será el medio para cultivo y otro se usará como control y para blancos. Para preparar cada bote de medio se añaden 5,2 g de MRS en 100 mL de agua, esa mezcla se agita hasta que quede disuelta, se vierte en el bote y se autoclava para conseguir un medio estéril. El bote del control se deja enfriar hasta su posterior utilización y para el cultivo se inocula la bacteria y se deja a 37  $^{\circ}\text{C}$  con agitación orbital durante 24 h.

Pasadas 24 horas desde la inoculación de la bacteria ya es posible llevar a cabo el experimento. En primer lugar, se debe controlar la densidad óptica (DO) ya que esta medida indica la población de bacterias. Para ello, se coge una alícuota de medio de unos 1000  $\mu\text{L}$  en una cubeta de plástico y se mide su densidad óptica a 600 nm. Una vez conocida la densidad óptica del cultivo se llevan a cabo diluciones con el medio hasta obtener el valor de 0.1 – 0.2 de DO. Para llegar a ese valor se toman 20  $\mu\text{L}$  de cultivo y 980  $\mu\text{L}$  de MRS. Sabiendo la proporción de medio y cultivo se prepara una disolución de mayor volumen para montar la placa, esta entonces es de 0.2 mL de cultivo y 9.8 mL de MRS. En la placa se ponen 250  $\mu\text{L}$  de cultivo a DO 0.1 – 0.2 o de MRS en cada pocillo según corresponda haciendo 6 columnas de 3 pocillos cada una, y a dos columnas le va a dar la radiación UV y las otras dos se cubren con papel de aluminio para que se mantengan en oscuridad.

Para montar la placa se marcan en la tapa los pocillos que van a llevar la disolución siguiendo el siguiente el Esquema 2.



Esquema 2: Esquema de la tapa de la placa del experimento.

Una vez marcados los pocillos se prepara la tapa. Para llevar a cabo el experimento es necesario que transcurran 48 horas.

El primer día se prepara el medio y el cultivo y algunas suspensiones de la tapa. Se procura que los pocillos estén lo más centrados posible en la placa por lo que se utilizan las filas C, D y E para someter a las bacterias a radiación. Las suspensiones se hacen antes de preparar la tapa. Para el filtro AB se toman 30 mg en 180  $\mu\text{L}$ , y para el EHT se toman 20 mg en 180  $\mu\text{L}$ . Del EHS se añaden 60  $\mu\text{L}$  directamente sobre la tapa. Para ensayar la mezcla PMA-láctico 1:60 se siguen dos estrategias: i) primero secar PMA y añadir LA al día siguiente (PMA+LC); ii) colocar directamente una gota de la mezcla PMA-láctico antes de irradiar, lo que sería probarlo en disolución (PMA/LC).

- Columna 1 (PMA+LC): Se pone sobre cada pocillo 60  $\mu\text{L}$  de disolución stock de PMA 1mM.
- Columna 5 (EHT): Se pone sobre cada pocillo 60  $\mu\text{L}$  de suspensión de AB.

- Columna 7 (AB): Se toman 60  $\mu$ L de la disolución stock de EHS y se distribuye uniformemente sobre los 3 pocillos.
- Columna 9 (EHS): Se pone sobre cada pocillo 60  $\mu$ L de suspensión de EHT.

Lo que se ha colocado ya en la tapa se deja secar a temperatura ambiente y protegido de la luz ambiental durante una noche. Pasado este tiempo se completa la tapa:

- Columna 1 (PMA+LC): Se le añade al PMA seco 60  $\mu$ L de láctico 60 mM.
- Columna 3 (PMA/LC): De la mezcla PMA-láctico 1:60 se toman 60  $\mu$ L para cada pocillo.

En la columna 12 corresponde al control oscuridad, los pocillos no llevan nada en la tapa. Esta columna se va a mantener en oscuridad tapando con papel de aluminio. Los pocillos de las filas B y F corresponden a blanco de MRS.

Y por último la fila G corresponde al control luz, los pocillos 4 y 8 son el blanco de MRS.

Se irradia la placa durante 20 minutos con radiación UVC en el esterilizador de material cosmético respectivamente. Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

### 3.2.5 Prueba filtros frente a la irradiación de células.

Para probar la eficacia frente a la irradiación de células se ha elegido la línea celular 293 - Riñón de embrión humano disponible en el centro de instrumentación científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR). Estas células se cultivan en frascos de 25 mL usando el siguiente medio de cultivo: EMEM + 2 mM de glutamina + 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA) + 10% de suero de caballo o 10% de suero bovino fetal inactivado. Posteriormente, se incuban durante 24 h más en una placa de 96 pocillos en las posiciones indicadas (siguiendo un esquema similar al que se usa para el experimento anterior de bacterias, Esquema 2) para formar una monocapa.

La placa junto con la tapadera que contiene los filtros es irradiada durante 20 minutos en el esterilizador de material cosmético. Posteriormente, se agrega a todos los pocillos 20  $\mu$ L del indicador MTS. Este indicador se deja actuar durante 90 minutos y se lleva a cabo la medición de absorbancia a 490 nm. A mayor número de células vivas, mayor será la absorbancia registrada. Los datos se expresan en % de viabilidad considerando las células no sometidas a radiación como el 100% de viabilidad. Las muestras se preparan por duplicado y se expresan los resultados mediante el promedio de las señales y los errores se calculan mediante la desviación estándar.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Experimento solubilidad de PMA en DMSO.

En primer lugar, y para proceder a optimizar el sensor de radiación UV ya diseñado, se pretende incorporar en éste diferentes filtros UV químicos bien descritos como tales en bibliografía. [2] Tal y como se ha planteado en el apartado de objetivos, son dos las estrategias a perseguir para esta incorporación: añadir los filtros en disolución o añadirlos sobre el propio sensor. Comenzaremos nuestros experimentos estudiando la posibilidad de añadir los filtros en disolución.

Según se describe en la ficha de información de los diferentes filtros comerciales, estos son insolubles en agua y solubles en DMSO. Puesto que en primer lugar queremos estudiar la interacción de los filtros con nuestro sistema PMA-láctico en disolución, será necesario evaluar la solubilidad de PMA en este disolvente, así como, el posible papel reductor del propio disolvente sobre PMA. Para ello, se preparan disoluciones de PMA 1 mM con diferentes concentraciones en volumen de DMSO (de 0 a 75 %) y se evalúa visualmente cualquier precipitación a la vez que se monitoriza mediante espectroscopía de UV-Vis la aparición o no del color azul del POM tras mezclarlo con el disolvente y/o tras irradiar las muestras con luz UV.

Los resultados que se muestran en la Figura 3 ponen de manifiesto que solo una vez que se utiliza la luz UV durante 30 min, aparece color azul, registrándose absorbancia a las bandas características de PMA reducido (700 y 820 nm). Esto indica que el DMSO ejerce poder reductor sobre el PMA y que esta reducción es mayor cuanto mayor es la concentración del disolvente. En ningún caso se observó precipitación del PMA.

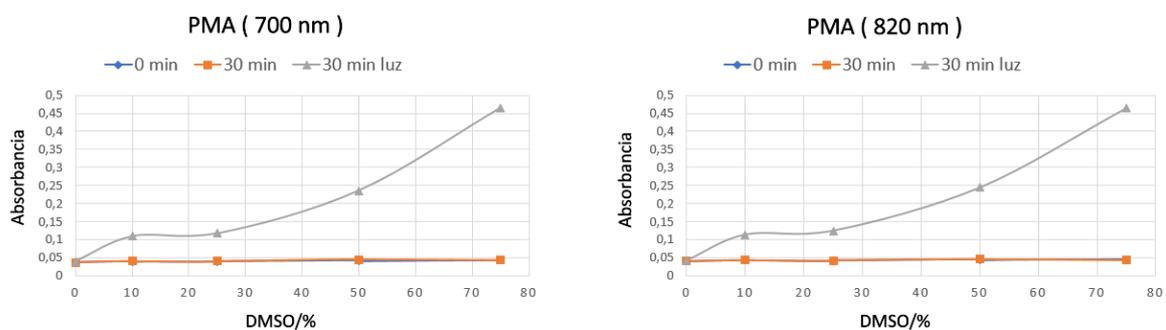


Figura 3: Absorbancias PMA según concentración de DMSO a tiempo 0, 30 min, tras 30 min de irradiación UVA.

A pesar de que existe poder reductor del DMSO hacia PMA, el hecho de no existir precipitación nos indica que sería posible utilizar el sensor preparado en DMSO en vez de en agua. Para ello, preparamos las condiciones del sensor en ambos disolventes y comparamos la absorbancia que se obtiene al irradiar una u otra condición, de cara a incorporar los filtros al sensor usando DMSO como disolvente en vez de agua. Los resultados se muestran en la Figura 4.

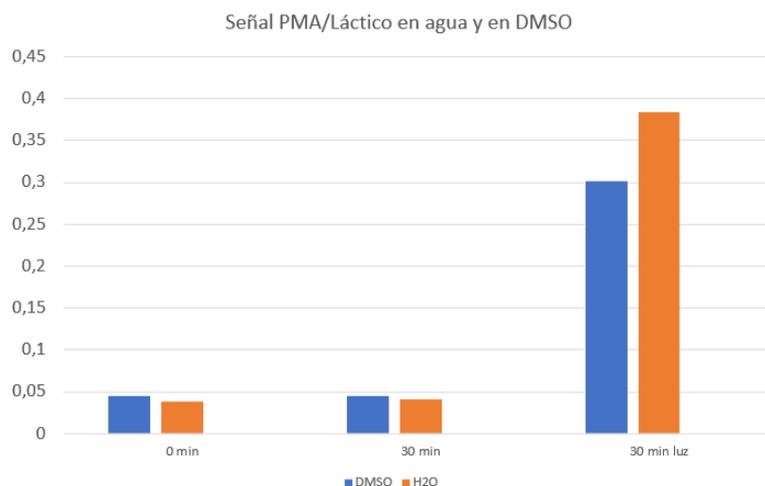


Figura 4. Señal de la mezcla PMA-láctico utilizando H<sub>2</sub>O o DMSO como disolventes.

Los resultados indican que hay una señal algo menor en el caso de usar DMSO como disolvente en vez de agua para el sensor ya puesto en marcha. Sin embargo, los valores son bastante similares, por lo que consideramos posible utilizar DMSO como disolvente para nuestro sensor y así poder incorporar los filtros en disolución y perseguir nuestro objetivo de optimizar el sensor desarrollado.

#### 4.2 Efecto de los filtros en disolución

Para comprobar si los filtros protegen de la radiación ultravioleta en disolución se llevan a cabo ensayos de diferentes concentraciones de cada filtro junto con la mezcla PMA-láctico 1:60 en disolución. Lo que se pretende con este experimento es saber si es posible mezclar los filtros junto con la mezcla PMA-láctico 1:60 para su posterior fijación en el soporte que usa el sensor. Se observan por tanto de nuevo posibles precipitaciones que indiquen la incompatibilidad del PMA con los filtros en disolución, así como, se miden absorbancias tras la irradiación de las muestras para comparar el valor en presencia o no de los filtros. Datos de absorbancia menores en presencia de los filtros respecto al control que no los lleva indicarían que estos están ejerciendo su papel.

##### 4.2.1 EHS con PMA/LA

La disolución stock de EHS se añade a cada pocillo de la placa en diferentes cantidades para así obtener un gradiente de concentraciones que permita detectar el límite de concentración a la que el filtro hace efecto protector de la radiación ultravioleta. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Las señales de absorbancia nula antes de la irradiación a 0 y a 30 minutos indican que la mezcla es estable a lo largo de este tiempo y que no hay precipitación, esto quiere decir que el filtro es compatible con la mezcla PMA-láctico 1:60. Tras someter la mezcla a radiación UV durante 30 minutos se obtienen unos valores de absorbancia mayores donde no hay filtro (0 mM de EHS), esto indica que el filtro sí protege de la radiación UV. Por lo tanto, el filtro EHS funciona en disolución.

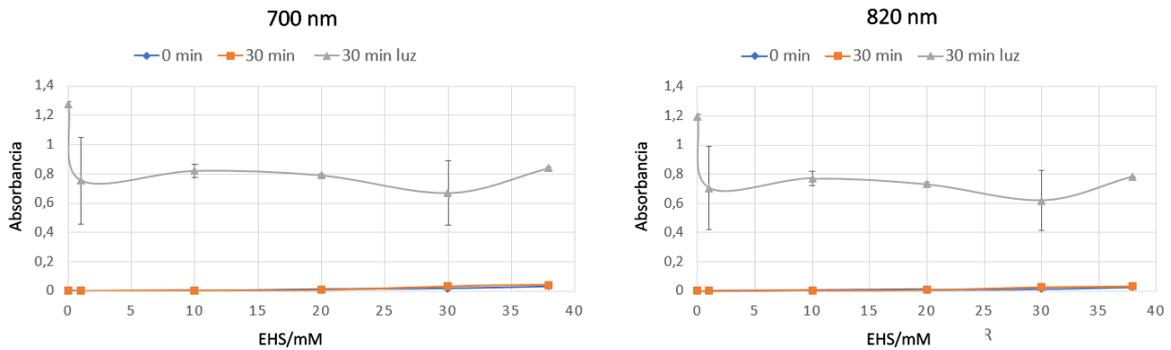


Figura 5. Absorbancias registradas para comprobar la función del filtro EHS sobre la mezcla PMA-láctico 1:60

#### 4.2.2 AB con PMA/LA

Cuando diferentes concentraciones del filtro AB se ponen en contacto con la mezcla PMA-láctico 1:60 en DMSO tiene lugar una disolución de color amarillo que es más intensa cuanto mayor es la concentración del filtro. Se añaden diferentes cantidades a los pocillos para obtener diferentes concentraciones y poder detectar la concentración a la que el filtro protege de la radiación UV. Los resultados que se muestran en la Figura 6, son similares a los encontrados para EHS.

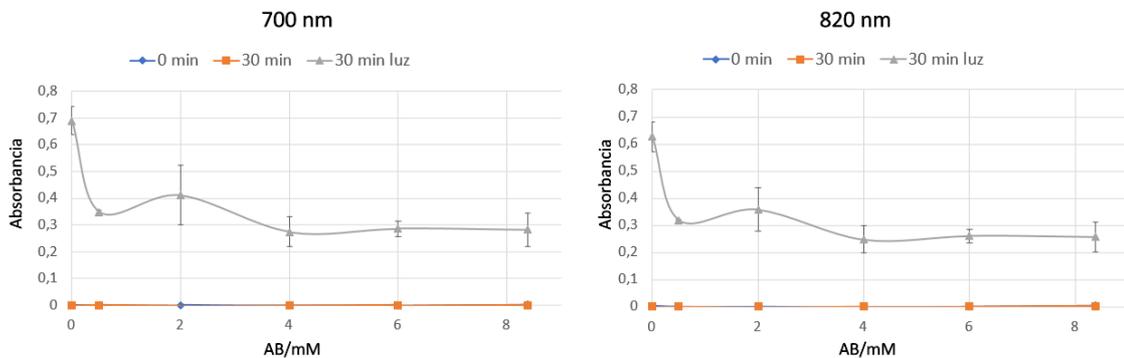


Figura 6: Absorbancias registradas para comprobar la función del filtro AB sobre la mezcla PMA-láctico 1:60 a diferentes concentraciones.

Las señales de absorbancia nula y el análisis a simple vista de los pocillos 0 y a 30 minutos antes de la irradiación indican que la mezcla es estable a lo largo de este tiempo y que no hay precipitación, lo que quiere decir que el filtro es compatible con la mezcla PMA-láctico 1:60. Tras someter la mezcla a radiación UV durante 30 minutos se obtienen unos valores de absorbancia mayores donde no hay filtro (0 mM de AB). Esto indica que el filtro sí protege de la radiación UV. Por lo tanto, el filtro AB funciona en disolución, incluso a la concentración más baja de filtro probada el efecto protector es ya notable y similar al de concentraciones mayores.

#### 4.2.3 EHT con PMA/LA

El filtro EHT al entrar en contacto con la mezcla PMA-láctico 1:60 en DMSO forman de manera instantánea un precipitado blanco en prácticamente todas las concentraciones de EHT que se ponen a prueba. Sólo en la menor concentración probada (1 mM) no se aprecia dicho precipitado. Las absorbancias registradas a los tiempos probados que se muestran en la Figura 7, ponen de manifiesto que existe esta precipitación, pues las señales son debidas a la turbidez que esta precipitación otorga a la muestra.

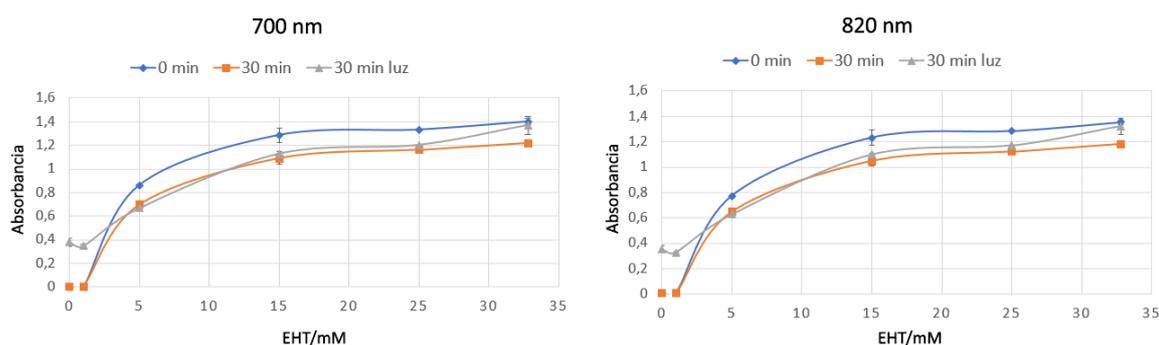


Figura 7: Absorbancias registradas para comprobar la función del filtro EHT sobre la mezcla PMA-láctico 1:60 a diferentes concentraciones.

Solo el pocillo a la concentración 1 mM no refleja este comportamiento y solo registra señal tras ser irradiado con luz UV 30 min, lo que indica que esta sería la única concentración de todas las probadas que no interacciona con la mezcla de PMA-láctico del sensor. No obstante, el valor de absorbancia es solo levemente inferior al del control sin filtro, lo que nos indica también que el papel del EHT como filtro a esta concentración no es muy adecuado.

Estos resultados nos hacen determinar que el EHT no es un buen filtro para ser utilizado en disolución a las concentraciones que se han probado.

Llegados a este punto, ha sido posible determinar que cualquiera de las concentraciones testadas de EHS y AB podrían funcionar como filtros en disolución, es decir, podrían ser añadidas a la mezcla PMA-láctico 1:60 y posteriormente la mezcla final podría ser fijada en el soporte que utiliza el sensor. Sin embargo, los resultados de las concentraciones de EHT con las que hemos trabajado no permiten la misma conclusión, ya que se ha encontrado un precipitado de color blanco que no permite la aparición del color azul que buscamos en el sensor.

El siguiente de los pasos a dar podría ser determinar concentraciones adecuadas de AB o EHS que podrían ser añadidas al sensor o probar qué ocurre a tiempos menores de irradiación con luz UV que podrían dar aún más diferencia respecto al control sin filtro. No obstante, y debido a que EHT no puede ser utilizado en disolución, vamos a optar por comprobar el efecto que tienen los filtros si los fijamos sobre el sensor en vez de aplicarlos a la disolución de la mezcla.

### 4.3 Prueba filtros sobre sensor

#### 4.3.1 Gota seca sobre tapadera y sensor en disolución.

Para comprobar la eficacia de los filtros sobre el sensor, en primer lugar, y para poder ser capaces de monitorizar la aparición del color azul de la mezcla PMA-láctico, vamos a colocar los sensores sobre la tapadera de la placa de pocillos y a irradiar los mismos con luz UV una vez tapados. De este modo, podremos comparar la señal que se obtiene para cada uno de los filtros y para los pocillos donde estos no se apliquen, esperando ver menor señal en aquellos pocillos donde se ha usado el filtro en la tapadera.

Para aplicar los filtros, se preparan estos en suspensión acuosa tal y como se ha explicado en el apartado 3.2.2.4 para que una vez depositadas varias gotas de estas suspensiones en las posiciones correctas de la tapadera y tras llevar a sequedad, cada filtro quede fijado en tapa de la placa en forma de una película sólida sobre los pocillos que contienen la mezcla PMA-láctico 1:60. Seguidamente, la placa con su tapadera se ha sometido a radiación UV en intervalos de 5 min y se ha medido la absorbancia de las muestras después de cada irradiación durante un período total de 215 minutos. Se ha comprobado así la evolución de la señal a lo largo del tiempo. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

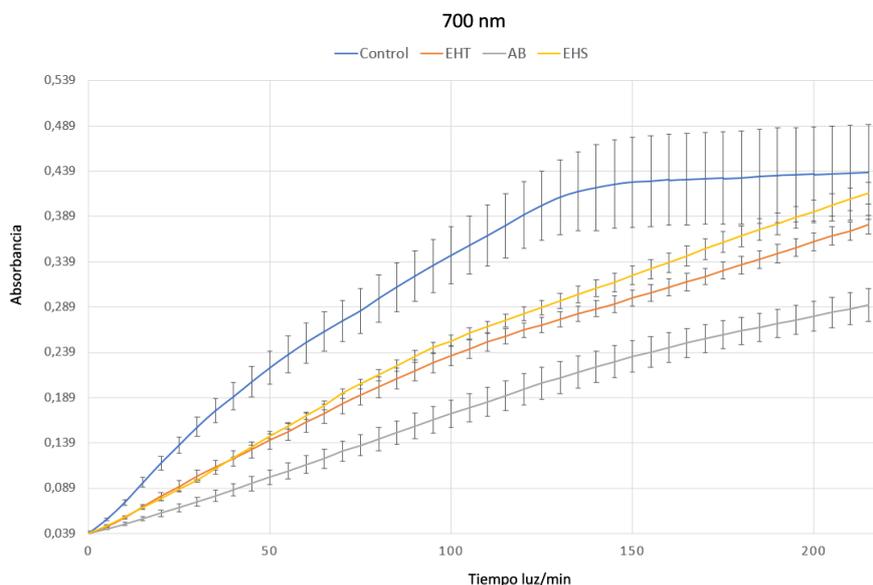


Figura 8: Resultado de la acción de los filtros en gota seca frente a la disolución PMA-láctico 1:60

Los resultados ponen de manifiesto una diferencia significativa en la absorbancia registrada para los pocillos en los que no se aplica filtro en la tapadera y para los que sí, siendo la señal de los primeros siempre superior a la de los segundos. Por otro lado, podemos también observar como las señales de las disoluciones sometidas a los filtros no siguen la misma tendencia que la del control en el tiempo medido, ya que, allí donde hay filtros la absorbancia no llega a estabilizarse, mientras que el control se estabiliza pasados los 140 minutos, siendo ese valor de absorbancia, la absorbancia máxima que

puede dar la mezcla PMA-láctico. En este sentido, los pocillos cubiertos con los filtros EHT y EHS parecen acercarse a esta estabilización en los tiempos más largos estudiados, mientras que AB queda lejos de alcanzar ese valor de absorbancia. Podemos por tanto también concluir que el filtro AB es el que más protege de la radiación UV, ya que es el que logra mantener la señal más baja con diferencia.

#### 4.3.2 Prueba de los filtros sobre sensor fijado en papel

Una vez comprobado que los filtros colocados sobre los pocillos dan distintas intensidades de color azul, se pretende ahora comprobar si el aplicar estos filtros directamente sobre el prototipo del sensor sería suficiente para retrasar la aparición del color azul. Tal y como se ha descrito en la introducción, el sensor previamente diseñado por el grupo de investigación utiliza papel de filtro y material TFF. Basándonos en el mismo prototipo, se ha diseñado un nuevo prototipo de sensor donde se aplican los filtros sobre las diferentes capas de TFF que se utilizan, utilizando también condiciones para diferentes colores de piel (ver experimental 3.2.2.5).

De nuevo, se van a utilizar suspensiones acuosas de los filtros que se dejan secar. En este caso, la mezcla PMA-láctico va a estar fijada en el papel de filtro y los filtros estarán sobre las correspondientes capas de TFF. Posteriormente, se ha llevado a cabo la irradiación con la lámpara para cosmética en intervalos de 5 min para así poder observar progresivamente el cambio de color de la disolución, tomando fotografías a cada tiempo para registrar los resultados. Se muestra en la Figura 9 el cambio de color de la disolución en cada posición para los tiempos de 5, 20 y 95 min de exposición a la radiación UV.

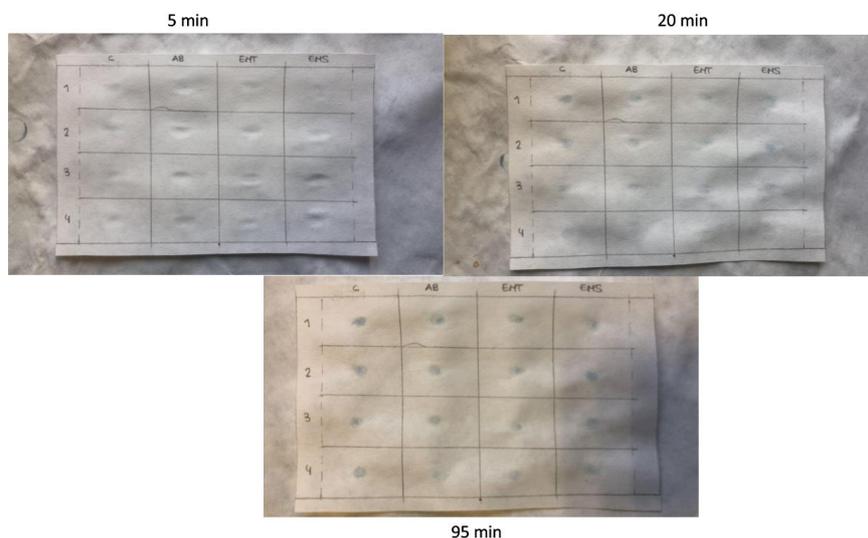


Figura 9: Resultado de irradiaciones a tiempos cortos de la disolución sobre papel.

En la imagen se observa que a los 5 minutos no hay color azul en el papel de filtro. Pasados 20 minutos, se observa color azul más intenso en la primera columna (C) donde no se ha puesto ningún filtro solar, lo que indica que los filtros aplicados de este modo también retrasan la aparición del color azul. Del mismo modo, en la primera fila que corresponde al prototipo de color de piel tipo 1, podemos observar mayor intensidad de color azul que en las filas consecutivas, siendo la última fila la que tiene

la menor intensidad (prototipo de color de piel 4). Esto último se debe a que en este sentido también aumenta el número de capas de TFF utilizadas. Cuando se alcanzan los 95 minutos de irradiación, ya ha aparecido color azul en todas las posiciones, lo que indicaría que el efecto de los filtros ya se ha agotado.

Los resultados de estos dos últimos experimentos han puesto de manifiesto la eficacia de los filtros para frenar la aparición del color azul en el sensor, siendo esto uno de los objetivos perseguidos desde el principio de este trabajo. De este modo, podemos indicar que la aplicación de los filtros sobre el sensor resulta más eficaz que aplicarlos en disolución, ya que esto evita problemas de interacción entre los reactivos que deriven en precipitaciones o enmascaramiento de la señal. Del mismo modo, también evita la utilización de disolventes no acuosos como el DMSO, lo que siempre aumenta la toxicidad de las muestras y requiere un manejo más específico de las mismas.

Por lo tanto, estos resultados nos permiten plantear la optimización del sensor previamente diseñado y publicado. La aplicación en seco de los filtros solares podría ser suficiente para simular en el sensor el efecto que ejerce una crema con protector solar sobre nuestra piel. No obstante, cabe destacar que estos resultados son solo el comienzo de esa optimización, ya que se precisan más experimentos para llegar a esta afirmación, como, por ejemplo, la comparación de que la duración del efecto del filtro solar es o no la misma en el sensor que sobre nuestra piel.

#### *4.4 Uso de la disolución mezcla PMA/LA como otro filtro químico.*

Al ya haberse demostrado la eficacia de la mezcla PMA-láctico como sensor de radiación UV debido a la capacidad de la misma de absorber dicha radiación, se pretende en un segundo bloque de experimentos de este trabajo comprobar si esta disolución podría actuar además como filtro químico, del mismo modo que lo hacen AB, EHT y EHS. Para ello, siguiendo la misma metodología previamente planteada para aplicar los filtros sobre el sensor (punto 4.3), se someten en este caso bacterias y células vivas a radiación UV previamente protegidas con la disolución PMA-láctico y se compara su eficacia con la de los filtros solares ya estudiados, determinando así si es posible utilizar esta disolución también como filtro solar.

##### *4.4.1 Bacterias*

En primer lugar, debido a la disponibilidad de bacterias y la amplia experiencia del grupo de investigación en el trabajo con probióticos, se ensaya la eficacia de la disolución como filtro químico frente al probiótico *Lactobacillus fermentum* LC40. Para ello, se prepara un cultivo siguiendo protocolos conocidos. Posteriormente, se adapta la concentración de bacterias con la que vamos a trabajar utilizando medidas de DO. Esta medida de DO relaciona directamente la absorbancia de la muestra a 600 nm con la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias, es decir, con la cantidad de bacterias viables presentes en un cultivo. De este modo, cuanto mayor es dicha absorbancia a 600 nm, mayor será la cantidad de bacterias viables.

Así, se preparan varios pocillos en una placa de 96 que contienen cultivo a DO de 0.1-0.2 nm siguiendo el esquema 2 y se colocan y se dejan secar los diferentes filtros (AB, EHS, EHT y mezcla PMA-láctico) sobre la tapadera de la placa. La mezcla PMA-láctico se va a ensayar simultáneamente en seco y en gota directa en disolución. Además, habrá pocillos que no se tapen con ningún filtro al igual que hay pocillos que quedarán en oscuridad, ambas condiciones a modo de control. Posteriormente, se somete la placa con tapadera a irradiación UVC. Finalmente, se coloca la placa en el lector Nanoquant programado a 37 °C y se mide la absorbancia a 600 nm de los pocillos durante aproximadamente 18 horas cada 10 min. De este modo, se monitoriza el aumento de la DO, y, por tanto, el crecimiento bacteriano en cada condición.

El resultado se muestra en la Figura 10.

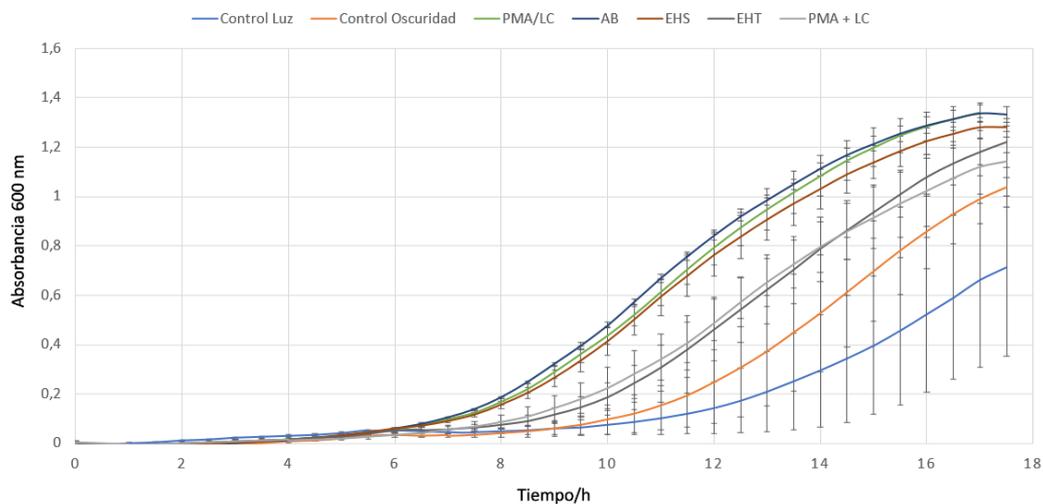


Figura 10: Resultado de la irradiación de bacterias protegidas con los diferentes filtros químicos y la mezcla PMA:láctico 1:60.

La gráfica de la Figura 10 muestra como las bacterias tardan en comenzar a crecer en los pocillos, sin embargo, todos los pocillos, los tratados y no tratados con los filtros comienzan a dar señal a 600 nm al mismo tiempo (tras aproximadamente 6 h de incubación). Al comparar los valores de DO, vemos como la muestra control con luz (bacterias sometidas a la UVC sin ningún filtro) es la que menor DO presenta a lo largo del tiempo, lo que indicaría que un mayor número de bacterias se ven afectadas por acción de la radiación. Seguidamente, con un valor ligeramente superior de DO, encontramos el control de oscuridad y ya con valores superiores están todos los pocillos que se han tapado con los diferentes filtros ensayados, lo que nos indica que todos los filtros ensayados presentan actividad protectora de la luz UVC. Teniendo en cuenta que una mayor absorbancia a 600 nm indica un mayor crecimiento bacteriano y por tanto que el filtro usado ejerce mayor protección sobre las bacterias, AB es el filtro que presenta mayor protección, seguido de la mezcla PMA-láctico en disolución (PMA/LC), EHS, EHT y la mezcla PMA-láctico en seco (PMA+LC). En concreto, EHT y PMA+LC muestran un comportamiento similar. Estos resultados ponen de manifiesto el buen funcionamiento de los filtros químicos AB, EHS y EHT, así como, indican que la mezcla PMA-láctico puede ser utilizada como filtro solar y que esta es más efectiva cuando se aplica en disolución y no en seco.

#### 4.4.2. Células

En una segunda aproximación y siguiendo una metodología similar a la anterior, se ha estudiado el efecto de los filtros y de la disolución PMA-láctico sobre células, utilizando como modelo la línea celular 293 - Riñón de embrión humano suministrada por el CIC-UGR. En este caso, se ha utilizado un test de viabilidad celular estándar que consiste en añadir a las células el reactivo MTS tras un determinado tratamiento. Este ensayo está basado en la reducción del reactivo MTS mediante células vivas que genera un tinte de formazán coloreado soluble en medios de cultivo celular. Esta conversión es debida a enzimas deshidrogenasas en células metabólicas activas. [11] Por lo tanto según la intensidad del tinte es posible determinar el número de células vivas siendo mayor a mayor intensidad.

De este modo, tras la lectura de la absorbancia a 600 nm y tomando como 100 % de viabilidad la señal de los pocillos donde tenemos células sin tratar (en nuestro caso no sometidas a radiación UVC), podemos determinar la viabilidad en los pocillos que sí han sido tratados (en nuestro caso protegidos o no de radiación UVC mediante los filtros a estudiar). Los resultados de este tratamiento se muestran en la Figura 11.

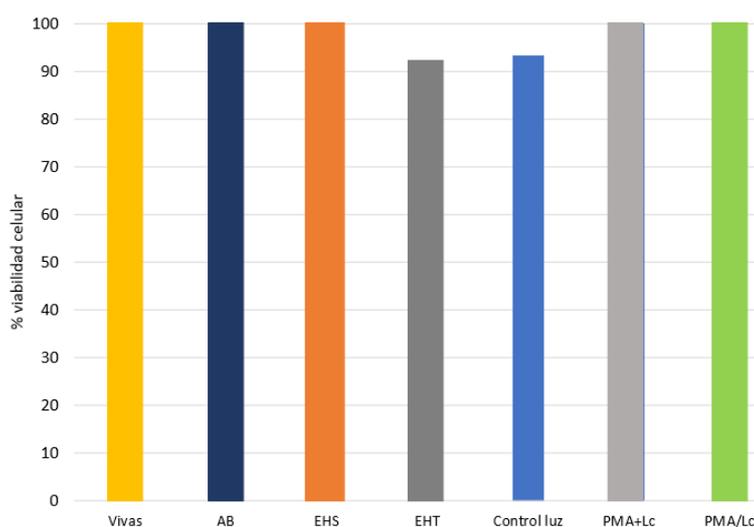


Figura 11: % de viabilidad celular tras el tratamiento con luz UVC bajo protección con los filtros.

Los resultados de las absorbancias en la Figura 11 indican que efectivamente la mezcla PMA-láctico protege de la radiación ultravioleta, así como los filtros solares con los que se ha llevado a cabo el estudio ejercen protección a las células, ya que en todos los casos se registra un porcentaje de viabilidad igual al de las células que no se tratan con la luz UVC (vivas) y superior al que se obtiene para las células expuestas a la luz sin filtro (Control luz). Existe una excepción con el filtro EHT que muestra un porcentaje de viabilidad menor que la muestra control luz. Además, cabe destacar que no se aprecia diferencia entre los datos para PMA/LC y PMA+LA, lo que indica que ambas formas de aplicar la mezcla PMA-láctico (en disolución o en seco, respectivamente) son efectivas.

Los resultados de estos últimos experimentos para proteger bacterias y células muestran que tanto los filtros estudiados como la disolución de PMA-láctico 1:60 son efectivos y protegen de la radiación

UV. Además, tal y como se muestra en la Figura 12, usar la mezcla PMA-láctico como filtro solar tiene una ventaja adicional que consiste en que este filtro al agotarse se pone de color azul, lo que podría a su vez ser usado como indicativo de que es necesario una nueva aplicación de protección solar, es decir, la mezcla PMA-láctico podría servir como un sistema 2 en 1, como sensor y como filtro químico.

## 5. CONCLUSIONES

A lo largo de este documento se ha llevado a cabo la optimización del sensor de radiación UV existente probando su compatibilidad con los filtros solares más comunes. En primer lugar, se ha evaluado la función de la disolución PMA-láctico 1:60 como sensor en DMSO. También se ha probado la función de los filtros en disolución y como gota seca. Y para terminar se ha planteado el uso del sensor como filtro de radiación UV. De estos experimentos se han obtenido una serie de conclusiones:

1. La utilización de DMSO como disolvente PMA es posible ya que no se observan precipitaciones en las muestras. No obstante, DMSO sí ejerce poder reductor sobre PMA. Sin embargo, se ha observado que ese poder reductor no afecta significativamente al sensor si se prepara en DMSO en vez de disolución acuosa, lo que abre la puerta a poder incorporar los filtros en disolución.
2. En el estudio de la incorporación de los filtros solares EHS y AB en disolución se ha demostrado que esto realizan su función en disolución ya que se ha puesto de manifiesto que la aparición del color azul en el sensor se retrasa cuando se trata este con ellos. Además, ya que no se han encontrado problemas de precipitación, es posible también confirmar que no hay interferencias entre los filtros y PMA. Sin embargo, el filtro EHT no es compatible con el sensor en disolución ya que en este caso sí se han encontrado problemas de precipitación para casi todas las concentraciones probadas.
3. Por otro lado, en la aplicación de los filtros en gota seca se ha puesto de manifiesto que es posible aplicar los 3 sin que existan problemas de interferencias en disolución y sin la necesidad de tener que usar disolventes químicos no acuosos que aumenten la toxicidad del sistema. Esto se ha comprobado tanto con el sensor en disolución como para el sensor en el soporte usado para su prototipo.
4. Finalmente, se ha demostrado que el sensor también tiene la capacidad de actuar como filtro de radiación UV ya que este ejerce actividad protectora sobre la bacteria LC40, así como, sobre la línea celular 293. En este caso se ha ensayado la aplicación de la mezcla PMA-láctico tanto en seco como en disolución, resultados ambas efectivas.

Por lo tanto, es posible la optimización del sensor ya que es compatible con los filtros solares más comunes y también funciona como filtro. Estamos ante un posible sistema 2 en 1 que actúa al mismo tiempo como filtro solar y sensor. No obstante, algunos experimentos complementarios podrían ser necesarios de cara a realizar una completa optimización del sensor, como, por ejemplo, la comparación del sensor como tal y como filtro con cremas solares reales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Flores, A. M. (n.d.). *Rayos ultravioleta (UV)*. Ciencias-medicas.com. Retrieved August 31, 2022, from <https://blog.ciencias-medicas.com/archives/1423>
- [2] Franco, G. N. (2003). Histología de la piel. *Rev Fac Med UNAM [Internet]*, 46(4), 130-3.
- [3] Mora Ochoa, M., Olivares Savigñon, A. R., González Gross, T. M., & Castro Mela, I. (2010). El sol: ¿enemigo de nuestra piel?. *Medisan*, 14(6), 0-0.
- [4] Soledispa, K. C. (2010). Radiación Ultravioleta Y su efecto en la salud. *Ciencia Unemi*, 3(4), 26-33.
- [5] Ballén, J. B., & Mogollón, J. F. P. (2007). Radiación ultravioleta. *Ciencia y tecnología para la salud visual y ocular*, 9, 97–104. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5599224>
- [6] Duro Mota, E., Campillos Páez, M. T., & Causín Serrano, S.. (2003). El sol y los filtros solares. *Medifam*, 13(3), 39-45. Recuperado en 02 de septiembre de 2022, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S11312003000300005&lng=es&tlng=pt](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S11312003000300005&lng=es&tlng=pt).
- [7] Flor, J., Davolos, M. R., & Correa, M. A. (2007). Protectores solares. *Química nova*, 30, 153-158.
- [8] Marín, D., & Del Pozo, A. (2005). *Offarm*. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-r- revista-offarm-4-pdf-13079607>
- [9] Papaconstantinou, E. (1989). Photochemistry of polyoxometallates of molybdenum and tungsten and/or vanadium. *Chemical Society Reviews*, 18(0), 1–31
- [10] Zou, W., González, A., Jampaiah, D. *et al.* Skin color-specific and spectrally-selective naked-eye dosimetry of UVA, B and C radiations. *Nat Commun* **9**, 3743 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06273-3>
- [11] MTS Assay Kit (cell proliferation) (colorimetric) (ab197010). (2022, August 30). Abcam.com. <https://www.abcam.com/mts-assay-kit-cell-proliferation-colorimetric-ab197010.html>