

**DESARROLLO DE NUEVOS
ELEMENTOS ANTIMICROBIANOS
DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL:
MASCARILLAS, PANTALLAS
FACIALES Y CREMA LABIAL
ANTIMICROBIANA**

TESIS DOCTORAL

AUTOR: Alberto Tuñón Molina

DIRECTOR: Ángel Serrano Aroca

PROGRAMA: Ciencias de la Vida y del Medio Natural

UNIVERSIDAD: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir

Valencia, octubre 2023.

A mi abuela, a mi abuelo, a mi yayo y a mi yaya

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ángel Serrano Aroca, por confiar en mí para formar parte de su equipo en un momento donde reinaba la incertidumbre para todos. Por darme la oportunidad de acercarme un poco más a mi sueño de ser científico. Por guiarme en este camino, el cual sólo he empezado a recorrer, y sentar las bases del que espero que sea un futuro prometedor en el campo de la investigación.

Al Dr. Miguel Martí Jiménez, por estar desde el principio y enseñarme todo lo que sé. Por ver siempre algo bueno en los momentos en los que parecía que nada salía. Por dar siempre una vuelta de tuerca más y no parar de pensar. Y, sobre todo, por ayudarnos a desarrollar nuestro pensamiento crítico.

A la Dra. Beatriz Salesa Landete, por ser nuestro pilar fundamental en todo este recorrido. Por escucharnos, entendernos y aconsejarnos. Por enseñarnos y nunca poner una mala cara. Gracias por esos pequeños “cónclaves” cuando peor estábamos o cuando había cosas que no entendíamos. Por darnos siempre esa fuerza y ese ánimo extra cada vez que hacía falta.

A Samanta, Álvaro y Helena, por haber estado ahí durante todo este camino, por ayudarme y por animarme. Por haber compartido tantos momentos dentro y fuera del trabajo. Gracias por haberme hecho mucho más fácil esta etapa.

A todos los becarios y becarias que han estado todos estos años en los laboratorios de la universidad, en especial a Pascual, y con los que hemos compartido horas y horas de trabajo. Gracias por vuestra amabilidad, vuestra buena cara en todo momento y por ayudarnos a hacer nuestro trabajo mucho más fácil.

A todos los TFGs que han pasado por nuestro laboratorio. A Alex, Irene, Andrea, Patricia, Raúl y Lorena. Gracias por elegirnos, por dejaros enseñar, por compartir opiniones y vuestra visión de las cosas, que muchas veces nos ha ayudado a comprender mejor nuestro trabajo. Gracias por las relaciones que hemos creado y por mantenerlas después de todos estos años.

A “los de siempre”. Por tantos años juntos, por tanto sufrimiento, por tantas alegrías, por haber llorado juntos, por haber reído juntos... En definitiva, gracias por haber podido crecer juntos. Por alegraros conmigo en todo lo bueno que me ha pasado y por alegrarme con cada cosa buena que os pasaba. Gracias por no fallarme y no faltarme nunca.

A mis “berenjenas”, por haber sido lo mejor de la carrera. Por compartir pasiones, confesiones, alegrías, tristezas. Por contarme vuestras penas, vuestras alegrías y, sobre todo, por aguantar las mías. Por entender y apoyarme en cada paso que he dado, compartierais o no mi opinión.

A Àlex Valero y Alex Albert. Por ser mis mayores descubrimientos. Gracias por ser y por estar, por ir siempre de frente conmigo, por aguantarme, por inspirarme y levantarme siempre el ánimo. Habéis sido y sois un pilar fundamental en el camino que es la vida. Simplemente gracias.

A mi padre y a mi madre, en primer lugar, por darme la vida. A mi hermano, por ser mi mayor regalo. Gracias a los tres por darme todo lo que tengo y todo lo que soy. Por los valores que me habéis inculcado desde el primer momento. Por, a pesar de haber discutido mucho, siempre mirar por mi bien. Por haber estado en los mejores momentos de mi vida, pero sobre todo en los peores. Por siempre buscar entenderme, por cada bronca que me habéis echado, que sé que siempre ha sido buscando lo mejor para mí. Y, especialmente, gracias por antepoñernos a mí y a mi hermano por encima de cualquier cosa. Gracias por demostrar día tras día que somos lo más importante para vosotros.

Y por último, a Alba. Gracias por estos más de tres años trabajando juntos. Gracias, porque sin ti llegar hasta aquí no habría sido posible. Gracias por ser mi compañera, mi apoyo y por darme fuerza cada día. Gracias por hacerme el día a día en el laboratorio tan fácil, por soportar cada carga conmigo y, sobre todo, por siempre estar dispuesta a intentar aliviarlas. Gracias por acompañarme en cada paso del camino, que tú sabes que no siempre ha sido fácil. Y, mayormente, gracias por ser compañera y no competencia. Ojalá podamos seguir compartiendo muchos años más.

RESUMEN

El mundo se ha enfrentado de forma reciente a grandes desafíos como la pandemia de la enfermedad infecciosa del coronavirus 2019 (COVID-19) causada por el patógeno Síndrome Respiratorio Severo Agudo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Está ampliamente aceptado que las mascarillas y las pantallas faciales son herramientas de protección eficaces para evitar la transmisión bacteriana y viral entre personas. Sin embargo, estos utensilios de protección están fabricados de materiales que carecen de propiedades de inactivación frente a virus como el SARS-CoV-2 o bacterias resistentes a antibióticos. En este contexto, en este trabajo se han desarrollado novedosas tecnologías que dotan a los materiales de protección individual de propiedades antimicrobianas frente a virus con y sin envoltura o frente a bacterias resistentes a antibióticos. De este modo, en este estudio se ha desarrollado una tecnología basada en un amonio cuaternario como el cloruro de benzalconio aplicado a filtros de mascarilla y pantallas de protección facial. Este compuesto dota a los materiales de protección de capacidad antiviral frente a virus con envoltura como el bacteriófago Phi6 o el SARS-CoV-2. Además, protege también a los usuarios frente a bacterias resistentes a antibióticos como la *Staphylococcus aureus* o la *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina. También se ha desarrollado una tecnología de bajo coste basada en jabón solidificado que es eficaz contra virus con envoltura sin resultar tóxica para las células epiteliales humanas. Por otro lado, se ha desarrollado una nueva tecnología antimicrobiana basada en un compuesto natural y biodegradable como es el extracto de arándanos rojo. Este extracto contiene proantocianidinas, las cuales son unas moléculas que han demostrado ser efectivas en la inactivación de virus con envoltura y bacterias Grampositivas resistentes a meticilina. Además, la no toxicidad de este compuesto fue demostrada con el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Por último, se ha llevado a cabo el desarrollo de una crema labial antimicrobiana basada en extractos naturales de arándanos rojos. Esta crema permite formar una barrera protectora en la vía de entrada de microorganismos que protege contra virus con y sin envoltura, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y también contra infecciones causadas por hongos.

Los materiales desarrollados en este trabajo pueden ayudar en la lucha contra la actual pandemia del COVID-19 o en futuras pandemias ofreciendo una novedosa forma de protección contra una amplia variedad de microorganismos patógenos.

ABSTRACT

The world has recently faced big challenges such as the Coronavirus disease (COVID-19) pandemic caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pathogen. It is widely accepted that face masks and face shields are effective protective tools to prevent bacterial and viral transmission between people. However, these protective utensils are made of materials than lack of inactivation properties against viruses such as SARS-CoV-2 or multidrug-resistant bacteria. In this context, in this work, novel technologies have been developed that provide personal protective equipment with antimicrobial properties against enveloped and non-enveloped viruses or against multidrug-resistant bacteria. Thus, in this study, a technology based on a quaternary ammonium such as benzalkonium chloride has been developed applied to mask filters and face shields. This compound provides protective materials with antiviral capacity against enveloped viruses such as bacteriophage Phi6 or SARS-CoV-2. In addition, it also protects users against multidrug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. A low-cost technology based on solidified hand soap has also been developed that is effective against enveloped viruses without being toxic to human epithelial cells. On the other hand, a new antimicrobial technology has been developed based on a natural and biodegradable compound such as cranberry extract. This extract contains proanthocyanidins, which are molecules that have been shown to be effective in the inactivation of enveloped viruses and methicillin-resistant Gram-positive bacteria. Furthermore, the non-toxicity of this compound was demonstrated with the model organism *Caenorhabditis elegans*. Finally, the development of an antimicrobial lipstick based on natural extracts of cranberries has been carried out. This cream allows to form a protective barrier in the entry route of microorganisms that protect against enveloped and non-enveloped viruses, against Gram-positive and Gram-negative bacteria and against infections caused by fungi.

The materials developed in this work can help in the fight against the current COVID-19 pandemic or in possible future pandemics by offering a novel form of protection against a wide variety of pathogenic microorganisms.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS	15
1.2 BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	17
1.3 PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.....	19
1.3.1 MASCARILLAS	20
1.3.1.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN.....	21
1.3.1.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE MASCARILLAS.....	23
1.3.1.3 TIPOS DE MASCARILLAS	26
1.3.2 PANTALLAS FACIALES.....	30
1.3.3 CREMAS ANTIMICROBIANAS	32
1.4 PROBLEMÁTICA DE LA GENERACIÓN DE RESIDUOS	33
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
3. CAPÍTULO I. MASCARILLAS ANTIMICROBIANAS BASADAS EN CLORURO DE BENZALCONIO	39
3.1 INTRODUCCIÓN.....	41
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS FILTROS.....	43
3.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL CLORURO DE BENZALCONIO.....	43
3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	44
3.2.4 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6.....	44
3.2.5 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2.....	45
3.2.6 ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR	46
3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL BAK	49

3.3.2	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	50
3.3.3	ENSAYOS ANTIVIRALES.....	51
3.3.3.1	BACTERIÓFAGO PHI6.....	51
3.3.3.2	SARS-CoV-2.....	52
3.3.4	ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	54
3.4	CONCLUSIONES.....	57
4.	CAPÍTULO II. MASCARILLAS ANTIVIRALES DE BAJO COSTE BASADAS EN JABÓN SOLIDIFICADO.....	59
4.1	INTRODUCCIÓN.....	61
4.2	MATERIAL Y MÉTODOS	63
4.2.1	PREPARACIÓN DE LOS FILTROS.....	63
4.2.2	RESPIRABILIDAD DE LOS FILTROS DE MASCARILLA.....	64
4.2.3	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	64
4.2.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	65
4.2.5	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6.....	65
4.2.6	CUANTIFICACIÓN DE ARN.....	65
4.2.7	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2	66
4.2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
4.3.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	67
4.3.2	RESPIRABILIDAD DE LOS FILTROS	68
4.3.3	ENSAYOS ANTIVIRALES.....	69
4.3.3.1	BACTERIÓFAGO PHI6.....	69
4.3.3.2	SARS-CoV-2.....	71
4.3.4	CUANTIFICACIÓN DE ARN.....	72
4.3.5	CITOTOXICIDAD IN VITRO	73
4.4	CONCLUSIONES.....	77
5.	CAPÍTULO III. MASCARILLAS ANTIMICROBIANAS BASADAS EN PRODUCTOS NATURALES A BASE DE EXTRACTO DE ARÁNDANOS ROJOS	79
5.1	INTRODUCCIÓN.....	81

5.2	MATERIAL Y MÉTODOS	83
5.2.1	PREPARACIÓN DE LOS FILTROS.....	83
5.2.2	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS FILTROS	84
5.2.2.1	DEGRADACIÓN Y COMPORTAMIENTO TÉRMICOS.....	84
5.2.2.2	PROPIEDADES MECÁNICAS	84
5.2.3	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD IN VIVO	85
5.2.4	MICROSCOPIA	87
5.2.4.1	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	87
5.2.4.2	MICROSCOPIA ÓPTICA	87
5.2.5	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6.....	87
5.2.6	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2.....	87
5.2.7	ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR	87
5.2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	88
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
5.3.1	MICROSCOPIA	89
5.3.2	CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS FILTROS	91
5.3.3	ENSAYOS ANTIVIRALES.....	92
5.3.3.1	BACTERIÓFAGO PHI6.....	92
5.3.3.2	SARS-CoV-2.....	95
5.3.4	ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	97
5.3.5	CITOTOXICIDAD IN VIVO.....	98
5.4	CONCLUSIONES.....	101
6.	CAPÍTULO IV. PANTALLAS ANTIMICROBIANAS BASADAS EN CLORURO DE BENZALCONIO	103
6.1	INTRODUCCIÓN.....	105
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
6.2.1	PREPARACIÓN DE LAS PANTALLAS FACIALES	107
6.2.2	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA.....	107
6.2.3	ESTUDIO DE OPACIDAD	108

6.2.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	108
6.2.5	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6.....	108
6.2.6	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2.....	108
6.2.7	ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR	109
6.2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109
6.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
6.3.1	MICROSCOPIA DE FUERZA ELECTRÓNICA	111
6.3.2	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	112
6.3.3	ENSAYOS ANTIVIRALES.....	114
6.3.3.1	BACTERIÓFAGO PHI6.....	114
6.3.3.2	SARS-CoV-2.....	115
6.3.4	ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	117
6.3.5	TRANSPARENCIA DE LA PANTALLA FACIAL	117
6.4	CONCLUSIONES.....	121
7.	CAPÍTULO V. CREMA LABIAL ANTIMICROBIANA BASADA EN PRODUCTOS NATURALES A BASE DE EXTRACTO DE ARÁNDANOS ROJOS	123
7.1	INTRODUCCIÓN.....	125
7.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	127
7.2.1	PREPARACIÓN DE LA CREMA DE PINTALABIOS	127
7.2.2	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6.....	127
7.2.3	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2.....	127
7.2.4	ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO MS2.....	128
7.2.5	ENSAYOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS	129
7.2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	130
7.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
7.3.1	ENSAYOS ANTIVIRALES.....	131
7.3.1.1	BACTERIÓFAGO PHI6.....	131
7.3.1.2	BACTERIÓFAGO MS2	133
7.3.2	ENSAYOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS.....	135

7.4	CONCLUSIONES.....	139
8.	CONCLUSIONES GENERALES	141
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	147
10.	ANEXO I.....	175
11.	ANEXO II	189
12.	ANEXO III.....	201
13.	ANEXO IV.....	221
14.	ANEXO V	237

ABREVIATURAS

AFM – Microscopía de fuerza atómica
ARN – Ácido ribonucleico
ASTM – Asociación Americana de Testado y Materiales
BAK – Cloruro de benzalconio
BFE – Eficiencia de filtración de bacterias
CGC – *Caenorhabditis* Genetics Center
CMC – Concentración micelar crítica
COVID-19 – Enfermedad infecciosa del coronavirus 2019
DEA – Dietanolamina
DMDM hidantoína - 1,3-dimetilol-5,5-dimetil hidantoína
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO – Dimetil sulfóxido
DMTA – Análisis mecánico dinámico
DSC – Calorimetría diferencial de barrido
E' – Módulo de almacenamiento
E'' – Módulo de pérdidas
EDS – Espectroscopía de rayos-X de energía dispersa
EDTA– Ácido etilendiaminotetraacético
EPA – Agencia de Protección Ambiental
EPI – Equipo de protección individual
FBS – Suero Fetal Bovino
FESEM – Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
FFP – Piezas faciales filtrantes

HaCaT (células) – Queratinocitos humanos no tumorales
HCoV-229E – Coronavirus Humano 229E
HSV-1 – Virus del herpes simplex 1
HSV-2 – Virus del herpes simplex 2
MCN – Medio de crecimiento de nematodos
MEM – Medio esencial mínimo
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OMS – Organización Mundial de la Salud
PACs – Proantocianidinas
PAN – Poliacrilonitrilo
PBS – Tampón fosfato salino
PC – Policarbonato
PE – Polietileno
PES – Poliéster
PET – Polietileno tereftalato
PFE – Eficiencia de filtración de partículas
PP – Polipropileno
PPE – Equipamiento de protección personal
PS – Poliestireno
PU – Poliuretano

PVA – Polivinilalcohol
QACs – Amonios cuaternarios
RMN – Resonancia magnética nuclear
RPE – Equipamiento de protección respiratoria
RSV – Virus respiratorio sincitial
SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratorio Severo Agudo Coronavirus 2
SIDA – Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SMS – *Spunbond-meltblown-spunbond*
Tan δ - Tangente de pérdidas
TCID₅₀ – Dosis infecciosa de cultivo celular del 50%

TGA – Análisis termales gravimétricos
TMS – Tetrametilsilano
TSA – Agar triptona soja
TSB – Caldo triptona soja
UFC (bacterias) – Unidades formadoras de colonias
UFC (virus) – Unidades formadoras de calvas
UV – Ultravioleta
Vero (células) – Células epiteliales de riñón de mono verde africano
VFE – Eficiencia de filtración de virus

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reducción del título infeccioso medido en UFC/mL determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6. Se muestra el resultado del logaritmo de las UFC/mL (log (UFC/mL)) de las muestras control, filtro sin tratamiento (Filtro Control), filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y de filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) tras 1, 10 y 30 minutos de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.....	52
Tabla 2. Reducción del título infeccioso determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6 y por el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2. Se muestran el control, el filtro sin tratamiento (Filtro Control), el filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y el filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[157] Copyright 2021 MDPI.	54
Tabla 3. Titulación de partículas infecciosas obtenidas por el método de doble capa para los ensayos antivirales llevados a cabo con el bacteriófago Phi6 expresada como media ± desviación estándar, porcentaje de inactivación viral con respecto al control sin estar en contacto con ningún filtro (CONTROL), tras estar en contacto con filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro con el recubrimiento de jabón de manos solidificado (Filtro HS) durante 1, 10 y 30 minutos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.	70
Tabla 4. Título infeccioso y valores de logaritmo obtenidos por el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2 expresado como media ± desviación estándar, reducción de logaritmos y porcentaje de inactivación viral con respecto al control sin estar en contacto con ningún filtro (CONTROL), tras estar en contacto con filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro con el recubrimiento de jabón de manos solidificado (Filtro HS) durante 1 minuto. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.....	72
Tabla 5. Reducción del título infeccioso medido en UFC/mL determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6. Se muestra el resultado del logaritmo de las UFC/mL (log (UFC/mL)) de las muestras control, pantalla PET sin tratamiento (PET Control), pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de	

BAK (PET BAK) tras 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI..... 115

Tabla 6. Resultados de los ensayos antivirales de la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos frente al bacteriófago Phi6 tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 131

Tabla 7. Resultados de los ensayos antivirales de la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos contra el bacteriófago MS2 tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos de filtración de mascarillas faciales: (a) sedimentación gravitacional, (b) filtración por colado, (c) intercepción, (d) difusión, (e) impactación por inercia e (f) interacciones electrostáticas. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.	22
Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de fabricación de mascarillas faciales: (a) método de soplado por fusión, (b) electrohilado, (c) método de hilado no tejido, (d) proceso de recubrimiento por inmersión o “dip coating”. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.	24
Figura 3. Ensamblaje para electrohilado sin aguja de una solución de polímero. Adaptado con permiso de ref. [87] Copyright 2021 Elsevier.	25
Figura 4. Diferentes tipos de mascarillas disponibles de forma comercial en el mundo: (a) mascarillas quirúrgicas, (b) mascarillas higiénicas, (c) mascarillas KN95, (d) mascarillas N95, (e) mascarillas FFP1, (f) mascarillas FFP2, (g) mascarillas FFP3. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.....	27
Figura 5. Representación esquemática de la funcionalidad de las pantallas faciales. Creado con Biorender por Alberto Tuñón-Molina.	31
Figura 6. Representación esquemática de la funcionalidad de pintalabios antimicrobianos, inhibiendo la entrada de microorganismos patógenos a través de la boca. Creado con Biorender por Alberto Tuñón-Molina.	33
Figura 7. Espectro RMN 1D de protones del cloruro de benzalconio disuelto en agua bidestilada 99.9% recogido a 25°C. Se muestra la estructura molecular, asignación e integral del cloruro de benzalconio. Las letras en la estructura molecular y el espectro indican el protón en los diferentes subgrupos químicos del cloruro de benzalconio. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.	49
Figura 8. Morfología de los filtros de mascarilla mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. Filtro sin tratar (Control), tratado mediante “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y tratado con $0.46 \pm 0.13\%$ p/p de recubrimiento biofuncional de cloruro de benzalconio (Filtro BAK) a dos aumentos (x100 y x1000). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.	50

Figura 9. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medido por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación del bacteriófago de muestras sin diluir para el control, el filtro sin tratar (Filtro Control), filtro tratado por el método de “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) para tiempos de contacto de 1, 10 y 30 minutos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI. 51

Figura 10. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para el filtro sin tratamiento (F. CONTROL), filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (FILTRO E), filtro con recubrimiento biofuncional de BAK (FILTRO BAK) y control acorde al método del TCID50/mL. Un gráfico de puntos se establece en función del valor de cada punto. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI. 53

Figura 11. Ensayos antibacterianos de difusión en agar. Se muestran los resultados de filtros sin tratamiento (Filtro Control), de filtros tratados con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y de filtros con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) tras 24 h de incubación a 37°C. Se observa en cada imagen la anchura normalizada de los halos antibacterianos, expresada como media ± desviación estándar calculada con la ecuación (1). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI. 55

Figura 12. Imágenes FESEM de los filtros de mascarilla sin tratamiento (Filtro Control) y del filtro de mascarilla con un recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado $0.57 \pm 0.03\%$ p/p (Filtro HS) a dos aumentos (x50 y x1000). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 67

Figura 13. Diferencia de presión de los filtros sin tratamiento (Filtro Control) y del filtro con $0.57 \pm 0.03\%$ p/p de recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS); ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 68

Figura 14. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medida por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación de muestras no diluidas del control, filtro de mascarilla sin tratamiento (Filtro Control), y de filtro de mascarilla con el recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS) tras 1, 10 y 30 minutos de

contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021..... 69

Figura 15. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para el filtro sin tratamiento (Filtro Control), filtro con recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS) y control acorde al método del TCID50/mL. * $p < 0.05$; ns, no significativo Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 71

Figura 16. Extracción y cuantificación de ARN del bacteriófago Phi6. Se muestra la concentración de ARN en ng/ μ L del virus Phi6 medida en el control (sin estar en contacto con ningún tipo de filtro) y la misma cantidad de virus tras estar en contacto durante 5 minutos con un filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro tratado con jabón de manos (Filtro HS). * $p < 0.05$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 73

Figura 17. Esquema que representa la estructura de una mascarilla comercial con el filtro tratado por el método de “dip coating” con jabón de manos solidificado. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021..... 74

Figura 18. Ensayo de citotoxicidad por el método del MTT de los extractos obtenidos de las mascarillas de 5 capas con (Filtro HS) y sin (Filtro Control) el filtro antiviral tratado con jabón de manos solidificado. Se midieron también los resultados de controles positivo y negativos cultivados en presencia de células de queratinocitos humanos HaCaT a 37°C. *** $p < 0.001$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 75

Figura 19. Representación esquemática de la utilidad de la tecnología antiviral desarrollada de bajo coste basada en jabón de manos solidificado. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021. 78

Figura 20. Imágenes de microscopía óptica a dos aumentos (x10 y x40) y fotografías macroscópicas de los filtros de mascarilla limpios (Control S) antes (**a, b, c**) y después del tratamiento con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) (**d, e, f**) o con extracto de arándanos rojos NUTRIBIOLITE (E10N) (**g, h, i**). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI. 89

Figura 21. Imágenes de alta resolución por FESEM de los filtros de mascarilla antes (**a,b**) y después del tratamiento con los extractos de arándanos rojos VITAFAIR (**c,d**) o NUTRIBIOLITE (**e,f**). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI. 90

Figura 22. (a) Análisis termogravimétrico. Pérdida de peso (%) y derivada de la pérdida de peso frente a la temperatura. (b) Calorimetría diferencial de barrido. Flujo de calor normalizado calentando a 20°C/min. (c) Análisis mecánico dinámico. Módulo de almacenamiento (E') frente a temperatura a 1 Hz. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI. 91

Figura 23. Viabilidad del bacteriófago Phi6 determinada por el método de doble capa. Se muestra la titulación de muestras sin diluir para el control, telas sin tratamiento (Control S) y telas con recubrimiento biofuncional de extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) o NUTRIBIOLITE (E10N) a 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI. 93

Figura 24. Reducción del título infeccioso del bacteriófago Phi6 en logaritmo de unidades formadoras de colonias por mL (log(UFC/mL)). Se muestran los resultados de bacteriófagos sin estar en contacto con ningún tipo de filtro (CONTROL), con un filtro sin tratamiento (Control S) y con los filtros tratados con extractos de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N) a 1 minuto de tiempo de contacto con el virus. Tres ensayos independientes se llevaron a cabo en dos días diferentes (n=6). Se determinaron diferencias significativas mediante una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. ***p < 0.001; **p < 0.01; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI. 94

Figura 25. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto medido por el método del TCID50/mL. Se muestran los resultados de las partículas virales sin estar en contacto con ningún tejido (CONTROL), en contacto con filtros de mascarilla sin tratamiento (Control S) y filtros tratados con los extractos de arándanos rojos de VITAFAIR (E10V) o NUTRIBIOLITE (E10N) durante 1 minuto de contacto. Tres réplicas independientes (n=3) se estudiaron. Se determinaron diferencias significativas con respecto al control con una prueba ANOVA con una corrección de Tukey para múltiples comparaciones. ***p < 0.001; ns, no significativo. Adaptado con

permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.	96
Figura 26. Ensayos de difusión en agar con las bacterias MRSA y MRSE. Se muestran los resultados con la muestra sin tratamiento (Control S) y las muestras tratadas con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N). Se incubaron durante 24 h a 37°C. La anchura normalizada de los halos de inhibición calculada con la ecuación (1) se muestra como media \pm desviación estándar. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[182] Copyright 2021 MDPI.	97
Figura 27. Toxicidad in vivo con el modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> . Se muestran los resultados de la proporción de supervivencia, crecimiento y reproducción tras una exposición de 24 h con los extractos de filtros de mascarilla sin tratamiento (Control S) y tratados con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N) con respecto al control positivo. Se realizó el ensayo con cinco réplicas independientes (n=5). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. Ns; no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.	98
Figura 28. Representación esquemática de la utilidad de la tecnología antiviral desarrollada basada en extracto de arándanos rojos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.	99
Figura 29. Imágenes topográficas por AFM (altura, error de amplitud e imágenes de fase) y representación de la fase 3D grabadas en modo de contacto para muestras sin tratamiento (PET Control), muestras tratadas con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y muestras con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) escaneando un área de 10 μm x 10 μm . Estas imágenes muestran cómo se forma el recubrimiento de BAK sobre la superficie de la pantalla PET tras el tratamiento de recubrimiento por inmersión. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[210] Copyright 2021 MDPI.	111
Figura 30. Morfología del recubrimiento biofuncional de BAK en la superficie de las pantallas PET observado mediante FESEM con análisis EDS. Se observa la pantalla PET con $0.182 \pm 0.034\%$ p/p de recubrimiento biofuncional de BAK a dos aumentos: (a) x150 y (b) x720, además de (c) el análisis EDS para el recubrimiento de la matriz de PET.	

Reimpreso con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210].
Copyright 2021 MDPI..... 113

Figura 31. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medida por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación de muestras no diluidas del control, pantalla PET sin tratamiento (PET Control), pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) tras 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI. 114

Figura 32. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para la pantalla sin tratamiento (PET Control), pantalla tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E), pantalla con recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) y control acorde al método del TCID50/mL. Los puntos, cuadrados y triángulos se establecen en función del valor de cada punto. *p < 0.05. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI. 116

Figura 33. Ensayos antibacterianos de difusión en agar. Se muestran los resultados de la pantalla PET sin tratamiento (PET Control), de pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) tras 24 h de incubación a 37°C. Se observa en cada imagen la anchura normalizada de los halos antibacterianos, expresada como media ± desviación estándar calculada con la ecuación (1). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI..... 117

Figura 34. Resultados de la medida de opacidad para las muestras de PET sin tratamiento (PET Control), PET tratado por el método de “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK). Los resultados de la prueba ANOVA se muestran en la gráfica; ns: no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI. 118

Figura 35. Viabilidad del bacteriófago Phi6 determinada por el método de doble capa tras 1 minuto de contacto. Se muestran imágenes de muestras sin diluir para TSB (CONTROL), dilución al 10% p/v de crema sin extracto de arándanos rojos (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% p/v en TSB. Se empleó TSB sin bacteriófago para controlar posibles contaminaciones

(CONTROL NEGATIVO). Las imágenes muestran una clara reducción de la capacidad de infección del bacteriófago Phi6 con el tratamiento con la crema con arándanos rojos diluida tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 132

Figura 36. Reducción del título de infección del bacteriófago MS2 en logaritmos de unidades formadoras de colonias por mL (LOG(UFC/mL)) medido por el método de doble capa. Se muestran los resultados de bacteriófagos en contacto con TSB (CONTROL), crema diluida al 10% p/v sin extracto de arándanos rojos (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% p/v en TSB. Tres ensayos antivirales se realizaron por separado en dos días diferentes (n=6). Se determinaron diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. ***p < 0.05; ns: no significativo. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 133

Figura 37. Viabilidad del bacteriófago MS2 determinada por el método de doble capa tras 1 minuto de contacto. Se muestran imágenes de muestras sin diluir para TSB (CONTROL), dilución al 10% p/v de crema sin tratamiento (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% p/v en TSB. Se empleó TSB sin bacteriófago para controlar posibles contaminaciones (CONTROL NEGATIVO). Las imágenes muestran una clara reducción de la capacidad de infección del bacteriófago MS2 con el tratamiento con la crema con arándanos rojos diluida tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 135

Figura 38. Resultados antibacterianos de la crema con extractos de arándanos rojos frente a MRSA (A); Escherichia coli (B); Mycobacterium smegmatis (C) y Candida albicans (D). Los resultados se muestran como reducción del logaritmo de las UFC/mL. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society. 136

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Una enfermedad infecciosa emergente es aquella que se reconoce como nueva en una población o involucra un patógeno reconocido que afecta a poblaciones o áreas geográficas nuevas o más grandes[1,2]. La aparición de enfermedades está influenciada por cambios ecológicos y ambientales (como la agricultura, deforestación, sequía o inundaciones), por la demografía y el comportamiento humano (donde interviene la migración de la población, la urbanización, el comercio internacional o los viajes), por la tecnología e industria, la adaptación microbiana y la descomposición en medidas sanitarias[1,2].

La infección no siempre lleva a la enfermedad[3]. La infección ocurre cuando un patógeno (virus, bacteria u otros microbios) entra en el organismo y comienza a multiplicarse[4]. La enfermedad, que normalmente ocurre en una pequeña proporción de las personas infectadas, se da cuando las células del cuerpo se encuentran dañadas como resultado de la infección y los síntomas de la enfermedad aparecen[5].

Los microorganismos capaces de causar una enfermedad normalmente entran en el organismo a través de la boca, ojos, nariz, orificios urogenitales o a través de heridas que permitan traspasar la barrera de la piel[5,6]. Estos microorganismos pueden ser dispersados y transmitidos a través de varias rutas. Una de ellas es la de contacto, mediante la cual algunas enfermedades se propagan por contacto directo con la piel infectada, membranas mucosas o con fluidos corporales[7,8]. Enfermedades transmitidas por esta vía incluyen el herpes labial (virus del herpes simplex tipo I (HSV-1)) y enfermedades de transmisión sexual como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)[9]. Los patógenos también pueden transmitirse por contacto indirecto cuando una persona infectada toca una superficie, dejando microbios que se transfieren a otra persona y posteriormente toca sus ojos, boca o nariz[7,8]. Gotículas producidas al estornudar o toser también son una importante vía de transmisión si entran en contacto con membranas mucosas de otra persona[5]. Otra ruta son los vehículos comunes, como comida contaminada, agua o sangre, entre otros medios, pueden diseminar patógenos. Microorganismos como *Escherichia coli* o *Salmonella* entran al sistema digestivo de esta

manera[5]. Los vectores, es decir, criaturas como pulgas, ácaros, garrapatas, ratas, caracoles o perros también pueden transmitir enfermedades[7]. El vector más común para las infecciones en humanos es el mosquito, que transmite la malaria, el virus del Nilo occidental o la fiebre amarilla[5]. Por último, la transmisión aérea es otra de las rutas para dispersar microorganismos patógenos[10–12]. Hay patógenos que también pueden transmitirse por el aire a partir de gotículas o partículas de polvo que contengan microorganismos suspendidos en el aire por largos períodos de tiempo[10,13,14]. Este tipo de transmisión es sobre todo característico de enfermedades respiratorias como la enfermedad del COVID-19 causada por el SARS-CoV-2, por ejemplo[5].

Los patógenos presentes en el aire se propagan en partículas o gotículas. Las gotículas se generan en la parte alta o baja del aparato respiratorio, boca, nariz o por circunstancias como vomitar, goteos de agua o diarrea[15].

Las gotículas respiratorias pueden transportar microorganismos como bacterias y virus y constituir un medio idóneo para la transmisión de enfermedades infecciosas[15]. Se demostró que las gotículas procedentes de la nariz y la boca contenían bacterias, pero no eran capaces de viajar en el aire durante más de 2 m[16]. Wells[17] postuló una hipótesis ampliamente aceptada hoy en día acerca de la distinción entre tamaños de gotículas y rutas de transmisión aérea. Las gotículas más pequeñas empiezan a evaporarse nada más son liberadas y esto cambia su tamaño, resultando en pequeños núcleos que son lo suficientemente pequeños para mantenerse suspendidos en el aire durante mucho tiempo y seguir resultando infecciosos. Las gotículas grandes ($> 100 \mu\text{m}$) pueden depositarse en el suelo antes de convertirse en núcleos.

La mayoría de gotículas respiratorias son de tamaño menor a $100 \mu\text{m}$ [18–20] y se evaporan rápidamente en el ambiente[17] para convertirse en núcleos, que se quedan suspendidas en el aire o son transportadas por corrientes de aire.

La supervivencia de los patógenos en el aire depende de muchos factores, entre los que destacan el tiempo que pasan en el aire, el nivel de humedad (lo que en parte depende de la temperatura), contaminantes atmosféricos y luz ultravioleta (UV)[21,22]. Tanto la

temperatura como la humedad afectan a la envoltura lipídica y proteica, afectando al período de supervivencia[23]. Son factores que actúan conjuntamente bien para destruir microorganismos o estabilizarlos[22,23]. Contaminantes químicos en el ambiente como el monóxido de carbono o el dióxido de sulfuro, juntamente con la luz UV, son factores que influyen negativamente en la supervivencia de los microorganismos en el ambiente[14,24]. El transporte de las gotículas en el aire puede deberse a varios factores ambientales, como los flujos de aire debidos a la ventilación local[25,26], así como al movimiento de personas y los gradientes térmicos que puedan ser producidos por equipos eléctricos[10].

Implementar sistemas efectivos de ventilación reduce la transmisión aérea de aerosoles que puedan ir cargados con virus o bacterias patógenas[25,27,28]. Se recomienda en espacios cerrados asegurar una ventilación suficiente y evitar la recirculación del aire[11,27]. Los sensores de dióxido de carbono pueden emplearse como indicadores de la acumulación de aire exhalado y sirven como una manera sencilla de monitorizar y optimizar la ventilación[29,30]. Asimismo, el uso de mascarillas, pantallas faciales y la distancia física es también efectiva para reducir las oportunidades de inhalar aerosoles debido a que la concentración de éstos es mucho mayor en la proximidad de un individuo infectado[31].

1.2 BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Uno de los desafíos más importantes en el manejo de las enfermedades infecciosas es la resistencia antimicrobiana[32]. Este problema afecta a todo tipo de infecciones, sean causadas por virus, parásitos, hongos o bacterias.

La resistencia a antibióticos en bacterias es producto de la genética y la fisiología innatas, las cuales se transmiten verticalmente entre especies, y de la tendencia de las bacterias a intercambiar material mediante la transferencia genética horizontal entre especies y géneros[32]. Esta estrategia de combinación genética ha dado como resultado la acumulación de fenotipos resistentes a antibióticos en muchas especies bacterianas. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas ha identificado a las bacterias

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, a las Enterobacteriaceae productoras de β -lactamasa de amplio espectro y a las bacterias *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* como los patógenos bacterianos que son especialmente complejos para el tratamiento de enfermedades infecciosas[33]. Además, la reciente aparición de la tuberculosis resistente a antibióticos[34] y de *Clostridium difficile*[35], hace que esta lista de peligros vaya en aumento.

Combatir la resistencia a antibióticos requiere un entendimiento detallado de las bases moleculares, evolución y propagación de la resistencia[36,37]. Se necesitan también nuevos químicos con propiedades antimicrobianas para hacer más eficientes los tratamientos[38,39]. Crear estrategias novedosas que puedan ampliar la vida de las moléculas antibióticas o que permitan descubrir nuevas aproximaciones para controlar el crecimiento de los patógenos se ha convertido en algo crucial para los investigadores hoy en día[32].

Los mecanismos de resistencia más importantes incluyen la transformación enzimática, modificación de la diana molecular, aislamiento de la droga, eflujo activo desde el interior celular y prevención de la entrada del compuesto al interior de la célula[36,37,40]. La resistencia puede surgir bien de forma pasiva como resultado de mecanismos innatos preexistentes o bien por vías activas como la adquisición de nuevo material genético por elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones[41,42].

La resistencia innata incluye barreras fisiológicas como la membrana externa de las bacterias Gram negativas, la expresión de bombas de flujo intrínsecas y mutaciones naturales en dianas de antibióticos[43,44]. Algunas bacterias están repletas con mecanismos de defensa innatos, como *Pseudomonas aeruginosa*[45]. Este patógeno oportunista se encuentra en ambientes acuáticos o con barro y puede expresar una gran variedad de bombas de eflujo eficientes, así como enzimas capaces de inactivar antibióticos[32].

Por el contrario, otros organismos como *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* adquieren fácilmente genes de resistencia a antibióticos mediante plásmidos u otros

elementos genéticos móviles[46,47]. Estos genes frecuentemente ofrecen resistencia a varios antibióticos a la vez y, como resultado, estos genes se pueden mantener sin necesidad de selección directa[42,48]. Este hecho puede ser un impedimento para que las estrategias de rotación cíclicas de antibióticos funcionen para superar la resistencia a antibióticos[48]. Los genes de resistencia se asocian también con transposones e integrones[49]. Los transposones permiten la movilización de genes desde plásmidos a los cromosomas bacterianos y viceversa. Los integrones, bien en cromosomas o plásmidos, permiten el aumento continuo de genes de resistencia a antibióticos[41,42,50]. Independientemente de si el antibiótico es de origen natural o sintético, la resistencia surgirá y circulará por el ambiente[42,48,51]. Un estudio reciente con muestras de bacterias formadoras de esporas del suelo en diferentes ambientes demostró que todos estos microbios eran multirresistentes a los fármacos[52]. De media, cada cepa bacteriana no patógena se descubrió que era resistente a 7-8 antibióticos de un panel de 21 muestras. La resistencia no solo estaba asociada a antibióticos de origen natural. Niveles significativos de resistencia se encontraron también contra antibióticos sintéticos, como la linezolidina, o el ciprofloxacino, así como contra antibióticos semi-sintéticos diseñados para superar los mecanismos de resistencia como la telitromicina[32]. El estudio reveló que la colección de todos los genes de resistencia es genéticamente extensa y que pueden responder a un amplio rango de químicos[51].

1.3 PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las enfermedades infecciosas son un factor inevitable en la vida, pero hay muchas estrategias disponibles para ayudar a protegerse de infecciones y para tratar enfermedades una vez se han desarrollado.

Las vacunas son preparaciones biológicas que mejoran la inmunidad respecto a una enfermedad particular[53,54]. Una vacuna incluye, normalmente, un agente que se parece al organismo causante de la enfermedad y se fabrican con formas atenuadas o muertas del microbio o alguna de sus toxinas[54]. El agente estimula al sistema inmunitario del cuerpo para reconocerlo como un agente extraño, destruirlo y “acordarse” de ello, de manera que el sistema inmunitario pueda identificarlo y destruirlo más fácilmente si lo

encuentra más tarde[55,56]. Las personas vacunadas producen anticuerpos que neutralizan al agente causante de una enfermedad[5].

Existen también antibióticos o antivirales capaces de combatir infecciones bacterianas o virales, respectivamente[57]. Los antibióticos pueden destruir bacterias o impedir la reproducción de éstas, permitiendo al cuerpo humano utilizar sus defensas naturales para eliminar el agente patógeno[58]. Los antivirales pueden inhibir la capacidad del virus de reproducirse o pueden aumentar la capacidad de respuesta inmune del cuerpo a la infección[59]. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los microorganismos mutan y pueden desarrollar resistencias a antibióticos o medicamentos antivirales[5].

A parte de estos medicamentos, existen otros tipos de mecanismos de prevención de enfermedades infecciosas, como pueden ser barreras artificiales que evitan el contacto de los microorganismos con el individuo. Este es el caso de mascarillas, pantallas faciales o cremas labiales antimicrobianas.

1.3.1 MASCARILLAS

Las mascarillas faciales son herramientas de protección diseñadas para el uso en la población y evitar la transmisión de agentes contaminantes y/o partículas biológicas infecciosas[60]. Estos dispositivos de prevención de transmisión de enfermedades infecciosas son los más conocidos, los cuales se han convertido en un icono en la sociedad actual desde el inicio de la pandemia del SARS-CoV-2[60]. Sin embargo, existen imágenes de trabajadores sanitarios de la temprana era moderna tratando a pacientes contagiados de peste bubónica llevando mascarillas de formas triangulares[61]. Los primeros ensayos analizando la eficiencia de las mascarillas se llevaron a cabo en 1918 utilizando la bacteria *Bacillus prodigious*[62]. El comienzo del cubrimiento de nariz y boca se puede datar a inicios del siglo XX[63]. De hecho, se demostró en 1937 que cubriendo solo la nariz no era suficiente para una protección total[64]. El uso de mascarillas faciales resultó inefectivo contra la propagación de la gripe española debido a la mala calidad y el uso inapropiado de las mismas[65]. Este asunto dio lugar a una década de mejoras en la eficiencia y confort de las mascarillas. Muchos tipos nuevos de

mascarillas se fabricaron durante este período, incluyendo una mascarilla con una doble capa de tejido[62], una mascarilla con un alambre de oro de 14 quilates diseñada para proteger al médico y al paciente[66], una mascarilla fabricada con una red de gasas con un trozo de goma entre ellas y una mascarilla de gasas con celofán entre ellas[62].

Sin embargo, fue la aparición de nuevos materiales poliméricos en la década de los 50 lo que supuso la mayor contribución a la fabricación de mascarillas faciales más eficientes y de un menor coste[67]. Entre estos materiales, el polipropileno (PP) y las fibras de poliéster (PES) se propusieron como los materiales más eficientes para la fabricación de mascarillas debido a su naturaleza hidrófoba, lo cual les permite bloquear el paso de partículas acuosas que contengan cargas víricas[68]. Otros materiales como el poliestireno (PS)[69], el policarbonato (PC)[70] y el polietileno (PE)[71,72] también se han empleado en la fabricación de mascarillas. Además, se han desarrollado nuevos métodos para determinar la efectividad de estas[63].

1.3.1.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN

Las mascarillas utilizan diferentes procedimientos de filtración, incluyendo sedimentación gravitacional, intercepción, impactación por inercia, difusión, filtración por colado e interacciones electrostáticas (ver Figura 1)[71,73–75].

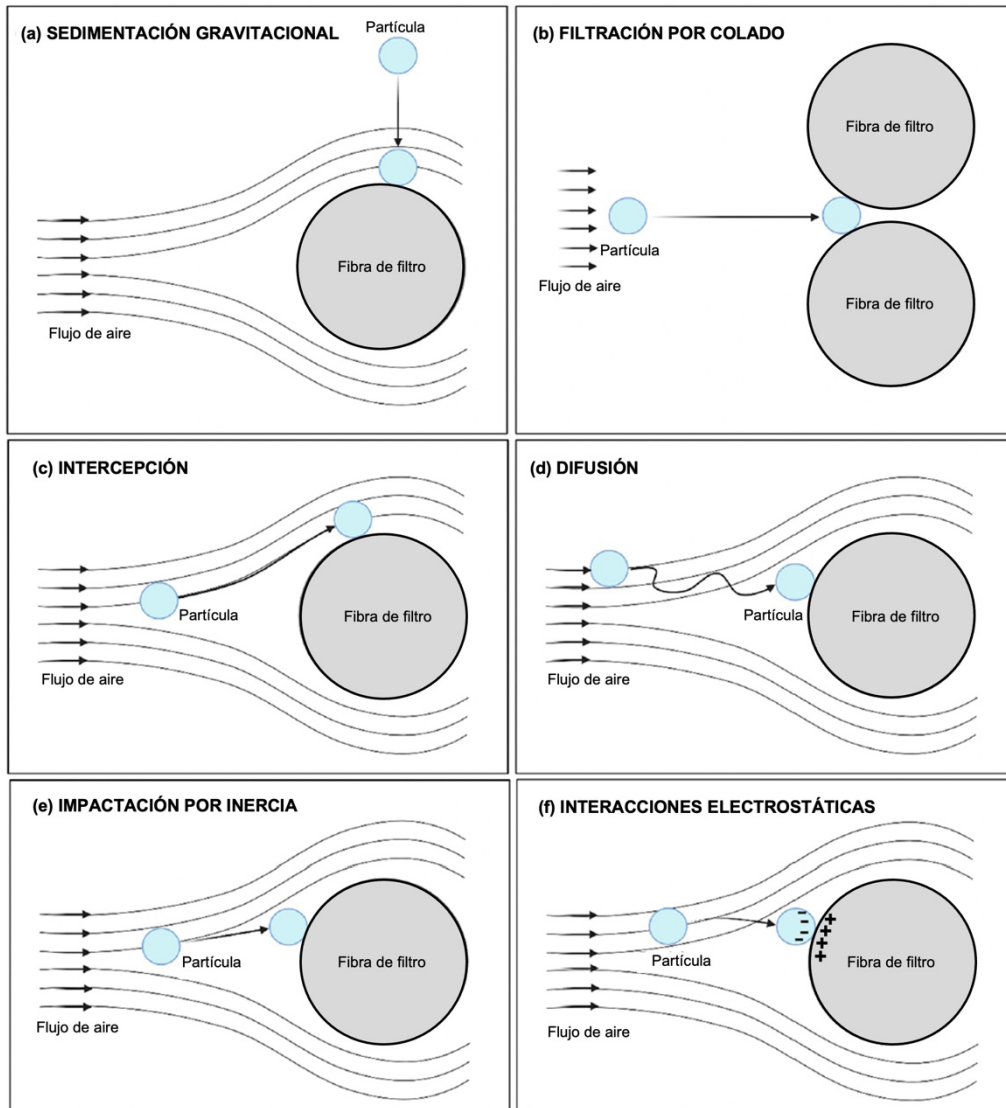


Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos de filtración de mascarillas faciales: (a) sedimentación gravitacional, (b) filtración por colado, (c) intercepción, (d) difusión, (e) impactación por inercia e (f) interacciones electrostáticas. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.

Para partículas de gran tamaño ($> 20 \mu\text{m}$), el mecanismo de filtración dominante es la sedimentación gravitacional porque partículas grandes de aerosoles se fijan debido a fuerzas gravitacionales[71,76]. Los mecanismos de impactación por inercia e intercepción son los que cobran mayor relevancia en el caso de partículas de entre $1\text{-}10 \mu\text{m}$, mientras que la difusión juega un papel más importante para partículas de menor tamaño ($< 1 \mu\text{m}$)[71,76]. La impactación por inercia ocurre cuando el tamaño, la velocidad y la densidad de las partículas crece debido a un aumento de la inercia de las partículas, causando que estas se desvíen de la dirección del flujo de aire y choquen con

las fibras[71,73,77–79]. El proceso de intercepción ocurre cuando las partículas entran en contacto físico directo con el filtro y se mantiene fijado al mismo. La filtración por colado tiene lugar cuando el tamaño del poro es menor al diámetro de las partículas, resultando en una captura de las partículas en el filtro[75]. El proceso de difusión se define por el movimiento Browniano relativo de las partículas en el medio[71]. Las partículas difundidas son desviadas desde el flujo laminar y se dispersan de manera aleatoria sobre la matriz de filtración del tejido[71,80]. Las interacciones electrostáticas suponen el uso de ciertos materiales durante la fabricación de las mascarillas lo que les confiere una carga electrostática[81,82]. Las nanopartículas de un tamaño menor a 0.2 μm son capturadas principalmente por fuertes interacciones electrostáticas[71].

1.3.1.2 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE MASCARILLAS

Los principales métodos de fabricación y tratamiento de filtros de mascarillas son los conocidos como soplado por fusión, hilado no tejido, electrohilado o recubrimiento por inmersión o también existen procesos sin aguja (ver Figura 2).

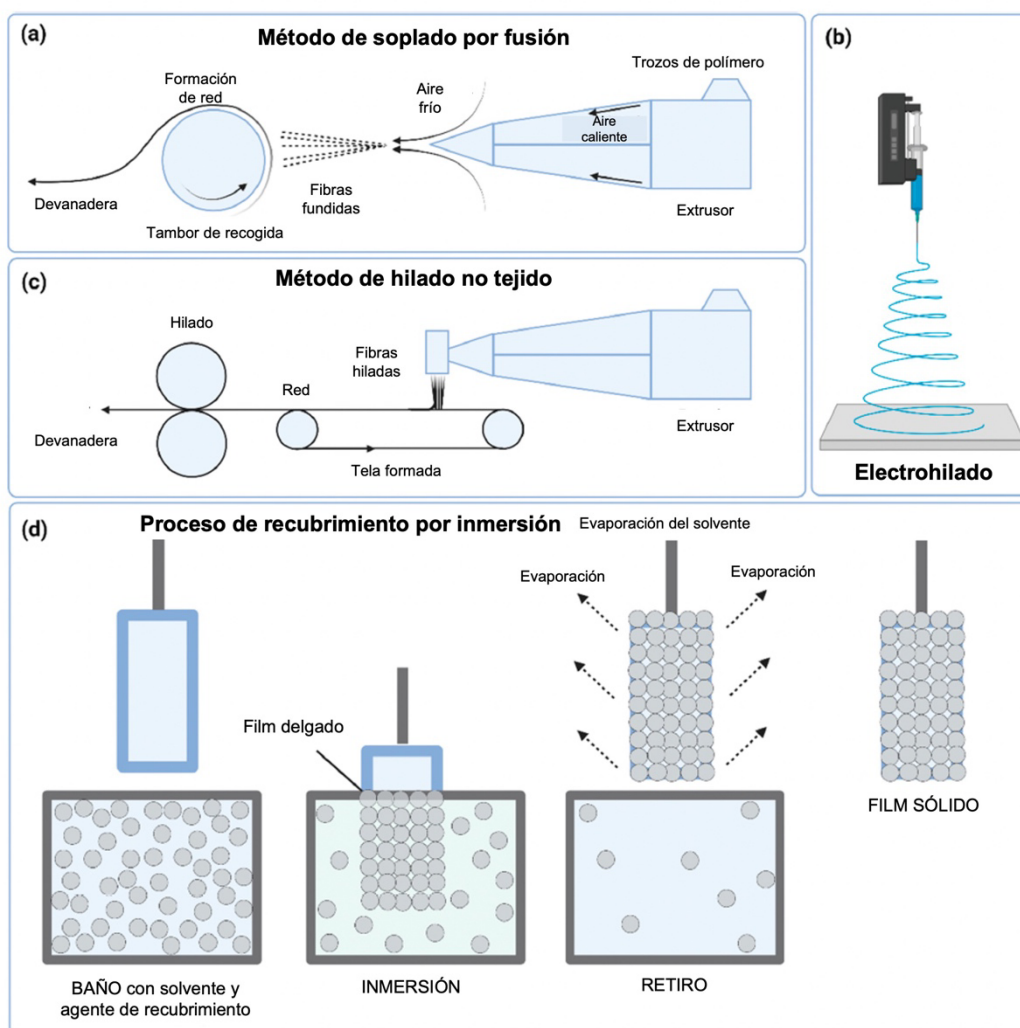


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de fabricación de mascarillas faciales: (a) método de soplado por fusión, (b) electrohilado, (c) método de hilado no tejido, (d) proceso de recubrimiento por inmersión o “dip coating”. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.

El **soplado por fusión** es un método de fabricación de micro- y nanofibras en el que un polímero o resina se funde y es expulsado por cientos de pequeñas boquillas (Figura 2a). Se emplea un gas soplado de alta velocidad para depositar las fibras en una cinta transportadora y forma una red no tejida con fibras depositadas de forma aleatoria[83,84]. Materiales como el PS, PC, PES o PE son apropiados para este método[85]. Como resultado de este proceso, se fabrican fibras de pequeño diámetro (1-5 μm) y poros con tamaños menores[83,84]. Este tipo de telas se emplean en la fabricación de mascarillas de alta calidad, respiradores o filtros para limpieza de habitaciones[70].

Durante el **hilado no tejido**, un polímero fundido se proyecta sobre una cinta transportadora (Figura 2c). Luego, las fibras se conectan entre sí mediante calentamiento

o por métodos químicos o mecánicos para generar la tela no tejida. El tejido formado se envuelve en un rollo por la bobinadora[84]. Este tipo de tejido se caracteriza por fibras de entre 1 y 50 μm de diámetro. Polímeros como el PP, PES, PE o poliuretano (PU) son apropiados para este procedimiento, aunque el polipropileno isotáctico es el más comúnmente empleado[83,84].

En el método de **electrohilado** se utiliza un campo eléctrico para descargar la disolución del polímero (Figura 2b). Mientras el polímero pasa por el campo electromagnético, se hace más fino y se acumula en una superficie plana, generando una red de nanofibras no tejidas[85]. Se ha determinado que el diámetro de las fibras formadas por esta metodología varía entre 100-500 nm, dependiendo de las fuerzas electrostáticas o la viscoelasticidad de los polímeros[83]. Polímeros como el polivinilpirrolidona, polivinilalcohol (PVA), poliacrilonitrilo (PAN) o PS son adecuados para el “electrospinning”. Polímeros biocompatibles y biodegradables como la policaprolactona son también apropiados[86].

En el **electrohilado sin aguja** se fija la distancia entre dos electrodos para obtener una capa de nanofibras que se consigue ajustando los voltajes en el electrodo colector y el electrodo rotatorio (Figura 3)[87].

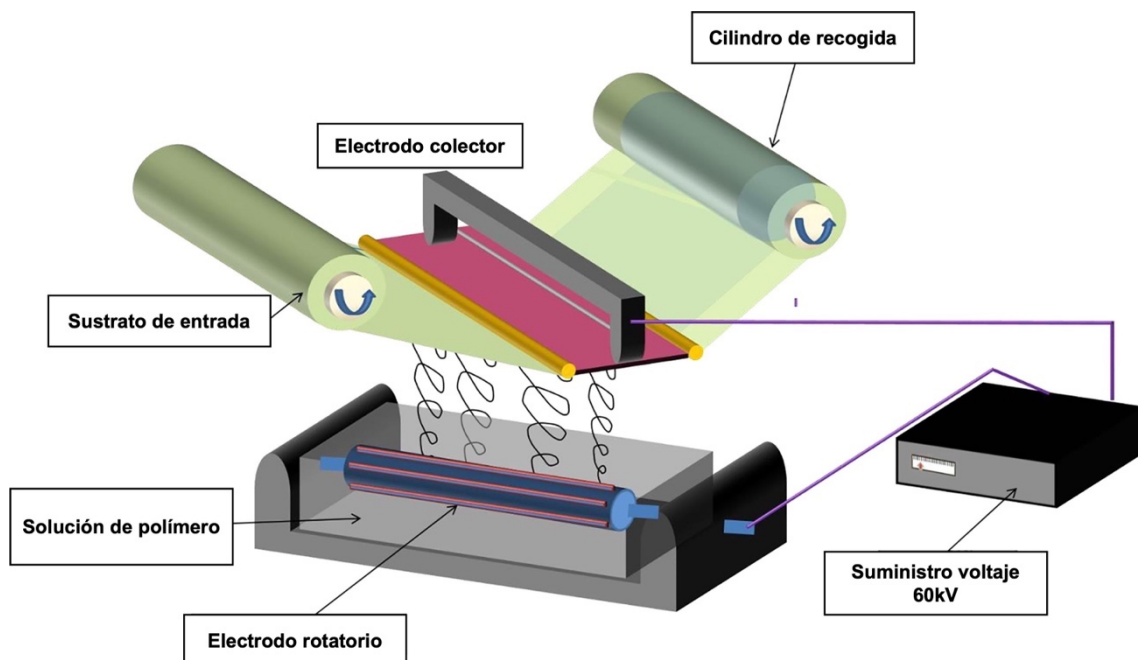


Figura 3. Ensamblaje para electrohilado sin aguja de una solución de polímero. Adaptado con permiso de ref. [87] Copyright 2021 Elsevier.

El método de **recubrimiento por inmersión** (o método *dip-coating* en inglés) es un proceso fácil y de bajo coste para producir y tratar telas no tejidas. Consiste en la acumulación de una capa delgada y uniforme de una mezcla que contiene partículas metálicas, biomoléculas o fibras poliméricas para crear una capa de recubrimiento en un sustrato (Figura 2d). El proceso se divide en cinco fases: inmersión del material, iniciación y desplazamiento seguido de filtración y evaporación[83]. Este proceso es adecuado para superficies horizontales o planas, pero no es aconsejable para tratar una única cara de un objeto.

1.3.1.3 TIPOS DE MASCARILLAS

Los tipos de mascarillas más importantes se muestran en la Figura 4. La Asociación Americana de Testado y Materiales (ASTM) especifica en su norma F2100 los criterios necesarios para la fabricación y comercialización de mascarillas comerciales[88]. Debido a que las mascarillas otorgan protección frente a partículas transmitidas por el aire, microorganismos patógenos, secreciones o fluidos corporales mediante el impedimento físico de su paso por el aire respirado, las siguientes características deben ser analizadas: eficiencia de filtración de partículas (PFE), eficiencia de filtración de bacterias (BFE), resistencia a fluidos, diferencia de presión o inflamabilidad. Otro parámetro utilizado para la fabricación de mascarillas es la eficiencia de filtración de virus (VFE). Además, cuando las mascarillas contienen algún compuesto químico o se fabrican con materiales que podrían ser tóxicos para los humanos, se recomienda hacer ensayos de citotoxicidad siguiendo la norma ISO-10993[89]. De acuerdo con estos parámetros, podemos encontrar los siguientes tipos de mascarillas comerciales que se describen a continuación.

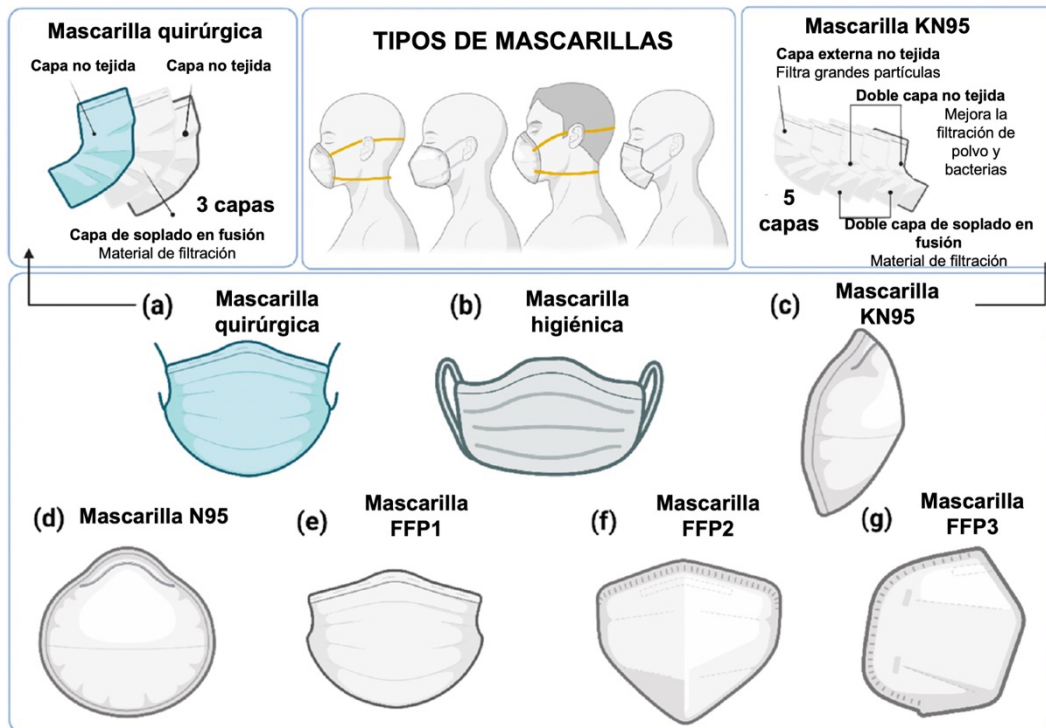


Figura 4. Diferentes tipos de mascarillas disponibles de forma comercial en el mundo: (a) mascarillas quirúrgicas, (b) mascarillas higiénicas, (c) mascarillas KN95, (d) mascarillas N95, (e) mascarillas FFP1, (f) mascarillas FFP2, (g) mascarillas FFP3. Adaptado con permiso de la ref. [60] Copyright 2021 American Chemical Society.

Las **mascarillas quirúrgicas** (ver Figura 4a) se fabrican, normalmente, siguiendo el diseño de tres capas, con dos capas de tela no tejida y una capa de tejido de tela fundida por soplado entre ellas[90]. Es la capa de tejido de tela fundida la que proporciona a este tipo de mascarillas la actividad filtrante[91]. Las mascarillas quirúrgicas tienen como objetivo proveer a los usuarios con una barrera para evitar que salpicaduras y gotículas entren en contacto con el aparato respiratorio[92]. Las mascarillas quirúrgicas no se clasifican como equipamiento de protección respiratoria (RPE) ya que no ofrecen protección contra infecciones ocasionadas por partículas de aerosoles[93]. Sin embargo, este tipo de mascarillas sí están diseñadas para prevenir a los portadores de contaminar el ambiente alrededor de ellos mismos, ya que minimiza la transmisión de agentes infecciosos hacia fuera de la mascarilla[94]. Para ser consideradas seguras para su uso, las mascarillas quirúrgicas deben ser fabricadas de acuerdo con las regulaciones técnicas recogidas en las normas UNE-EN 14683:2019, la cual incluye especificaciones sobre la estructura, diseño, requisitos de funcionamiento y métodos de ensayo[95]; UNE-EN ISO

10993-1:2010, que determina los criterios técnicos para la evaluación biológica de dispositivos de curación[89]; UNE-EN ISO 11737-1:2018, la cual se relaciona con la determinación de poblaciones de microorganismos en los productos[96]; UNE-EN ISO 15223-1:2017, que trata sobre la simbología que se necesita emplear en dispositivos médicos y datos que deben ser facilitados[97]; y UNE-EN 1041/2009 y A1:2014, que clarifican información esencial que debe incluir el fabricante de equipamiento médico[98]. Todos estos criterios técnicos permiten a las mascarillas quirúrgicas ser evaluadas con criterios como la BFE, respirabilidad, resistencia a salpicaduras o higiene microbiana[94].

Un estudio de interacciones de las gotículas entrantes sobre las tres capas de una mascarilla quirúrgica reveló que tanto la parte externa como la interna muestran características muy similares en cuanto a humedecimiento, adhesión y dinámica de impacto[99]. De acuerdo con las normas UNE-EN 14683:2019 y AC:2019[95] referentes a las mascarillas quirúrgicas, pueden categorizarse en tres categorías diferentes según su BFE ($\geq 95\%$ para el Tipo I y $\geq 98\%$ para los Tipos II y IIR), presión diferencial (< 40 Pa/cm² para el Tipo I y < 60 Pa/cm² para los Tipos II y IIR), presión de resistencia a salpicaduras (≥ 16 kPa para el Tipo IIR) y carga bacteriana (≤ 30 unidades formadoras de colonias (UFC)/g para los Tipos I, II y IIR)[94]. Las mascarillas quirúrgicas Tipo I deben ser utilizadas únicamente por individuos enfermos con el propósito de reducir el riesgo de transmisión de infecciones, principalmente durante una epidemia o una pandemia[94]. Sin embargo, se demostró que partículas entre 0.04 y 0.2 μm pueden atravesar los filtros de una mascarilla quirúrgica[100].

Las **mascarillas higiénicas** (ver Figura 4b) se fabrican, habitualmente, con cinco capas de tela no tejida[101]. Estas mascarillas contienen dos capas de tela no tejida de PP en las partes externas de la mascarilla, dos capas de tela no tejida de PE y, finalmente, una capa más de PP en la zona más interna de la mascarilla. Las mascarillas higiénicas no pueden considerarse una pieza de equipamiento sanitario de acuerdo con la norma UE/2017/745 ni tampoco una pieza de equipamiento de protección individual de acuerdo con la norma UE/2016/425[102]. Hay ciertas regulaciones que los fabricantes de mascarillas higiénicas deben tener en cuenta en relación con los materiales empleados en su producción o su uso: UNE 0064-1:2020 trata sobre los requerimientos en cuanto a materiales, diseño y

uso de mascarillas higiénicas en adultos[103], mientras que la norma UNE 0064-2:2020 habla de su uso en niños[104]. La norma UNE 0065:2020 habla sobre requerimientos en cuanto a materiales, diseño y uso de mascarillas higiénicas reutilizables en adultos y niños[101]. Las mascarillas higiénicas dotan al portador con una BFE mayor o igual al 95% en el caso de mascarillas desechables o mayor al 90% en el caso de mascarillas reutilizables[105]. Ofrecen una respirabilidad menor de 60 Pa/cm². Estas dos condiciones hacen de estas mascarillas una doble barrera protectora (de fuera hacia adentro y de dentro hacia afuera) que permite a los usuarios llevar su vida cotidiana con normalidad mientras están protegidos[101].

Las **mascarillas filtrantes** se utilizan para proporcionar a los individuos que la usan de una protección respiratoria[92]. Los estándares europeos para mascarillas filtrantes marcan tres clases de piezas faciales filtrantes (FFP): **FFP1**, **FFP2** y **FFP3**[106]. Las mascarillas FFP se fabrican siguiendo la norma *spunbond-meltblown-spunbond* (SMS)[107]. Esto quiere decir que el diagrama básico para este tipo de mascarillas se compone de tres capas: dos de tela *spunlace* no tejida en la parte exterior e interior de la mascarilla y una de tejido *meltblown* no tejido entre ambas[108]. A veces, las mascarillas FFP también incluyen una capa de algodón y PP entre la capa externa y la capa de tejido *meltblown*[107]. Las mascarillas FFP se fabrican para proteger a los usuarios de partículas tóxicas o patógenos que puedan ser inhalados[109]. Este tipo de protecciones están reguladas por las reglas de equipamiento de protección individual recogidas en la norma UE 2016/425[110] y los estándares técnicos detallados en las normas UNE-EN 149:2001 y A1:2010[111], que aportan especificaciones sobre la fuga de partículas, inflamabilidad o contenido de dióxido de carbono entre otras características. Las mascarillas FFP1 (Figura 4e) se fabrican, normalmente, de papel flexible que ofrece protección y comodidad a los usuarios frente a polvos no tóxicos[112,113]. Se suelen utilizar en ambientes donde se emiten grandes cantidades de polvo al aire, habitualmente en actividades como construcción, limpieza o barridos. Sin embargo, no protegen contra polvos, gases o vapores que puedan resultar perjudiciales contra la salud. Las mascarillas FFP1 proporcionan a sus usuarios una filtración de aerosoles de al menos un 80%, y su ratio de filtración interna es inferior al 22%[112,113]. Las mascarillas FFP2 (ver Figura 4f) son los accesorios de cubrimiento facial más empleados en el cuidado de la salud[114]. Este tipo de mascarillas son de alta filtración ya que tienden a filtrar más del 94% de las

partículas de entre 0.3-0.6 μm de diámetro[92]. Para partículas de entre 0.04 y 150 μm de diámetro, las mascarillas FFP2 pueden filtrar entre el 98.8-99.8% de las partículas[115]. El hecho de que los virus respiratorios se mueven por el aire a través de aerosoles explica la excelente protección viral que confieren las mascarillas FFP2 a pesar de que el tamaño de las partículas virales es menor que el estándar de filtración[115]. Las mascarillas FFP2 proporcionan una filtración de aerosoles $\geq 94\%$ y su goteo interno es menor al 8%[113]. Este tipo de mascarillas debería ser utilizada por trabajadores del sector sanitario cuando estén llevando a cabo intervenciones médicas en el tracto respiratorio de pacientes u otros procesos con riesgo de generación de aerosoles[112]. Las mascarillas **KN95** y **N95** (Figura 4c y 4d) se fabrican acorde con las normas para mascarillas FFP que se garantizan en China y Estados Unidos, respectivamente. Las KN95 están controladas por el gobierno chino bajo las normas GB2626-2006, GB262-2019 y GB19083-2010. Estas mascarillas conforman una protección de cinco capas al portador. Las capas están hechas de tela no tejida, algodón de ventilación de aire y tela *meltblown*[116]. Bajo estas regulaciones, las mascarillas KN95 y N95 ofrecen una protección frente a partículas mayores a 0.3 μm igual o mayor a un 95% y un goteo interno menor al 8%. Las mascarillas FFP3 (Figura 3g) son las mascarillas más protectoras de la clase FFP[92]. Aunque en muchos países, incluyendo los Estados Unidos, las mascarillas FFP2 se aceptan para proteger de agentes infecciosos en aerosoles, las FFP3 son las únicas aceptadas para este propósito en otros lugares como el Reino Unido[92]. Este tipo de mascarilla FFP filtra al menos el 99% de las partículas y tiene el menor goteo interno, siendo menor a un 2%[113]. Se recomienda que las mascarillas FFP3 se cambien tras cada uso, cuando la respiración sea costosa, la mascarilla parezca deteriorada o se contamine con excreciones respiratorias u otros fluidos corporales[92].

1.3.2 PANTALLAS FACIALES

Las pantallas faciales se clasifican como equipamiento de protección personal (PPE) que proporciona una barrera de protección a la zona facial relacionada con membranas mucosas (ojos, nariz y labios) (Figura 5)[117].

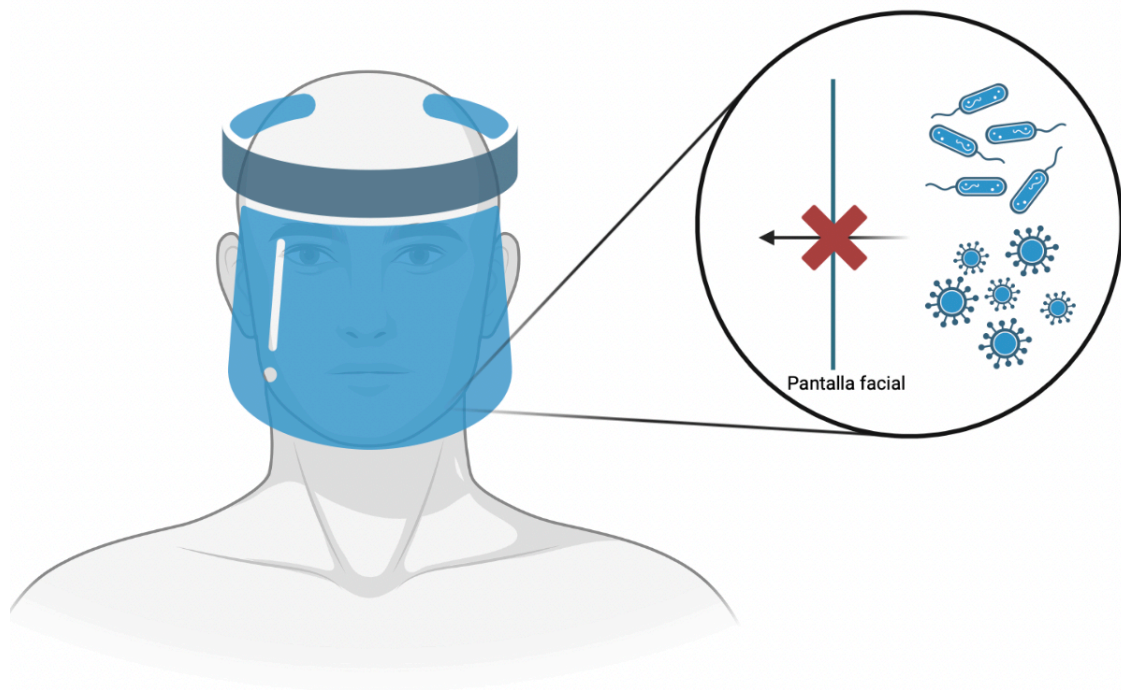


Figura 5. Representación esquemática de la funcionalidad de las pantallas faciales. Creado con Biorender por Alberto Tuñón-Molina.

Las pantallas faciales se componen, principalmente, de tres partes: el visor, normalmente fabricado con materiales como el polietileno tereftalato (PET), que tiende a ser el más económico[118], o el policarbonato que es uno de los más utilizados[119]. La montura de este tipo de protecciones se suele fabricar de plástico de peso ligero. Existe una amplia variedad de monturas, incluyendo ajustables y no ajustables. Algunas también permiten levantar el visor cuando no se está utilizando la protección[117]. El sistema de suspensión presenta también una amplia variedad en el mercado, ofreciendo posibilidades de que estos accesorios sean parcial o totalmente circulares[117].

Las pantallas faciales proporcionan una barrera contra aerosoles de fluidos corporales fuertemente expulsados y se utilizan como una alternativa a las gafas para conferir una protección en un área facial mucho mayor[120]. Se estudió cómo, utilizando un simulador de aerosoles cargado con el virus de la gripe (volumen de aerosoles con una media de diámetro de $8.5 \mu\text{m}$) y un simulador de respiración, con una pantalla facial había un 96% y un 92% menos de probabilidades de inhalar estos aerosoles tosiendo a una distancia de 46 cm o 183 cm, respectivamente[121].

1.3.3 CREMAS ANTIMICROBIANAS

La nanotecnología ha ganado mucha atención en la sociedad actual gracias a su amplia variedad de aplicaciones en la física, la química, la biología, la ciencia de materiales y también en la medicina[122]. Las nanopartículas metálicas como la plata, el oro o el cobre se han utilizado en diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades debido, en gran parte, a sus propiedades antimicrobianas[123]. Por ello, este tipo de nanopartículas de plata se han empleado para el desarrollo de una crema antimicrobiana, ya que han demostrado ser 200 veces más efectivas que elementos como el nitrato de plata contra la acción de bacterias como *Escherichia coli*[124].

En este mismo campo, otra crema que contenía nanopartículas de óxido de zinc demostró tener una gran eficacia contra el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus epidermidis* y hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Candida* sp., causante de la candidiasis la cual ha demostrado tener un 2% de resistencia a cremas antifúngicas comerciales[125].

Sin embargo, no solo han sido cremas los productos que se han desarrollado para el cuidado de la piel con propiedades antimicrobianas. También se han desarrollado otros productos con alta capacidad de protección de vías de entrada de virus y bacterias como son pintalabios antimicrobianos (Figura 6), los cuales protegen la vía de entrada bucal[126]. Se empleó pigmento extraído de la pitaya como componente para la fabricación de un pintalabios que confería actividad antibacteriana contra ciertas bacterias patógenas[126]. Otro estudio empleó mucus de peces de la familia de los siluriformes y de peces cabeza de serpiente para la elaboración de un pintalabios capaz de inactivar *Escherichia coli*[127].

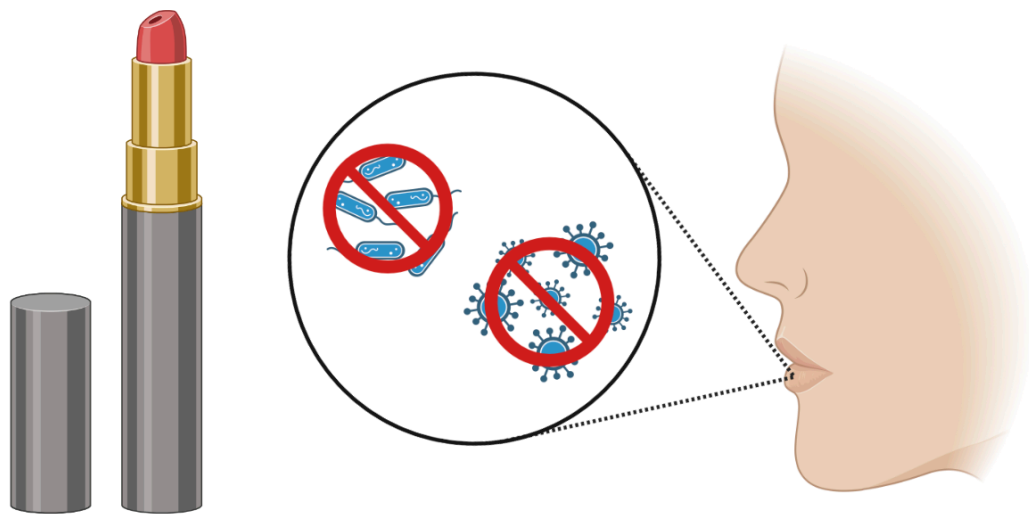


Figura 6. Representación esquemática de la funcionalidad de pintalabios antimicrobianos, inhibiendo la entrada de microorganismos patógenos a través de la boca. Creado con Biorender por Alberto Tuñón-Molina.

1.4 PROBLEMÁTICA DE LA GENERACIÓN DE RESIDUOS

Una persona con una jornada laboral de 8 horas puede gastar, seguramente, un par de mascarillas al día. Esto supone que, aproximadamente, 5 gramos de plástico terminan en la basura al final de la jornada[128]. A nivel mundial se calcula que son unos 350.000 kg de basura no reciclable lo que se genera de forma mensual en todo el mundo[128].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), desde el inicio de la pandemia de la COVID-19 se han generado más de 200.000 toneladas de residuos (contando mascarillas desechables, tests, embalajes y viales de vacunas, jeringas, equipos de protección individual (EPIs)...) que no tienen otro tratamiento que la incineración o la contaminación de suelos y aguas[129].

En los tres años de pandemia se han comercializado más de 140 millones de kits de diagnóstico de COVID-19 los cuales se calculan que han podido generar más de 2.600

toneladas de residuos no infecciosos (principalmente plástico) y más de 730.000 litros de desechos químicos[128]. Por otro lado, según el informe de la OMS, se han administrado más de 8.000 millones de vacunas que han generado 144.000 toneladas de residuos plásticos en forma de contenedores de seguridad, jeringas y agujas[129].

Además, hay que tener en cuenta que un envase de plástico necesita entre 500 y 1.000 años para descomponerse[128]. El consumo de plásticos de un solo uso se ha disparado y se emplea alrededor del 40% del plástico que se fabrica en embalajes o productos de un solo uso como mascarillas, jeringuillas o EPIs[128]. Un 12% de estos plásticos se incinera y gran parte del resto acaban en ecosistemas, contaminándolos, a veces en forma de microplásticos[128].

Es por todo esto que la búsqueda de materiales biodegradables y antimicrobianos para la fabricación de dispositivos de prevención como mascarillas o EPIs que permitan reducir la generación de residuos infecciosos y no infecciosos es una vía primordial en la investigación hoy en día.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La principal hipótesis de esta línea de investigación es que se pueden fabricar materiales que proporcionen capacidad antimicrobiana sin comprometer la biocompatibilidad de los materiales base para poder emplearse en la fabricación de elementos de prevención de infecciones microbianas.

Con esta hipótesis, los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Introducción de una tecnología basada en cloruro de benzalconio capaz de inactivar virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y bacterias resistentes a los antibióticos en tejidos empleado para la fabricación de mascarillas faciales.
2. Incorporación a tejidos empleados para la fabricación de mascarillas faciales de una tecnología basada en jabón solidificado capaces de destruir virus con envoltura como el SARS-CoV-2.
3. Adición de un producto natural como el extracto de arándanos rojos que dota a los tejidos empleados para la fabricación de filtros de mascarillas faciales de capacidad antiviral y antibacteriana frente a bacterias multirresistentes.
4. Desarrollo de pantallas faciales con un recubrimiento biofuncional basado en cloruro de benzalconio con capacidad para inactivar virus con envoltura y bacterias resistentes a antibióticos.
5. Elaboración de una crema labial con base de extracto de arándanos rojos capaz de inactivar virus con envoltura, bacterias y hongos, que pueda servir como barrera en las vías de entrada de microorganismos patógenos.

**3. CAPÍTULO I. MASCARILLAS ANTIMICROBIANAS
BASADAS EN CLORURO DE BENZALCONIO**

3.1 INTRODUCCIÓN

El cloruro de benzalconio (BAK) es un amonio cuaternario (QAC) que normalmente se comercializa como una mezcla de compuestos con diferentes longitudes para la cadena alquílica, en un rango de entre 8 y 18 átomos de carbono, con mayor actividad biocida con derivados de 12 y 14 carbonos[130,131].

El BAK apareció por primera vez en 1935 en el mercado como cloruro de cefirán, comercializándose como un desinfectante y antiséptico muy prometedor[132]. En 1947 se registró en la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos el primer producto que contenía BAK[133]. Desde entonces, el BAK se ha utilizado en una amplia variedad de productos con aplicaciones domésticas, agrícolas, industriales o clínicas. En las aplicaciones domésticas se incluyen la fabricación de suavizantes[134]; productos de higiene personal y cosméticos, como champús, acondicionadores y lociones corporales[135]; también se emplea en la preparación de soluciones oftálmicas y medicamentos que se aplican por vía nasal[136]. El BAK es también el compuesto activo más común en desinfectantes utilizados en aplicaciones domésticas, industriales, agrícolas y médicas[134,137].

La toxicidad del BAK en humanos y otros animales se ha descrito previamente, aunque se han obtenido conclusiones discordantes por diferentes condiciones experimentales. El BAK es un agente que puede causar irritaciones en la piel, llegando a causar alergias en raras ocasiones[138]. Este compuesto está catalogado por la EPA como tóxico de categoría II por vía oral o nasal y tóxico de categoría III por vía dermal[133]. Se detectaron efectos genotóxicos pequeños pero significantes en ensayos *in vitro* con células de plantas y mamíferos con bajas concentraciones de BAK como 1 mg/L, lo que es menor que lo que encontramos en el ambiente[139]. Además, una considerable toxicidad celular se observó en un ensayo *in vitro* con células oculares humanas expuestas a concentraciones de BAK al 0.0001%[140].

En contraste con estos resultados, otros estudios demostraron que el BAK es un compuesto que puede considerarse seguro[135,141]. Un informe de la EPA en 2006 no

reconoce al BAK como un elemento cancerígeno, mutagénico o genotóxico[133]. Adicionalmente, con respecto a su adición a productos de aplicación intranasal, una revisión de 18 estudios no reveló problemas de seguridad importantes cuando el BAK se utilizaba en concentraciones entre 0.00045% y 0.1%[141].

El BAK tiene un potente efecto antibacteriano. Se ha demostrado su efecto contra bacterias como la MRSA, aunque se ha observado un aumento de la resistencia doblando la concentración mínima inhibitoria de 5 a 10 mg/L tras un período de adaptación[142]. También se ha demostrado su eficacia contra bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes* o *Pseudomonas* sp., aunque en todas ellas también se ha demostrado un preocupante aumento de la resistencia[143–147].

El mecanismo de acción de los QACs, incluyendo el BAK, se basa en la perturbación y alteración de las bicapas de las membranas por las cadenas de radicales alquilo y la alteración de la carga de la membrana causado por el nitrógeno cargado[148]. En consecuencia, la susceptibilidad al BAK puede surgir a través de una combinación de mecanismos, muchos de los cuales están relacionados con la membrana celular. Los mecanismos propuestos incluyen cambios en la composición general de la membrana, desregulación de las porinas, sobreexpresión o modificación de las bombas de eflujo, transferencia horizontal de genes, formación de biofilm y biodegradación[146].

En este trabajo se ha aplicado el BAK por el método de recubrimiento por inmersión en los filtros de mascarilla con el objetivo de prevenir infecciones frente a virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y bacterias resistentes a antibióticos.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS FILTROS

Se prepararon discos de aproximadamente 10 mm de diámetro con un filtro de tela *spunlace* de tela no tejida (filtros comerciales utilizados para la fabricación de mascarillas) de NV EVOLUTIA (Valencia, España) cortando con un troquel circular. Los filtros con el recubrimiento de BAK ($n=6$) se fabricaron a través del método de “dip coating”[149] sumergiendo los discos en etanol 70% comercial suplementado con 0.1% *p/p* de cloruro de benzalconio (Montplet, Barcelona, España) durante 1 minuto a 25°C para conseguir un contenido seco de BAK, determinado gravimétricamente, de $0.46\pm 0.13\%$ *p/p*. De manera simultánea, otros discos del mismo tejido ($n=6$) fueron tratados en una disolución de etanol absoluto y agua destilada (70/30% *v/v*) sin BAK durante 1 minuto a 25°C. Filtros sin tratar del mismo tejido ($n=6$) se utilizaron como material de referencia. Los discos fueron secados después del tratamiento a 60°C durante 48 h y esterilizados mediante radiación UV (TELSTAR Technologies S.L., Terrassa, España) durante 1 hora por cada lado.

3.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL CLORURO DE BENZALCONIO

Los ensayos de caracterización del cloruro de benzalconio utilizado en esta tesis se realizaron en la Universidad de Ciencia y Tecnología de Noruega por el grupo de investigación NOBIPOL. Se empleó la resonancia magnética nuclear (RMN) para la caracterización del cloruro de benzalconio empleado en el recubrimiento biofuncional de los filtros de tela comerciales. Previamente a la preparación de las muestras para RMN, el disolvente etanol/agua fue evaporado del etanol comercial Montplet 70% con cloruro de benzalconio (99.9% *p/p* disolvente/0.1% *p/p* BAK) a 25°C. Tras este proceso, la muestra de cloruro de benzalconio concentrado se preparó disolviendo 10 mg en 550 μL D_2O (D, 99.9%) (Sigma-Aldrich, City Norway) y transferido a un tubo de 5 mm LabScape Stream RMN. Los ensayos de RMN se llevaron a cabo en un BRUKER AVIIIHD 800 MHz (Bruker BioSpin AG, Fälladen, Suiza) equipado con un CP-TCI criogénico de 5 mm. Todas las RMN se llevaron a cabo a 25°C o 37°C. Para la caracterización del cloruro

de benzalconio el siguiente espectro fue registrado: 1D protones, 2D espectroscopía de correlación filtrada cuántica doble y 2D ^{13}C coherencia cuántica única heteronuclear con edición de multiplicidad. El tetrametilsilano (TMS) se utilizó como químico de referencia para los cambios químicos de protones y carbono. El espectro fue grabado, procesado y analizado utilizando el software TopSpin 3.7 (Bruker BioSpin AG, Fälladen, Suiza).

3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Zeiss Ultra 55 (FESEM, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) con un voltaje acelerado de 3 kV o 10 kV, según la muestra, para observar la morfología porosa de los filtros de mascarilla de tela no tejida tratados y no tratados a diferentes aumentos (x50, x100, x150, x720 y/o x1000) según la muestra. Se prepararon las muestras para ser conductoras con un recubrimiento de platino con una unidad de pulverizado.

3.2.4 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHI6

La bacteria aceptora del bacteriófago Phi6 fue la *Pseudomonas syringae* (DSM 21482), adquirida del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Alemania). Se cultivó en agar triptona soja (TSA, Scharlab) y posteriormente en medio líquido caldo triptona soja (TSB, Scharlab). La incubación en medio líquido se llevó a cabo a 25°C y 120 rpm.

La propagación del bacteriófago Phi6 (DSM 21518) se llevó a cabo acorde a las especificaciones aportadas por el del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Alemania).

Un volumen de 50 μL de una suspensión del bacteriófago Phi6 en TSB fue añadido a cada filtro con un título de, aproximadamente, 1×10^6 unidades formadoras de calvas por mL (UFC/mL) y se incubaron a diferentes tiempos (1, 10 y/o 30 minutos, según el ensayo). Tras la incubación, cada filtro se introdujo en un tubo Falcon con 10 mL de TSB

y se sonicaron durante 5 minutos a 24°C. Tras la sonicación, los tubos se vortearon durante 1 minuto. Se prepararon diluciones seriadas de cada uno de los tubos Falcon para la titulación del bacteriófago en cada filtro y, 100 µL de cada dilución de bacteriófago se mezcló con 100 µL de la bacteria aceptora del bacteriófago a una $OD_{600nm}=0.5$. La capacidad infecciosa del bacteriófago fue medida por el método de la doble capa[150], donde se mezclan 4 mL de top agar (TSB + 0.75% agar bacteriológico, Scharlab) suplementado con 5 mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con la mezcla de bacteriófago y bacteria y se vierte sobre placas de TSA. Las placas se incubaron durante 18-24 h en una estufa refrigerada a 25°C. El título de bacteriófago de cada tipo de muestra se calculó en UFC/mL y se comparó con el control, el cual se trata de 100 µL de la disolución de 50 µL de bacteriófago en 10 mL de TSB añadido a la bacteria sin haber estado en contacto con ningún tipo de filtro ni pasar por el proceso de sonicación.

La actividad antiviral se estimó en reducción de logaritmos del título del virus a los tiempos correspondientes de contacto. Se comprobó que la cantidad residual de desinfectantes en las muestras no interfirieron en el proceso de titulación y que el proceso de sonicación y vorteo no afectó a la capacidad infecciosa del bacteriófago. Los ensayos antivirales se llevaron a cabo tres veces durante dos días diferentes ($n=6$) para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

3.2.5 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2

Estos ensayos fueron realizados por el grupo de investigación del Prof. Kazuo Takayama de la Universidad de Kioto. La cepa de SARS-CoV-2 empleada en este estudio (SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027) fue generosamente cedida por el Dr. Tomohiko Takasaki y el Dr. Jun-Ichi Sakuragi del Instituto de Salud Pública de la prefectura de Kanagawa. El virus fue aislado, purificado y propagado en placas de cultivos de células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero). El SARS-CoV-2 se almacenó a -80°C.

Un volumen de 50 µL de una suspensión del virus en tampón fosfato salino (PBS) se añadió a cada filtro con un título de 1.3×10^5 dosis infecciosa de cultivo celular del 50%

(TCID50)/filtro y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1 mL de PBS a cada filtro y se vorteoó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Los títulos virales se determinaron acorde al TCID50 y los ensayos se llevaron a cabo en el interior de un laboratorio de Bioseguridad de Nivel 3 en la Universidad de Kioto. Las células TMPRSS2/Vero[151] (JCRB1818, JCRB Cell Bank), cultivadas con el medio esencial mínimo (MEM, Sigma-Aldrich) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest SAS, Francia), 1% penicilina/estreptomicina, se sembraron en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Se prepararon diluciones seriadas de las muestras con un factor de dilución 1/10 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} en el medio de cultivo. Las diluciones se pusieron en contacto con las células TMPRSS2/Vero por triplicado y se incubaron a 37°C durante 96 h. El efecto citopático fue evaluado bajo microscopio. La TCID50/mL se calculó empleando el método Reed-Muench[152].

3.2.6 ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Los ensayos de difusión en agar se llevaron a cabo para analizar la actividad antibacteriana de los filtros con y sin tratamiento[153,154]. Céspedes de MRSA, COL[155] y *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE), RP62A[156], en una concentración de, aproximadamente, 1.5×10^8 UFC/mL en TSB, se cultivaron en placas de TSA.

Los discos de filtros con y sin tratamiento fueron previamente esterilizados y colocados sobre los céspedes de bacteria para ser incubados de manera aeróbica a 37°C durante 24 h. La actividad antibacteriana de los filtros estudiados se calculó de acuerdo con la ecuación (1) [153]:

$$nw_{halo} = \frac{d_{iz} - d}{d} \quad (1)$$

Donde nw_{halo} indica la anchura normalizada de la zona de inhibición antimicrobiana, d_{iz} es el diámetro de la zona de inhibición y d hace referencia al diámetro del disco de muestra. Los diámetros fueron medidos con el software de análisis de imagen ImageJ

(Wayne Rasband (NIH), Bethesda, MD, USA). Los ensayos se realizaron seis veces en días diferentes para asegurar reproducibilidad.

3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante un análisis ANOVA seguido de una prueba de Tukey post hoc (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) en el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL BAK

El espectro RMN del cloruro de benzalconio empleado en este estudio para el tratamiento de los filtros de mascarilla se muestra en la Figura 7.

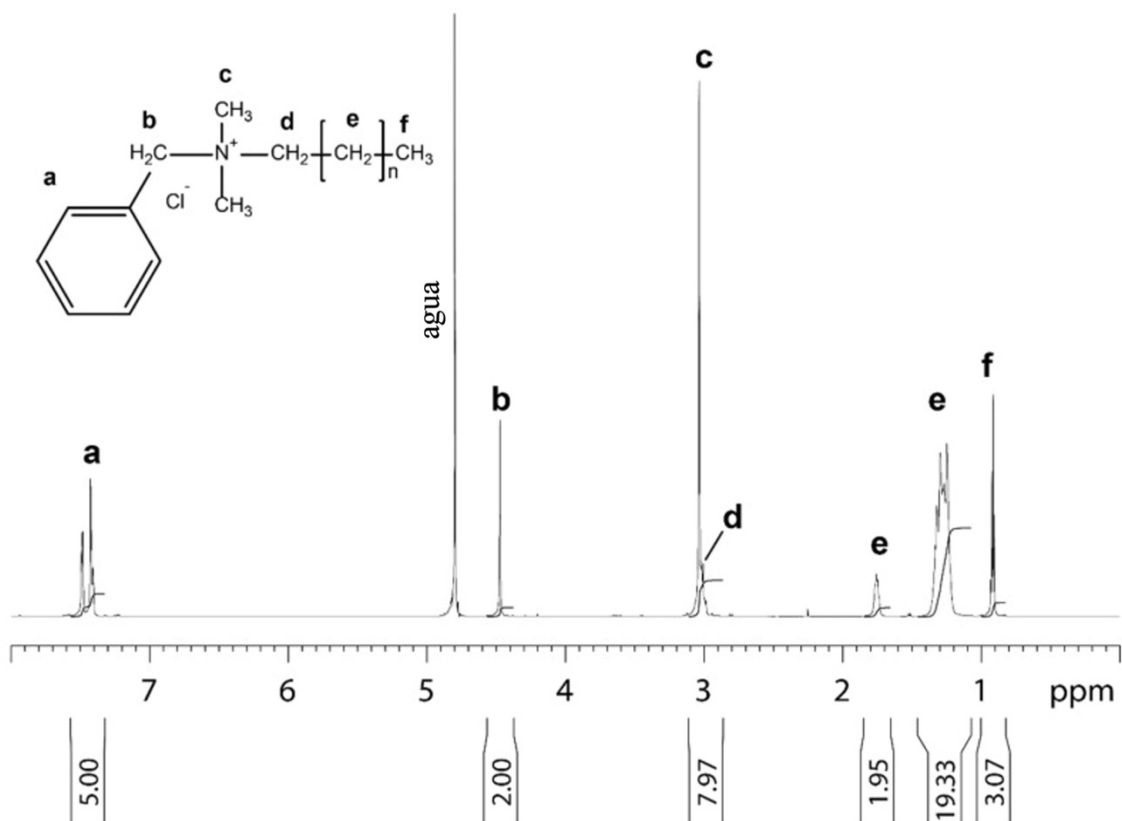


Figura 7. Espectro RMN 1D de protones del cloruro de benzalconio disuelto en agua bidestilada 99.9% recogido a 25°C. Se muestra la estructura molecular, asignación e integral del cloruro de benzalconio. Las letras en la estructura molecular y el espectro indican el protón en los diferentes subgrupos químicos del cloruro de benzalconio. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

3.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo que muestran la morfología porosa de los filtros de mascarilla se muestran en la Figura 8.

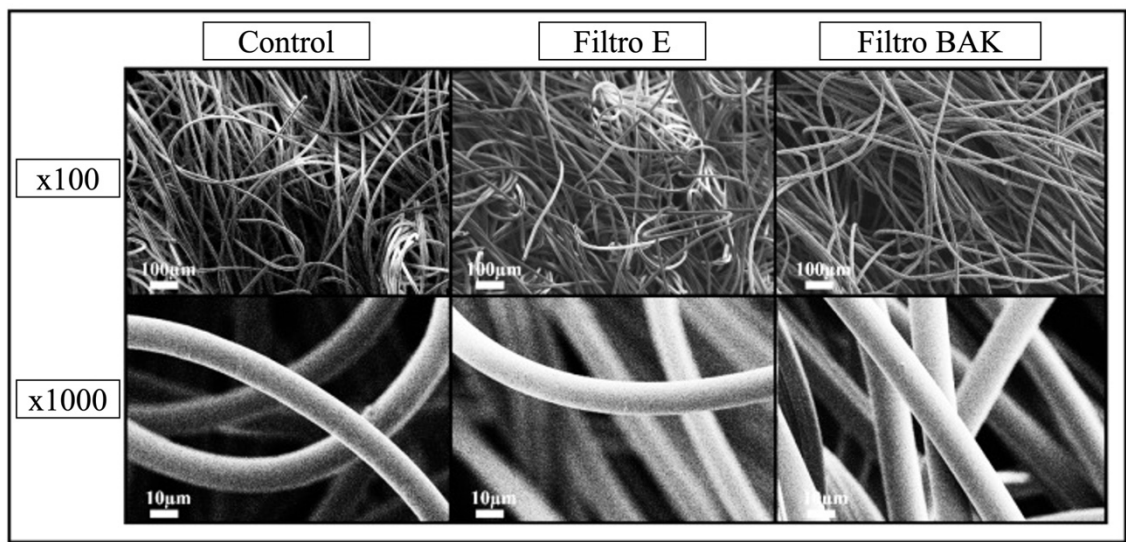


Figura 8. Morfología de los filtros de mascarilla mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo. Filtro sin tratar (Control), tratado mediante “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y tratado con $0.46 \pm 0.13\%$ *p/p* de recubrimiento biofuncional de cloruro de benzalconio (Filtro BAK) a dos aumentos (x100 y x1000). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

La observación al FESEM no mostró signos de cambio morfológico en los poros tras el tratamiento por “dip coating” tanto por etanol absoluto (Filtro E) como por el compuesto por BAK (Filtro BAK). Estos cambios sugieren que no hay un cambio en la respirabilidad ni en la eficacia de filtración bacteriana requerida para la comercialización de los filtros acorde a la normativa europea para recubrimientos faciales (CWA 17553:2020).

3.3.3 ENSAYOS ANTIVIRALES

3.3.3.1 BACTERIÓFAGO PHI6

El filtro tratado con BAK demostró tener una potente actividad antiviral frente al bacteriófago Phi6 (ver Figura 9 y Tabla 1) mostrando un 100% de inhibición del virus. Los céspedes bacterianos eran claramente visibles en la placa, pero no había calvas que resultasen indicativas de partículas virales activas a ninguno de los tres tiempos testados (1, 10 o 30 minutos) de contacto entre el filtro tratado con BAK y el bacteriófago Phi6. Este bacteriófago es un virus con envoltura que puede utilizarse como modelo vírico del SARS-CoV-2 en condiciones bioseguras[158]. Además, las muestras del filtro sin tratamiento y el filtro tratado con etanol absoluto mostraron resultados similares al control sin actividad antiviral (ver Figura 9 y Tabla 1).

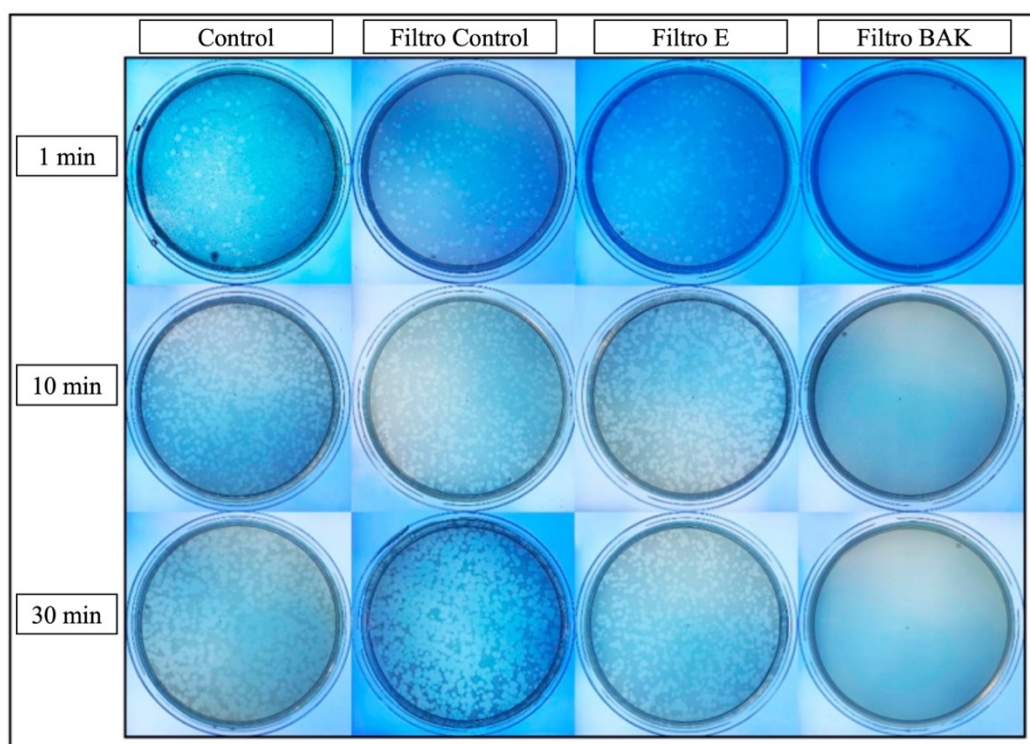


Figura 9. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medido por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación del bacteriófago de muestras sin diluir para el control, el filtro sin tratar (Filtro Control), filtro tratado por el método de “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) para tiempos de contacto de 1, 10 y 30 minutos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

Tabla 1. Reducción del título infeccioso medido en UFC/mL determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6. Se muestra el resultado del logaritmo de las UFC/mL (log (UFC/mL)) de las muestras control, filtro sin tratamiento (Filtro Control), filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y de filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) tras 1, 10 y 30 minutos de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

MUESTRA	Phi6 1 min (UFC/mL)	Phi6 10 min (UFC/mL)	Phi6 30 min (UFC/mL)
CONTROL	$4.36 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^5$	$3.60 \times 10^6 \pm 2.54 \times 10^5$	$5.63 \times 10^6 \pm 3.41 \times 10^5$
Filtro Control	$4.38 \times 10^6 \pm 1.98 \times 10^5$	$2.70 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^5$	$3.83 \times 10^6 \pm 1.96 \times 10^5$
Filtro E	$4.23 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$	$2.48 \times 10^6 \pm 5.25 \times 10^5$	$6.47 \times 10^6 \pm 2.02 \times 10^5$
Filtro BAK	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

La Figura 9 muestra que el título de bacteriófago obtenido en los filtros sin tratamiento y tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK fueron altamente similares al control, mientras que en el filtro con recubrimiento de BAK se observó una fuerte inactivación del virus. Esto demostró que el compuesto activo con propiedades antivirales era el BAK.

3.3.3.2 SARS-CoV-2

Los resultados logrados mediante el método del TCID₅₀/mL sobre la reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto con el control, el filtro sin tratamiento, el filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK y el filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK se muestran en la Figura 10.

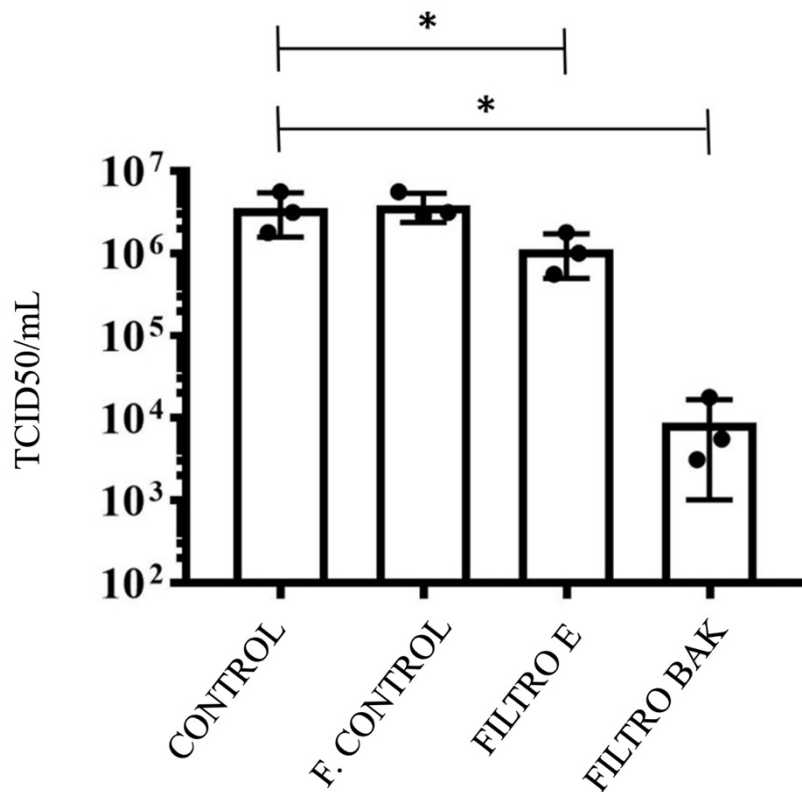


Figura 10. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para el filtro sin tratamiento (F. CONTROL), filtro tratado con con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (FILTRO E), filtro con recubrimiento biofuncional de BAK (FILTRO BAK) y control acorde al método del TCID50/mL. Un gráfico de puntos se establece en función del valor de cada punto. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos con el modelo Phi6 y demuestran claramente que el filtro con recubrimiento de BAK es altamente efectivo contra el SARS-CoV-2 incluso tras 1 minuto de contacto. La reducción de título infeccioso en UFC/mL determinado por el método de doble capa para el ensayo con el bacteriófago Phi6 y con el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Reducción del título infeccioso determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6 y por el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2. Se muestran el control, el filtro sin tratamiento (Filtro Control), el filtro tratado con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y el filtro con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[157] Copyright 2021 MDPI.

MUESTRA	Phi6 1 min (UFC/mL)	SARS-CoV-2 1 min (UFC/mL)
Control	$4.36 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$
Filtro Control	$4.38 \times 10^6 \pm 1.98 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$
Filtro E	$4.23 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6 \pm 6.2 \times 10^5$
Filtro BAK	0.00 ± 0.00	$8.9 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^3$

3.3.4 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR

Los resultados antibacterianos de los filtros de mascarilla tratados y sin tratamiento contra las bacterias multirresistentes MRSA y MRSE se muestran en la Figura 11.

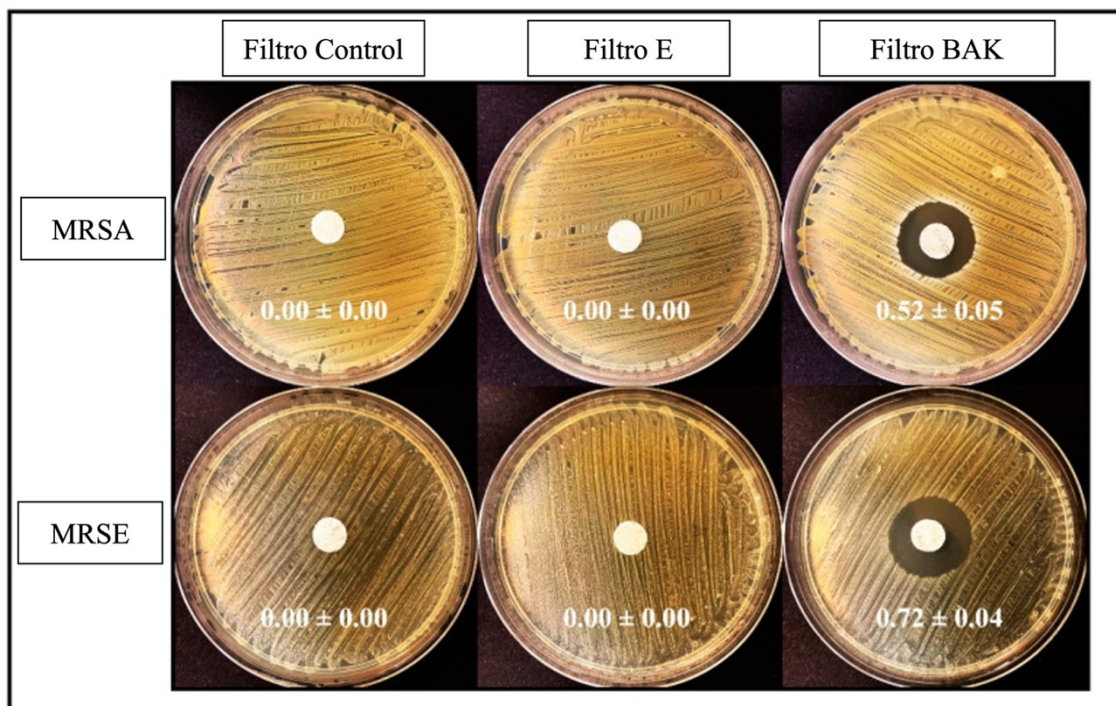


Figura 11. Ensayos antibacterianos de difusión en agar. Se muestran los resultados de filtros sin tratamiento (Filtro Control), de filtros tratados con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (Filtro E) y de filtros con el recubrimiento biofuncional de BAK (Filtro BAK) tras 24 h de incubación a 37°C. Se observa en cada imagen la anchura normalizada de los halos antibacterianos, expresada como media \pm desviación estándar calculada con la ecuación (1). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [157] Copyright 2021 MDPI.

El filtro tratado mediante “dip coating” con etanol 70% suplementado con 0.1% de BAK presentó una alta actividad antibacteriana contra las bacterias MRSA y MRSE, siendo más efectiva contra esta última.

El modo de acción antimicrobiana de los amonios cuaternarios como el BAK contra los fosfolípidos de las membranas de virus y bacterias se atribuye a la carga positiva de los átomos de nitrógeno[130,159]. Esto da lugar a la erradicación de bacterias y virus comunes como el de la gripe mediante la desestabilización de la bicapa de fosfolípidos de la membrana[160], la envuelta de glicoproteínas y las glicoproteínas que se encargan de la interacción con el receptor ACE2 en la célula huésped[161]. Por esta razón, el BAK es un componente de un gran número de productos de uso cotidiano como son por ejemplo desinfectantes de hogar, jabones y algunos desinfectantes de manos[162–164].

3.4 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un nuevo filtro de mascarilla con propiedades antivirales y antibacterianas contra bacterias Gram positivas resistentes a antibióticos que son capaces de reducir las infecciones por COVID-19. Este filtro de mascarilla se ha desarrollado por el método de recubrimiento por inmersión que es un proceso simple, de bajo coste y reproducible. Se ha utilizado un filtro comercial no tejido en el que se ha depositado un fino recubrimiento de BAK en la superficie del material por adsorción física. El mismo tipo de recubrimiento biofuncional se podría aplicar a cualquier otro tipo de filtro de mascarilla o filtros biodegradables, lo que también podría representar una solución a la necesidad de mascarillas de base biológica para frenar los brotes de infección por coronavirus.

El proceso de fabricación del filtro mediante el recubrimiento por inmersión con BAK abre un amplio rango de aplicaciones que demandan urgentemente nuevas aplicaciones antimicrobianas. De este modo, esta novedosa tecnología podría emplearse para la fabricación de ropa, guantes, etc., para uso de trabajadores sanitarios e inactivar aerosoles que puedan contener virus como el SARS-CoV-2 o bacterias resistentes a antibióticos.

El artículo publicado relacionado con este capítulo se encuentra en el Anexo I.

4. CAPÍTULO II. MASCARILLAS ANTIVIRALES DE BAJO COSTE BASADAS EN JABÓN SOLIDIFICADO

4.1 INTRODUCCIÓN

En el año 2020, con el inicio de la pandemia del COVID-19, la OMS recomendó el lavado frecuente de manos con jabón como una manera eficaz de prevenir la transmisión del SARS-CoV-2[165]. Esta recomendación nace a partir de estudios como el de Contreras *et al.*[166], donde observaron que jabones comerciales tenían propiedades capaces de inactivar el virus respiratorio sincitial (RSV). Además, también se demostró que geles desinfectantes de manos eran eficaces contra bacterias como *Staphylococcus aureus* y contra virus como los norovirus, causantes de enfermedades gastrointestinales[167]. Al igual que la OMS, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades también aconsejó que la mejor manera y la más económica para prevenir la transmisión de infecciones de COVID-19 y disminuir el riesgo de enfermarse era el lavado frecuente de manos con jabón y agua[168]. Cabe destacar además que muchos productos de higiene y salud disponibles a nivel comercial tienen actividad viricida contra virus como el coronavirus humano 229E (HCoV-229E), empleado con frecuencia como sustituto del SARS-CoV-2. Es el caso del champú para bebés Johnson's de Johnson & Johnson Consumer Inc. y de la pasta de dientes de Procter & Gamble[169].

Además, se ha descrito en la literatura actividad antibacteriana de diferentes jabones líquidos comerciales contra bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus* sp.[170].

Se han descrito tres posibles mecanismos antivirales para el jabón[171]. El primer mecanismo se basa en la ruptura de la membrana vírica, la cual es una bicapa compuesta principalmente por fosfolípidos y proteínas de membrana[172]. Con la adición de un surfactante, los fosfolípidos de la bicapa interactúan con los monómeros del surfactante con interacciones entre elementos hidrofóbicos de las colas de los lípidos y del surfactante. Parte de estos elementos se insertan en la bicapa y compiten con los fosfolípidos, causando una disrupción del orden natural de la membrana[173]. Se ha descrito también un mecanismo simple de elución donde las partículas virales son eliminadas de superficies como las manos con un lavado corto con jabón. Las soluciones jabonosas tienen una tensión superficial muy baja por lo que son capaces de crear films

muy delgados y, como resultado, puede entrar en espacios diminutos y difundirse de forma fácil entre las partículas de suciedad, incluyendo virus[171,174]. Además, el jabón tiene la capacidad de humedecer las superficies y de ser adsorbido por cualquier partícula presente, siendo capaz de cargar y estabilizar estas partículas. La naturaleza anfifílica del jabón, en particular las interacciones atractivas entre los extremos hidrofóbicos de las moléculas de jabón con las membranas lipídicas hidrófobas, favorece la adsorción del jabón. De este modo, las partículas virales no pueden agregarse y su propiedad de adsorción se pierde y son arrastradas con las moléculas de agua en los lavados[171]. El último mecanismo descrito es el de aprisionamiento vírico, el cual consiste en que cuando la concentración de surfactante excede el valor de concentración micelar crítica (CMC), comienza la micelización[171,175]. Las micelas de jabón atrapan las partículas virales en su interior mediante interacciones hidrofóbicas[171,175]. Las moléculas de agua que entran en contacto con la parte hidrofílica de la micela arrastran las partículas víricas en los lavados[171].

En esta parte de la tesis se propone el uso de jabón solidificado para el desarrollo de mascarillas antimicrobianas de bajo coste con el objetivo de que sean capaces de inactivar virus con envoltura como el SARS-CoV-2.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 PREPARACIÓN DE LOS FILTROS

Se prepararon discos ($n=6$) de, aproximadamente, 10 mm de diámetro con un filtro de tela *spunlace* de tela no tejida, que son filtros comerciales utilizados para la fabricación de mascarillas de NV EVOLUTIA (Valencia, España) cortando con un troquel circular. Los discos resultantes se trataron mediante el método del “dip coating”[149] sumergiéndolos en una dilución acuosa muy diluida (1% *p/v*) de un jabón de manos líquido comercial (KYREY dermo, Laboratorios Forenqui, S.A., Picassent, Valencia, España) durante 30 minutos a 23 ± 1 °C para determinar gravimétricamente un contenido de jabón seco solidificado muy bajo ($0.57 \pm 0.03\%$ *p/p*). Este producto sanitario de KYREY dermo ha sido dermatológicamente testado y presenta una composición química común aprobada por las autoridades europeas. De acuerdo con el fabricante, este jabón líquido de manos comercial se compone de los siguientes ingredientes: agua, lauril sulfato de sodio, cloruro de sodio, cocamidopropil betaína, glicerina, cocamida dietanolamina (DEA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico, propilen glicol, copolímero estireno/acrílico, ácido láctico, perfume, alcohol bencílico, limoneno, linalool, 1,3-dimetilol-5,5-dimetil (DMDM) hidantoína, imidazolidinil urea, methylcloroisotiazolinona, methylisotiazolinona, y benzoato de sodio. Algunos de estos compuestos han mostrado previamente actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 como el surfactante lauril sulfato de sodio[176] o el cloruro de sodio[177].

El tiempo y la concentración se ajustaron para obtener un tratamiento por “dip coating” con las propiedades antivirales óptimas y la menor cantidad posible de jabón de manos. Una vez tratados los discos, se secaron a 60°C durante 48 h. Se prepararon también discos ($n=6$) de filtro de mascarilla sin tratamiento para utilizar como material control. Todos los discos fueron esterilizados por radiación UV durante 1 h por cada lado.

4.2.2 RESPIRABILIDAD DE LOS FILTROS DE MASCARILLA

Las diferencias de presión de las mascarillas control y las mascarillas con tratamiento fueron medidas acordes a la norma EN 14683:2019+AC:2019, como medida de la respirabilidad. Así pues, cinco muestras de 4.9 cm² se emplearon en estos ensayos llevados a cabo a una temperatura de 22 ± 1 °C, un 30% de humedad relativa y con un flujo de aire de 8 ± 0.2 L/min.

4.2.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para asegurar la seguridad y el correcto uso de las tecnologías desarrolladas, se estudió la toxicidad de las muestras siguiendo la norma ISO-10993 que regula los estándares recomendados para mascarillas faciales. De este modo, se prepararon trozos de filtro de mascarilla con y sin tratamiento de, aproximadamente, 0.1 g de peso y se esterilizaron con radiación UV durante 1 h por cada lado. Cada trozo se colocó en el interior de un pocillo de una placa de 6 pocillos con 1 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biowest SAS, Francia) sin FBS. Se añadió, además, un volumen de DMEM acorde a la relación 0.1 g/mL ya que la norma ISO-10993 recomienda esta ratio para materiales porosos irregulares de baja densidad como textiles. Tras incubar los trozos de filtro de mascarilla en un ambiente húmedo (5% CO₂/95% humedad relativa) a 37°C durante 72 h, se recogieron los extractos y se emplearon inmediatamente para el ensayo de toxicidad. La línea celular de queratinocitos humanos no tumorales (HaCaT) utilizada fue donada por el Instituto de Investigación Médica del Hospital Universitario La Fe, Valencia, España. La incubación celular se realizó con medio DMEM bajo en glucosa enriquecido con 10% de FBS, 100 unidades/mL de penicilina (Lonza, Bélgica) y 100 mg/mL de estreptomomicina (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) a 37°C y 5% CO₂.

El efecto del tratamiento con los extractos de los trozos de filtros de mascarillas se midió mediante el ensayo colorimétrico del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se cultivaron 100 µL de medio DMEM incluyendo una cantidad de 10⁴ células HaCaT en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras incubar durante 24 h a 37°C, el medio de cada pocillo se reemplazó con 100 µL del extracto del filtro de

mascarilla correspondiente. El medio también fue reemplazado con 100 μ L del mismo medio empleado en la extracción de los filtros de mascarilla (control positivo), así como por 100 μ L de una disolución de cloruro de zinc 1000 μ M ($\geq 97.0\%$, Sigma-Aldrich) como control negativo ya que esta concentración es altamente tóxica para células HaCaT[178]. Tras incubar 24 h a 37°C y 5% CO₂ con humedad relativa del 95%, el extracto de los filtros de mascarilla de cada pocillo se sustituyó por 100 μ L de una disolución 5 mg/mL de MTT y se dejó incubar durante 3 h a 37°C. Los cristales de formazán formados se disolvieron en 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Varioskan, Thermo Fisher).

4.2.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los ensayos de microscopía electrónica se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.3.

4.2.5 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PH16

Los ensayos antivirales con el bacteriófago Phi6 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.4.

4.2.6 CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se llevó a cabo una extracción y cuantificación del ácido ribonucleico (ARN) de doble cadena del bacteriófago Phi6 para testar si partículas víricas quedaban retenidas entre las fibras del tejido de los filtros de mascarillas de forma que pudiera dar lugar a falsos resultados. Se dispuso una gota de 50 μ L de una suspensión del virus en TSB a una concentración de, aproximadamente, 1×10^6 UFC/mL y se dejó incubar a 25°C durante 5 minutos en los filtros con y sin tratamiento. Una gota del mismo volumen de bacteriófago a la misma concentración también se incubó a la misma temperatura y tiempo, pero sin estar en contacto con ningún material para tomarlo como valor de referencia. Tras el

tiempo de incubación, los materiales y el control se introdujeron en un tubo Falcon con 10 mL de TSB y se sonicaron durante 5 minutos y posteriormente se vortearon durante 45 segundos. El siguiente paso fue la extracción de ARN vírico utilizando el protocolo de extracción de ARN provisto por Norgen Biotek Corp. (Ontario, Canadá)[179]. Este protocolo consiste en un primer paso de lisis de las partículas virales con un paso posterior de purificación del ARN que conlleva una serie de pasos: unión de la molécula a la columna de purificación, lavado de la columna de purificación y elución del ARN para su posterior almacenaje a -70°C para evitar su degradación. Tras la extracción de ARN, la cantidad de ARN presente en las muestras se cuantificó mediante el uso del Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) y el resultado se expresó en ng/μL. Las medidas se realizaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

4.2.7 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2

Los ensayos antivirales con SARS-COV-2 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.5.

4.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo de la manera que se explica en el punto 3.2.7.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La morfología de los filtros con y sin tratamiento tras observarlos al microscopio electrónico se muestra en la Figura 12.

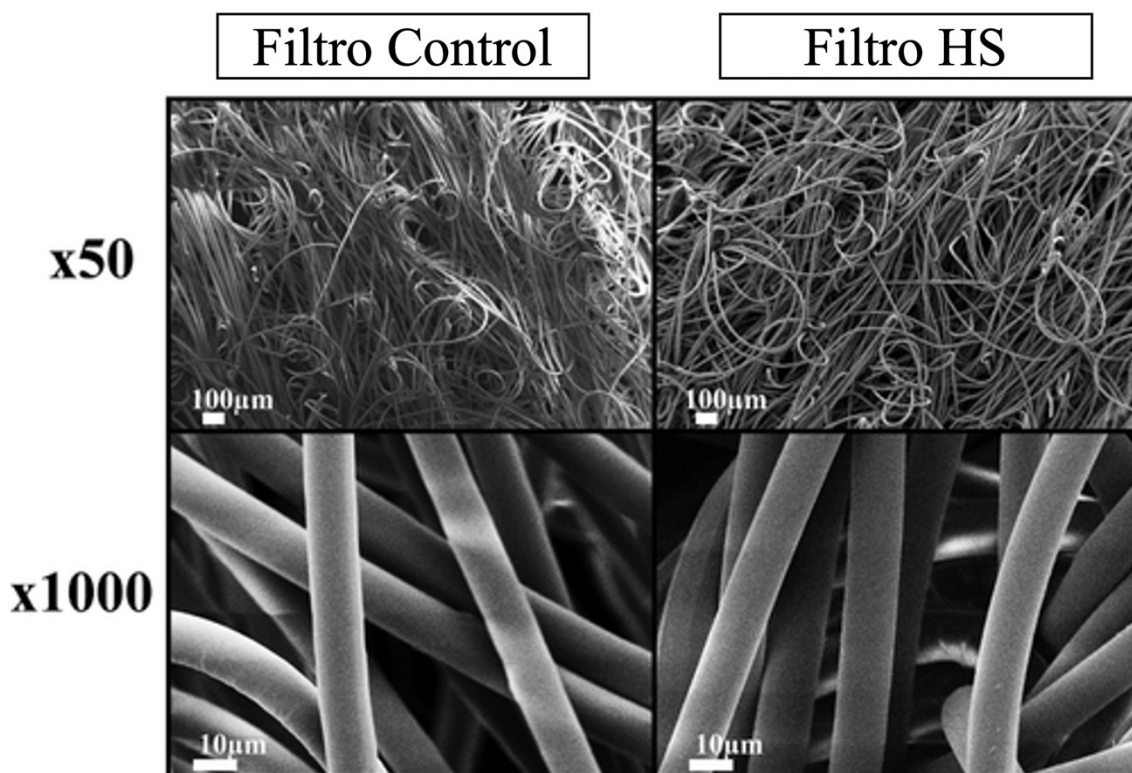


Figura 12. Imágenes FESEM de los filtros de mascarilla sin tratamiento (Filtro Control) y del filtro de mascarilla con un recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado $0.57 \pm 0.03\%$ *p/p* (Filtro HS) a dos aumentos (x50 y x1000). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Las imágenes no muestran ningún tipo de cambio morfológico tras el tratamiento de “dip coating” con la disolución de jabón (Filtro HS) en comparación con el filtro sin tratar (Filtro Control).

4.3.2 RESPIRABILIDAD DE LOS FILTROS

Observando los resultados anteriores obtenidos mediante FESEM, se esperaba no obtener cambios en la eficiencia de filtración bacteriana. De hecho, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de diferencial de presión (respirabilidad) entre el filtro sin tratamiento y el filtro con recubrimiento de jabón de manos solidificado (ver Figura 13).

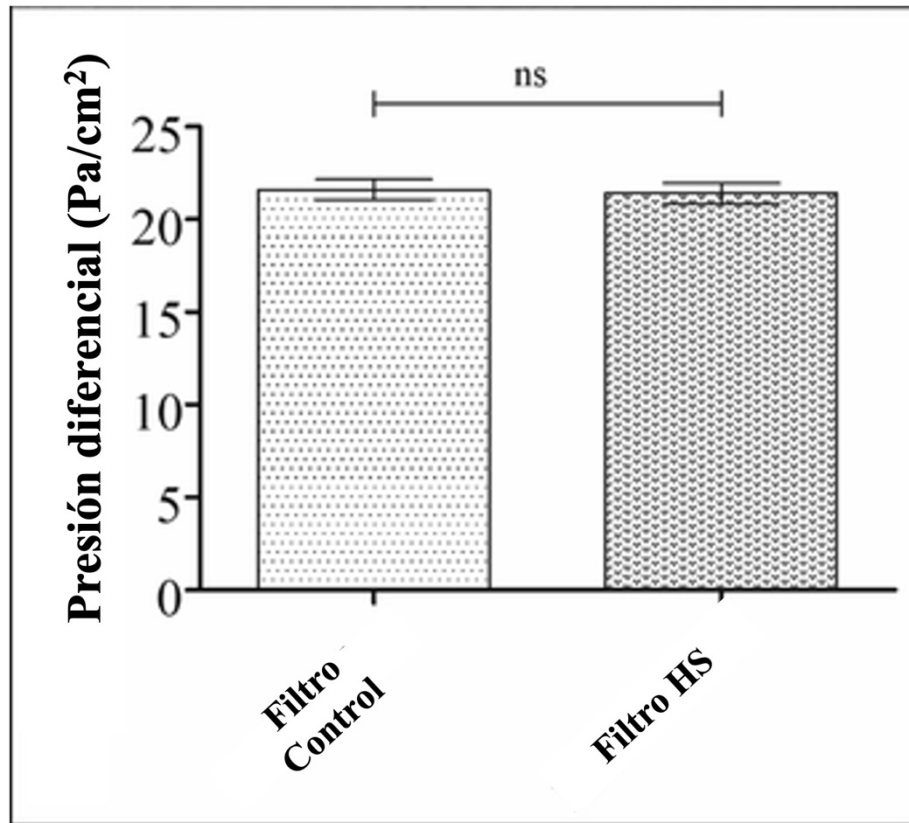


Figura 13. Diferencia de presión de los filtros sin tratamiento (Filtro Control) y del filtro con $0.57 \pm 0.03\%$ *p/p* de recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS); ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Cabe destacar que el filtro con el tratamiento de jabón presenta un valor de diferencial de presión que entra dentro de los niveles de aceptación ($< 40 \text{ Pa/cm}^2$) para poder fabricar mascarillas faciales de acuerdo con la norma EN 14683:2019+AC:2019.

4.3.3 ENSAYOS ANTIVIRALES

4.3.3.1 BACTERIÓFAGO PH16

Los resultados de los ensayos antivirales evidenciaron que el filtro con recubrimiento de jabón de manos (Filtro HS) posee una actividad antiviral altamente eficaz (100% inhibición del virus, ver Figura 14) con tan solo 1 minuto de contacto frente al bacteriófago Phi6.

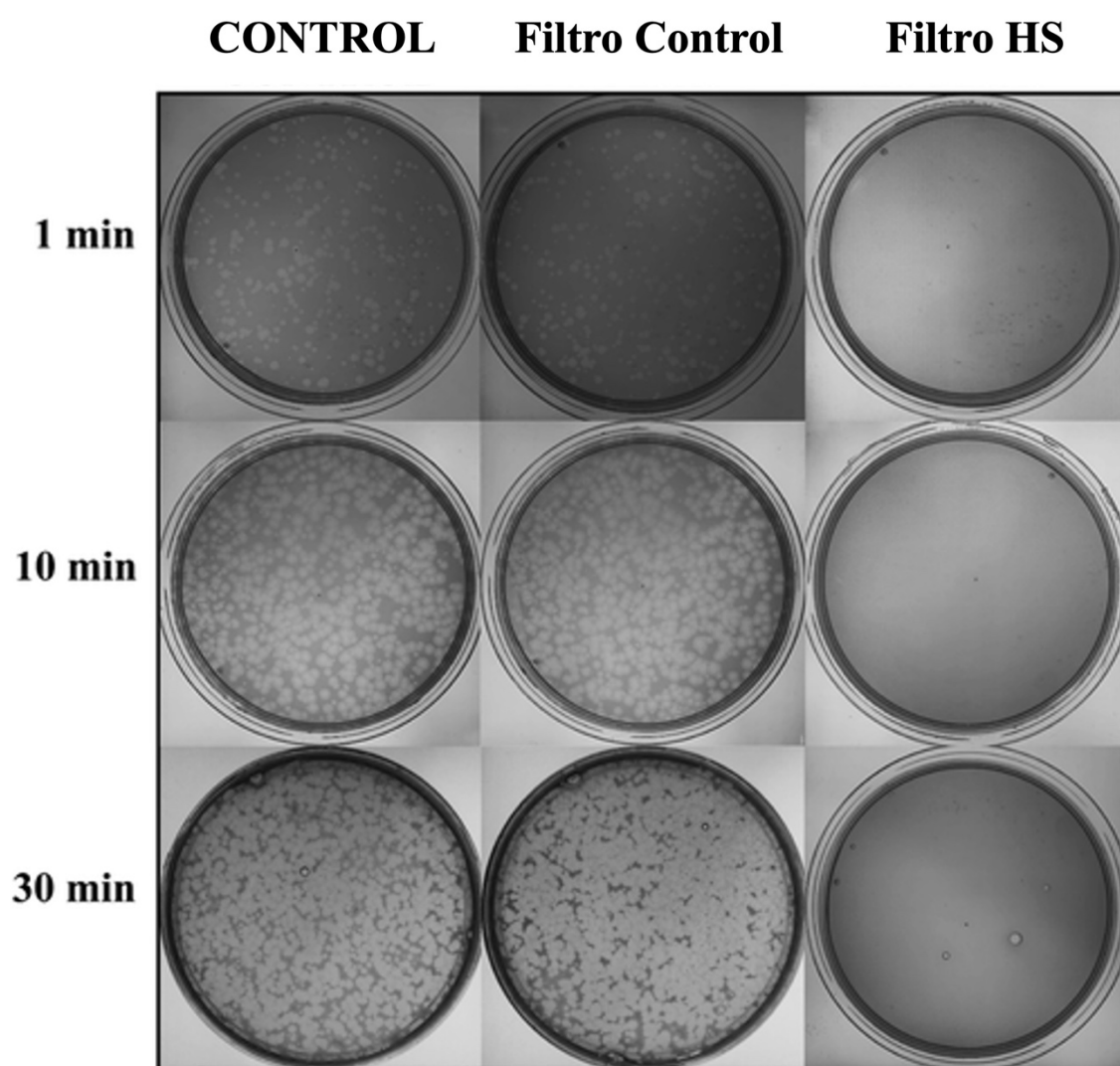


Figura 14. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medida por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación de muestras no diluidas del control, filtro de mascarilla sin tratamiento (Filtro Control), y de filtro de mascarilla con el recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS) tras 1, 10 y 30 minutos de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Se observó cómo, tras 1, 10 o 30 minutos de contacto entre el filtro con tratamiento y el modelo viral del SARS-CoV-2, crecieron en la placa los céspedes bacterianos, pero sin observar ninguna calva en ellas (ver Figura 14). Por el contrario, el filtro sin tratar (Filtro Control) mostró resultados muy similares al control (sin estar en contacto con ningún tipo de filtro) sin actividad antiviral, como era esperado. Las UFC/mL del bacteriófago Phi6 tras estar en contacto con los filtros con y sin tratamiento y el control se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Titulación de partículas infecciosas obtenidas por el método de doble capa para los ensayos antivirales llevados a cabo con el bacteriófago Phi6 expresada como media \pm desviación estándar, porcentaje de inactivación viral con respecto al control sin estar en contacto con ningún filtro (CONTROL), tras estar en contacto con filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro con el recubrimiento de jabón de manos solidificado (Filtro HS) durante 1, 10 y 30 minutos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

MUESTRA	Bacteriófago Phi6 1 min (UFC/mL)	Inactivación a 1 min (%)	Bacteriófago Phi6 10 min (UFC/mL)	Inactivación a 10 min (%)	Bacteriófago Phi6 30 min (UFC/mL)	Inactivación a 30 min (%)
CONTROL	$1.6 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$	-	$3.2 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^5$	-	$1.4 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$	-
Filtro Control	$3.5 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^5$	≈ 0	$2.5 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$	≈ 0	$4.3 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$	≈ 0
Filtro HS	0.00 ± 0.00	100	0.00 ± 0.00	100	0.00 ± 0.00	100

El título obtenido poniendo en contacto el bacteriófago Phi6 con el filtro sin tratamiento es similar al título obtenido con el control, como era esperado (Tabla 3). Sin embargo, el filtro con el tratamiento de jabón exhibió una potente capacidad de inactivación del bacteriófago (100% de inactivación del virus).

Las partículas víricas expulsadas por individuos infectados durante la respiración, durante el habla, estornudos o a través de la tos, contactan con la tela antiviral desarrollada en gotículas que contienen altas cantidades de agua[181]. De este modo, como el jabón de manos es soluble en agua, se cree que la inactivación del virus ocurre de manera muy rápida como se confirma con los resultados antivirales mostrados.

La acción antiviral del jabón de manos se atribuye principalmente a las moléculas surfactantes presentes en el jabón y su mecanismo de acción se atribuye a la ruptura de membranas, mecanismo de elución simple, o atrapamiento de las partículas virales[171].

4.3.3.2 SARS-CoV-2

El ensayo se realizó siguiendo el método del TCID₅₀/mL. Los resultados mostraron una reducción significativa del título infeccioso tras estar en contacto con el filtro tratado con jabón de manos solidificado durante 1 minuto de 5.16 o 5.21 a 3.46 logaritmos (ver Figura 15).

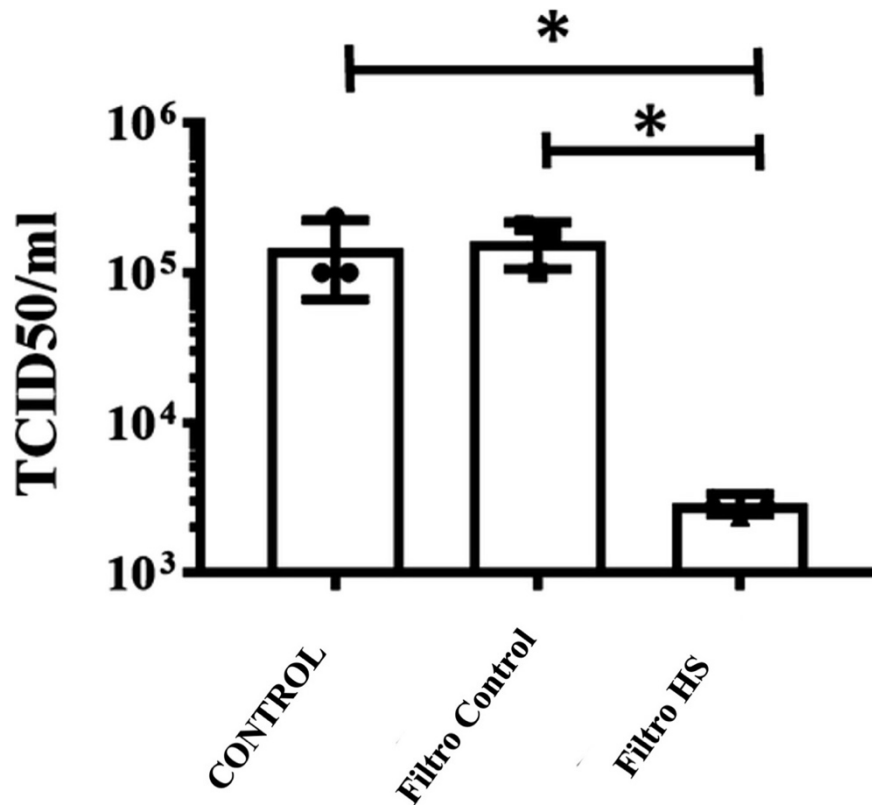


Figura 15. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para el filtro sin tratamiento (Filtro Control), filtro con recubrimiento biofuncional de jabón de manos solidificado (Filtro HS) y control acorde al método del TCID₅₀/mL. * $p < 0.05$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Sin embargo, el filtro sin tratamiento y el control no muestran reducción del título del bacteriófago, como era esperable. Estos resultados evidencian claramente el potente efecto antiviral que posee el filtro de mascarilla con recubrimiento de jabón de manos solidificado contra el SARS-CoV-2 tras solo 1 minuto de contacto. Los resultados, además, van en consonancia con los obtenidos con el bacteriófago Phi6. El título infeccioso obtenido por el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2 se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Título infeccioso y valores de logaritmo obtenidos por el método del TCID50/mL para el SARS-CoV-2 expresado como media \pm desviación estándar, reducción de logaritmos y porcentaje de inactivación viral con respecto al control sin estar en contacto con ningún filtro (CONTROL), tras estar en contacto con filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro con el recubrimiento de jabón de manos solidificado (Filtro HS) durante 1 minuto. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

MUESTRA	SARS-CoV-2 1 min (TCID50/mL)	SARS-CoV-2 1 min log (TCID50/mL)	Reducción log	Inactivación a 1 min (%)
CONTROL	$1.46 \times 10^5 \pm 7.90 \times 10^4$	5.16 ± 0.21		
Filtro Control	$1.62 \times 10^5 \pm 5.57 \times 10^4$	5.19 ± 0.16	≈ 0	≈ 0
Filtro HS	$2.90 \times 10^3 \pm 4.56 \times 10^2$	3.46 ± 0.07	1.7	98.0

4.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se llevó a cabo una extracción y cuantificación del ARN del bacteriófago Phi6 tras haber estado en contacto con filtros sin tratamiento (Filtro Control) y con el tratamiento de jabón de manos (Filtro HS) para determinar que las partículas virales no quedan atrapadas en los poros de la tela con anterioridad a la realización del ensayo antiviral, lo que podría dar lugar a falsos resultados.

De este modo, la Figura 16 muestra cómo la cantidad de ARN no disminuyó significativamente tras estar en contacto el virus con las telas con o sin tratamiento con respecto al control (misma cantidad de virus sin haber estado en contacto con ningún tipo de filtro).

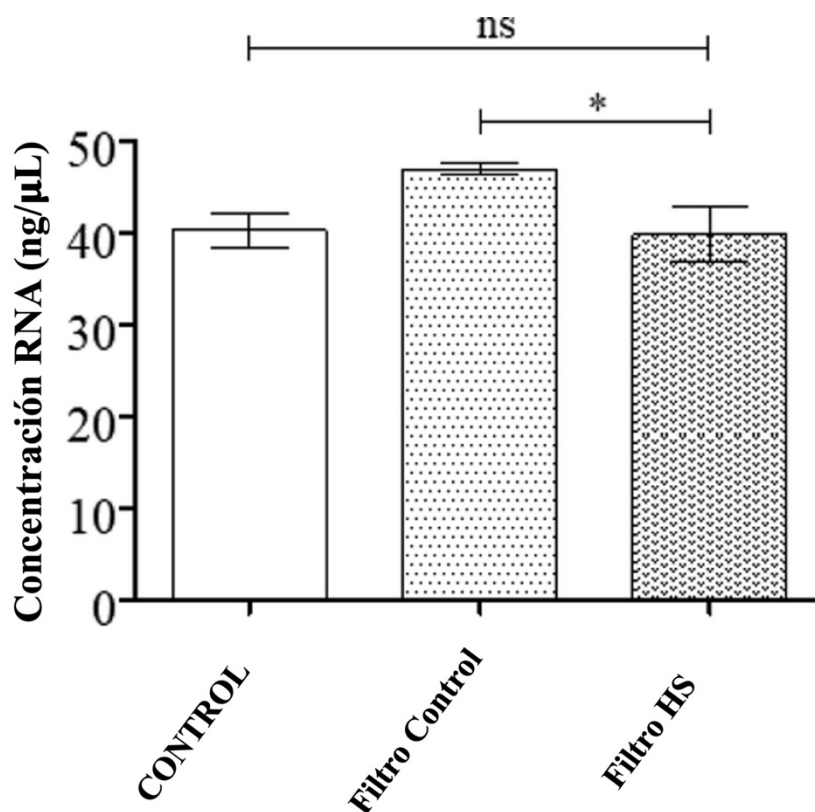


Figura 16. Extracción y cuantificación de ARN del bacteriófago Phi6. Se muestra la concentración de ARN en ng/μL del virus Phi6 medida en el control (sin estar en contacto con ningún tipo de filtro) y la misma cantidad de virus tras estar en contacto durante 5 minutos con un filtro sin tratamiento (Filtro Control) y el filtro tratado con jabón de manos (Filtro HS). * $p < 0.05$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

4.3.5 CITOTOXICIDAD IN VITRO

El filtro de mascarilla antiviral desarrollado se empleó para la fabricación de una mascarilla antiviral. Para evitar cualquier contacto directo del filtro antiviral con la cara de la persona portadora de la mascarilla, el filtro con propiedades antivirales se situó en la cuarta capa desde la cara interna en una mascarilla comercial de cinco capas WottoCare (Quanzhou Huanda Bags Co. Ltd, Quanzhou, China) (Figura 17). Una mascarilla similar, pero sin colocar ningún filtro antiviral se utilizó como material control.

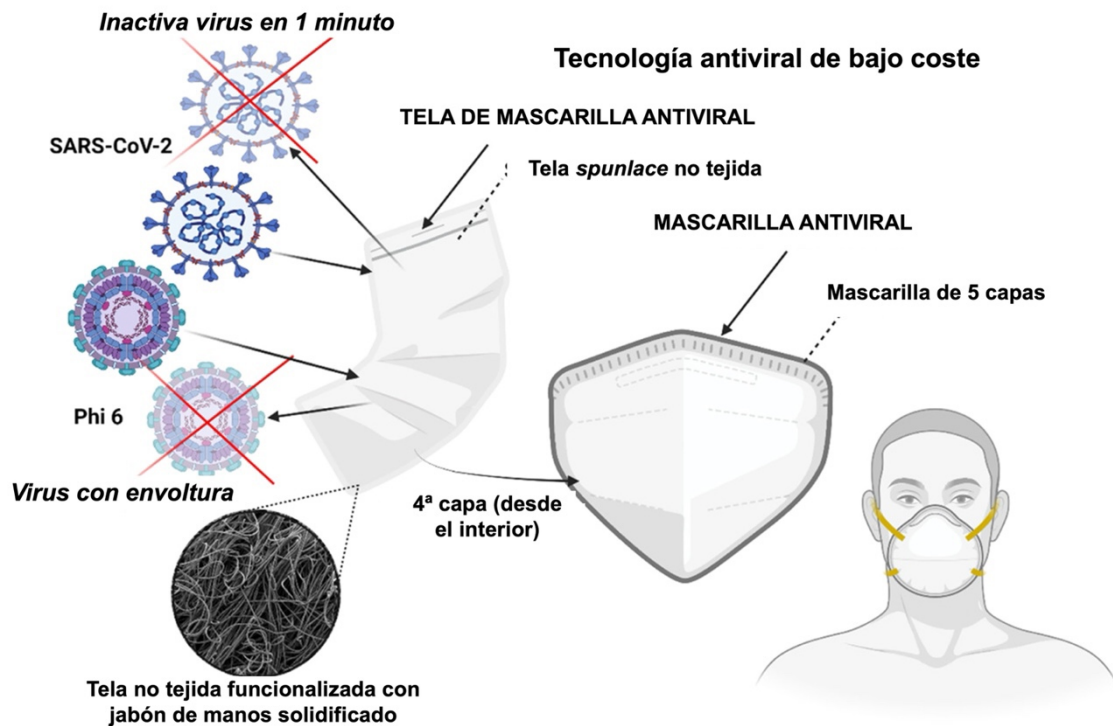


Figura 17. Esquema que representa la estructura de una mascarilla comercial con el filtro tratado por el método de “dip coating” con jabón de manos solidificado. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con estas mascarillas fabricadas con el filtro con tratamiento (Filtro HS) y sin el filtro con propiedades antivirales (Filtro Control). La Figura 18 muestra que la mascarilla fabricada con el filtro antiviral con el tratamiento de jabón de manos solidificado no produce ningún efecto citotóxico en las células de queratinocitos humanos.

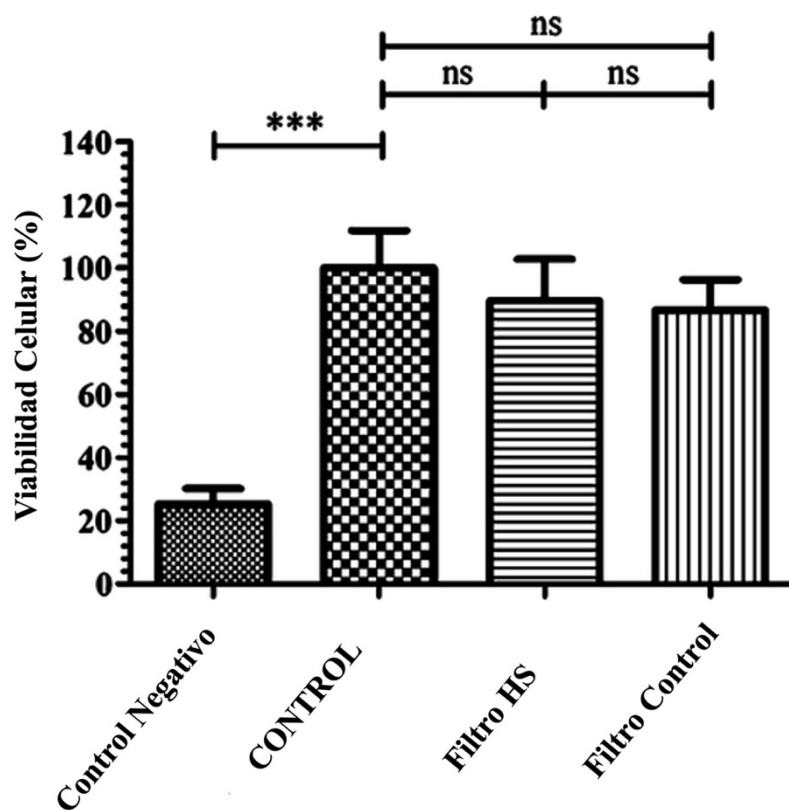


Figura 18. Ensayo de citotoxicidad por el método del MTT de los extractos obtenidos de las mascarillas de 5 capas con (Filtro HS) y sin (Filtro Control) el filtro antiviral tratado con jabón de manos solidificado. Se midieron también los resultados de controles positivo y negativos cultivados en presencia de células de queratinocitos humanos HaCaT a 37°C. *** $p < 0.001$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

4.4 CONCLUSIONES

En este trabajo se han desarrollado mascarillas antivirales mediante una tecnología de bajo coste a base de jabón de manos solidificado. Para ello dos ensayos antivirales diferentes se han llevado a cabo considerando las características de cada tipo de virus (bacteriófago Phi6 o SARS-CoV-2). Los resultados confirman que el bacteriófago Phi6 es un buen modelo viral bioseguro del SARS-CoV-2 frente al jabón de manos de la misma forma que se ha visto frente a amonios cuaternarios como el BAK. Estos resultados sugieren que este modelo viral podría resultar de gran utilidad para investigadores trabajando en este campo y que no tengan acceso a un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 para testar otros agentes con potencial actividad antiviral contra el SARS-CoV-2 u otros virus de ARN con envoltura como el de la gripe o el ébola.

De este modo, en este estudio se ha desarrollado una nueva mascarilla de bajo coste y no citotóxica con propiedades antivirales que reduce las infecciones de COVID-19 en dos sentidos, desde individuos infectados a individuos no infectados y viceversa. El filtro se ha desarrollado por el método de recubrimiento por inmersión, el cual tiene un coste mínimo y es altamente reproducible y utiliza una tela no tejida comercial con filamentos de polímero cilíndricos con jabón de manos adsorbido en la superficie de cada filamento. El mismo método de fabricación se podría aplicar a cualquier tipo de mascarilla u otras ropas de protección como pueden ser gorras, camisetas, pantalones, guantes, batas... (Figura 19).

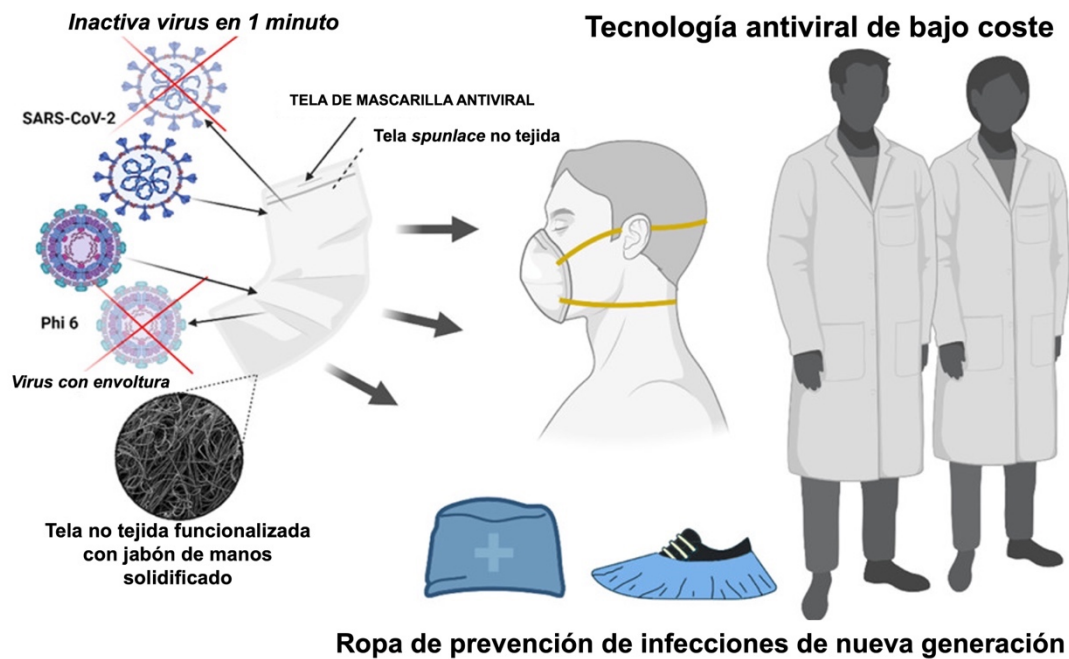


Figura 19. Representación esquemática de la utilidad de la tecnología antiviral desarrollada de bajo coste basada en jabón de manos solidificado. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC-BY de ref. [180]. Copyright American Chemical Society 2021.

Este método abre una amplia posibilidad de aplicaciones en la necesidad de búsqueda de aproximaciones antimicrobianas en la ciencia. Sin embargo, a pesar de los resultados, más investigación es necesaria para asegurar de que la tecnología es completamente segura para la producción a gran escala y la comercialización de estos elementos de protección.

El artículo publicado relacionado con este capítulo se encuentra en el Anexo II.

**5. CAPÍTULO III. MASCARILLAS ANTIMICROBIANAS
BASADAS EN PRODUCTOS NATURALES A BASE DE
EXTRACTO DE ARÁNDANOS ROJOS**

5.1 INTRODUCCIÓN

Ante la problemática de la escasez de recursos y el coste de la fabricación y elaboración de muchos materiales sintéticos, se está potenciando la búsqueda y el uso de recursos naturales renovables que permitan obtener resultados similares. Así, este camino se ha erguido como una vía de investigación primordial y necesaria hoy en día.

En este contexto, los extractos de arándanos rojos son productos naturales que han demostrado tener actividad antiviral contra virus con envoltura como el HSV-1 y virus del herpes simplex tipo 2 (HSV-2) debido a la presencia de proantocianidinas antimicrobianas de tipo A (PACs), las cuales causan alteraciones en la envoltura de glicoproteínas[182]. Estas moléculas son capaces de interactuar con las glicoproteínas de la membrana vírica e impedir la unión del virus a la superficie celular y la subsecuente entrada en las células huésped[183,184]. También se ha demostrado actividad antiviral del extracto de arándanos rojos frente al virus de la gripe[185]. Además, las PACs también son conocidas por su efecto antibacteriano contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*[186] y actividad antifúngica contra *Candida albicans*[187]. Se ha visto también que los fenoles solubles presentes en el extracto de los arándanos rojos pueden presentar una potente actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*[188].

Por otra parte, la pulpa de estos extractos ha demostrado ser efectiva para neutralizar la capacidad infecciosa de virus como el Zika o el Dengue[189]. El ácido quínico presente en la pulpa de los arándanos rojos es uno de los componentes principales que acidifica la orina, previniendo infecciones urinarias, ya que posee propiedades antiadherentes que consiguen que bacterias como *Escherichia coli* no se adhiera al tracto urinario[190].

El extracto de arándanos rojos también ha demostrado ser útil en la conservación de alimentos[191]. De este modo, películas de quitosano fabricadas con extracto de arándanos rojos han mostrado propiedades antioxidantes y antimicrobianas que previenen el deterioro de los alimentos, permitiendo así aumentar la durabilidad de estos y reducir el riesgo de causar enfermedades o intoxicaciones en los consumidores[191].

En este trabajo se propone el tratamiento de filtros de mascarilla con productos naturales basados en los extractos de arándanos rojos con el objetivo de proporcionarles gran capacidad antimicrobiana frente a virus y bacterias resistentes a los antibióticos.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 PREPARACIÓN DE LOS FILTROS

Se prepararon dos disoluciones de extracto de arándanos rojos con una concentración del 10% *p/v* utilizando etanol absoluto como disolvente y dos polvos de arándanos comerciales de *Vaccinium macrocarpon*: VITAFAIR (Whitewall GmbH, Berlín, Alemania) y NUTRIBIOLITE (Uritractin, Valladolid, España). De acuerdo con los fabricantes de VITAFAIR y NUTRIBIOLITE, los polvos de arándanos rojos contienen proantocianidinas en un 25 y 30% *p/p*, respectivamente. Se mezclaron 10 g de polvo de arándanos rojos con 100 mL de etanol absoluto ($\geq 99.8\%$, AnalaR Normapur, VWR chemicals, Radnor, PA, USA) y se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente (24 ± 1 °C) sellado con Parafilm. Tras disolverlo, se dejó decantar la parte sólida de la disolución durante toda la noche. Tras 12 h, se centrifugó el sobrenadante a 10000 rpm ($16,993x g$) en una centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durante 30 minutos para asegurar una completa separación de la parte líquida de la fase sólida. Tras la centrifugación, el extracto se volvió a dejar toda la noche para decantar la posible fase sólida restante. Al día siguiente, se recogió el sobrenadante con una pipeta serológica de 25 mL (LABCLINICS, Barcelona, España) y se filtró mediante filtros no estériles de 0.2 μ L. Tras el filtrado, el extracto se centrifugó una vez más a 10000 rpm ($16,993x g$) durante 30 minutos para asegurar una completa separación de la parte líquida de la fase sólida.

Se prepararon discos ($n=6$) de aproximadamente 10 mm de diámetro con un filtro de tela *spunlace* de tela no tejida que son filtros comerciales utilizados para la fabricación de mascarillas de NV EVOLUTIA (Valencia, España) cortando con un troquel circular. Los filtros se trataron con la disolución de extracto de arándanos rojos correspondiente mediante el método de “dip coating”[149]. Los filtros se sumergieron en las soluciones de extracto arándanos rojos (10% *p/p*) durante 30 minutos a temperatura ambiente (24 ± 1 °C) en un recipiente sellado con Parafilm. Tras ello, las muestras se secaron a 60°C durante 48 h para permitir la solidificación del extracto de arándanos rojos como recubrimiento asegurando la completa evaporación del etanol. Los filtros de mascarilla

tratados con el extracto de arándanos rojos VITAFAIR y NUTRIBIOLITE se denominan en este trabajo como filtros E10V y E10N, respectivamente. Los discos fueron esterilizados mediante radiación UV durante 1 h por cada lado.

Se utilizaron discos preparados a partir de filtros de mascarilla tratados únicamente con etanol absoluto bajo agitación magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente (24 ± 1 °C) (Control S) como material de referencia.

5.2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS FILTROS

5.2.2.1 DEGRADACIÓN Y COMPORTAMIENTO TÉRMICOS

Estos experimentos fueron realizados por el grupo de investigación de Roser Sabater i Serra del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València. Los análisis térmicos gravimétricos (TGA) se llevaron a cabo en un Mettler Toledo TGA 2 (SF system) (Mettler Toledo, Columbus, USA). Se colocaron muestras secas (entre 5-10 mg) en la balanza y se midió la pérdida de peso de la muestra en función de la temperatura. Las muestras (~10 mg) fueron calentadas desde 25 hasta 700°C a un ritmo de calentamiento de 20°C/minuto.

Se llevaron a cabo ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un PerkinElmer DSC 8000 (PerkinElmer, Waltham, USA) bajo una atmósfera de nitrógeno con muestras de entre 5 y 10 mg. Las muestras secadas al vacío fueron sometidas a un enfriamiento a 0°C seguidas de un calentamiento a 80°C, ambos procesos a un ritmo de calentamiento de 20°C/minuto.

5.2.2.2 PROPIEDADES MECÁNICAS

Estos experimentos fueron realizados por el grupo de investigación de Roser Sabater i Serra del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universitat Politècnica de València. Se realizó un análisis mecánico dinámico (DMTA) con un DMA 8000 (PerkinElmer, Waltham, USA) a una frecuencia de 1 Hz en las muestras (20 x 5 x 0.01 mm). La dependencia de la temperatura del módulo de almacenamiento (E'), el módulo

de pérdidas (E'') y de la tangente de pérdidas ($\tan \delta$) se midió en un rango de temperatura de 0 a 80°C con un ritmo de calentamiento de 3°C/minuto. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

5.2.3 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD IN VIVO

La toxicidad *in vivo* se estudió con el organismo *Caenorhabditis elegans*. Se realizaron extracciones de los filtros de mascarilla correspondientes para realizar el estudio acorde a la norma ISO-10993. Para ello, los filtros de mascarilla se sometieron a un proceso de esterilización por radiación UV durante 1 h por cada lado. En una placa de 6 pocillos se colocó en cada pocillo el trozo de tela de filtro de mascarilla correspondiente con 2 mL de medio K (2.36 g de cloruro de potasio, 3 g de cloruro de sodio en 1 L de agua destilada, autoclavado). Se añadió, además de los 2 mL previos, una proporción de volumen de 0.1 g/mL que se seleccionó acorde a la norma ISO-10993, la cual recomienda esta ratio para materiales porosos irregulares de baja densidad como textiles. Tras incubar 24 h a 25°C, los extractos se recogieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Los gusanos se mantuvieron y se propagaron en placas de medio para crecimiento de nematodos (MCN) preparado acorde a las especificaciones de Stiernagle, T.[192], sembradas con *Escherichia coli* OP50 y mantenidas a 25°C. La cepa de *Caenorhabditis elegans* N2 fue la empleada en estos ensayos, facilitada por el *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, Minneapolis, MN, USA).

Los nematodos se recogieron de las placas de MCN utilizando 5 mL de agua destilada y se recogieron en tubos Falcon de 15 mL para preparar un cultivo sincronizado de *Caenorhabditis elegans* en estadio L1. Los tubos se centrifugaron a 1300 rpm (2209x g) durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet de nematodos se resuspendió en 100 µL de agua destilada y transferido a un tubo Eppendorf añadiendo 700 µL de una disolución de lejía al 5%. Esta mezcla fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente (24 ± 1 °C) vorteando cada 2 minutos. Tras el último proceso de vorteo, los tubos se centrifugaron a 700 x g durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó en 800 µL de agua destilada. Este paso se llevó a cabo dos veces más. Tras el

último lavado, el pellet se resuspendió en 100 μ L de agua destilada y se transfirió a placas de MCN sembradas con 100 μ L de *Escherichia coli* OP50. Los huevos se incubaron por 72 h a 25°C.

Se realizó una centrifugación a 1300 rpm (2209x g) para obtener un pellet de larvas en estadio L1 y se resuspendió en 3 mL de medio K. En una placa de 48 pocillos se prepararon pocillos con 62.5 μ L de una suspensión 1:250 de colesterol (5 mg/mL en etanol) en medio K; 62.5 μ L de un cultivo concentrado 50X de *Escherichia coli* OP50 a una $OD_{600nm}=0.9$, obteniendo un pellet centrifugando a 4000 rpm (6797x g) durante 10 minutos y resuspendido en medio K; 115 μ L de medio K y 250 μ L del extracto del filtro correspondiente. Se agregó también un volumen de medio K que contuviese 50-100 nematodos. Las placas de 48 pocillos se sellaron con Parafilm y se cultivaron en un agitador orbital a 25°C y 120 rpm durante 24h.

Para determinar la proporción de supervivencia de los *Caenorhabditis elegans*, el volumen de cada uno de los pocillos se dividió en 10 gotas de 50 μ L y se colocaron bajo el microscopio (Motic BA410E incluyendo Moticam 580 5.0MP) para contar el número de nematodos vivos y los muertos. El crecimiento en el medio K y en una disolución tóxica de cloruro de zinc 1000 μ M se midió como control positivo y control negativo, respectivamente. Para analizar la capacidad de reproducción, tres nematodos se colocaron en una placa de MCN sembrada con *Escherichia coli* OP50 y se dejó poner huevos durante 48 h. Tras este tiempo, el número de huevos fue contado al microscopio. El crecimiento fue estudiado en muestras donde los nematodos se secaron mediante calor para medir la longitud del cuerpo en imágenes tomadas bajo el microscopio con el software Motic Images Plus 3.0. Cinco muestras independientes ($n=5$) se estudiaron en este ensayo.

5.2.4 MICROSCOPIA

5.2.4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los ensayos de microscopía electrónica se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.3.

5.2.4.2 MICROSCOPIA ÓPTICA

La morfología de los filtros de mascarilla con y sin tratamiento se observó al microscopio óptico (Motic BA410E) y se tomaron fotografías a 10X y 40X aumentos con la Moticam 580 5.0MP. Las imágenes fueron procesadas por el software Motic Images Plus 3.0 (Motic, Barcelona, España). También se tomaron imágenes macroscópicas de los tejidos con una cámara 64MP Xiaomi con un sensor Sony IMX682 y una abertura de f/1.89.

5.2.5 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHÍ6

Los ensayos antivirales con el bacteriófago Phi6 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.4.

5.2.6 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2

Los ensayos antivirales con SARS-COV-2 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.5.

5.2.7 ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Los ensayos antibacterianos de difusión en agar se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.6.

5.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó acabo de la manera que se explica en el punto 3.2.7.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 MICROSCOPIA

Las imágenes de microscopía óptica a dos aumentos (x10 y x40) y las fotografías macroscópicas de los filtros de mascarilla con y sin tratamiento de extractos de arándanos rojos se muestran en la Figura 20.

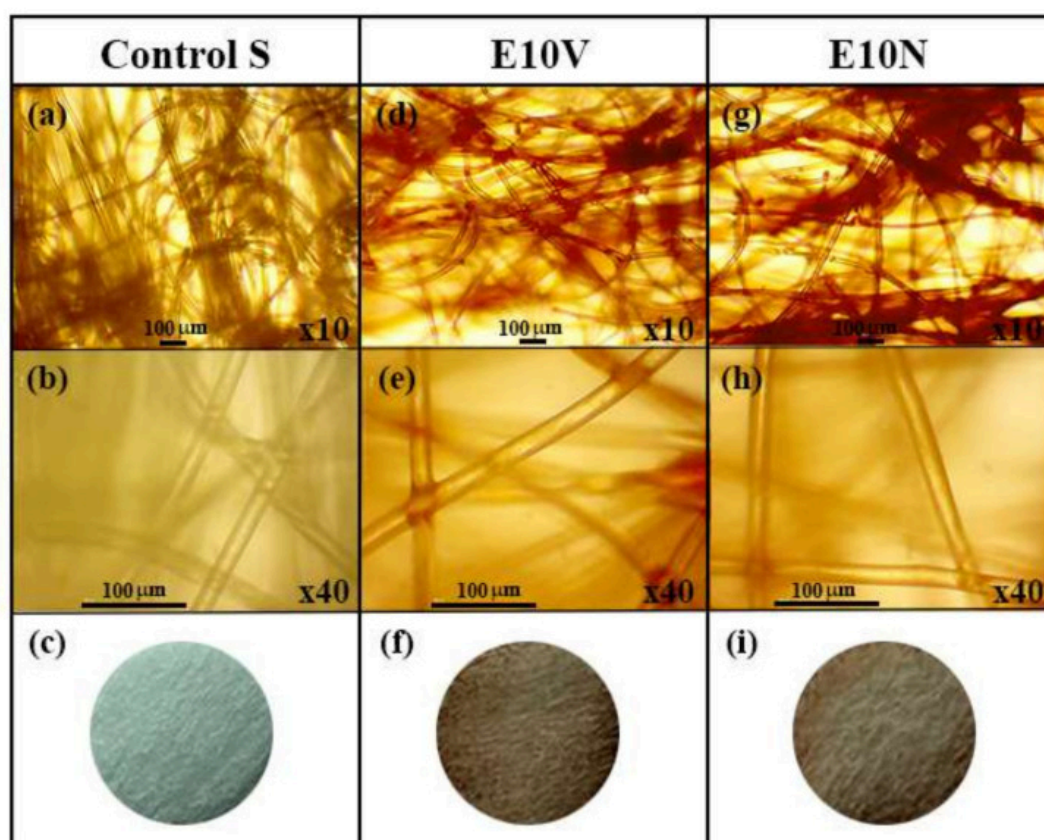


Figura 20. Imágenes de microscopía óptica a dos aumentos (x10 y x40) y fotografías macroscópicas de los filtros de mascarilla limpios (Control S) antes (a, b, c) y después del tratamiento con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) (d, e, f) o con extracto de arándanos rojos NUTRIBIOLITE (E10N) (g, h, i). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

Tanto las imágenes de microscopía óptica y las fotografías macroscópicas (Figura 20c,f,i) muestran que tan solo un delgado recubrimiento rojizo de extracto de arándanos rojos se forma sobre las fibras de los filtros de mascarilla. Adicionalmente, la morfología de la superficie de los filtros fue analizada mediante microscopía electrónica (Figura 21).

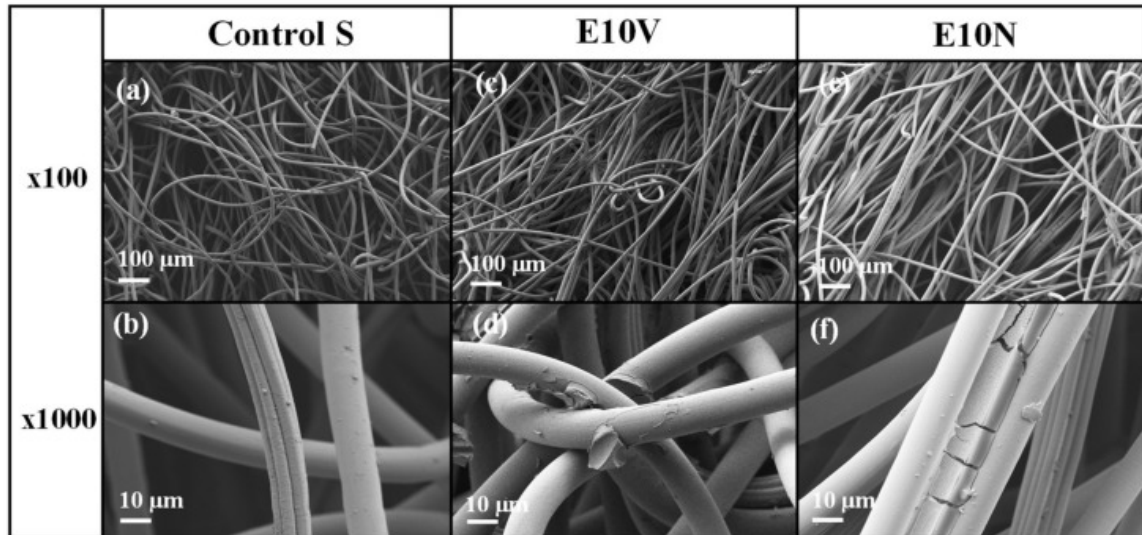


Figura 21. Imágenes de alta resolución por FESEM de los filtros de mascarilla antes (a,b) y después del tratamiento con los extractos de arándanos rojos VITAFAIR (c,d) o NUTRIBIOLITE (e,f). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

Previamente al tratamiento, las telas muestran una superficie lisa, con algunas pequeñas partículas en su superficie que podrían haber surgido a raíz del proceso de “electrospinning” (Figura 21a,b). Tras el tratamiento con los extractos, la morfología de las fibras y la porosidad de los filtros de mascarilla no cambian sustancialmente (Figura 21c,e), siendo resultados acordes con los obtenidos por microscopía óptica. Las imágenes de aumento x1000 muestran las fibras cubiertas por los extractos (Figura 21d,f). El recubrimiento se puede observar claramente (ver Figura 21f), formando una capa que envuelve las fibras. La superficie de las fibras se mantiene lisa, aunque se puede observar una gran cantidad de pequeñas partículas depositadas en la superficie, probablemente debido a la formación de pequeños agregados durante el proceso de secado tras la técnica del “dip-coating” con los dos extractos de arándanos rojos. Por lo tanto, no se observa un cambio sustancial en la porosidad o la disposición de las fibras, lo que sugiere que no hay cambios en la respirabilidad de los filtros ni en la filtración bacteriana de los mismos.

5.3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS FILTROS

El perfil de degradación térmico de la muestra de filtro de mascarilla sin tratamiento (Control S) y de las muestras tras el tratamiento por “dip-coating” con los extractos de arándanos rojos (E10N y E10V), analizados por termogravimetría se pueden observar en la Figura 22a. Tras una pérdida inicial de peso a temperaturas menores a 100°C, probablemente debido a la evaporación de humedad residual, el proceso de degradación empezó con temperaturas superiores a los 220°C y ocurrió en tres fases. El perfil de degradación en la primera y segunda fase, entre 220-360°C y 360-450°C, respectivamente, no muestran grandes diferencias entre los filtros con tratamiento con extractos de arándanos rojos y la tela sin tratamiento. Sin embargo, a temperaturas mayores a 450°C, la pérdida de peso fue aproximadamente un 10% menor en las muestras tratadas con extracto de arándanos rojos. El peso residual al final del ensayo (700°C) se mantuvo con la misma diferencia del 10% entre los filtros con y sin tratamiento. Además, los resultados de calorimetría, mostrados en la Figura 22b, evidencian que el tratamiento de extracto de arándanos rojos no afecta al comportamiento térmico en el rango de temperaturas (de 0 a 80°C) adecuado para la aplicación en materiales con capacidad de prevención de infecciones.

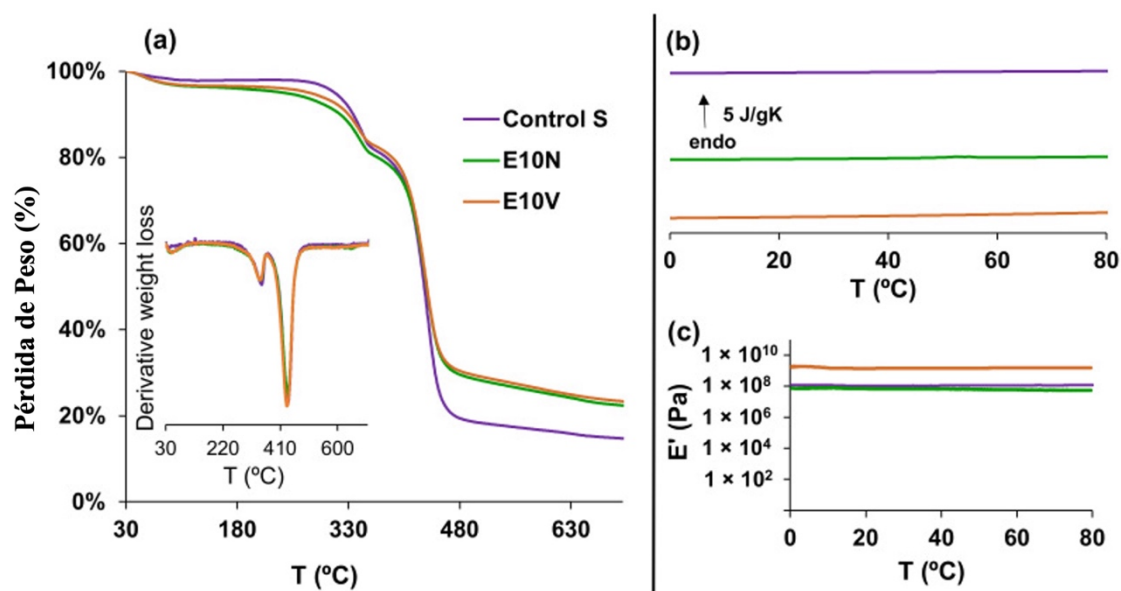


Figura 22. (a) Análisis termogravimétrico. Pérdida de peso (%) y derivada de la pérdida de peso frente a la temperatura. (b) Calorimetría diferencial de barrido. Flujo de calor normalizado calentando a 20°C/min. (c) Análisis mecánico dinámico. Módulo de almacenamiento (E') frente a temperatura a 1 Hz. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

El DMTA también se realizó para estudiar las propiedades mecánicas entre 0 y 80°C. Estos resultados demostraron que el tratamiento con el extracto de arándanos rojos NUTRIBIOLITE (E10N) prácticamente no modificaba el módulo de almacenamiento con respecto al filtro sin tratamiento. Sin embargo, este valor incrementaba de $1.1 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^6$ Pa a $1.52 \times 10^9 \pm 1.37 \times 10^8$ Pa tras el tratamiento con extractos de arándanos rojos VITAFAIR (E10V). Estas diferencias en las propiedades mecánicas podrían estar relacionadas a los diferentes aditivos presentes en cada uno de los productos comerciales. Estos resultados demuestran que los tratamientos con extractos de arándanos rojos afectan a las propiedades térmicas y mecánicas de la tela, aunque no de la misma manera.

5.3.3 ENSAYOS ANTIVIRALES

Los extractos de arándanos rojos son conocidos por su potencial farmacológico[193–196]. Además, las proantocianidinas presentes en el extracto de frutos rojos tienen un gran uso en industrias como la cosmética, sugiriendo un uso potencial como desinfectante de uso externo[197]. Su *et al.* mostró actividad antiviral del zumo de arándanos y las PACs contra diferentes virus, incluyendo sustitutos de virus entéricos humanos, norovirus murino, calcivirus felino, el bacteriófago MS2 y el PhiX-174[198]. Demostraron una reducción muy importante de la titulación del virus tras 1 hora de contacto con el zumo de arándanos y las PACs.

5.3.3.1 BACTERIÓFAGO PHI6

Los resultados logrados de los ensayos antivirales frente al bacteriófago Phi6 tras 1 minuto de contacto con los filtros de mascarilla tratados con extractos de arándanos rojos se muestran en la Figura 23.

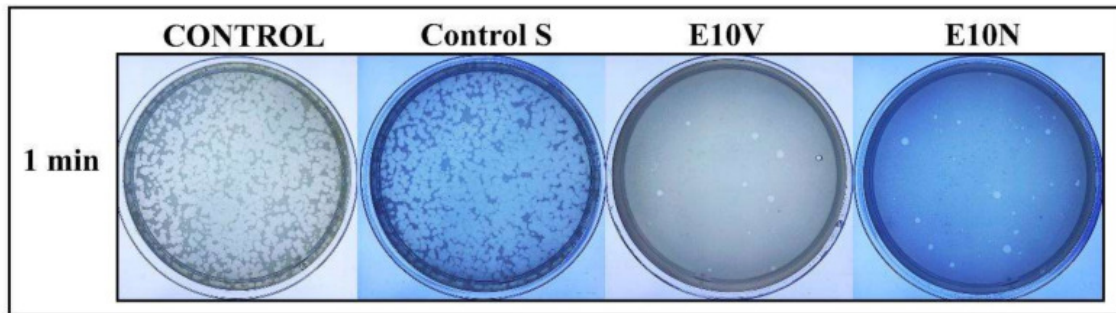


Figura 23. Viabilidad del bacteriófago Phi6 determinada por el método de doble capa. Se muestra la titulación de muestras sin diluir para el control, telas sin tratamiento (Control S) y telas con recubrimiento biofuncional de extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) o NUTRIBIOLITE (E10N) a 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

Se demostró que el bacteriófago Phi6 pierde su capacidad de infección tras estar en contacto con los dos tipos de filtros antimicrobianos durante 1 minuto ya que se observan muy pocas calvas en los céspedes bacterianos. Por el contrario, una cantidad similar de calvas se observó en el control y en la tela sin tratamiento tras el mismo tiempo de contacto. El título de bacteriófago en UFC/mL de cada tipo de muestra se calculó y se comparó con el control en forma de reducción de logaritmos (ver Figura 24).

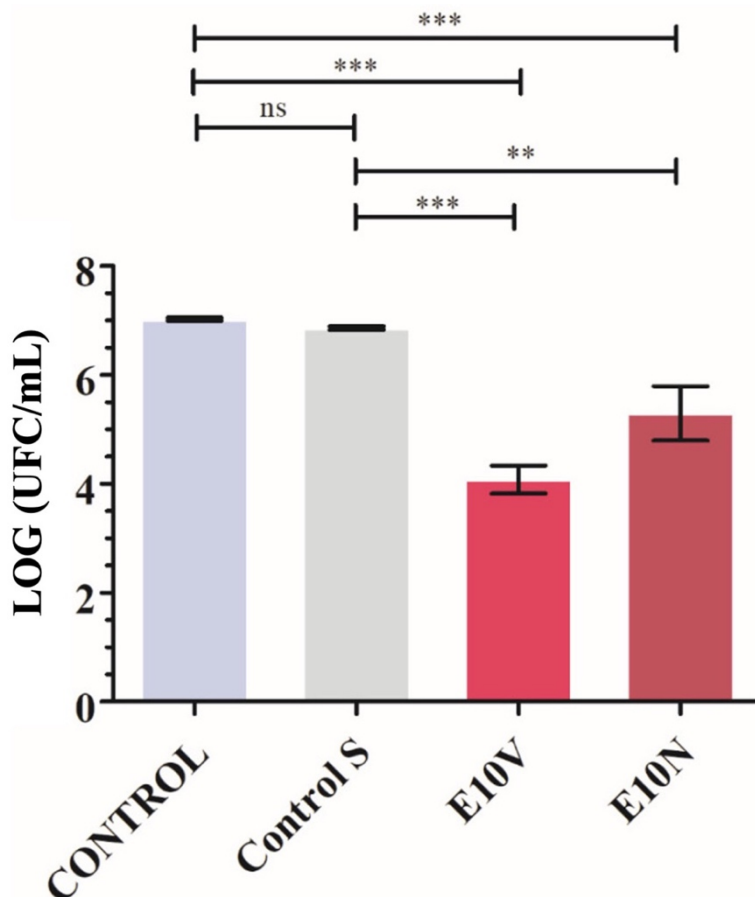


Figura 24. Reducción del título infeccioso del bacteriófago Phi6 en logaritmo de unidades formadoras de colonias por mL (log(UFC/mL)). Se muestran los resultados de bacteriófagos sin estar en contacto con ningún tipo de filtro (CONTROL), con un filtro sin tratamiento (Control S) y con los filtros tratados con extractos de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N) a 1 minuto de tiempo de contacto con el virus. Tres ensayos independientes se llevaron a cabo en dos días diferentes (n=6). Se determinaron diferencias significativas mediante una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

La Figura 24 muestra que el título obtenido contactando los bacteriófagos con la tela Control S es muy similar al CONTROL. Sin embargo, cuando el bacteriófago entra en contacto con las telas tratadas con extracto de arándanos rojos (E10V y E10N) durante 1 minuto, hay una reducción estadísticamente significativa de la infectividad del bacteriófago de un $99.87 \pm 0.07\%$ y un $97.39 \pm 1.95\%$, respectivamente.

En relación con el mecanismo de acción antiviral, Mirandola *et al.* atribuyen la actividad antiviral de los extractos de arándanos rojos contra el virus Hazara al objetivo de las

primeras etapas del ciclo de replicación del virus, incluyendo la adsorción inicial a las células huésped[199]. Existen diferentes hipótesis sobre cómo los extractos de arándanos o las PACs afectan a los virus. Las PACs podrían actuar mediante la unión y la destrucción de la estructura de la cápside viral o podría causar la inhibición de enzimas clave para la replicación del virus[200]. Un estudio reciente sobre el descubrimiento de canales inhibidores del SARS-CoV-2 como candidatos antivirales ha demostrado que las PACs se unen directamente al canal 2-E[197]. Además, algunos estudios muestran también que la exposición a PACs previene a algunos bacteriófagos de unirse a su huésped bacteriano[201].

5.3.3.2 *SARS-CoV-2*

Los resultados antivirales logrados frente al SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto con los filtros de mascarilla tratados con extractos de arándanos rojos se muestran en la Figura 25.

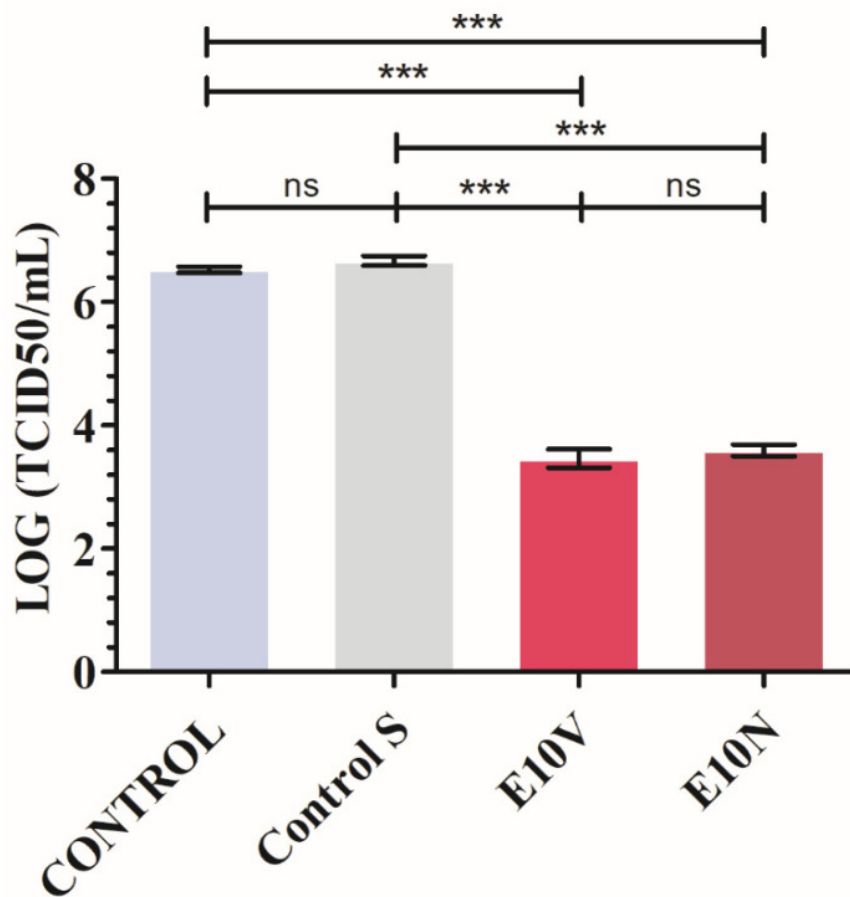


Figura 25. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto medido por el método del TCID50/mL. Se muestran los resultados de las partículas virales sin estar en contacto con ningún tejido (CONTROL), en contacto con filtros de mascarilla sin tratamiento (Control S) y filtros tratados con los extractos de arándanos rojos de VITAFAIR (E10V) o NUTRIBIOLITE (E10N) durante 1 minuto de contacto. Tres réplicas independientes (n=3) se estudiaron. Se determinaron diferencias significativas con respecto al control con una prueba ANOVA con una corrección de Tukey para múltiples comparaciones. *** $p < 0.001$; ns, no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

Utilizando los filtros de mascarilla E10V y E10N, el valor del TCID50 se redujo enormemente en un porcentaje de 99.91 ± 0.02 y 99.88 ± 0.02 , respectivamente. Un contacto más prolongado en el tiempo con las telas E10V y E10N debería causar una mayor inactivación viral.

5.3.4 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR

Los resultados de los ensayos antibacterianos obtenidos por el método de difusión en agar se muestran en la Figura 26.

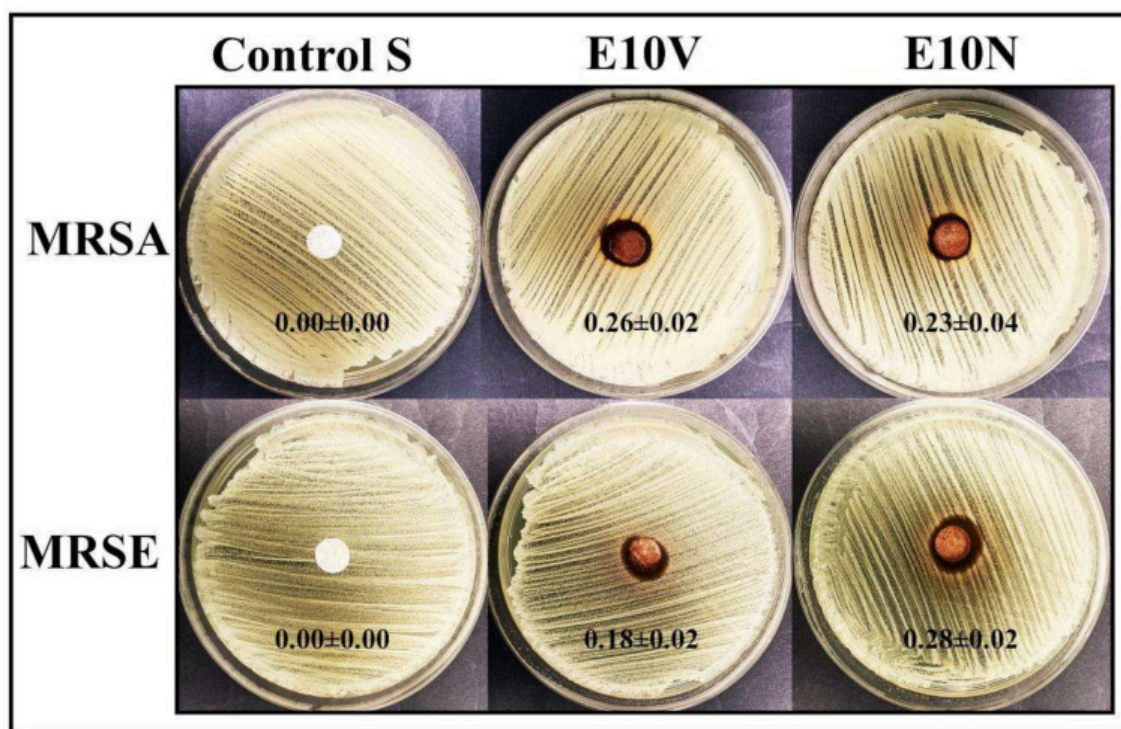


Figura 26. Ensayos de difusión en agar con las bacterias MRSA y MRSE. Se muestran los resultados con la muestra sin tratamiento (Control S) y las muestras tratadas con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N). Se incubaron durante 24 h a 37°C. La anchura normalizada de los halos de inhibición calculada con la ecuación (1) se muestra como media \pm desviación estándar. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[182] Copyright 2021 MDPI.

Se observa como ambos filtros tratados con los diferentes extractos de arándanos rojos (E10V y E10N) poseen un efecto antibacteriano similar contra bacterias resistentes a meticilina como son las bacterias MRSA y MRSE.

5.3.5 CITOTOXICIDAD IN VIVO

La toxicidad *in vivo* se estudió con el modelo *Caenorhabditis elegans*. La proporción de supervivencia, el crecimiento y la reproducción de los nematodos se analizaron tras una exposición de 24 h a los extractos de las telas antimicrobianas (ver Figura 27).

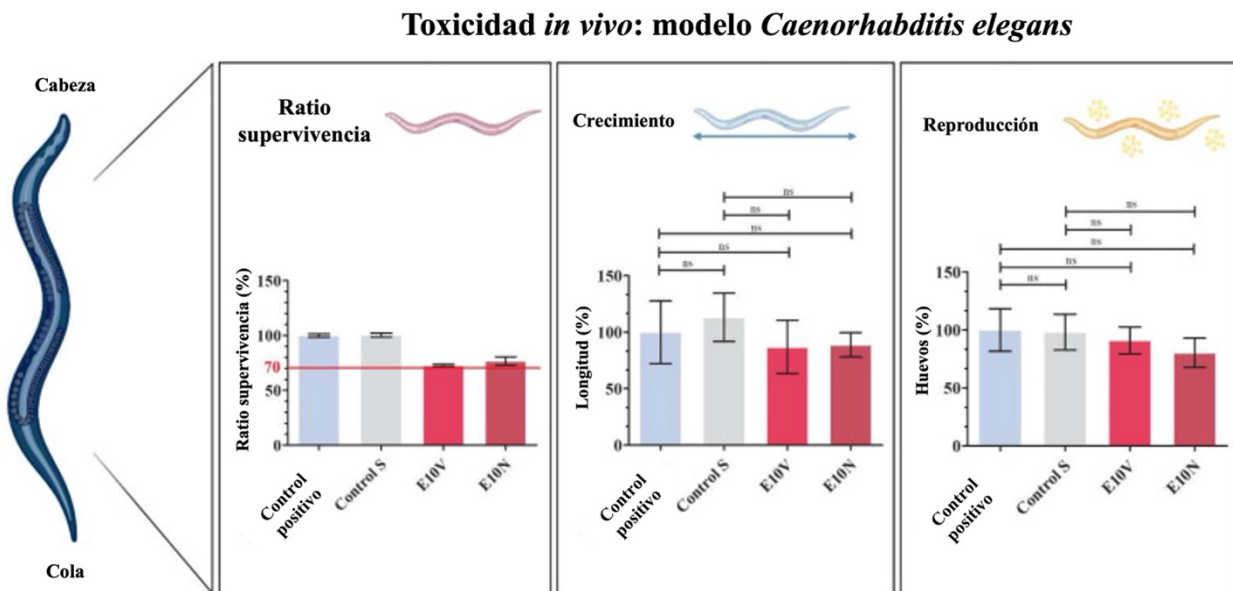


Figura 27. Toxicidad *in vivo* con el modelo *Caenorhabditis elegans*. Se muestran los resultados de la proporción de supervivencia, crecimiento y reproducción tras una exposición de 24 h con los extractos de filtros de mascarilla sin tratamiento (Control S) y tratados con extracto de arándanos rojos VITAFAIR (E10V) y NUTRIBIOLITE (E10N) con respecto al control positivo. Se realizó el ensayo con cinco réplicas independientes ($n=5$). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. Ns; no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

Una exposición de 24 h se consideró suficiente para la aplicación de los filtros en la fabricación de mascarillas faciales ya que éstas no deben ser utilizadas por más de 4 h de acuerdo con las recomendaciones de la OMS[202].

Ambas telas antimicrobianas (E10V y E10N) demostraron que la reducción de la supervivencia era menor al 30% en comparación con el crecimiento de *Caenorhabditis elegans* en condiciones óptimas (control positivo). Además, los extractos de los filtros

E10V y E10N no mostraron ningún efecto negativo en el crecimiento o la reproducción de los nematodos, con longitud y puesta de huevos similar al control tras 24 h.

Debido a estos resultados tan prometedores, se propone esta tecnología como una oportunidad de fabricar ropa capaz de prevenir infecciones que pueda ser utilizada, por ejemplo, en entornos hospitalarios (ver Figura 28).



Figura 28. Representación esquemática de la utilidad de la tecnología antiviral desarrollada basada en extracto de arándanos rojos. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [182] Copyright 2021 MDPI.

5.4 CONCLUSIONES

En el presente estudio, se ha desarrollado un nuevo tejido antimicrobiano basado en productos naturales como el extracto de arándanos rojos. Se ha demostrado que son capaces de inactivar el SARS-CoV-2 y el bacteriófago Phi6 en un tiempo muy bajo (1 minuto). Esta rapidez puede atribuirse a la alta superficie de contacto presente en los materiales porosos desarrollados mediante fibras recubiertas.

En este trabajo se demuestra que los filtros E10N y E10V poseen una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias MRSA y MRSE. Los extractos de arándanos y las PACs afectan más a bacterias Gram negativas que a las Gram positivas, ya que pueden dañar sus membranas y paredes de manera más sencilla.

Los materiales que presentamos en este trabajo pueden considerarse no tóxicos, especialmente si se utilizan en aplicaciones como la fabricación de ropa y tejidos para la prevención de infecciones, donde los materiales se encuentran fuera del cuerpo. Es necesario destacar que las telas no tejidas que se han desarrollado están producidas con arándanos rojos, los cuales son un producto natural y biodegradable que puede crecer de manera rápida y sencilla y proporcionar una alta protección en la lucha contra el SARS-CoV-2. El proceso de fabricación aquí presentado también se puede emplear para producir una gran cantidad de mascarillas basadas en material biológico y otras ropas de protección como camisetas, pantalones, batas, guantes, entre otros y que puedan inactivar virus con envoltura como el SARS-CoV-2.

El artículo publicado relacionado con este capítulo se encuentra en el Anexo III.

**6. CAPÍTULO IV. PANTALLAS ANTIMICROBIANAS
BASADAS EN CLORURO DE BENZALCONIO**

6.1 INTRODUCCIÓN

Las pantallas faciales proporcionan una barrera protectora de plástico a los usuarios que permite tratar de evitar contagios de enfermedades infecciosas[203]. Las pantallas faciales ofrecen un gran número de ventajas. Mientras que las mascarillas tienen una durabilidad limitada y poco potencial de ser reutilizadas, las pantallas faciales se pueden reutilizar indefinidamente y son fáciles de limpiar con jabón y agua o con desinfectantes de uso cotidiano[203]. Son cómodas de llevar, protegen las vías de entrada de virus y reducen el riesgo de autoinoculación impidiendo que el usuario se toque la cara. Además, al ser transparentes, permiten la buena comunicación sin necesidad de quitarse la pantalla y permiten una buena percepción de expresiones faciales y del movimiento de los labios[203].

Lo más importante, sin embargo, es que las pantallas faciales parecen reducir significativamente la cantidad de aire inhalado expuesto a virus respiratorios como el de la gripe[204,205]. Un estudio determinó que las pantallas faciales reducen la exposición a virus en un 96% cuando la lleva un usuario a una distancia de 45 cm de una persona con tos[206]. Incluso tras 30 minutos, el efecto protector era mayor al 80% y la pantalla facial era capaz de bloquear el 68% de partículas de aerosoles, los cuales suponen una importante vía de transmisión de virus como el SARS-CoV-2[206]. Cuando el experimento se realizó a una distancia de unos 180 cm aproximadamente, las pantallas faciales demostraron ser capaces de reducir en un 92% la cantidad de virus inhalado[206].

También se han desarrollado pantallas faciales biodegradables con propiedades antimicrobianas[207]. Estas pantallas están fabricadas con ácido poliláctico biodegradable y llevan un recubrimiento de nanopartículas de plata el cual les confiere actividad antibacteriana[207].

En este trabajo se propone el desarrollo de pantallas faciales tratadas con BAK por el método de recubrimiento por inmersión con el objetivo de dotar a las pantallas de protección con propiedades antivirales contra virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y capacidad antibacteriana contra bacterias resistentes a antibióticos, todo ello sin comprometer la transparencia del material para permitir una perfecta visión del usuario.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 PREPARACIÓN DE LAS PANTALLAS FACIALES

Se prepararon láminas de PET de grosor 0.3167 ± 0.0408 mm a partir de una pantalla facial comercial comprada de Plásticos Villamarchante S.L.[208] (Valencia, España). Seis muestras (n=6) de aproximadamente 10 mm de diámetro de estas pantallas faciales de PET se trataron con 70% de etanol suplementado con 0.1% *p/p* de cloruro de benzalconio por el método de “dip coating”[149] durante 1 minuto a 25°C para conseguir un contenido seco de BAK de $0.182 \pm 0.034\%$ *p/p* determinado gravimétricamente. Otros seis discos de PET (n=6) fueron sometidos al mismo tratamiento de “dip coating” pero empleando únicamente una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% *v/v*) sin BAK durante 1 minuto a 25°C. Discos de PET (n=6) sin someter a ningún tratamiento se utilizaron como material de referencia. Todos los discos fueron sometidos a un proceso de secado a 60°C durante 48 h y fueron esterilizados bajo radiación UV durante 1 h por cada lado.

6.2.2 MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Se realizaron ensayos de microscopía de fuerza atómica (AFM) con un microscopio de barrido Bruker MultiMode 8 (SPM, Karlsruhe, Alemania) operando en modo de contacto y con el NanoScope V Controller y en software NanoScope 8.15 (Bruker, Karlsruhe, Alemania). Un soporte de silicón cubierto de antimonio de Bruker se empleó con una velocidad de escaneo de 0.500 Hz. La señal de fase se puso a cero en la frecuencia de resonancia de la punta. La frecuencia de golpeteo fue un 5-10% más baja que la frecuencia de resonancia. La amplitud de excitación y los puntos de ajuste de amplitud fueron 308,5 y 644,8 mV, respectivamente, y la relación de aspecto fue 1.00.

6.2.3 ESTUDIO DE OPACIDAD

La transparencia de las láminas de PET creadas para el estudio se evaluó acorde al método espectrofotométrico de medidas de opacidad empleado por Park y Zhao[209]. De este modo, láminas rectangulares (4 mm x 50 mm) de PET secas se colocaron directamente en cubetas de espectrofotómetro para medir la absorbancia a 600 nm con el espectrofotómetro UV/VIS Nanocolor UV0245 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Una cubeta vacía fue utilizada como referencia. Posteriormente, la opacidad (O) de las láminas se determinó con la ecuación (2), donde Abs600 es el valor de absorbancia a 600 nm y x es el grosor de la lámina en mm. Las medidas fueron tomadas con tres réplicas de cada material y se analizaron como absorbancia dividida entre grosor de la lámina (media \pm desviación estándar).

$$O = \frac{Abs600}{x} \quad (2)$$

6.2.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los ensayos de microscopía electrónica se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.3.

6.2.5 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PH16

Los ensayos antivirales con el bacteriófago Phi6 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.4.

6.2.6 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2

Los ensayos antivirales con SARS-CoV-2 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.5.

6.2.7 ENSAYO ANTIBACTERIANO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Los ensayos antimicrobianos de difusión en agar se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.6.

6.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó acabo de la manera que se explica en el punto 3.2.7.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 MICROSCOPIA DE FUERZA ELECTRÓNICA

La Figura 29 muestra las imágenes de AFM para las muestras de pantalla PET tratadas y sin tratar sobre un área de escaneo de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

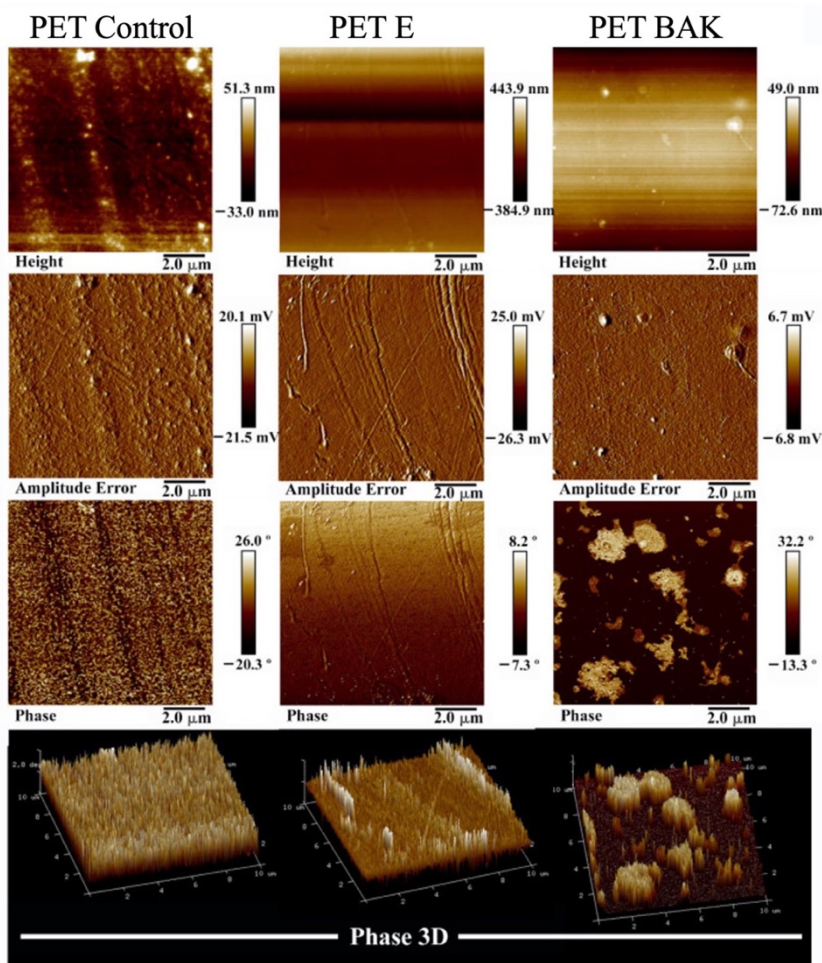


Figura 29. Imágenes topográficas por AFM (altura, error de amplitud e imágenes de fase) y representación de la fase 3D grabadas en modo de contacto para muestras sin tratamiento (PET Control), muestras tratadas con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y muestras con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) escaneando un área de $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Estas imágenes muestran cómo se forma el recubrimiento de BAK sobre la superficie de la pantalla PET tras el tratamiento de recubrimiento por inmersión. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref.[210] Copyright 2021 MDPI.

El PET sin tratamiento muestra algunas impurezas en su superficie que desaparecen tras la inmersión en etanol absoluto. Además, la muestra tratada con etanol absoluto todavía

presenta algunas imperfecciones en su superficie que desaparecen tras el tratamiento con BAK. Las muestras con recubrimiento de BAK poseen zonas algo elevadas que se observan como zonas blancas en la imagen de fase.

6.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En el caso de las pantallas faciales de PET, las imágenes de FESEM mostraron como un microrecubrimiento de BAK se forma en la superficie de PET con un grosor aproximado de unos 25 μm (ver Figura 30). Además, los análisis por espectroscopía de rayos-X de energía dispersa (EDS) demostraron que el contenido de nitrógeno es del 0.37% del peso de recubrimiento de BAK, lo cual concuerda con la cantidad de átomos de nitrógeno presentes en el BAK[211]. Sin embargo, los análisis por EDS no mostraron contenido de nitrógeno en la matriz de PET como era esperado.

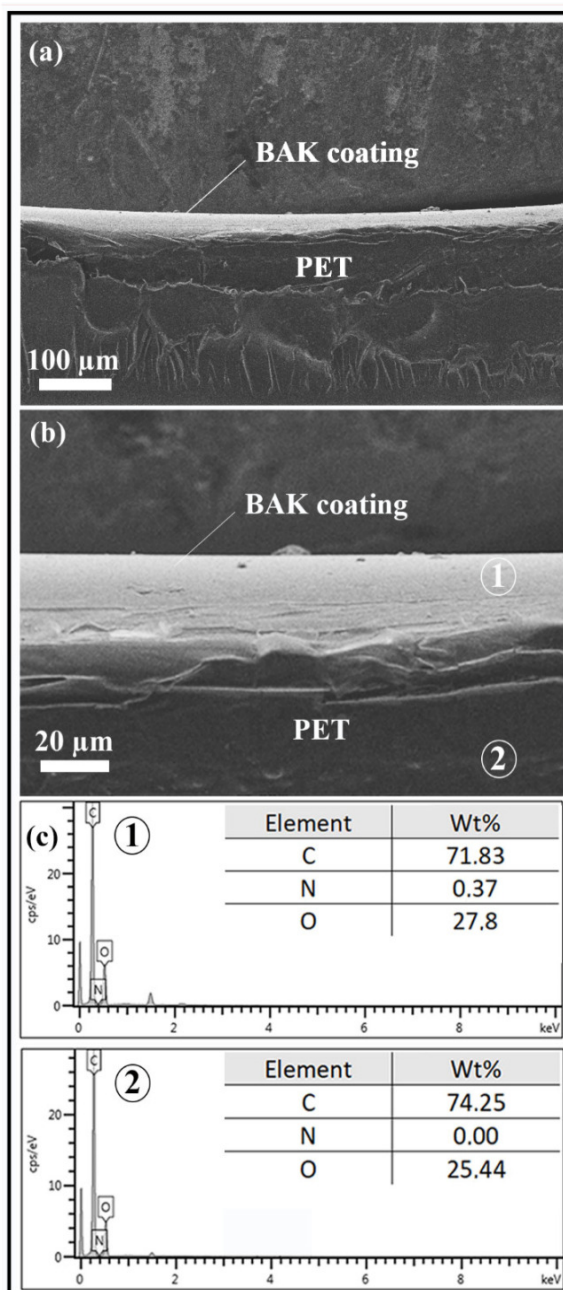


Figura 30. Morfología del recubrimiento biofuncional de BAK en la superficie de las pantallas PET observado mediante FESEM con análisis EDS. Se observa la pantalla PET con $0.182 \pm 0.034\%$ *p/p* de recubrimiento biofuncional de BAK a dos aumentos: (a) x150 y (b) x720, además de (c) el análisis EDS para el recubrimiento de la matriz de PET. Reimpreso con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210]. Copyright 2021 MDPI.

6.3.3 ENSAYOS ANTIVIRALES

6.3.3.1 BACTERIÓFAGO PHÍ6

En el estudio de las pantallas PET (Figura 31), la pantalla con el recubrimiento biofuncional de BAK reveló una potente actividad antiviral contra el bacteriófago Phi6 (100% de inhibición del virus).

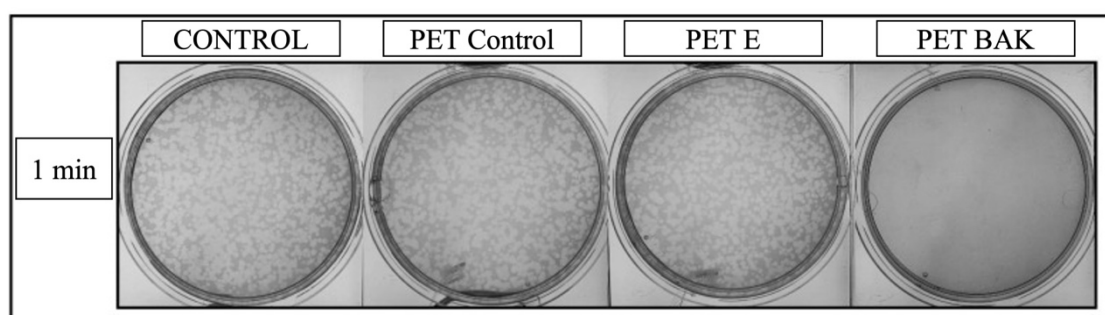


Figura 31. Pérdida de viabilidad del bacteriófago Phi6 medida por el método de doble capa. Se muestran imágenes de la titulación de muestras no diluidas del control, pantalla PET sin tratamiento (PET Control), pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) tras 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI.

Se observó cómo no se produjeron calvas en el césped bacteriano tras 1 minuto de contacto entre la pantalla con recubrimiento de BAK y el modelo viral bioseguro del SARS-CoV-2. Sin embargo, el número de calvas entre el control y las muestras de pantalla sin tratar y tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK es muy similar, resultando en una titulación prácticamente idéntica, indicando que no ocurría inactivación del virus en estas muestras (ver Tabla 5).

Tabla 5. Reducción del título infeccioso medido en UFC/mL determinado por el método de doble capa para el bacteriófago Phi6. Se muestra el resultado del logaritmo de las UFC/mL ($\log(\text{UFC/mL})$) de las muestras control, pantalla PET sin tratamiento (PET Control), pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) tras 1 minuto de contacto con el virus. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI.

MUESTRA	Phi6 1 min (UFC/mL)
CONTROL	$4.36 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^5$
PET Control	$4.38 \times 10^6 \pm 1.98 \times 10^5$
PET E	$4.23 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^5$
PET BAK	0.00±0.00

6.3.3.2 SARS-CoV-2

Los resultados de los ensayos antivirales con la pantalla PET contra el SARS-CoV-2 indican que el recubrimiento de BAK en este tipo de material también es altamente efectivo contra el SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Los resultados se muestran en la Figura 32.

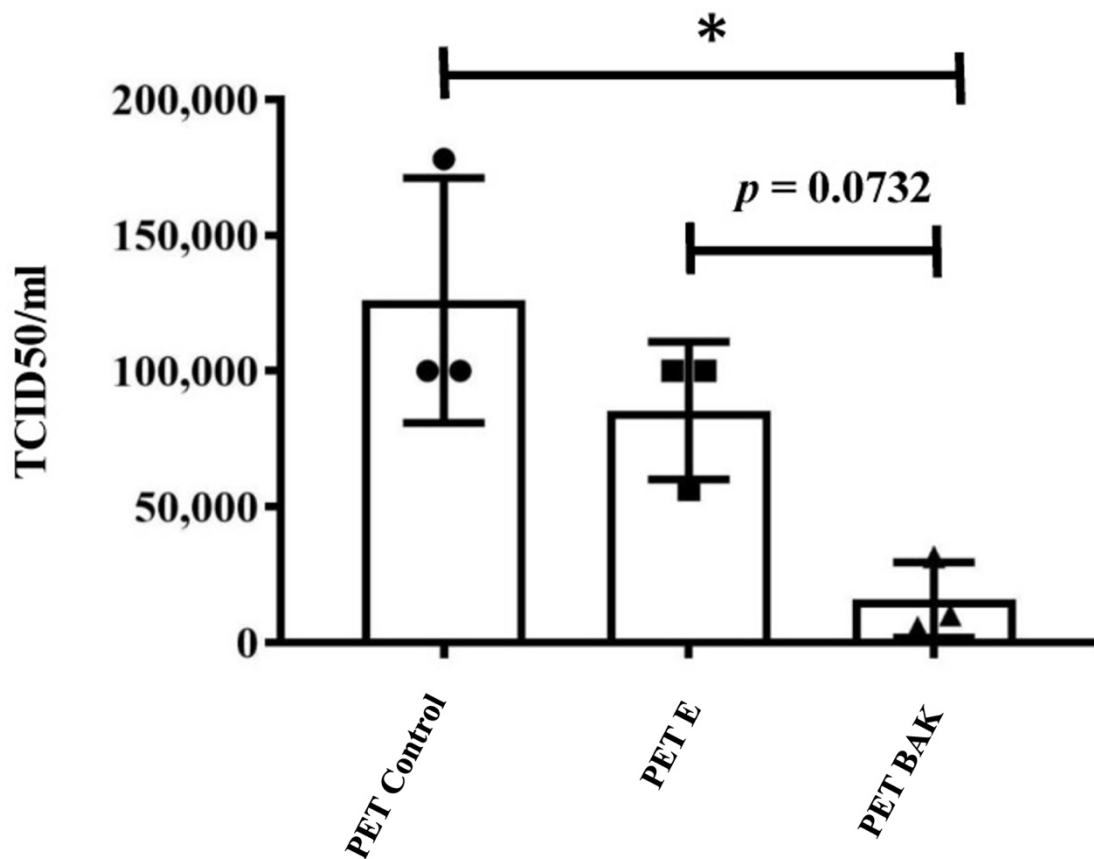


Figura 32. Reducción del título infeccioso del SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto. Se muestran los datos para la pantalla sin tratamiento (PET Control), pantalla tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E), pantalla con recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) y control acorde al método del TCID50/mL. Los puntos, cuadrados y triángulos se establecen en función del valor de cada punto. $*p < 0.05$. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI.

Debido a que el BAK es una sustancia altamente soluble en agua, se llevaron a cabo ensayos antivirales con las pantallas PET tratadas con BAK, pero previamente lavadas con agua destilada. Los resultados mostraron que el recubrimiento antimicrobiano de BAK se disuelve realmente rápido al entrar en contacto con el agua y pierde su efecto antimicrobiano (resultados no mostrados).

6.3.4 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS DE DIFUSIÓN EN AGAR

En el caso de las pantallas PET, se observa también como el plástico con el recubrimiento biofuncional de BAK posee una potente actividad antibacteriana contra las bacterias resistentes MRSA y MRSE, con un halo antibacteriano muy similar de 0.61 ± 0.03 y 0.57 ± 0.05 , respectivamente (Figura 33).

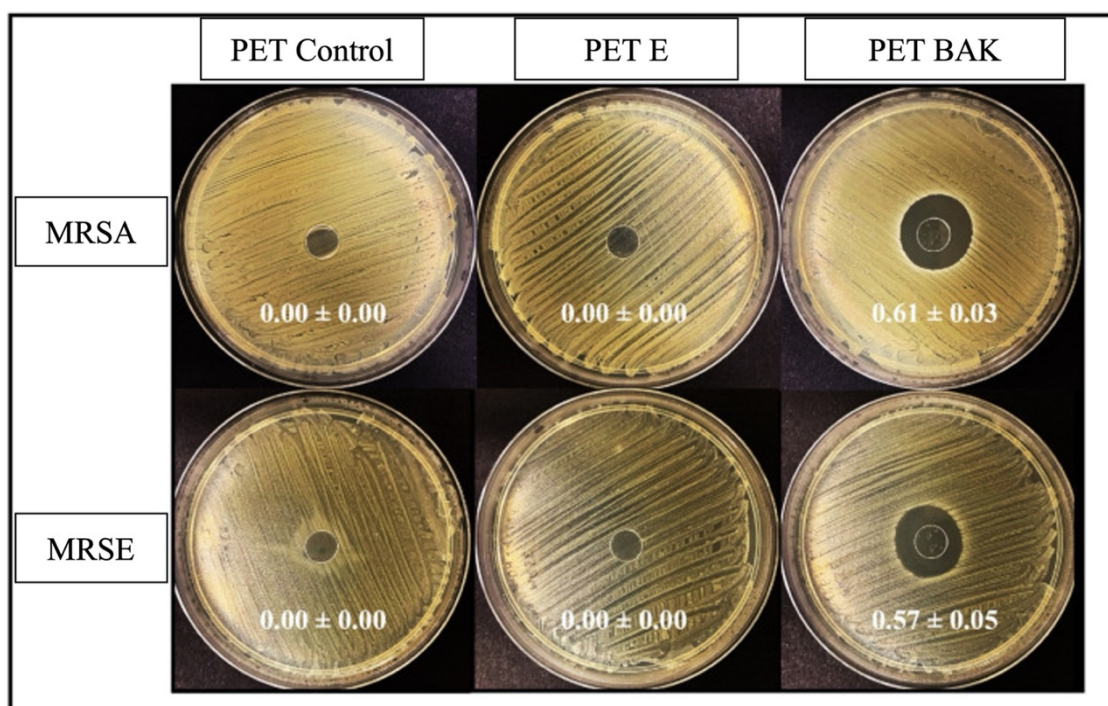


Figura 33. Ensayos antibacterianos de difusión en agar. Se muestran los resultados de la pantalla PET sin tratamiento (PET Control), de pantalla PET tratada con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y de pantalla PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK) tras 24 h de incubación a 37°C. Se observa en cada imagen la anchura normalizada de los halos antibacterianos, expresada como media \pm desviación estándar calculada con la ecuación (1). Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI.

6.3.5 TRANSPARENCIA DE LA PANTALLA FACIAL

La Figura 34 muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas de la opacidad (o transparencia), calculada por la ecuación (2), de las muestras de pantalla PET antes y después de ser tratadas con una solución de etanol absoluto/agua destilada

(70/30% v/v) sin BAK o con BAK, lo cual resulta esencial para poder utilizar este tipo de equipamiento facial transparente de protección individual.

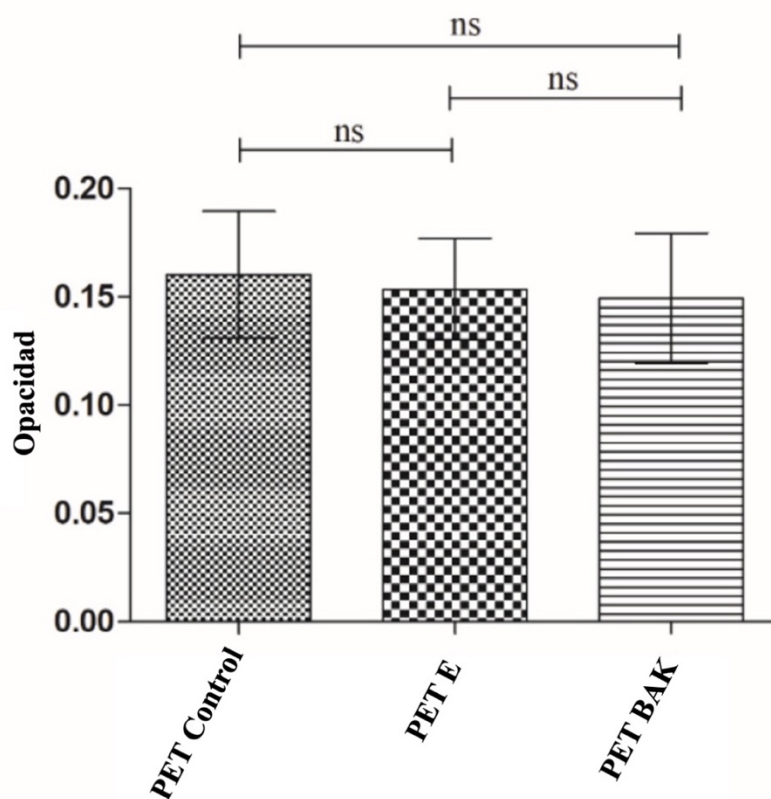


Figura 34. Resultados de la medida de opacidad para las muestras de PET sin tratamiento (PET Control), PET tratado por el método de “dip coating” con una solución de etanol absoluto/agua destilada (70/30% v/v) sin BAK (PET E) y PET con el recubrimiento biofuncional de BAK (PET BAK). Los resultados de la prueba ANOVA se muestran en la gráfica; ns: no significativo. Adaptado con permiso bajo licencia Creative Commons CC BY 4.0 de ref. [210] Copyright 2021 MDPI.

Estas pantallas faciales avanzadas pueden dotar de una protección muy superior a las normales a virólogos que trabajen con patógenos con una alta capacidad infecciosa en laboratorios de bioseguridad y a cirujanos y trabajadores del sector sanitario en general. Además, el plástico PET propuesto es un material reciclable que puede reutilizarse[212] y contribuir a la reducción la cantidad de residuos infecciosos generados. Además, el recubrimiento antimicrobiano puede producirse de manera muy sencilla y tantas veces como sean necesario al ser esta tecnología reutilizable. El recubrimiento de BAK se puede realizar únicamente en la parte externa para personas no infectadas o también en la cara interna del material si el material de protección va a ser utilizado por pacientes infectados.

También podría llevarse a cabo en otros tipos de polímeros sintéticos transparentes como el policarbonato, polimetil metacrilato, poli (2-hidroxietil metacrilato), en materiales no transparentes o en polímeros biodegradables que pudieran resultar una solución a la necesidad de materiales de protección de base biológica por razones medioambientales[213]. Este equipamiento de nueva generación puede reducir significativamente el aumento de generación de residuos biológicos infecciosos. Esta nueva tecnología de bajo coste podría revolucionar la industria de herramientas de protección facial, ya que permite fabricar otros elementos de protección aplicando el mismo proceso para dotarlos de actividad antimicrobiana.

6.4 CONCLUSIONES

Se han desarrollado materiales transparentes fabricados con PET que poseen una alta actividad antiviral para reducir la propagación de virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y con capacidad antibacteriana frente a bacterias resistentes a la meticilina. Este material extra-protector se ha desarrollado con un método de bajo coste como el recubrimiento por inmersión que permite al BAK ser físicamente adsorbido en la superficie del PET. Este material antimicrobiano puede ser utilizado en la fabricación de pantallas faciales y otros materiales de protección como separadores transparentes, cascos, mascarillas de plástico, etc. Sin embargo, más investigación es necesaria para superar posibles deficiencias en la aplicabilidad de esta tecnología de recubrimiento para otras herramientas de protección y otros tipos de materiales transparentes. El efecto del empaquetamiento, almacenamiento y transporte en las propiedades antimicrobianas del recubrimiento de BAK necesita ser estudiado también antes de aplicar esta tecnología a gran escala.

El artículo publicado relacionado con este capítulo se encuentra en el Anexo IV.

**7. CAPÍTULO V. CREMA LABIAL ANTIMICROBIANA
BASADA EN PRODUCTOS NATURALES A BASE DE
EXTRACTO DE ARÁNDANOS ROJOS**

7.1 INTRODUCCIÓN

La práctica del pintado de labios es original de la prehistoria, donde los pigmentos utilizados para colorear la boca se solían obtener de recursos naturales como de escarabajos carmín machacados, la henna o incluso de hormigas[214]. Hoy en día, esta práctica continúa arraigada en la sociedad y se considera una práctica de cosmética importante. El uso del pintalabios se ha incrementado con la gran disponibilidad de colores, texturas, fragancias y otras propiedades que poseen los pintalabios hoy en día[215]. Esto se observa en que los pintalabios han aumentado su valor de mercado para poder satisfacer las necesidades de los consumidores, principalmente las mujeres[215].

Los pintalabios son cosméticos que se asocian con un mayor atractivo físico, sexual y social[216–222], pero normalmente no están fabricados con materiales antimicrobianos. Sin embargo, algunos productos naturales se han ido introduciendo en la fabricación de pintalabios y otros cosméticos para tratar de evitar posibles efectos secundarios como la irritación de la piel de los consumidores[214].

Estudios anteriores ya demostraron que colorantes naturales como la pitaya u otras hierbas como *Randia spinosa*, *Tagetes erecta* o *Iris germanica* pueden dotar a los pintalabios con actividad antimicrobiana contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Klebsiella*[214,223]. Estos descubrimientos van acorde a las altas demandas que se dan hoy en día de productos naturales cultivados sin pesticidas y químicos, de alimentos naturales, de hierbas medicinales, etc., todo ello debido a que el mundo trata de adoptar un modo de vida más natural para conseguir un desarrollo sostenible[224].

Algunos de los componentes que forman los pintalabios pueden causar en algunas personas alergia, náuseas, dermatitis o secado de labios[126]. Es por ello por lo que en este trabajo planteamos la opción de trabajar con un compuesto natural como es el extracto de arándanos rojos que podría ayudar a mitigar estos problemas además de dotar al pintalabios de capacidad antimicrobiana. Como se ha comentado en capítulos anteriores, los extractos de arándanos rojos contienen unos compuestos antimicrobianos

denominados proantocianidinas[186,187,194,198]. Estos compuestos son capaces de dar lugar a alteraciones en la envoltura proteica de virus como el HSV-1, el HSV-2 o el virus de la gripe, de modo que impiden la unión de los virus a la superficie de las células huésped[182–185]. Las proantocianidinas también pueden afectar a bacterias como son *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes*[186–188]. Entre los mecanismos que pueden contribuir a la acción antibacteriana se incluyen el atravesar la pared bacteriana, interferir con moléculas intracelulares, unión a lipopolisacáridos, aumentar la permeabilidad celular afectando así al metabolismo de la bacteria o alteración de la expresión génica[225].

Además, los arándanos rojos contienen un pigmento natural conocido como peonidina, un componente principal de las antocianidinas que dota a estos frutos de su característico color rojo[226]. Es por todo esto por lo que el extracto de arándanos rojos se puede considerar un componente de gran relevancia para la fabricación de pintalabios por todas las propiedades beneficiosas que puede aportar.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 PREPARACIÓN DE LA CREMA DE PINTALABIOS

En este trabajo, se ha utilizado como material base un lápiz labial comercial (CIEN, Cosmolux Deutschland GmbH, Pulheim, Deutschland) que está compuesto, de acuerdo con el fabricante de manteca de karité, vitamina E, provitamina B5, aceite de babasú y aceite de aguacate.

Para preparar la crema de pintalabios antimicrobiano, se disolvieron 5 g de extracto de arándanos rojos NUTRIBIOLITE (Uritractin, Valladolid, España) en 100 mL de etanol 100% (VWR, Llinars del Vallès, España) y se mantuvo en agitación en un agitador magnético a 750 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 4.8 g del lápiz labial comercial CIEN y se mantuvo en agitación hasta que el lápiz labial se disolvió completamente. La disolución se dejó a 37°C hasta que el etanol se evaporó de manera completa (5-7 días).

7.2.2 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO PHİ6

Los ensayos antivirales con el bacteriófago Phi6 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.4.

7.2.3 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL SARS-CoV-2

Los ensayos antivirales con SARS-CoV-2 se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones detalladas en el punto 3.2.5.

7.2.4 ENSAYOS ANTIVIRALES CON EL BACTERIÓFAGO MS2

La bacteria *Escherichia coli* (DSM 5695) fue adquirida del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Alemania). Se cultivó en TSA y posteriormente en medio líquido TSB. La incubación en medio líquido se llevó a cabo a 37°C y 240 rpm.

La propagación del bacteriófago MS2 (DSM 13767) se llevó a cabo acorde a las especificaciones aportadas por el del Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Alemania).

Estos ensayos antivirales se llevaron a cabo mezclando un volumen de 50 µL de una dispersión del bacteriófago MS2 en TSB de una titulación de, aproximadamente, 1×10^6 UFC/mL, con 50 µL de la dilución del líquido correspondiente (crema de arándanos rojos) en un tubo Eppendorf e incubando durante el tiempo correspondiente (1 minuto, 2 h, 5 h, 15 h o 24 h) a 37°C.

En el caso de la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos, se prepararon diluciones de la crema en TSB al 3, 4, 5, 6 y 10%.

Tras la incubación a 37°C, 50 µL de la mezcla se trasvasaron a un tubo Falcon con 10 mL de TSB y se vorteo durante 1 minuto a temperatura ambiente (24 ± 1 °C). Se llevó a cabo la titulación del bacteriófago MS2 preparando diluciones seriadas de cada muestra de cada tubo Falcon y 100 µL de cada dilución de bacteriófago se mezcló con 100 µL de la bacteria aceptora a una $OD_{600nm}=0.13$. La capacidad de infección del bacteriófago MS2 se estudió mediante el método de doble capa [150]. Un volumen de 4 mL de top agar (TSB + 0.75% agar bacteriológico, Scharlab) suplementado con 5 mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se añade a la dispersión de bacteriófago mezclada con la bacteria aceptora y se vierte el contenido sobre placas de TSA para incubarlas durante 18-24 h a 37°C. El título del bacteriófago para cada muestra en UFC/mL se comparó con el título del control, el cual consiste en 100 µL de la disolución de 50 µL de bacteriófago en 10

mL de TSB añadido a 100 µL de bacteria aceptora sin haber estado en contacto con ningún tipo de filtro ni pasar por el proceso de sonicación.

En el caso de la crema pintalabios de arándanos rojos, se realizó también un control consistente en 50 µL de una dilución de crema sin extracto de arándanos rojos al 10% en TSB que se mezcló con 50 µL de dilución de bacteriófago y posteriormente con 100 µL de la bacteria aceptora.

La actividad antiviral se estimó en reducción de logaritmos del título del virus a los tiempos correspondientes de contacto. Se comprobó que la cantidad residual de desinfectantes en las muestras no interfirieron en el proceso de titulación y que el proceso de sonicación y de vorteo no afectó a la capacidad infecciosa del bacteriófago. Los ensayos antivirales se llevaron a cabo tres veces durante dos días diferentes ($n=6$) para asegurar la reproducibilidad.

7.2.5 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS

Los ensayos antibacterianos de recuento de colonias se llevaron a cabo con las bacterias MRSA COL[155], *Escherichia coli* (CECT 101) y *Mycobacterium smegmatis* (CECT 3032). Los ensayos antifúngicos de recuento de colonias se realizaron con el modelo *Candida albicans* (CECT 1394). Los microorganismos *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* y *Candida albicans* fueron obtenidos de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia.

Las bacterias se cultivaron y crecieron hasta una OD_{540nm} de 0.2 para la MRSA en TSB; 0.13 para *Escherichia coli* en TSB y 2 para *Mycobacterium smegmatis* en Difco™ Middlebrook 7H9 suplementado con 0.5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 0.4% de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Todas estas medidas de OD_{540nm} corresponden a una concentración de, aproximadamente, 1×10^8 UFC/mL. *Candida albicans* se cultivó y creció en caldo Sabouraud (Scharlab, Barcelona, España) hasta una OD_{540nm} de 2, a una concentración de, aproximadamente, 1×10^8 UFC/mL.

10 µL del microorganismo a estudiar se mezclaron con 990 µL de cada dilución de crema pintalabios con extracto de arándanos rojos (3, 4, 5, 6 y 10%), 990 µL de una dilución al 10% de lápiz labial sin extracto de arándanos rojos o 990 µL de medio de cultivo. Las diluciones se prepararon en TSB para MRSA y *Escherichia coli*, caldo Middlebrook 7H9 (0.5% Tween 80 + 0.4% Glicerol) para *Mycobacterium smegmatis* o caldo Sabouraud para *Candida albicans*. Los microorganismos se dejaron crecer en un agitador orbital a 240 rpm y 37°C. Se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻¹⁰. Se plaquearon 100 µL de cada dilución en placas de TSA para la MRSA y *Escherichia coli*, en placas de agar Middlebrook 7H10 (0.5% Tween 80 + 0.4% Glicerol) para *Mycobacterium smegmatis* y en placas de agar Sabouraud para *Candida albicans* y se extendieron los 100 µL con un asa de siembra estéril para posteriormente incubar a 37°C durante 18-24 h. Las colonias en UFC/mL de cada muestra se compararon con las del medio control de cada microorganismo y el control de lápiz labial sin extracto de arándanos rojos. La actividad antimicrobiana fue medida tras diferentes tiempos de contacto (1, 2, 5, 15 y 24 h).

7.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo de la manera que se explica en el punto 3.2.7.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1 ENSAYOS ANTIVIRALES

7.3.1.1 BACTERIÓFAGO PHİ6

El potencial farmacológico de los extractos de arándanos rojos ha sido previamente establecido[193–196], ya que es capaz, por ejemplo, de evitar la adhesión de bacterias como *Escherichia coli* al tracto urinario[227]. También tienen un importante uso en la industria cosmética, actuando como dispersante o adyuvante cuando se utiliza en forma de aceite o actuando como antimicrobiano o astringente cuando se emplea como extracto[228]. También se ha sugerido su uso como desinfectante[197,199].

Los resultados obtenidos con el bacteriófago Phi6 muestran una clara inactivación del virus tras 1 minuto de contacto. De este modo, se consiguió una inactivación total (0.00 ± 0.00 UFC/mL, ver Tabla 6) con la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos a todas las concentraciones (3, 4, 5, 6 y 10% *p/v*).

Tabla 6. Resultados de los ensayos antivirales de la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos frente al bacteriófago Phi6 tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN VIRAL (UFC/mL)	REDUCCIÓN LOG	INACTIVACIÓN VIRAL (%)
CONTROL (TSB)	$6.32 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$	-	-
CONTROL C (crema sin tratamiento)	$2.76 \times 10^6 \pm 3.96 \times 10^5$	≈ 0	≈ 0
CREMA 10%	0.00 ± 0.00	≈ 6	100
CREMA 6%	0.00 ± 0.00	≈ 6	100
CREMA 5%	0.00 ± 0.00	≈ 6	100
CREMA 4%	0.00 ± 0.00	≈ 6	100
CREMA 3%	0.00 ± 0.00	≈ 6	100

Los resultados del ensayo con una dilución de crema al 10% *p/v* sin extracto de arándanos rojos (CONTROL C) mostró una concentración de virus de $2.76 \times 10^6 \pm 3.96 \times 10^5$

UFC/mL, similar al resultado obtenido con el control sin estar en contacto con ningún tipo de crema ($6.32 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$ UFC/mL). Estos resultados sugieren una potente actividad antiviral de la crema con extracto de arándanos rojos contra virus con envoltura como el bacteriófago Phi6 (ver Figura 35), el cual, como se ha comentado, es un buen modelo bioseguro del SARS-CoV-2.

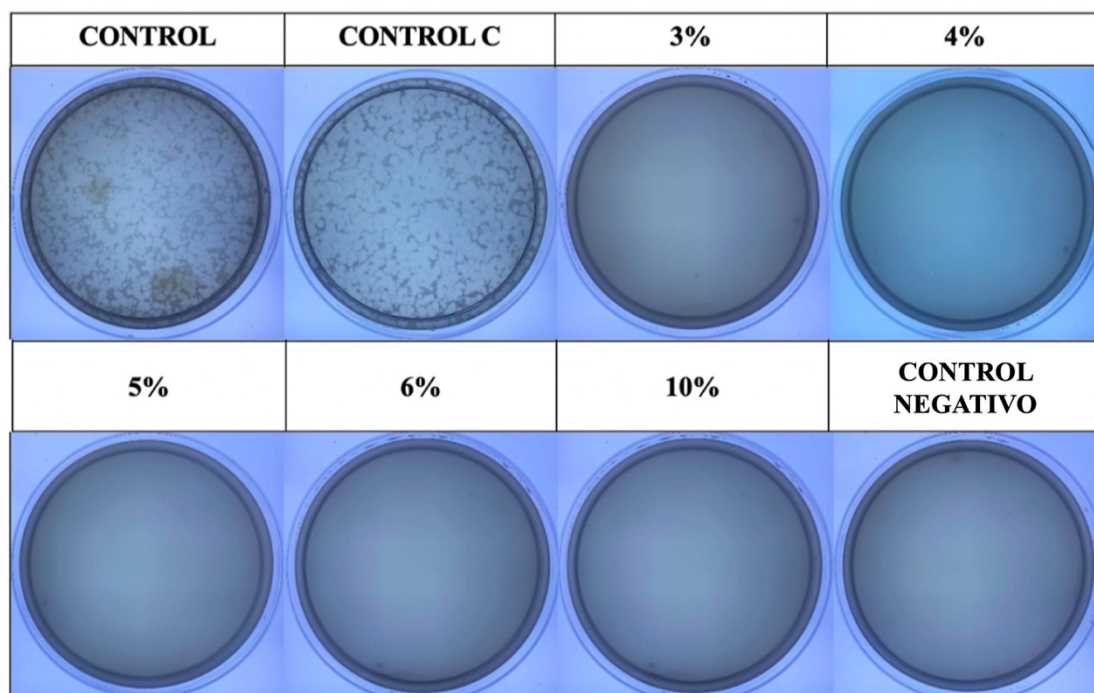


Figura 35. Viabilidad del bacteriófago Phi6 determinada por el método de doble capa tras 1 minuto de contacto. Se muestran imágenes de muestras sin diluir para TSB (CONTROL), dilución al 10% *p/v* de crema sin extracto de arándanos rojos (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% *p/v* en TSB. Se empleó TSB sin bacteriófago para controlar posibles contaminaciones (CONTROL NEGATIVO). Las imágenes muestran una clara reducción de la capacidad de infección del bacteriófago Phi6 con el tratamiento con la crema con arándanos rojos diluida tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

La actividad antiviral se puede explicar por las PACs uniéndose y destruyendo la configuración de la cápside vírica o inhibiendo la acción de enzimas clave implicadas en la replicación del virus[200]. Diferentes estudios han señalado que las PACs previenen la unión de los bacteriófagos a las bacterias huésped[201].

7.3.1.2 BACTERIÓFAGO MS2

La crema con extracto de arándanos rojos también se testó contra un modelo de virus sin envoltura como es el bacteriófago MS2. Tras 1 minuto de contacto, las diluciones de crema al 6 y 10% fueron capaces de reducir la actividad viral en un 91.32 y un 98.63%, respectivamente (ver Figura 36).

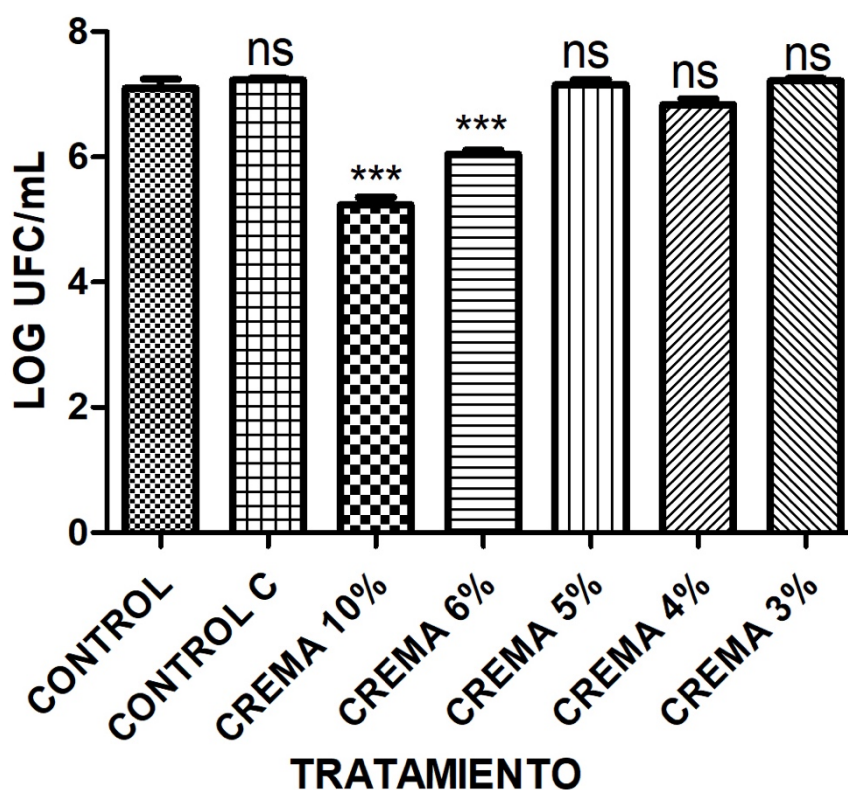


Figura 36. Reducción del título de infección del bacteriófago MS2 en logaritmos de unidades formadoras de colonias por mL (LOG(UFC/mL)) medido por el método de doble capa. Se muestran los resultados de bacteriófagos en contacto con TSB (CONTROL), crema diluida al 10% *p/v* sin extracto de arándanos rojos (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% *p/v* en TSB. Tres ensayos antivirales se realizaron por separado en dos días diferentes (n=6). Se determinaron diferencias significativas con respecto al control mediante una prueba ANOVA con una corrección Tukey para múltiples comparaciones. *** $p < 0.05$; ns: no significativo. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

Las unidades formadoras de colonias se redujeron enormemente tras exponer el bacteriófago MS2 a las diluciones de crema con extracto de arándanos rojos al 6 y 10% (ver Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de los ensayos antivirales de la crema pintalabios con extracto de arándanos rojos contra el bacteriófago MS2 tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN VIRAL (UFC/mL)	REDUCCIÓN LOG	INACTIVACIÓN VIRAL (%)
CONTROL (TSB)	$1.29 \times 10^7 \pm 4.38 \times 10^6$		
CONTROL C (crema sin tratamiento)	$1.70 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^6$	≈ 0	≈ 0
CREMA 10%	$1.77 \times 10^5 \pm 4.77 \times 10^4$	≈ 2	98.6
CREMA 6%	0.00 ± 0.00	≈ 1	91.3
CREMA 5%	0.00 ± 0.00	≈ 0	≈ 0
CREMA 4%	0.00 ± 0.00	≈ 0	≈ 0
CREMA 3%	0.00 ± 0.00	≈ 0	≈ 0

Los ensayos control mostraron unos resultados de $1.29 \times 10^7 \pm 4.38 \times 10^6$ UFC/mL y $1.70 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^6$ UFC/mL para el control con TSB y el control con crema diluida al 10% sin extracto de arándanos rojos, respectivamente (ver Figura 37).

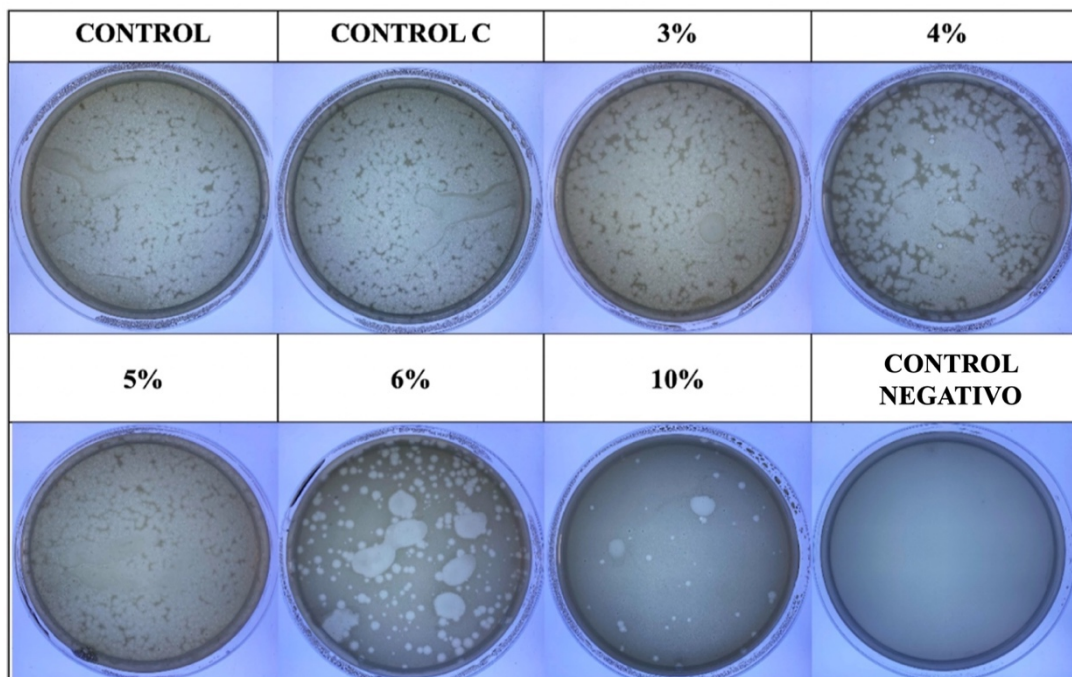


Figura 37. Viabilidad del bacteriófago MS2 determinada por el método de doble capa tras 1 minuto de contacto. Se muestran imágenes de muestras sin diluir para TSB (CONTROL), dilución al 10% *p/v* de crema sin tratamiento (CONTROL C) y diluciones de la crema con extracto de arándanos rojos al 3, 4, 5, 6 y 10% *p/v* en TSB. Se empleó TSB sin bacteriófago para controlar posibles contaminaciones (CONTROL NEGATIVO). Las imágenes muestran una clara reducción de la capacidad de infección del bacteriófago MS2 con el tratamiento con la crema con arándanos rojos diluida tras 1 minuto de contacto. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

Tras 1 minuto de contacto, las diluciones de crema con extracto de arándanos rojos al 5, 4 y 3% *p/v* no fueron capaces de inactivar el bacteriófago MS2.

7.3.2 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS

Los resultados antimicrobianos contra las bacterias MRSA, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* y el hongo *Candida albicans* obtenidos mediante el método de conteo de colonias se muestran en la Figura 38.

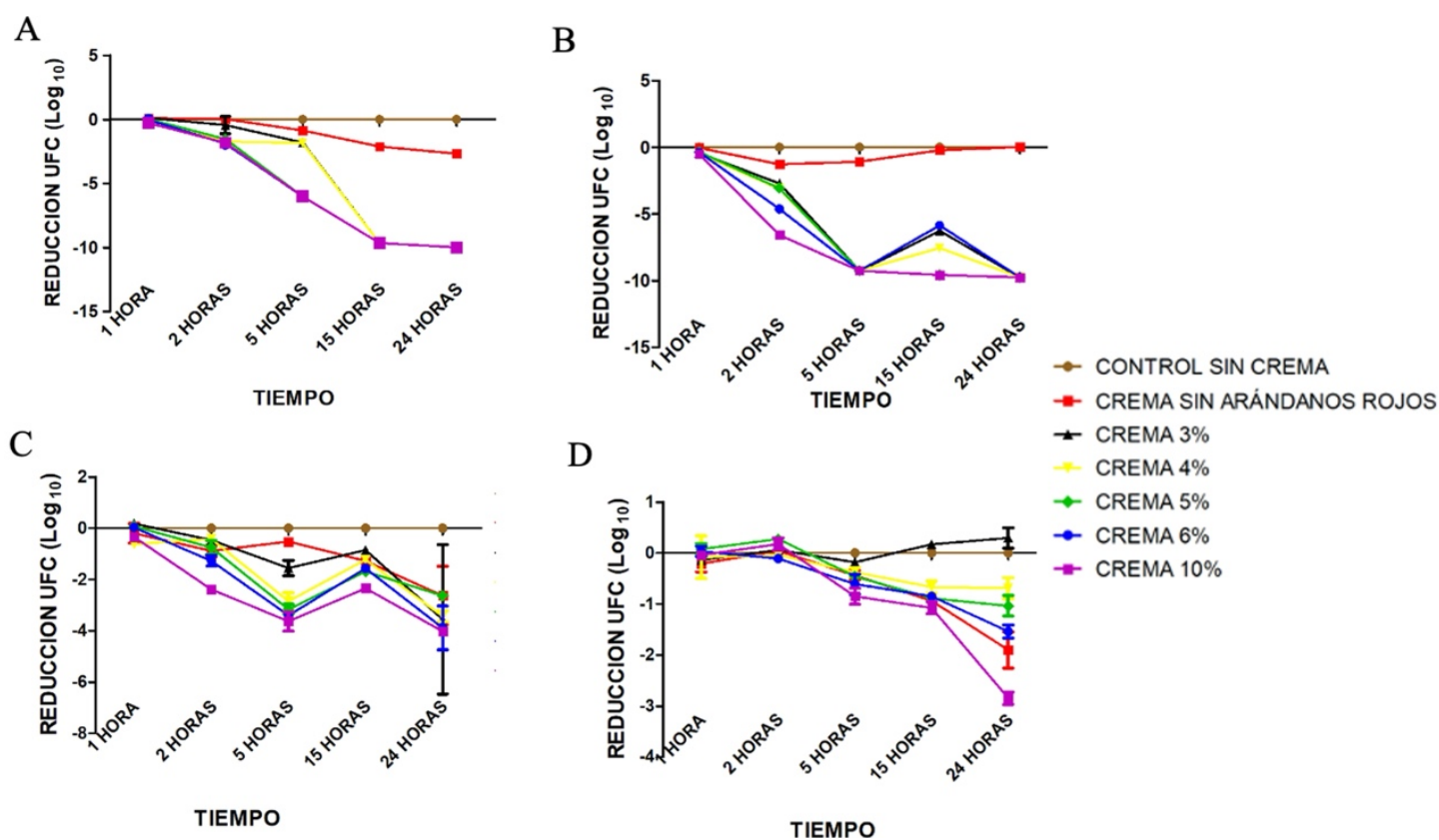


Figura 38. Resultados antibacterianos de la crema con extractos de arándanos rojos frente a MRSA (A); *Escherichia coli* (B); *Mycobacterium smegmatis* (C) y *Candida albicans* (D). Los resultados se muestran como reducción del logaritmo de las UFC/mL. Adaptado con permiso de ref. [229] Copyright 2022 American Chemical Society.

La Figura 38 revela una potente actividad antibacteriana de la crema con extracto de arándanos rojos frente a la bacteria Gram positiva MRSA y frente a la Gram negativa *Escherichia coli*. Las diluciones más altas (5, 6 y 10%) muestran una fuerte respuesta antibacteriana (reducción > 5 logaritmos, lo que equivale a un $\approx 100\%$ de inactivación bacteriana) contra la MRSA tras solo 5 h de contacto. Todas las diluciones de la crema redujeron las UFC de *Escherichia coli* más de 2 logaritmos tras 2 h de contacto, lo que implica que más del 99.79% de la bacteria se inactivaba tras 2 h de contacto.

También existe actividad antimicrobiana frente a *Mycobacterium smegmatis* y contra *Candida albicans*. *Mycobacterium smegmatis* reducía su actividad tras 5 h de contacto con las diluciones de crema al 4, 5 y 6%, llegando a lograr una reducción logarítmica > 4 logaritmos tras 24 h de contacto. Resultados estadísticamente significativos se obtuvieron

para *Candida albicans* tras 15 h de contacto, donde la dilución de crema con extracto de arándanos rojos al 10% lograba reducir en 1 logaritmo la actividad fúngica. Tras 24 h de contacto, concentraciones del 5% y superiores reflejaron una reducción significativa de la concentración del hongo.

7.4 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una crema de pintalabios antimicrobiana basada en productos naturales como el extracto de arándanos rojos. En el presente estudio, encontramos que la crema desarrollada es capaz de inactivar virus sin envoltura como el bacteriófago MS2 en un tiempo menor a 1 minuto, un tiempo mucho más rápido que cualquier estudio previo. Además, también ha demostrado ser muy efectiva contra el bacteriófago Phi6, un modelo bioseguro de virus con envoltura como pueden ser el SARS-CoV-2, el virus de la gripe o el ébola.

La actividad antibacteriana de este novedoso pintalabios se ha demostrado también contra bacterias resistentes a antibióticos como son la MRSA y otras bacterias como *Escherichia coli*, indicando la capacidad de esta crema labial para eliminar bacterias potencialmente patógenas para los humanos. Además, se ha descrito que esta crema ofrece también protección contra microorganismos como *Mycobacterium smegmatis*, un análogo de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y contra el hongo *Candida albicans*.

El artículo publicado relacionado con este capítulo se encuentra en el Anexo V.

8. CONCLUSIONES GENERALES

A continuación, se presentan las conclusiones generales derivadas de la presente tesis doctoral:

1. Se ha desarrollado un filtro de mascarilla capaz de inactivar el SARS-CoV-2 y bacterias multirresistentes como la MRSA y MRSE, una nueva herramienta para combatir la pandemia de la COVID-19 y su propagación. Este filtro antimicrobiano ha sido fabricado mediante un método reproducible y económico utilizando cloruro de benzalconio que dota al tejido de excelentes propiedades antivirales contra el SARS-CoV-2 (> 99% de inactivación del virus tras solo 1 minuto de contacto) y el bacteriófago Phi6 (100% de inactivación del virus tras 1 minuto de contacto), el cual se empleó en este estudio como un modelo bioseguro del SARS-CoV-2. Debido a la innovación del descubrimiento, la empresa valenciana Visor Medical (www.visormed.com/es) se hizo eco de la noticia y gracias a su colaboración se pudo transferir el conocimiento de nuestra investigación a la sociedad comercializando mascarillas faciales que contenían el filtro antimicrobiano desarrollado, teniendo un gran éxito entre los consumidores.
2. Se ha fabricado un filtro antiviral con una tela no tejida que contenía filamentos de polímeros recubiertos con jabón de manos comercial solidificado. Este tejido antiviral ha demostrado ser capaz de inactivar virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y el bacteriófago Phi6 en tan solo 1 minuto de contacto. Además, se ha demostrado que este filtro antimicrobiano puede ser utilizado para la fabricación de mascarillas sin que sea tóxico para queratinocitos humanos. Esta tecnología permitiría reducir la propagación de la COVID-19 a nivel global y ayudar en futuras pandemias ya que puede fabricarse a muy bajo coste, lo cual sería un aspecto muy valorable en países subdesarrollados.
3. Se han desarrollado dos tipos de tela recubiertas con dos extractos de arándanos rojos comerciales diferentes por el método de recubrimiento por inmersión. Ambos extractos no mostraron toxicidad en el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* y una alta actividad antiviral (aproximadamente un 99% de inactivación del virus) contra virus con envoltura como el SARS-CoV-2 y el bacteriófago Phi6

en tan solo 1 minuto de contacto. Los extractos de arándanos también han mostrado actividad antiviral contra otros virus con envoltura como el HSV-1, HSV-2 e IFV, y la idea de que las PACs producen fuertes alteraciones en las glicoproteínas de la membrana es cada vez más y más consistente. Asimismo, ambos tejidos mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra las bacterias resistentes a antibióticos MRSA y MRSE.

4. Se ha desarrollado una pantalla facial antimicrobiana de uso único como una nueva generación de elementos de protección facial que es capaz de inactivar virus con envoltura como el bacteriófago Phi6 o el SARS-CoV-2 tras 1 minuto de contacto, así como bacterias resistentes a antibióticos como la MRSA y la MRSE. Este material evita la inhalación de virus y bacterias y la entrada en el cuerpo a través de las vías respiratorias o por salpicaduras, aportando un extra de bioseguridad gracias a su capacidad de inactivación de microorganismos tan pronto como entran en contacto con el elemento protector. Además, este material es reciclable y reduce la generación de residuos biológicos. La tecnología utilizada para su fabricación se puede emplear para crear otros elementos de protección de materiales plásticos como gafas, cascos, separadores, etc.
5. Se ha fabricado una nueva crema de pintalabios antimicrobiana a base de extractos de arándanos rojos. Se ha demostrado su efectividad antiviral frente a virus con envoltura como el bacteriófago Phi6 como modelo del SARS-CoV-2, herpes o Epstein-Barr y frente a virus sin envoltura como el bacteriófago MS2 como modelo de la hepatitis A. Los virus se inactivan en menos de 1 minuto de contacto. También se ha demostrado que tiene gran capacidad antimicrobiana frente a las bacterias (como la MRSA, *Mycobacterium smegmatis* o *Escherichia coli*) y hongos (como *Candida albicans*).
6. Todos los resultados derivados de este trabajo indican que el bacteriófago Phi6 puede ser utilizado de manera eficiente como un modelo bioseguro del SARS-CoV-2. Durante el desarrollo del trabajo se ha comprobado que los resultados obtenidos con el bacteriófago Phi6 son muy similares a los obtenidos con el SARS-CoV-2, tanto para las mascarillas con la tecnología basada en amonios

cuaternarios, con la tecnología de bajo coste basada en jabón de manos solidificado, con la tecnología basada en extracto de arándanos rojos, así como para las pantallas faciales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.S. Morse, Factors and determinants of disease emergence, *Rev Sci Tech.* 23 (2004) 443–451. <https://doi.org/10.20506/RST.23.2.1494>.
- [2] S.S. Morse, Factors in the emergence of infectious diseases, *Emerg Infect Dis.* 1 (1995) 7–15. <https://doi.org/10.3201/EID0101.950102>.
- [3] J.D. García Palomo, J. Agüero Balbín, J.A. Parra Blanco, M.F. Santos Benito, Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación, *Medicine.* 10 (2010) 3251. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70027-5](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70027-5).
- [4] A. Casadevall, L.A. Pirofski, Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease, *Infect Immun.* 68 (2000) 6511–6518. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000/ASSET/7598D20F-75A0-4B52-9A23-B3893F314255/ASSETS/GRAPHIC/III1200422001.JPEG>.
- [5] What You Need to Know About Infectious Disease, *What You Need to Know About Infectious Disease.* (2011). <https://doi.org/10.17226/13006>.
- [6] Ending the War Metaphor: The Changing Agenda for Unraveling the Host-Microbe Relationship, *Ending the War Metaphor.* (2006). <https://doi.org/10.17226/11669>.
- [7] Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, *Vector-Borne Diseases.* (2008). <https://doi.org/10.17226/11950>.
- [8] I. of M. (US) F. on M. Threats, Infectious Disease Movement in a Borderless World, *Infectious Disease Movement in a Borderless World.* (2010). <https://doi.org/10.17226/12758>.
- [9] Global Infectious Disease Surveillance and Detection: Assessing the Challenges—Finding Solutions, *Workshop Summary, Global Infectious Disease Surveillance and Detection.* (2007). <https://doi.org/10.17226/11996>.
- [10] R.P. Clark, M.L. De Calcina-Goff, Some aspects of the airborne transmission of infection, *J R Soc Interface.* 6 (2009). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0236.FOCUS>.
- [11] L. Morawska, J.W. Tang, W. Bahnfleth, P.M. Bluyssen, A. Boerstra, G. Buonanno, J. Cao, S. Dancer, A. Floto, F. Franchimon, C. Haworth, J. Hogeling, C. Isaxon,

- J.L. Jimenez, J. Kurnitski, Y. Li, M. Loomans, G. Marks, L.C. Marr, L. Mazzearella, A.K. Melikov, S. Miller, D.K. Milton, W. Nazaroff, P. V. Nielsen, C. Noakes, J. Peccia, X. Querol, C. Sekhar, O. Seppänen, S. ichi Tanabe, R. Tellier, K.W. Tham, P. Wargocki, A. Wierzbicka, M. Yao, How can airborne transmission of COVID-19 indoors be minimised?, *Environ Int.* 142 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105832>.
- [12] I.T.S. Yu, Y. Li, T.W. Wong, W. Tam, A.T. Chan, J.H.W. Lee, D.Y.C. Leung, T. Ho, Evidence of Airborne Transmission of the Severe Acute Respiratory Syndrome Virus, *New England Journal of Medicine.* 350 (2004) 1731–1739. <https://doi.org/10.1056/nejmoa032867>.
- [13] L. Morawska, J. Cao, Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality, *Environ Int.* 139 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105730>.
- [14] C.C.-S.P. (1933-), undefined 1989, Airborne bacteria and viruses, JSTOR. (n.d.). <https://www.jstor.org/stable/43421049> (accessed March 2, 2023).
- [15] I. Eames, J.W. Tang, Y. Li, P. Wilson, Airborne transmission of disease in hospitals, *J R Soc Interface.* 6 (2009). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0407.FOCUS>.
- [16] C. Flügge, Ueber Luftinfection, *Zeitschrift Für Hygiene Und Infectionskrankheiten.* 25 (1897) 179–224. <https://doi.org/10.1007/BF02220473/METRICS>.
- [17] W.F. Wells, On Air-borne Infection. Study II. Droplets and Droplet Nuclei., *Am J Hyg.* 20 (1934) 611–18.
- [18] J.P. Duguid, The size and the duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei, *J Hyg (Lond).* 44 (1946) 471–479. <https://doi.org/10.1017/S0022172400019288>.
- [19] R.G. Loudon, R.M. Roberts, Droplet expulsion from the respiratory tract, *Am Rev Respir Dis.* 95 (1967) 435–442. <https://doi.org/10.1164/ARRD.1967.95.3.435>.
- [20] R.S. Papineni, F.S. Rosenthal, The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects, *J Aerosol Med.* 10 (1997) 105–116. <https://doi.org/10.1089/JAM.1997.10.105>.
- [21] J. Raymenants, C. Geenen, L. Budts, J. Thibaut, M. Thijssen, H. De Mulder, S. Gorissen, B. Craessaerts, L. Laenen, K. Beuselinck, S. Ombelet, E. Keyaerts, E. André, Indoor air surveillance and factors associated with respiratory pathogen

- detection in community settings in Belgium, *Nature Communications* 2023 14:1. 14 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36986-z>.
- [22] W.I. Lipkin, The changing face of pathogen discovery and surveillance, *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:2. 11 (2013) 133–141. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2949>.
- [23] A.C. Lowen, S. Mubareka, J. Steel, P. Palese, Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature, *PLoS Pathog.* 3 (2007) e151. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0030151>.
- [24] W.W.C. (William W.C. Topley, G.S. (Graham S. Wilson, L.H. (Leslie H. Collier, Albert. Balows, Max. Sussman, W.W.C. (William W.C. Topley, Topley & Wilson's microbiology and microbial infections., (1998).
- [25] P. V. Nielsen, Control of airborne infectious diseases in ventilated spaces, *J R Soc Interface.* 6 (2009). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0228.FOCUS>.
- [26] I. Eames, D. Shoaib, C.A. Klettner, V. Taban, Movement of airborne contaminants in a hospital isolation room, *J R Soc Interface.* 6 (2009). <https://doi.org/10.1098/RSIF.2009.0319.FOCUS>.
- [27] G.A. Somsen, C. van Rijn, S. Kooij, R.A. Bem, D. Bonn, Small droplet aerosols in poorly ventilated spaces and SARS-CoV-2 transmission, *Lancet Respir Med.* 8 (2020) 658–659. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30245-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30245-9).
- [28] Y. Li, H. Qian, J. Hang, X. Chen, L. Hong, P. Liang, J. Li, S. Xiao, J. Wei, L. Liu, M. Kang, Evidence for probable aerosol transmission of SARS-CoV-2 in a poorly ventilated restaurant, *MedRxiv.* (2020) 2020.04.16.20067728. <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067728>.
- [29] S.N. Rudnick, D.K. Milton, Risk of indoor airborne infection transmission estimated from carbon dioxide concentration, *Indoor Air.* 13 (2003) 237–245. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0668.2003.00189.X>.
- [30] Z. Peng, J.L. Jimenez, Exhaled CO₂ as a COVID-19 infection risk proxy for different indoor environments and activities, *Environ Sci Technol Lett.* 8 (2021) 392–397. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.1C00183/ASSET/IMAGES/MEDIUM/EZ1C00183_M040.GIF.
- [31] W. Chen, N. Zhang, J. Wei, H.L. Yen, Y. Li, Short-range airborne route dominates exposure of respiratory infection during close contact, *Build Environ.* 176 (2020) 106859. <https://doi.org/10.1016/J.BUILDENV.2020.106859>.

- [32] G.D. Wright, A.D. Sutherland, New strategies for combating multidrug-resistant bacteria, *Trends Mol Med.* 13 (2007) 260–267. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2007.04.004>.
- [33] G.H. Talbot, J. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheid, J.G. Bartlett, Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America, *Clin Infect Dis.* 42 (2006) 657–668. <https://doi.org/10.1086/499819>.
- [34] S.E. Haydel, Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Sign of the Times and an Impetus for Antimicrobial Discovery, *Pharmaceuticals* 2010, Vol. 3, Pages 2268-2290. 3 (2010) 2268–2290. <https://doi.org/10.3390/PH3072268>.
- [35] M. Sebahia, B.W. Wren, P. Mullany, N.F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N.R. Thomson, A.P. Roberts, A.M. Cerdeño-Tárraga, H. Wang, M.T.G. Holden, A. Wright, C. Churcher, M.A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, J. Parkhill, The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome, *Nat Genet.* 38 (2006) 779–786. <https://doi.org/10.1038/NG1830>.
- [36] S.B. Levy, M. Bonnie, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat Med.* 10 (2004) S122–S129. <https://doi.org/10.1038/NM1145>.
- [37] G.D. Wright, Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification, *Adv Drug Deliv Rev.* 57 (2005) 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2005.04.002>.
- [38] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* 2002 1:11. 1 (2002) 895–910. <https://doi.org/10.1038/nrd940>.
- [39] R.E. Duval, M. Grare, B. Demoré, Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria, *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3152. 24 (2019) 3152. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24173152>.
- [40] H. von Döhren, *Antibiotics: Actions, origins, resistance*, by C. Walsh. 2003. Washington, DC: ASM Press. 345 pp. \$99.95 (hardcover)., *Protein Sci.* 13 (2004) 3059. <https://doi.org/10.1110/PS.041032204>.

- [41] G.D. Wright, The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity, *Nat Rev Microbiol.* 5 (2007) 175–186. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO1614>.
- [42] A.O. Summers, Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem, *Anim Biotechnol.* 17 (2006) 125–135. <https://doi.org/10.1080/10495390600957217>.
- [43] G.G. Anderson, G.A. O’Toole, Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol.* 322 (2008) 85–105. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_5/COVER.
- [44] P.S. Stewart, J.W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet.* 358 (2001) 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- [45] D.G. Lee, J.M. Urbach, G. Wu, N.T. Liberati, R.L. Feinbaum, S. Miyata, L.T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Déziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L.G. Rahme, F.M. Ausubel, Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial, *Genome Biol.* 7 (2006). <https://doi.org/10.1186/GB-2006-7-10-R90>.
- [46] M.E.A. de Kraker, P.G. Davey, H. Grundmann, Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe, *PLoS Med.* 8 (2011) e1001104. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1001104>.
- [47] H. Flores-Villaseñor, A. Canizalez-Román, M. Reyes-Lopez, K. Nazmi, M. De La Garza, J. Zazueta-Beltrán, N. León-Sicairos, J.G.M. Bolscher, Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFc_{in}, LFc_{amp} and LFc_{chimera} on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *BioMetals.* 23 (2010) 569–578. <https://doi.org/10.1007/S10534-010-9306-4/METRICS>.
- [48] P.M. Bennett, Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, *Br J Pharmacol.* 153 (2008) S347–S357. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707607>.
- [49] P.R.-M. today, undefined 1999, Horizontal transfer of genes in bacteria, Uni-Ulm.De. (n.d.). http://www.uni-ulm.de/fileadmin/website_uni_ulm/nugi/Experimente/%C3%96kologie/Antibiotika-resistenz/HorizontalerGentransfer.pdf (accessed February 21, 2023).
- [50] A.C. Fluit, F.J. Schmitz, Resistance integrons and super-integrons, *Clin Microbiol Infect.* 10 (2004) 272–288. <https://doi.org/10.1111/J.1198-743X.2004.00858.X>.

- [51] C.S. Riesenfeld, R.M. Goodman, J. Handelsman, Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes, *Environ Microbiol.* 6 (2004) 981–989. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2004.00664.X>.
- [52] V.M. D’Costa, K.M. McGrann, D.W. Hughes, G.D. Wright, Sampling the antibiotic resistome, *Science.* 311 (2006) 374–377. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1120800>.
- [53] B. Pulendran, R. Ahmed, Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development, *Cell.* 124 (2006) 849–863. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.019>.
- [54] M.S. Gebre, L.A. Brito, L.H. Tostanoski, D.K. Edwards, A. Carfi, D.H. Barouch, Novel approaches for vaccine development, *Cell.* 184 (2021) 1589–1603. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.02.030>.
- [55] C.A. Siegrist, P.H. Lambert, How Vaccines Work, *The Vaccine Book: Second Edition.* (2016) 33–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00002-3>.
- [56] A. Iwasaki, S.B. Omer, Why and How Vaccines Work, *Cell.* 183 (2020) 290–295. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.09.040>.
- [57] M Lindsay Grayson, Suzanne M Crowe, James S McCarthy, John Mills, Johan W Mouton, S Ragnar Norrby, David L Paterson, Michael A Pfaller, Kucers’ *The Use of Antibiotics Sixth Edition: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic and Antiviral Drugs*, n.d.
- [58] G.J. Sullivan, N.N. Delgado, R. Maharjan, A.K. Cain, How antibiotics work together: molecular mechanisms behind combination therapy, *Curr Opin Microbiol.* 57 (2020) 31–40. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2020.05.012>.
- [59] S. Kausar, F. Said Khan, M. Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M. Akram, M. Riaz, G. Rasool, A. Hamid Khan, I. Saleem, S. Shamim, A. Malik, A review: Mechanism of action of antiviral drugs, *Int J Immunopathol Pharmacol.* 35 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1177/20587384211002621>.
- [60] A. Tuñón-Molina, K. Takayama, E.M. Redwan, V.N. Uversky, J. Andrés, Á. Serrano-Aroca, Protective Face Masks: Current Status and Future Trends, *ACS Appl Mater Interfaces.* 13 (2021) 56725–56751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsami.1c12227>.
- [61] J.Patrick. Byrne, *Daily life during the Black Death*, Greenwood Press, 2006.

- [62] R. CA, O. DH, The surgical mask: its development, usage, and efficiency. A review of the literature, and new experimental studies, *Arch Surg.* 80 (1960) 963–971. <https://doi.org/10.1001/ARCHSURG.1960.01290230081010>.
- [63] C. Matuschek, F. Moll, H. Fangerau, J.C. Fischer, K. Zänker, M. van Griensven, M. Schneider, D. Kindgen-Milles, W.T. Knoefel, A. Lichtenberg, B. Tamaskovics, F.J. Djiepmo-Njanang, W. Budach, S. Corradini, D. Häussinger, T. Feldt, B. Jensen, R. Pelka, K. Orth, M. Peiper, O. Grebe, K. Maas, E. Bölke, J. Hausmann, The history and value of face masks, *European Journal of Medical Research* 2020 25:1. 25 (2020) 1–6. <https://doi.org/10.1186/S40001-020-00423-4>.
- [64] D. JS, IS ADEQUATE MASKING ESSENTIAL FOR THE PATIENT'S PROTECTION?, *Ann Surg.* 105 (1937) 990–997. <https://doi.org/10.1097/00000658-193706000-00012>.
- [65] A.A. Chughtai, H. Seale, C.R. MacIntyre, Use of cloth masks in the practice of infection control – evidence and policy gaps, *Int J Infect Control.* 9 (2013) 3. <https://doi.org/10.3396/IJIC.V9I3.11366>.
- [66] H. v. Mellinger, A NEW MASK THAT PROTECTS BOTH PHYSICIAN AND PATIENT, *J Am Med Assoc.* 95 (1930) 662–663. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1930.27210090002008C>.
- [67] B. NL, The evolution of the surgical mask: filtering efficiency versus effectiveness, *Infect Control Hosp Epidemiol.* 18 (1997) 49–57. <https://doi.org/10.2307/30141964>.
- [68] S.R. Lustig, J.J.H. Biswakarma, D. Rana, S.H. Tilford, W. Hu, M. Su, M.S. Rosenblatt, Effectiveness of Common Fabrics to Block Aqueous Aerosols of Virus-like Nanoparticles, *ACS Nano.* 14 (2020) 7651–7658. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C03972/ASSET/IMAGES/LARGE/NN0C03972_0003.JPEG.
- [69] M.M. Bandi, Electrocharged facepiece respirator fabrics using common materials, *Proceedings of the Royal Society A.* 476 (2020). <https://doi.org/10.1098/RSPA.2020.0469>.
- [70] K.P. Chellamani, D. Veerasubramanian, R.S. Vignesh Balaji, Surgical Face Masks: Manufacturing Methods and Classification, *Journal of Academia and Industrial Research.* 2 (2013) 320.
- [71] E.A. Ogbuoji, A.M. Zaky, I.C. Escobar, Advanced Research and Development of Face Masks and Respirators Pre and Post the Coronavirus Disease 2019 (COVID-

- 19) Pandemic: A Critical Review, *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 1998. 13 (2021) 1998. <https://doi.org/10.3390/POLYM13121998>.
- [72] Y. Yesil, G.S. Bhat, Structure and mechanical properties of polyethylene melt blown nonwovens, *International Journal of Clothing Science and Technology*. 28 (2016) 780–793. <https://doi.org/10.1108/IJCST-09-2015-0099>.
- [73] A. Tcharkhtchi, N. Abbasnezhad, M. Zarbini Seydani, N. Zirak, S. Farzaneh, M. Shirinbayan, An overview of filtration efficiency through the masks: Mechanisms of the aerosols penetration, *Bioact Mater.* 6 (2021) 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.002>.
- [74] W. Hao, A. Parasch, S. Williams, J. Li, H. Ma, J. Burken, Y. Wang, Filtration performances of non-medical materials as candidates for manufacturing facemasks and respirators, *Int J Hyg Environ Health*. 229 (2020) 113582. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2020.113582>.
- [75] Z. Xu, Filtration Mechanism of Fine Particle, *Fundamentals of Air Cleaning Technology and Its Application in Cleanrooms*. (2014) 133. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39374-7_3.
- [76] B. Maher, R. Chavez, G.C.Q. Tomaz, T. Nguyen, Y. Hassan, A fluid mechanics explanation of the effectiveness of common materials for respiratory masks, *International Journal of Infectious Diseases*. 99 (2020) 505–513. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.07.066>.
- [77] P. Abdolghader, C. Brochot, F. Haghighat, A. Bahloul, Airborne nanoparticles filtration performance of fibrous media: A review, *Science and Technology for the Built Environment* . 24 (2018) 648–672. <https://doi.org/10.1080/23744731.2018.1452454>.
- [78] F. Drewnick, J. Pikmann, F. Fachinger, L. Moormann, F. Sprang, S. Borrmann, Aerosol filtration efficiency of household materials for homemade face masks: Influence of material properties, particle size, particle electrical charge, face velocity, and leaks, *Aerosol Science and Technology* . 55 (2020) 63–79. <https://doi.org/10.1080/02786826.2020.1817846>.
- [79] N.P.B. Tan, S.S. Paclijan, H.N.M. Ali, C.M.J.S. Hallazgo, C.J.F. Lopez, Y.C. Eborá, Solution Blow Spinning (SBS) Nanofibers for Composite Air Filter Masks, *ACS Appl Nano Mater.* 2 (2019) 2475–2483. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.9B00207>.

- [80] Z. Z, J. D, H. H, R. S, Electrospun ultrafine fibers for advanced face masks, *Mater Sci Eng R Rep.* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2020.100594>.
- [81] S.N. Rogak, T.A. Sipkens, M. Guan, H. Nikookar, D. Vargas Figueroa, J. Wang, Properties of materials considered for improvised masks, *Aerosol Science and Technology.* 55 (2021) 398–413. https://doi.org/10.1080/02786826.2020.1855321/SUPPL_FILE/UAST_A_1855321_SM7763.ZIP.
- [82] F. Seidi, C. Deng, Y. Zhong, Y. Liu, Y. Huang, C. Li, H. Xiao, Functionalized Masks: Powerful Materials against COVID-19 and Future Pandemics, *Small.* 17 (2021) 2102453. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202102453>.
- [83] G. Pullangott, U. Kannan, G. S., D.V. Kiran, S.M. Maliyekkal, A comprehensive review on antimicrobial face masks: An emerging weapon in fighting pandemics, *RSC Adv.* 11 (2021) 6544–6576. <https://doi.org/10.1039/d0ra10009a>.
- [84] S. Adanur, A. Jayswal, Filtration mechanisms and manufacturing methods of face masks: An overview, *Journal of Industrial Textiles.* (2020). <https://doi.org/10.1177/1528083720980169>.
- [85] Y. Wibisono, C.R. Fadila, S. Saiful, M.R. Bilad, Facile Approaches of Polymeric Face Masks Reuse and Reinforcements for Micro-Aerosol Droplets and Viruses Filtration: A Review, *Polymers (Basel).* 12 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.3390/POLYM12112516>.
- [86] M. Khandaker, H. Progri, D.T. Arasu, S. Nikfarjam, N. Shamim, Use of Polycaprolactone Electrospun Nanofiber Mesh in a Face Mask, *Materials (Basel).* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/MA14154272>.
- [87] N.A. Patil, P.M. Gore, N. Jaya Prakash, P. Govindaraj, R. Yadav, V. Verma, D. Shanmugarajan, S. Patil, A. Kore, B. Kandasubramanian, Needleless electrospun phytochemicals encapsulated nanofibre based 3-ply biodegradable mask for combating COVID-19 pandemic, *Chemical Engineering Journal.* 416 (2021) 129152. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.129152>.
- [88] ASTM F2100 - 21 Standard Specification for Performance of Materials Used in Medical Face Masks, (n.d.). <https://www.astm.org/Standards/F2100.htm> (accessed August 29, 2021).
- [89] UNE-EN ISO 10993-1:2010 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0045143> (accessed January 25, 2021).

- [90] N95 vs FFP3 & FFP2 masks - what's the difference?, (n.d). <https://fastlife hacks.com/n95-vs-ffp/> (accessed February 13, 2023).
- [91] Y. Pu, J. Zheng, F. Chen, Y. Long, H. Wu, Q. Li, S. Yu, X. Wang, X. Ning, Preparation of Polypropylene Micro and Nanofibers by Electrostatic-Assisted Melt Blown and Their Application, *Polymers* (Basel). 10 (2018) 959. <https://doi.org/10.3390/polym10090959>.
- [92] J.E. Coia, L. Ritchie, A. Adishes, C. Makison Booth, C. Bradley, D. Bunyan, G. Carson, C. Fry, P. Hoffman, D. Jenkins, N. Phin, B. Taylor, J.S. Nguyen-Van-Tam, M. Zuckerman, Guidance on the use of respiratory and facial protection equipment, *Journal of Hospital Infection*. 85 (2013) 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.06.020>.
- [93] C.J. Kähler, R. Hain, Fundamental protective mechanisms of face masks against droplet infections, *J Aerosol Sci*. 148 (2020) 105617. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2020.105617>.
- [94] A. Santarsiero, P. Ciambelli, G. Donsì, F. Quadrini, R. Briancesco, D. D'alexandro, G.M. Fara, Face masks. Technical, technological and functional characteristics and hygienic-sanitary aspects related to the use of filtering mask in the community, *Ann Ig*. 32 (2020) 472–520. <https://doi.org/10.7416/ai.2020.2371>.
- [95] UNE-EN 14683:2019+AC:2019 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0062987> / (accessed January 25, 2021).
- [96] UNE-EN ISO 11737-1:2018 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0061265> (accessed January 25, 2021).
- [97] UNE-EN ISO 15223-1:2017 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0058117> (accessed January 25, 2021).
- [98] UNE-EN 1041:2009+A1:2014 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0052627> (accessed January 25, 2021).
- [99] K.R. Melayil, S.K. Mitra, Wetting, Adhesion, and Droplet Impact on Face Masks, *Langmuir*. 37 (2021) 2810–2815. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c03556>.
- [100] S.-A. Lee, S.A. Grinshpun, T. Reponen, Respiratory Performance Offered by N95 Respirators and Surgical Masks: Human Subject Evaluation with NaCl Aerosol Representing Bacterial and Viral Particle Size Range, *Ann Occup Hyg*. 52 (2008) 177–185. <https://doi.org/10.1093/annhyg/men005>.

- [101] UNE 0065/2020 Standard for hygienic face masks, (2020). <https://www.deia.eus/elementosWeb/gestionCajas/MMP/File/2020//une-mascarillas.pdf> (accessed June 22, 2021).
- [102] How to make sure a protective mask is effective? - Leitat's Projects Blog, (2020). <https://projects.leitat.org/how-to-make-sure-a-protective-mask-is-effective/> (accessed June 22, 2021).
- [103] UNE 0064-1:2020 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0063626> y 2020b (accessed February 1, 2021).
- [104] UNE 0064-2:2020 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0063627> (accessed February 1, 2021).
- [105] J.C. Rubio-Romero, M. del C. Pardo-Ferreira, J.A. Torrecilla-García, S. Calero-Castro, Disposable masks: Disinfection and sterilization for reuse, and non-certified manufacturing, in the face of shortages during the COVID-19 pandemic, *Saf Sci.* 129 (2020) 104830. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2020.104830>.
- [106] S. Executive, Health and Safety Executive HSG53 (Fourth edition, published 2013). Respiratory protective equipment at work A practical guide Health and Safety Executive, 2013. www.nationalarchives.gov.uk/doc/opengovernment-licence/, (accessed February 4, 2021).
- [107] L. Bernard, G. Desoubeaux, E. Bodier-Montagutelli, J. Pardessus, D. Brea, L. Allimonier, S. Eymieux, P.I. Raynal, V. Vasseur, L. Vecellio, L. Mathé, A. Guillon, P. Lanotte, J. Pourchez, P.O. Verhoeven, S. Esnouf, M. Ferry, N. Etteradossi, Y. Blanchard, P. Brown, P. Roingeard, J.P. Alcaraz, P. Cinquin, M. Si-Tahar, N. Heuzé-Vourc'h, Controlled Heat and Humidity-Based Treatment for the Reuse of Personal Protective Equipment: A Pragmatic Proof-of-Concept to Address the Mass Shortage of Surgical Masks and N95/FFP2 Respirators and to Prevent the SARS-CoV2 Transmission, *Front Med (Lausanne)*. 7 (2020) 584036. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.584036>.
- [108] S. Lifka, I. Ponomarev, A. Weth, D. Baumgartner, B. Lamprecht, W. Baumgartner, A simple and cheap aerosol penetrometer for filter testing using an electronic cigarette., *Open Research Europe*. 1 (2021) 5. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.13087.1>.
- [109] Personal Protective Equipment EUAs | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations->

- medical-devices/personal-protective-equipment-euas (accessed February 14, 2023).
- [110] European regulation (UE) 2016/425 for personal protection equipment, (n.d.). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32016R0425> (accessed February 4, 2021).
- [111] UNE-EN 149:2001+A1:2010 STANDARD, (n.d.). <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0044643> (accessed February 4, 2021).
- [112] D. Lepelletier, B. Grandbastien, S. Romano-Bertrand, S. Aho, C. Chidiac, J.F. Géhanno, F. Chauvin, What face mask for what use in the context of the COVID-19 pandemic? The French guidelines, *Journal of Hospital Infection*. 105 (2020) 414–418. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.04.036>.
- [113] Security File Card (Fiche Pratique de Sécurité): Appareils de protection respiratoire et métiers de la santé, (n.d.). <https://www.esst-inrs.fr/3rb/ressources/ed105.pdf> (accessed February 4, 2021).
- [114] L.A. Pompeii, C.S. Kraft, E.A. Brownsword, M.A. Lane, E. Benavides, J. Rios, L.J. Radonovich, Training and Fit Testing of Health Care Personnel for Reusable Elastomeric Half-Mask Respirators Compared with Disposable N95 Respirators, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 323 (2020) 1849–1852. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4806>.
- [115] S.A. Grinshpun, H. Haruta, R.M. Eninger, T. Reponen, R.T. McKay, S.A. Lee, Performance of an N95 filtering facepiece particulate respirator and a surgical mask during human breathing: Two pathways for particle penetration, *J Occup Environ Hyg*. 6 (2009) 593–603. <https://doi.org/10.1080/15459620903120086>.
- [116] KN95 Mask, (n.d.). <https://www.terrycralle.com/kn95-mask/> (accessed June 7, 2021).
- [117] R.J. Roberge, Face shields for infection control: A review, *J Occup Environ Hyg*. 13 (2016) 239–246. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1095302>.
- [118] Faceshield Protection: Product Selection and Use - Quick Tips #373 - Grainger KnowHow, (n.d.). <https://www.grainger.com/know-how/safety/ppe-in-the-workplace/eye-face-protection/kh-face-shield-protection-373-qt> (accessed February 17, 2023).

- [119] Face Up to Proper Protection | EHS Today, (n.d). <https://www.ehstoday.com/ppe/eye-face-head/article/21909983/face-up-to-proper-protection> (accessed February 17, 2023).
- [120] Eye Safety - Eye Protection for Infection Control | NIOSH | CDC, (n.d). <https://www.cdc.gov/niosh/topics/eye/eye-infectious.html> (accessed February 17, 2023).
- [121] W.G. Lindsley, J.D. Noti, F.M. Blachere, J. v. Szalajda, D.H. Beezhold, Efficacy of Face Shields Against Cough Aerosol Droplets from a Cough Simulator, *J Occup Environ Hyg.* 11 (2014) 509. <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.877591>.
- [122] M. Karuppiah, R. Rajmohan, Green synthesis of silver nanoparticles using *Ixora coccinea* leaves extract, *Mater Lett.* 97 (2013) 141–143. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2013.01.087>.
- [123] M.F. Zayed, W.H. Eisa, A.A. Shabaka, *Malva parviflora* extract assisted green synthesis of silver nanoparticles, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 98 (2012) 423–428. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2012.08.072>.
- [124] G. Marslin, R.K. Selvakesavan, G. Franklin, B. Sarmiento, A.C.P. Dias, Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*, *Int J Nanomedicine.* 10 (2015) 5955. <https://doi.org/10.2147/IJN.S81271>.
- [125] S.S. Sonia, L.J.K.H. Linda Jeeva Kumari, R.K. Ruckmani, S.M. Sivakumar, Antimicrobial and antioxidant potentials of biosynthesized colloidal zinc oxide nanoparticles for a fortified cold cream formulation: A potent nanocosmeceutical application, *Materials Science and Engineering: C.* 79 (2017) 581–589. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.059>.
- [126] N.N. Azwanida, N. Normasarah, A. Afandi, Utilization and Evaluation of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) as a Natural Colorant for Lipstick, *J Teknol.* 69 (2014) 2180–3722. <https://doi.org/10.11113/JT.V69.3326>.
- [127] W.P.L. Tarigan, C.U. Tarigan, C. Halim, J. Valerie, V. Itanza, R. Oeintz, Antimicrobial Potential of Catfish (*Clarias batrachus*) and Snakehead Fish (*Chana striata*) Mucus on Bacterial Coliform Growth and its Application as the Organic Face Mask and Lipstick, *Natural Science: Journal of Science and Technology.* 11 (2022) 58–66-58–66. <https://doi.org/10.22487/25411969.2022.V11.I02.16171>.

- [128] Basura covid: el mundo busca solución para más de 200.000 toneladas, (n.d.). <https://www.newtral.es/basura-covid-desechos-solucion-mascarillas/20220202/> (accessed March 29, 2023).
- [129] Global analysis of health care waste in the context of COVID-19, (n.d.). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240039612> (accessed March 29, 2023).
- [130] B.M.P. Pereira, I. Tagkopoulos, Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance, *Appl Environ Microbiol.* 85 (2019). <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-19>.
- [131] EURL | Single Residue Methods | Compilation of Analytical Observations Reports, (n.d.). https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?LabID=200&CntID=878&Theme_ID=1&Pdf=False&Lang=EN (accessed June 22, 2023).
- [132] P.B. PRICE, Benzalkonium chloride (zephiran chloride) as a skin disinfectant, *Arch Surg.* 61 (1950) 23–33. <https://doi.org/10.1001/ARCHSURG.1950.01250020026004>.
- [133] U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2006. Reregistration eligibility decision for alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (ADBAC). EPA739-R-06-009., (n.d.). <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1005J4P.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2006+Thru+2010&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C06thru10%5CTxt%5C00000011%5CP1005J4P.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL> (accessed March 6, 2023).
- [134] Patricia L. Keen, Mark H. M. M. Montforts, *Antimicrobial Resistance in the Environment*, 2012.

- [135] S.M. Choi, T.H. Roh, D.S. Lim, S. Kacew, H.S. Kim, B.M. Lee, Risk assessment of benzalkonium chloride in cosmetic products, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 21 (2018) 8–23. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1408552>.
- [136] Benzalkonium chloride | European Medicines Agency, (n.d.). <https://www.ema.europa.eu/en/benzalkonium-chloride> (accessed March 6, 2023).
- [137] O. Condell, C. Iversen, S. Cooney, K.A. Power, C. Walsh, C. Burgess, S. Fanning, Efficacy of biocides used in the modern food industry to control salmonella enterica, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds, *Appl Environ Microbiol.* 78 (2012) 3087–3097. <https://doi.org/10.1128/AEM.07534-11>.
- [138] D.A. Basketter, M. Marriott, N.J. Gilmour, I.R. White, Strong irritants masquerading as skin allergens: the case of benzalkonium chloride, *Contact Dermatitis.* 50 (2004) 213–217. <https://doi.org/10.1111/J.0105-1873.2004.00331.X>.
- [139] F. Ferk, M. Mišik, C. Hoelzl, M. Uhl, M. Fuerhacker, B. Grillitsch, W. Parzefall, A. Nersesyan, K. Mičičeta, T. Grummt, V. Ehrlich, S. Knasmüller, Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations, *Mutagenesis.* 22 (2007) 363–370. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEM027>.
- [140] M. de Saint Jean, F. Brignole, A.-F. Bringuier, A. Bauchet, G. Feldmann, C. Baudouin, Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40 (1999) 619–630.
- [141] B. Marple, P. Roland, M. Benninger, Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: An overview of conflicting data and opinions, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* 130 (2004) 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2003.07.005>.
- [142] N. Akimitsu, H. Hamamoto, R.I. Inoue, M. Shoji, K. Takemori, N. Hamasaki, K. Sekimizu, Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals, *Antimicrob Agents Chemother.* 43 (1999) 3042–3043. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.3042>.
- [143] E. Bore, M. Hébraud, I. Chafsey, C. Chambon, C. Skjæret, B. Moen, T. Møretro, Ø. Langsrud, K. Rudi, S. Langsrud, Adapted tolerance to benzalkonium chloride

- in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses, *Microbiology (Reading)*. 153 (2007) 935–946. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.29288-0>.
- [144] M. Rakic-Martinez, D.A. Drevets, V. Dutta, V. Katic, S. Kathariou, *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds, *Appl Environ Microbiol.* 77 (2011) 8714–8721. <https://doi.org/10.1128/AEM.05941-11>.
- [145] M. Braoudaki, A.C. Hilton, Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents, *J Clin Microbiol.* 42 (2004) 73–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.73-78.2004>.
- [146] M. Kim, J.K. Hatt, M.R. Weigand, R. Krishnan, S.G. Pavlostathis, K.T. Konstantinidis, Genomic and Transcriptomic Insights into How Bacteria Withstand High Concentrations of Benzalkonium Chloride Biocides, *Appl Environ Microbiol.* 84 (2018). <https://doi.org/10.1128/AEM.00197-18>.
- [147] P.H. Mc Cay, A.A. Ocampo-Sosa, G.T.A. Fleming, Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture, *Microbiology (Reading)*. 156 (2010) 30–38. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.029751-0>.
- [148] S. Wessels, H. Ingmer, Modes of action of three disinfectant active substances: a review, *Regul Toxicol Pharmacol.* 67 (2013) 456–467. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2013.09.006>.
- [149] J. Zhang, B. Li, L. Wu, A. Wang, Facile preparation of durable and robust superhydrophobic textiles by dip coating in nanocomposite solution of organosilanes, *Chemical Communications.* 49 (2013) 11509–11511. <https://doi.org/10.1039/c3cc43238f>.
- [150] A.M. Kropinski, A. Mazzocco, T.E. Waddell, E. Lingohr, R.P. Johnson, Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay, *Methods Mol Biol.* 501 (2009) 69–76. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7.
- [151] S. Matsuyama, N. Nao, K. Shirato, M. Kawase, S. Saito, I. Takayama, N. Nagata, T. Sekizuka, H. Katoh, F. Kato, M. Sakata, M. Tahara, S. Kutsuna, N. Ohmagari, M. Kuroda, T. Suzuki, T. Kageyama, M. Takeda, Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 117 (2020) 7001–7003. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2002589117>.

- [152] C. Lei, J. Yang, J. Hu, X. Sun, On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity, *Virol Sin.* 36 (2021) 141–144. <https://doi.org/10.1007/S12250-020-00230-5/METRICS>.
- [153] M. Martí, B. Frígols, Á. Serrano-Aroca, Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications, *Journal of Visualized Experiments.* (2018) e57710. <https://doi.org/10.3791/57710>.
- [154] W. Shao, H. Liu, X. Liu, S. Wang, J. Wu, R. Zhang, H. Min, M. Huang, Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property, *Carbohydr Polym.* 132 (2015) 351–358. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.06.057>.
- [155] S.R. Gill, D.E. Fouts, G.L. Archer, E.F. Mongodin, R.T. DeBoy, J. Ravel, I.T. Paulsen, J.F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, R. Madupu, S. v. Angiuoli, A.S. Durkin, D.H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I.R. Hance, K.E. Nelson, C.M. Fraser, Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain, *J Bacteriol.* 187 (2005) 2426–2438. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2426-2438.2005>.
- [156] G.D. Christensen, A.L. Bisno, J.T. Parisi, B. McLaughlin, M.G. Hester, R.W. Luther, Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Ann Intern Med.* 96 (1982) 1–10. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-96-1-1>.
- [157] M. Martí, A. Tuñón-Molina, F.L. Aachmann, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 207. 13 (2021) 207. <https://doi.org/10.3390/POLYM13020207>.
- [158] Á. Serrano-Aroca, Antiviral Characterization of Advanced Materials: Use of Bacteriophage Phi 6 as Surrogate of Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2, *Int J Mol Sci.* 23 (2022). <https://doi.org/10.3390/IJMS23105335>.
- [159] A.C. Barros, L.F. Melo, A. Pereira, A Multi-Purpose Approach to the Mechanisms of Action of Two Biocides (Benzalkonium Chloride and Dibromonitropropionamide): Discussion of *Pseudomonas fluorescens*' Viability

- and Death, *Front Microbiol.* 13 (2022) 842414. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.842414>.
- [160] C.L. Schrank, K.P.C. Minbiole, W.M. Wuest, Are Quaternary Ammonium Compounds, the Workhorse Disinfectants, Effective against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2?, *ACS Infect Dis.* 6 (2020) 1553–1557. <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.0C00265>.
- [161] P.I. Hora, S.G. Pati, P.J. McNamara, W.A. Arnold, Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications, *Environ Sci Technol Lett.* 7 (2020) 622–631. <https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.0C00437>.
- [162] E. Tuladhar, M.C. de Koning, I. Fundeanu, R. Beumer, E. Duizer, Different virucidal activities of hyperbranched quaternary ammonium coatings on poliovirus and influenza virus, *Appl Environ Microbiol.* 78 (2012) 2456–2458. <https://doi.org/10.1128/AEM.07738-11>.
- [163] T. Yamanaka, H. Bannai, K. Tsujimura, M. Nemoto, T. Kondo, T. Matsumura, Comparison of the Virucidal Effects of Disinfectant Agents Against Equine Influenza A Virus, *J Equine Vet Sci.* 34 (2014) 715–718. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2013.12.010>.
- [164] C.P. Gerba, Quaternary ammonium biocides: efficacy in application, *Appl Environ Microbiol.* 81 (2015) 464–469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>.
- [165] Handwashing an effective tool to prevent COVID-19, other diseases, (n.d.). <https://www.who.int/southeastasia/news/detail/15-10-2020-handwashing-an-effective-tool-to-prevent-covid-19-other-diseases> (accessed March 13, 2023).
- [166] P.A. Contreras, I.R. Sami, M.E.R. Darnell, M.G. Ottolini, G.A. Prince, Inactivation of Respiratory Syncytial Virus by Generic Hand Dishwashing Detergents and Antibacterial Hand Soaps, *Infect Control Hosp Epidemiol.* 20 (1999) 57–58. <https://doi.org/10.1086/501550>.
- [167] B. Baban, J.Y. Liu, F.R. Tay, D.H. Pashley, Use of a new, simple, laboratory method for screening the antimicrobial and antiviral properties of hand sanitizers., *Am J Dent.* 25 (2012) 327–331. <https://europepmc.org/article/med/23409622> (accessed March 14, 2023).
- [168] Q&A for Consumers | Hand Sanitizers and COVID-19 | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/qa-consumers-hand-sanitizers-and-covid-19> (accessed March 14, 2023).

- [169] C. Meyers, R. Robison, J. Milici, S. Alam, D. Quillen, D. Goldenberg, R. Kass, Lowering the transmission and spread of human coronavirus, *J Med Virol.* 93 (2021) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JMV.26514>.
- [170] J. Jose, K. Viji, ... P.A.-A. of B., undefined 2012, Study on the antibacterial potential of commercially available liquid hand wash using four different bacteria., *Stmaryscollegethrissur.Edu.In.* (n.d.). <https://stmaryscollegethrissur.edu.in/public/link/1612453245.pdf#page=53> (accessed March 21, 2023).
- [171] N.K. Chaudhary, N. Chaudhary, M. Dahal, B. Guragain, S. Rai, R. Chaudhary, K.M. Sachin, R. Lamichhane-Khadka, A. Bhattarai, Fighting the SARS CoV-2 (COVID-19) Pandemic with Soap, (2020). <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS202005.0060.V1>.
- [172] D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, A. Alonso, F.M. Goñi, Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces, *Trends Biochem Sci.* 38 (2013) 85–93. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2012.11.005>.
- [173] Phase Behavior of Dilute Aqueous Solutions of Lipid–Surfactant Mixtures: Effects of Finite Size of Micelles | *Langmuir*, (n.d.). <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la990984%2B> (accessed March 24, 2023).
- [174] L. Guruprasad, Human SARS CoV-2 spike protein mutations, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 89 (2021) 569–576. <https://doi.org/10.1002/PROT.26042>.
- [175] M.R. Chirani, E. Kowsari, T. Teymourian, S. Ramakrishna, Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: Biodegradable soap production and sustainable packaging, *Science of The Total Environment.* 796 (2021) 149013. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149013>.
- [176] R. Jahromi, V. Mogharab, H. Jahromi, A. Avazpour, Synergistic effects of anionic surfactants on coronavirus (SARS-CoV-2) virucidal efficiency of sanitizing fluids to fight COVID-19, *Food Chem Toxicol.* 145 (2020). <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111702>.
- [177] R.R.G. Machado, T. Glaser, D.B. Araujo, L.L. Petiz, D.B.L. Oliveira, G.S. Durigon, A.L. Leal, J.R.R. Pinho, L.C.S. Ferreira, H. Ulrich, E.L. Durigon, C.R. Guzzo, Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication by Hypertonic Saline Solution in Lung and Kidney Epithelial Cells,

- ACS Pharmacol Transl Sci. (2021).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acspsci.1c00080>.
- [178] B. Frígols, M. Martí, B. Salesa, C. Hernández-Oliver, O. Aarstad, A.S.T. Ulset, G.I. Sætrom, F.L. Aachmann, Á. Serrano-Aroca, Graphene oxide in zinc alginate films: Antibacterial activity, cytotoxicity, zinc release, water sorption/diffusion, wettability and opacity, *PLoS One*. 14 (2019).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212819>.
- [179] Total RNA Purification Kits (Cat. 17200, 37500, 17250, 17270, 48300, 48400, 35300, 35350, 48500, 26800, 24300, 24350, 24370, 24380) | Norgen Biotek Corp., (n.d.). <https://norgenbiotek.com/product/total-rna-purification-kits> (accessed January 25, 2023).
- [180] A. Cano-Vicent, A. Tuñón-Molina, M. Martí, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Antiviral Face Mask Functionalized with Solidified Hand Soap: Low-Cost Infection Prevention Clothing against Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2, *ACS Omega*. (2021).
<https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C03511>.
- [181] V. Stadnytskyi, P. Anfinrud, A. Bax, Breathing, speaking, coughing or sneezing: What drives transmission of SARS-CoV-2?, *J Intern Med*. 290 (2021) 1010–1027.
<https://doi.org/10.1111/JOIM.13326>.
- [182] K. Takayama, A. Tuñón-Molina, A. Cano-Vicent, Y. Muramoto, T. Noda, J.L. Aparicio-Collado, R. Sabater I Serra, M. Martí, Á. Serrano-Aroca, Non-Woven Infection Prevention Fabrics Coated with Biobased Cranberry Extracts Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria, *Int J Mol Sci*. 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/IJMS222312719>.
- [183] R.J. Danaher, C. Wang, J. Dai, R.J. Mumper, C.S. Miller, Antiviral effects of blackberry extract against herpes simplex virus type 1, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 112 (2011) e31–e35. <https://doi.org/10.1016/J.TRIPLEO.2011.04.007>.
- [184] H.Y. Cheng, C.C. Lin, T.C. Lin, Antiviral Properties of Prodelphinidin B-2 3'-O-Gallate from Green Tea Leaf, <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/095632020201300403>. 13 (2002) 223–229. <https://doi.org/10.1177/095632020201300403>.
- [185] A. Luganini, M.E. Terlizzi, G. Catucci, G. Gilardi, M.E. Maffei, G. Gribaudo, The Cranberry Extract Oximacro® Exerts in vitro Virucidal Activity Against Influenza

- Virus by Interfering With Hemagglutinin, *Front Microbiol.* 9 (2018).
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01826>.
- [186] A.B. Howell, J.D. Reed, C.G. Krueger, R. Winterbottom, D.G. Cunningham, M. Leahy, A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity, *Phytochemistry.* 66 (2005) 2281–2291.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2005.05.022>.
- [187] H.S. Rane, S.M. Bernardo, A.B. Howell, S.A. Lee, Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms, *J Antimicrob Chemother.* 69 (2014) 428–436. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT398>.
- [188] J. Côté, S. Caillet, G. Doyon, D. Dussault, J.F. Sylvain, M. Lacroix, Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts, *Food Control.* 22 (2011) 1413–1418.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.02.024>.
- [189] L. Tamkuté, J.G. Haddad, N. Diotel, P. Desprès, P.R. Venskutonis, C. El Kalamouni, Cranberry Pomace Extract Exerts Antiviral Activity against Zika and Dengue Virus at Safe Doses for Adult Zebrafish, *Viruses.* 14 (2022) 1101.
<https://doi.org/10.3390/V14051101/S1>.
- [190] APAMA - Asoc. Prod. de Arandanos Mesopotamia Argentina, (n.d.).
<https://www.apama.com.ar/apama/7/beneficios-y-propiedades-del-arandano.html>
 (accessed May 26, 2023).
- [191] C. Severo, I. Anjos, V.G.L. Souza, J.P. Canejo, M.R. Bronze, A.L. Fernando, I. Coelho, A.F. Bettencourt, I.A.C. Ribeiro, Development of cranberry extract films for the enhancement of food packaging antimicrobial properties, *Food Packag Shelf Life.* 28 (2021) 100646.
<https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2021.100646>.
- [192] T. Stiernagle, Maintenance of *C. elegans.*, *WormBook.* (2006) 1–11.
<https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.101.1>.
- [193] A.B. Howell, Update on health benefits of cranberry and blueberry, *Acta Hort.* 810 (2009) 779–784. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2009.810.104>.
- [194] X. Su, A.B. Howell, D.H. D’Souza, Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates--a time dependence study in vitro, *Food Microbiol.* 27 (2010) 985–991.
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.05.027>.

- [195] V.P. Santhi, V. Sriramavaratharajan, R. Murugan, P. Masilamani, S.S. Gurav, V.P. Sarasu, S. Parthiban, M. Ayyanar, Edible fruit extracts and fruit juices as potential source of antiviral agents: a review, *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15 (2021) 5181–5190. <https://doi.org/10.1007/S11694-021-01090-7/FIGURES/2>.
- [196] X. Su, M.Y. Sangster, D.H. D’Souza, In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates, *Foodborne Pathog Dis*. 7 (2010) 1473–1479. <https://doi.org/10.1089/FPD.2010.0583>.
- [197] Y. Wang, S. Fang, Y. Wu, X. Cheng, L. ke Zhang, X. rui Shen, S. qu Li, J. rong Xu, W. juan Shang, Z. bing Gao, B. qing Xia, Discovery of SARS-CoV-2-E channel inhibitors as antiviral candidates, *Acta Pharmacol Sin*. 43 (2022) 781–787. <https://doi.org/10.1038/S41401-021-00732-2>.
- [198] X. Su, A.B. Howell, D.H. D’Souza, The effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on the infectivity of human enteric viral surrogates, *Food Microbiol*. 27 (2010) 535–540. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.01.001>.
- [199] M. Mirandola, M.V. Salvati, C. Rodigari, K.S. Appelberg, A. Mirazimi, M.E. Maffei, G. Gribaudo, C. Salata, Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Extract Impairs Nairovirus Infection by Inhibiting the Attachment to Target Cells, *Pathogens*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10081025>.
- [200] J.L. Cannon, E. Papafragkou, G.W. Park, J. Osborne, L.A. Jaykus, J. Vinjé, Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: aA comparison of murine norovirus and feline calicivirus, *J Food Prot*. 69 (2006) 2761–2765. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2761>.
- [201] S.M. Lipson, L. Sethi, P. Cohen, R.E. Gordon, I.P. Tan, A. Burdowski, G. Stotzky, Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice, *Phytomedicine*. 14 (2007) 23–30. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2006.11.009>.
- [202] Rational use of personal protective equipment (PPE) for coronavirus disease (COVID-19) - Interim guidance 19 March 2020 - WHO, (n.d.). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331498/WHO-2019-nCoV-IPCPPE_use-2020.2-eng.pdf (accessed October 26, 2021).
- [203] E.N. Perencevich, D.J. Diekema, M.B. Edmond, Moving Personal Protective Equipment Into the Community: Face Shields and Containment of COVID-19, *JAMA*. 323 (2020) 2252–2253. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.7477>.

- [204] B.J. Cowling, Y. Zhou, D.K.M. Ip, G.M. Leung, A.E. Aiello, Face masks to prevent transmission of influenza virus: a systematic review, *Epidemiol Infect.* 138 (2010) 449–456. <https://doi.org/10.1017/S0950268809991658>.
- [205] M. Al Mohajer, K.M. Panthagani, T. Lasco, B. Lembcke, V. Hemmige, Association between universal face shield in a quaternary care center and reduction of SARS-COV2 infections among healthcare personnel and hospitalized patients, *International Journal of Infectious Diseases.* 105 (2021) 252–255. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2021.02.060>.
- [206] W.G. Lindsley, J.D. Noti, F.M. Blachere, J. V. Szalajda, D.H. Beezhold, Efficacy of face shields against cough aerosol droplets from a cough simulator, *J Occup Environ Hyg.* 11 (2014) 509–518. <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.877591>.
- [207] A. Bin Rashid, N.N. Showva, Design and fabrication of a biodegradable face shield by using cleaner technologies for the protection of direct splash and airborne pathogens during the COVID-19 pandemic, *Clean Eng Technol.* 13 (2023) 100615. <https://doi.org/10.1016/J.CLET.2023.100615>.
- [208] Plásticos Villamarchante | Empresa de moldeo por inyección de plástico | Fabricación de piezas de plástico |, (n.d.). <http://plasticosvillamarchante.com/> (accessed January 24, 2023).
- [209] M. Llorens-Gámez, B. Salesa, Á. Serrano-Aroca, Physical and biological properties of alginate/carbon nanofibers hydrogel films, *Int J Biol Macromol.* 151 (2020) 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.213>.
- [210] A. Tuñón-Molina, M. Martí, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 9518. 22 (2021) 9518. <https://doi.org/10.3390/IJMS22179518>.
- [211] M. Martí, A. Tuñón-Molina, F. Lillelund Aachmann, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Protective face mask filter capable of inactivating SARS-CoV-2, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *BioRxiv.* (2020) 2020.11.24.396028. <https://doi.org/10.1101/2020.11.24.396028>.
- [212] S.R. Shukla, V. Palekar, N. Pingale, Zeolite catalyzed glycolysis of poly(ethylene terephthalate) bottle waste, *J Appl Polym Sci.* 110 (2008) 501–506. <https://doi.org/10.1002/APP.28656>.

- [213] O. Das, R.E. Neisiany, A.J. Capezza, M.S. Hedenqvist, M. Försth, Q. Xu, L. Jiang, D. Ji, S. Ramakrishna, The need for fully bio-based facemasks to counter coronavirus outbreaks: A perspective, *Science of The Total Environment*. 736 (2020) 139611. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139611>.
- [214] N.N. Azwanida, N. Normasarah, A. Afandi, Utilization and Evaluation of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) as a Natural Colorant for Lipstick, *J Teknol*. 69 (2014) 2180–3722. <https://doi.org/10.11113/JT.V69.3326>.
- [215] A Cosmetic Industry Overview for Cosmetic Chemists - Chemists Corner, (n.d.). <https://chemistscorner.com/a-cosmetic-market-overview-for-cosmetic-chemists/> (accessed May 9, 2023).
- [216] N. Guéguen, C. Jacob, Lipstick and tipping behavior: When red lipstick enhance waitresses tips, *Int J Hosp Manag*. 31 (2012) 1333–1335. <https://doi.org/10.1016/J.IJHM.2012.03.012>.
- [217] T.F. Cash, K. Dawson, P. Davis, M. Bowen, C. Galumbeck, Effects of cosmetics use on the physical attractiveness and body image of american college women, *Journal of Social Psychology*. 129 (1989) 349–355. <https://doi.org/10.1080/00224545.1989.9712051>.
- [218] C.L. Cox, W.H. Glick, Resume evaluations and cosmetics use: When more is not better, *Sex Roles*. 14 (1986) 51–58. <https://doi.org/10.1007/BF00287847>.
- [219] J.A. GRAHAM, A.J. JOUHAR, The effects of cosmetics on person perception, *Int J Cosmet Sci*. 3 (1981) 199–210. <https://doi.org/10.1111/J.1467-2494.1981.TB00283.X>.
- [220] R. Nash, G. Fieldman, T. Hussey, J.L. Lévêque, P. Pineau, Cosmetics: They influence more than Caucasian female facial attractiveness, *J Appl Soc Psychol*. 36 (2006) 493–504. <https://doi.org/10.1111/J.0021-9029.2006.00016.X>.
- [221] R. Mulhern, G. Fieldman, T. Hussey, J.L. Lévêque, P. Pineau, Do cosmetics enhance female Caucasian facial attractiveness?, *Int J Cosmet Sci*. 25 (2003) 199–205. <https://doi.org/10.1046/J.1467-2494.2003.00188.X>.
- [222] J.E. Workman, K.K.P. Johnson, The Role of Cosmetics in Impression Formation, *Clothing and Textiles Research Journal*. 10 (1991) 63–67. <https://doi.org/10.1177/0887302X9101000109>.
- [223] S. Dwivedi, Formulation, evaluation and antimicrobial activity of herbal lipstick., *Recent Advances in Prospects and Potential of Medicinal Plants*. (2009) 39–43.





- [224] A. Aher, S. Bairagi, P.T. Kadaskar, S.S. Desai, P.K. Nimase, FORMULATION AND EVALUATION OF HERBAL LIPSTICK FROM COLOUR PIGMENTS OF BIXA ORELLANA (BIXACEAE) SEEDS, (2012).
- [225] D. Alshaibani, R. Zhang, V.C.H. Wu, Antibacterial characteristics and activity of Vaccinium macrocarpon proanthocyanidins against diarrheogenic Escherichia coli, J Funct Foods. 39 (2017) 133–138. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.10.003>.
- [226] V.K. Rajan, C.K. Hasna, K. Muraleedharan, The natural food colorant Peonidin from cranberries as a potential radical scavenger – A DFT based mechanistic analysis, Food Chem. 262 (2018) 184–190. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.04.074>.
- [227] J.A. Greenberg, S.J. Newmann, A.B. Howell, Consumption of sweetened dried cranberries versus unsweetened raisins for inhibition of uropathogenic Escherichia coli adhesion in human urine: a pilot study, J Altern Complement Med. 11 (2005) 875–878. <https://doi.org/10.1089/ACM.2005.11.875>.
- [228] B. J. Johnson, B. Lin, J. E. Bongard, Genus Vaccinium: Medicine, Cosmetics, and Coatings, Recent Pat Biotechnol. 4 (2010) 112–124. <https://doi.org/10.2174/187220810791110732>.
- [229] A. Tuñón-Molina, A. Cano-Vicent, Á. Serrano-Aroca, Antimicrobial Lipstick: Bio-Based Composition against Viruses, Bacteria, and Fungi, ACS Appl Mater Interfaces. (2022). <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.2C19460>.

10. ANEXO I

M. Martí, A. Tuñón-Molina, F.L. Aachmann, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 207. 13 (2021) 207.

Article

Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

Miguel Martí ^{1,†} , Alberto Tuñón-Molina ^{1,†} , Finn Lillelund Aachmann ² , Yukiko Muramoto ³, Takeshi Noda ³, Kazuo Takayama ^{4,*}  and Ángel Serrano-Aroca ^{1,*} 

¹ Biomaterials and Bioengineering Lab, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, c/Guillem de Castro 94, 46001 Valencia, Spain; miguel.marti@ucv.es (M.M.); alberto.tunon@ucv.es (A.T.-M.)

² The Norwegian Biopolymer Laboratory (NOBIPOL), Department of Biotechnology and Food Science, NTNU Norwegian University of Science and Technology, Sem Sælands vei 6-8, N-7491 Trondheim, Norway; finn.l.aachmann@ntnu.no

³ Laboratory of Ultrastructural Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; muramo@infront.kyoto-u.ac.jp (Y.M.); t-noda@infront.kyoto-u.ac.jp (T.N.)

⁴ Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Kyoto 606-8397, Japan

* Correspondence: kazuotakayama@cira.kyoto-u.ac.jp (K.T.); angel.serrano@ucv.es (Á.S.-A.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Face masks have globally been accepted to be an effective protective tool to prevent bacterial and viral transmission, especially against indoor aerosol transmission. However, commercial face masks contain filters that are made of materials that are not capable of inactivating either SARS-CoV-2 or multidrug-resistant bacteria. Therefore, symptomatic and asymptomatic individuals can infect other people even if they wear them because some viable viral or bacterial loads can escape from the masks. Furthermore, viral or bacterial contact transmission can occur after touching the mask, which constitutes an increasing source of contaminated biological waste. Additionally, bacterial pathogens contribute to the SARS-CoV-2-mediated pneumonia disease complex, and their resistance to antibiotics in pneumonia treatment is increasing at an alarming rate. In this regard, herein, we report the development of a non-woven face mask filter fabricated with a biofunctional coating of benzalkonium chloride that is capable of inactivating more than 99% of SARS-CoV-2 particles in one minute of contact, and the life-threatening methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (normalized antibacterial halos of 0.52 ± 0.04 and 0.72 ± 0.04 , respectively). Nonetheless, despite the results obtained, further studies are needed to ensure the safety and correct use of this technology for the mass production and commercialization of this broad-spectrum antimicrobial face mask filter. Our novel protective non-woven face mask filter would be useful for many healthcare workers and researchers working in this urgent and challenging field.

Keywords: SARS-CoV-2; MRSA; MRSE; face mask filter; benzalkonium chloride; COVID-19; multidrug-resistant bacteria



Citation: Martí, M.; Tuñón-Molina, A.; Aachmann, F.L.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Polymers* **2021**, *13*, 207. <https://doi.org/10.3390/polym13020207>

Received: 19 December 2020

Accepted: 6 January 2021

Published: 8 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first reported in Wuhan, Hubei province, China, in December 2019 [1]. The rapid spread of this pathogen, which has caused the current COVID-19 pandemic, is putting at high risk the health and economy of the most developed and underdeveloped countries. According to the World Health Organization (WHO), the current COVID-19 outbreak has 83,979,200 global cases and 1,827,796 global deaths in more than 200 countries (data as of 2 January 2021) [2]. SARS-CoV-2 is the third coronavirus causing severe pneumonia [3,4], an infection of the lungs usually caused by bacteria and viruses [5,6]. The death risk of viral pneumonias

can increase when co-infection can be caused by viruses in the setting of community-acquired bacterial pneumonia such as the lethal *Streptococcus pneumoniae* [7–10], with additional symptoms of bacterial pneumonia [11]. New pathogens, such as SARS-CoV-2, which can coexist with a broad range of other types of clinically relevant bacteria, including multidrug-resistant strains, constitute a real-life threat to humans. In addition, antibiotic resistance in bacterial pneumonia treatment is a widespread problem that is increasing at an alarming rate [12,13]. The SARS-CoV-2 pathogen is stable from hours to days in aerosols and surfaces of different chemical natures such as copper, cardboard, plastic, aluminum or stainless steel surfaces, demonstrating that infections can be easily transmitted through the air via microdroplets or direct contact after touching contaminated surfaces [14–18]. This coronavirus can spread faster than its two ancestors SARS-CoV and MERS-CoV [19] through coughing, sneezing, touching or breathing [20], and more broadly through asymptomatic carriers [21–23]. Recent studies have demonstrated that direct indoor aerosol transmission or ventilation systems can potentially transmit SARS-CoV-2 [24–26]. Although the confinements conducted in many countries flattened the epidemic curve before the hot season [27,28], SARS-CoV-2 continues to spread globally.

SARS-CoV-2 is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus [29] that belongs to Baltimore group IV [30]. Other enveloped RNA viruses such as influenza A (H1N1) can be inactivated by quaternary ammonium compounds such as benzalkonium chloride (BAK) [31]. It has been recently remarked, however, that further evaluation of the effectiveness of BAK against coronaviruses is needed [32] because the Centers for Disease Control and Prevention have reported that available evidence indicates BAK has less reliable activity against certain bacteria and viruses than either of the alcohols [33]. However, a recent report has shown the *in vitro* virucidal activity of ethanol (70%), povidone-iodine (7.5%), chloroxylenol (0.05%), chlorhexidine (0.05%) or benzalkonium chloride (0.1%) was similar when used as disinfectants against SARS-CoV-2 [18]. Thus, the oral rinse Dequonal, which contains BAK, has shown virucidal activity against SARS-CoV-2 under conditions mimicking nasopharyngeal secretions to support the idea that oral rinsing might reduce the viral load of saliva and could thus lower the transmission of SARS-CoV-2 [34]. Furthermore, very recently, a preprint reported an oil-in-water nanoemulsion formulation containing 0.13% BAK that has demonstrated safe and broad antiviral activity against enveloped viruses such as SARS-CoV-2, human coronavirus, respiratory syncytial virus and influenza B [35]. In that study, the repeated application of this BAK-containing nanoemulsion, twice daily for 2 weeks onto rabbit nostrils indicated safety with no irritation. In fact, this chemical compound is widely used as a disinfectant against bacteria, viruses, pathogenic fungi and mycobacteria, and it has been approved by the Food and Drug Administration as a skin disinfectant [36].

Face masks have been accepted as effective protective tools by blocking the pass of viral and bacterial particles [37]. However, if the filters that contain the face masks are made of composite materials with antimicrobial activity, the protection of these tools could increase even more. Thus, several antiviral face mask materials against SARS-CoV-2 have been recently proposed. However, all of these studies, some of them not peer-reviewed yet, propose expensive materials such as graphene [38], copper [39] or silver [40]. These antiviral composites are produced with complex and costly manufacturing processes, which render them non-viable for a global solution of the current COVID-19 pandemic strongly affecting both developed and underdeveloped countries. In this regard, we hypothesize here that the physical adsorption of BAK via the dip coating method [41] onto the surface of a commercial non-woven fabric filter, which is commonly used in the production of face masks in the present pandemic, could produce a low-cost antiviral filter that could inhibit the infection capacity of SARS-CoV-2. Non-woven filters are lightweight, flexible, resilient, provide good bacteria filtration and air permeability, are cost-effective materials for masks, have a lower manufacturing cost and are hygienic and clean as they are for single use [42]. Furthermore, due to the previously reported antibacterial activity of BAK against Gram-positive bacteria [43], we also expect that the developed BAK filter

will be able to inhibit the bacterial growth of two clinically relevant multidrug-resistant bacteria: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). In addition to the current COVID-19 pandemic, antibiotic resistance is another increasing challenge of the present century. According to the World Health Organization (WHO), antibiotic resistance will be one of the leading causes of death over other important diseases such as cancer by the year 2050 [44]. In fact, MRSE is a nosocomial pathogen that is spreading globally and is often the cause of catheter-associated disease, especially among low-birth-weight premature infants [45,46]. MRSA is causing global health problems, especially in medical instruments and catheters because *S. aureus* is a human pathogen that can easily develop resistance to antibiotics [47,48]. Therefore, in this study, we attempted to develop a low-cost protective face mask filter capable of inactivating SARS-CoV-2, and MRSA and MRSE.

2. Materials and Methods

2.1. Dip Coating of Commercial Face Filter Masks

Disks specimens of approximately 10 mm in diameter were prepared with a non-woven spunlace fabric filter (commercial filters used for face masks, NV EVOLUTIA, Valencia, Spain) by dry-cutting with a cylindrical punch. Face mask filter (BAK filter) disks ($n = 6$) were produced by the dip coating method [41] using commercial 70% ethyl alcohol with 0.1% w/w benzalkonium chloride (Montplet, Barcelona, Spain) for 1 min at 25 °C to achieve a dry BAK content, determined gravimetrically, of $0.46 \pm 0.13\%$ w/w . Another face mask filter (S filter) disk ($n = 6$) was subjected to the same dip coating treatment but using only an absolute ethanol/distilled water solution (70/30% v/v) without BAK for 1 min at 25 °C. Untreated face mask filter (U filter) disks ($n = 6$) were produced as reference material. The disks were subsequently dried at 60 °C for 48 h to constant weight and sterilized by UV radiation (TELSTAR Technologies S.L, Terrassa, Spain) for one hour per each side.

2.2. Characterization of the Benzalkonium Chloride

Nuclear magnetic resonance (NMR) was applied for the characterization of the benzalkonium chloride used in the biofunctional coating of the commercial non-woven filter. Prior to NMR sample preparation, the ethanol/water solvent was evaporated from commercial Montplet 70% ethyl alcohol with benzalkonium chloride (99.9/0.1% w/w) at 25 °C. After that, the sample of benzalkonium chloride was prepared by dissolving 10 mg in 550 μL D_2O (D, 99.9%) (Sigma-Aldrich, City Norway) and transferred to a 5 mm LabScape Stream NMR tube. The NMR experiments were recorded on a BRUKER AVIIIHD 800 MHz (Bruker BioSpin AG, Fälladen, Switzerland) equipped with a 5mm cryogenic CP-TCI. All NMR recording was performed at 25 °C or 37 °C. For the characterization of benzalkonium chloride the following spectra were recorded: 1D proton, 2D double quantum filtered correlation spectroscopy (DQF-COSY) and 2D ^{13}C heteronuclear single quantum coherence (HSQC) with multiplicity editing. TMS was used as a chemical shift reference for proton and carbon chemical shifts. The spectra were recorded, processed and analyzed using TopSpin 3.7 software (Bruker BioSpin AG, Fällanden, Switzerland).

2.3. Electron Microscopy

A Zeiss Ultra 55 field emission scanning electron microscope (FESEM, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) was operated at an accelerating voltage of 3 kV to observe the porous morphology of the treated and untreated non-woven face mask filters at a magnification of $\times 100$ and $\times 1000$. The filter samples were prepared to be conductive by platinum coating with a sputter coating unit.

2.4. Phage Phi 6 Host Culture

Pseudomonas syringae (DSM 21482) from the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Germany) was cultured

in solid tryptic soy agar (TSA, Liofilchem) and subsequently in liquid tryptic soy broth (TSB, Liofilchem). Liquid incubation was carried out at 25 °C and 120 rpm.

2.5. Phage Phi 6 Propagation

Phage phi 6 (DSM 21518) propagation was carried out according to the specifications provided by the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Germany).

2.6. Antiviral Test Using the Biosafe Viral Model

A volume of 50 µL of a phage suspension in TSB was added to each filter at a titer of about 1×10^6 plaque-forming units per mL (PFU/mL) and allowed to incubate for 1, 10 and 30 min. Each filter was placed in a falcon tube with 10 mL TSB and sonicated for 5 min at 24 °C. After that, each tube was vortexed for 1 min. Serial dilutions of each falcon sample were made for phage titration, and 100 µL of each phage dilution was contacted with 100 µL of the host strain at $OD_{600nm} = 0.5$. The infective capacity of the phage was measured based on the double-layer method [49], where 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlau) and 5 mM $CaCl_2$ were added to the phage–bacteria mixture which was poured on TSA plates. The plates were incubated for 24–48 h in an oven at 25 °C. The phage titer of each type of sample was calculated in PFU/mL and compared with the control, that is, 50 µL of phage added to the bacteria without being in contact with any filter and without being sonicated. The antiviral activity in log reductions of titers was estimated at 1, 10 and 30 min of contact with the virus model. It was checked that the residual amounts of disinfectants in the titrated samples did not interfere with the titration process and the sonication–vortex treatment did not affect the infectious capacity of the phage. The antiviral tests were performed three times during two different days ($n = 6$) to ensure reproducibility.

2.7. Antiviral Tests Using SARS-CoV-2

The SARS-CoV-2 strain used in this study (SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027) was kindly gifted to us by Dr. Tomohiko Takasaki and Dr. Jun-Ichi Sakuragi at the Kanagawa Prefectural Institute of Public Health. The virus was plaque-purified and propagated in Vero cells. SARS-CoV-2 was stored at -80 °C.

A volume of 50 µL of a virus suspension in phosphate-buffered saline (PBS) was added to each filter at a titer dose of 1.3×10^5 TCID₅₀/filter, and then incubated for 1 min at room temperature. Then, 1 mL PBS was added to each filter, and then vortexed for 5 min. After that, each tube was vortexed for 5 min at room temperature.

Viral titers were determined through median tissue culture infectious dose (TCID₅₀) assays inside a Biosafety Level 3 laboratory at Kyoto University. Briefly, TMRSS2/Vero cells [50] (JCRB1818, JCRB Cell Bank), cultured with the minimum essential media (MEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/ streptomycin, were seeded into 96-well plates (Thermo Fisher Scientific). Samples were serially diluted 10-fold from 10^{-1} to 10^{-8} in the culture medium. Dilutions were placed onto the TMRSS2/Vero cells in triplicate and incubated at 37 °C for 96 h. Cytopathic effect was evaluated under a microscope. TCID₅₀/mL was calculated using the Reed–Muench method.

2.8. Antibacterial Tests

The agar disk diffusion tests were performed to analyze the antibacterial activity of the treated and untreated filters [51,52]. Lawns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, COL [53], and the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, RP62A [54], in a concentration of about 1.5×10^8 CFU/mL in tryptic soy broth, were cultivated on trypticase soy agar plates. The sterilized disks were placed upon the lawns of bacteria to be incubated aerobically at 37 °C for 24 h. The antibacterial activity of the tested filter disks was expressed according to Equation (1) [51]:

$$nw_{halo} = \frac{d_{iz} - d}{2d} \quad (1)$$

where nw_{halo} indicates the normalized width of the antimicrobial inhibition zone, d_{iz} is the inhibition zone diameter and d refers to the sample disk diameter. These diameters were measured by image software analysis (Image J, Wayne Rasband (NIH), Bethesda, MD, USA). The tests were performed six times on different days to ensure reproducibility.

2.9. Statistical Analysis

The statistical analyses were performed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p > 0.05$, *** $p > 0.001$) on GraphPad Prism 6 software (gGraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Nuclear Magnetic Resonance of Benzalkonium Chloride

The benzalkonium chloride used in this study for the treatment of the non-woven filter analyzed by NMR is shown in Figure 1.

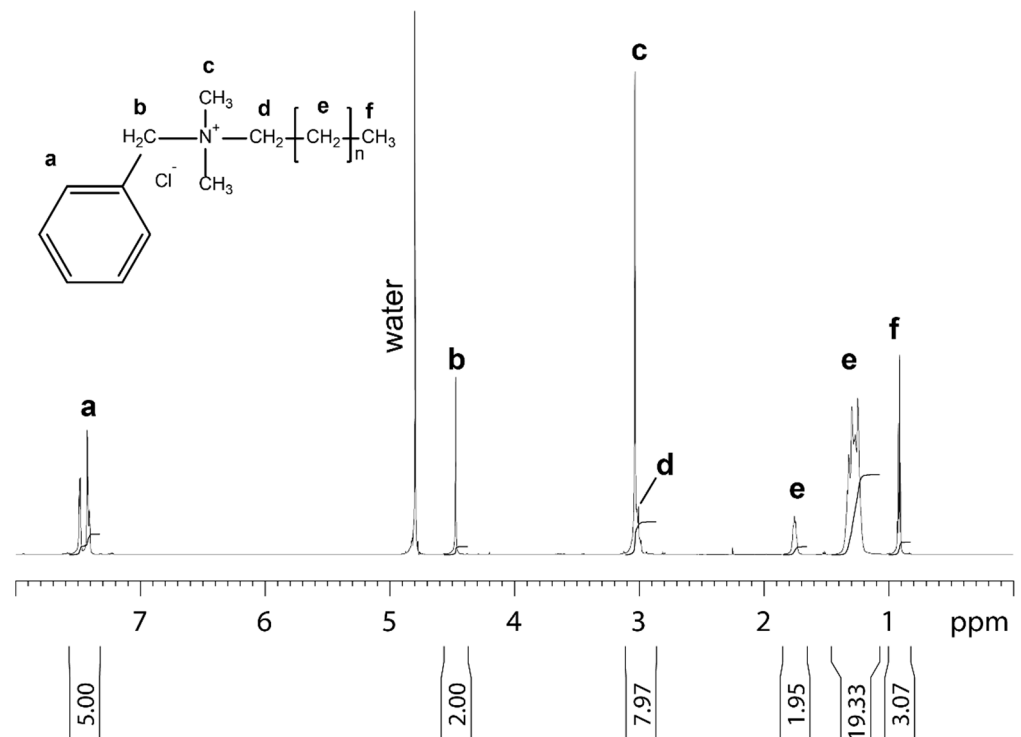


Figure 1. 1D proton NMR spectrum of benzalkonium chloride dissolved in 99.9% D₂O recorded at 25 °C. Molecular structure, assignment and integral for benzalkonium chloride are shown. The letters at the molecular structure and the spectrum indicate the proton in the different chemical subgroups of benzalkonium chloride.

3.2. Porous Morphology of the Non-Woven Face Mask Filters

The porous morphology images of the commercial and treated non-woven face mask filter are shown in Figure 2.

FESEM observation showed no signs of porous morphological change after performing the dip coating with both ethanol-based solvent or the BAK compound. These results suggest no change of breathability or bacterial filtration efficiency required for their commercialization according to the European standard for community face coverings (CWA 17553:2020).

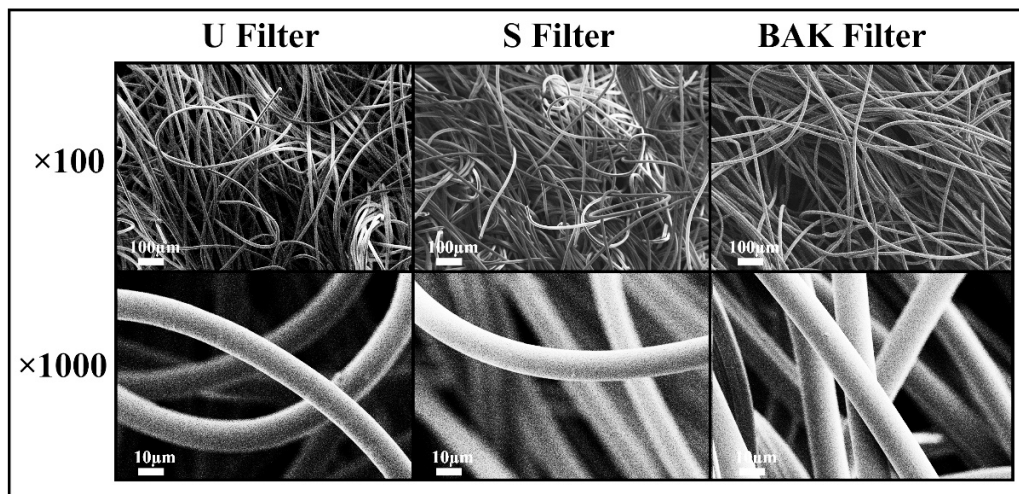


Figure 2. Morphology of the non-woven face mask filters by field emission scanning electron microscopy. Untreated filter (U filter), filter treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S filter) and filter with 0.46 ± 0.13% *w/w* of biofunctional benzalkonium chloride (BAK) coating (BAK filter) at two magnifications (×100 and ×1000).

3.3. Antiviral Tests with Phage Phi 6 and SARS-CoV-2

Phage phi 6 is a three-part, segmented, double-stranded RNA virus totaling ~13.5 kb in length. Even though this type of lytic bacteriophage belongs to group III of the Baltimore classification [30], it was proposed here as a viral model of SARS-CoV-2, due to biosafety reasons, as it also has a lipid membrane around its nucleocapsid. Thus, the BAK Filter showed potent antiviral activity (100% of viral inhibition, see Figures 3 and 4). Bacterial lawns had clearly grown in the plate and no plaques were observed after 1, 10 or 30 min of contact between the BAK filter and the SARS-CoV-2 viral model. Furthermore, the U filter and S filter showed similar results to control of no antiviral activity (see Figures 3 and 4).

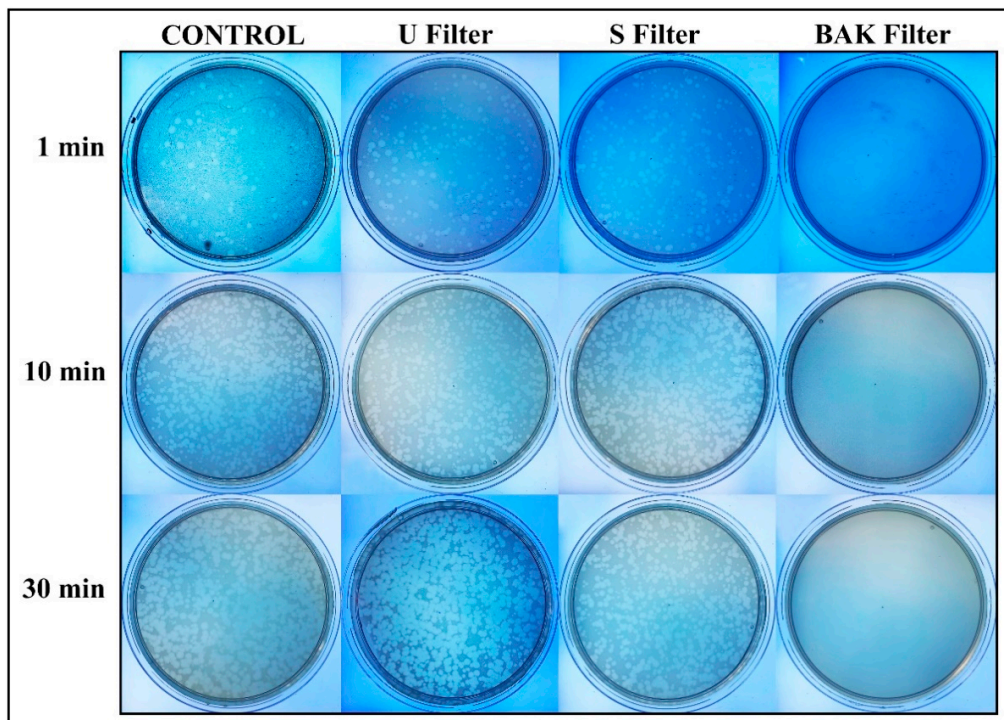


Figure 3. Loss of phage phi 6 viability measured by the double-layer method. Phage 6 titration images of undiluted samples for control, untreated filter (U filter), filter treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S filter) and filter with the biofunctional BAK coating (BAK filter) at 1, 10 and 30 min of viral contact.

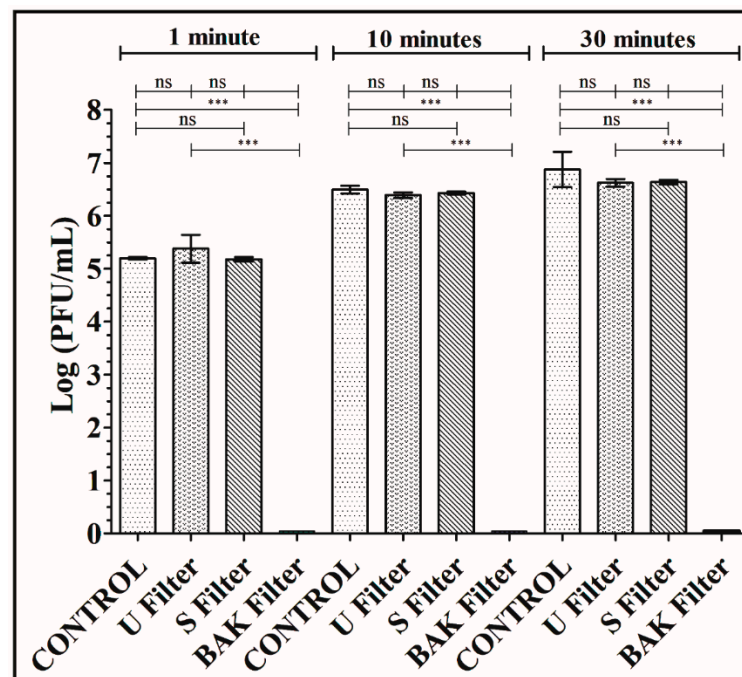


Figure 4. Titration after double-layer method with the phage phi 6 viral model. Logarithm of plaque-forming units per mL ($\log(\text{PFU}/\text{mL})$) of the control, untreated filter (U filter), filter treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S filter) and filter with the biofunctional BAK coating (BAK filter) at 1, 10 and 30 min of viral contact.

The phage titers of each type of face mask filter sample were calculated and compared with the control (see Figure 4).

Figure 4 shows that the titers obtained by contacting the phages with the U or S filter are similar to the control. However, the BAK filter displayed a strong phage inactivation.

The results achieved with the TCID₅₀/mL method about the reduction of infectious titers of SARS-CoV-2 after 1 min of contact with the control, the U filter, the S filter and the BAK filter containing the biofunctional coating are shown in Figure 5.

These results clearly demonstrate that the BAK filter is very effective against SARS-CoV-2 even after 1 min of contact. This is also in good agreement with the antiviral results of the biosafe viral model used in this study (see Figures 3 and 4). The reduction of infection titers in PFU/mL determined by the double-layer assay for the phage phi 6 and by the TCID₅₀/mL method for SARS-CoV-2 is shown in Table 1.

Table 1. Reduction of infection titers determined by the double layer assay for the phage phi 6 and via the TCID₅₀/mL method for SARS-CoV-2. Control, untreated filter (U filter), filter treated with the ethanol solvent (S filter), filter with the biofunctional BAK coating (BAK filter).

Sample	Phi 6 at 1 min (PFU/mL)	Phi 6 at 10 min (PFU/mL)	Phi 6 at 30 min (PFU/mL)	SARS-CoV-2 at 1 min (PFU/mL)
Control	$1.6 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$	$3.2 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^5$	$1.4 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$	$3.5 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^6$
U Filter	$3.5 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$	$4.3 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$	$3.9 \times 10^6 \pm 1.5 \times 10^6$
S Filter	$1.5 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^4$	$2.7 \times 10^6 \pm 2.8 \times 10^5$	$4.4 \times 10^6 \pm 7.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^6 \pm 6.2 \times 10^5$
BAK Filter	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	$8.9 \times 10^3 \pm 7.8 \times 10^3$

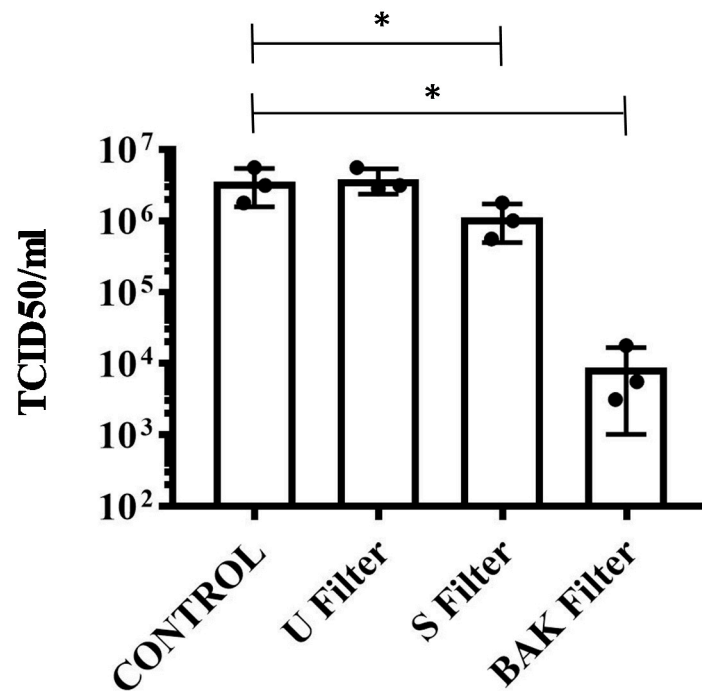


Figure 5. Reduction of infectious titers of SARS-CoV-2 after 1 min of contact. Untreated filter (U filter), filter treated with the ethanol solvent (S filter), filter with the biofunctional BAK coating (BAK filter) and control via the TCID50/mL method. A dot plot is data set based on the value of each point.

3.4. Antibacterial Tests

The antibacterial results of the treated and untreated filters against MRSA and MRSE multidrug-resistant bacteria are shown in Figure 6.

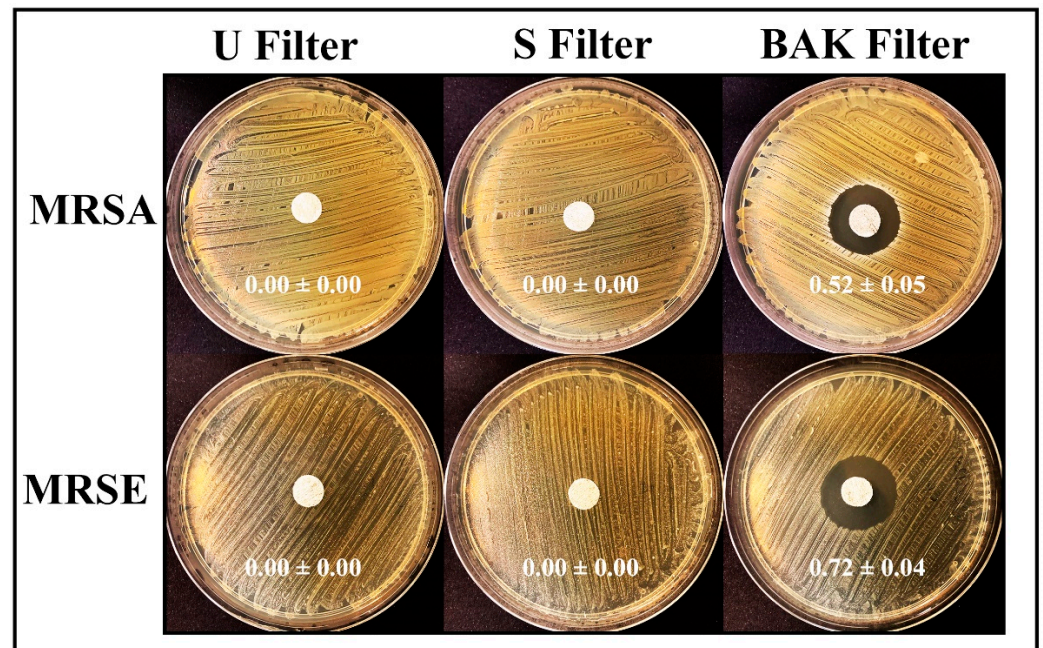


Figure 6. Antibacterial agar disk diffusion tests. Untreated filter (U filter), filter treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S filter) and filter with the biofunctional BAK coating (BAK filter) after 24 h of culture at 37 °C. The normalized widths of the antibacterial halos, expressed as mean \pm standard deviation and calculated with Equation (1), are shown in each image.

The filter treated by dip coating with 70% ethyl alcohol containing 0.1% benzalkonium chloride showed high antibacterial activity against MRSA and MRSE, being even more effective against the last strain. The antimicrobial mode of action of quaternary ammonium compounds (QACs) such as BAK against both bacterial and viral phospholipid membranes is attributed to the positively charged nitrogen atoms. This causes eradication of bacteria and common viruses such as influenza by disrupting their phospholipid bilayer membrane [32], the glycoproteinaceous envelope and the associated spike glycoproteins interacting with the ACE2 receptor in the infection of host cells [55]. For this reason, BAK is extensively found in many household disinfecting wipes and sprays and is also used as an additive in various soaps and non-alcohol-based hand sanitizers [31,56,57].

Here in this paper, a new face mask filter with antiviral and antibacterial properties against Gram-positive multidrug-resistant bacteria to reduce COVID-19 infections (from touching the filter masks and aerosol transmission in both senses) is demonstrated. This face mask filter has been developed here by dip coating (a simple, low-cost, reliable and reproducible method) a commercial non-woven filter where a thin coating of BAK was deposited onto the surface by physical adsorption [58]. The same biofunctional coating procedure could be applied to any type of face mask or biodegradable filters. This also represents a solution to the need for bio-based facemasks to counter coronavirus outbreaks [42]. The manufacturing procedure by dip coating with BAK opens up a broad range of applications that urgently demand new antimicrobial approaches. Thus, this technology may also be used for the fabrication of antimicrobial clothes, gloves, etc., for health personnel or to produce antimicrobial filters able to inactivate aerosols containing SARS-CoV-2 or Gram-positive multidrug-resistant bacteria in other applications. The antibacterial activity of this type of filter against MRSA and MRSE, and their viral inhibition capacity against SARS-CoV-2 as well as the enveloped phage phi 6 viral model demonstrates their broad antipathogenic protection.

4. Conclusions

This is the first report of the development of a face mask filter capable of inactivating SARS-CoV-2 and multidrug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, a new promising tool to combat the increasing COVID-19 spread. This antimicrobial non-woven face mask filter was produced by a reproducible and economic procedure using benzalkonium chloride that provides excellent antiviral properties against SARS-CoV-2 (>99% of viral inhibition after 1 min of contact) and the phage phi 6 (100% of viral inhibition after 1 min of contact), which was used here as a biosafe viral model of SARS-CoV-2. Therefore, the developed antiviral filter can be used in face masks and other protective tools, and thus is very promising to prevent the spread of SARS-CoV-2. Nonetheless, further research is required in order to ensure the safe use of the developed filters in the present COVID-19 pandemic.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, validation and formal analysis: M.M., K.T. and Á.S.-A.; software: F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; investigation: M.M., A.T.-M., Y.M., T.N., F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; resources: M.M., F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; data curation, A.T.-M., F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; visualization: F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; writing—original draft preparation: Á.S.-A.; writing—review and editing: M.M., A.T.-M., F.L.A., K.T. and Á.S.-A.; supervision, M.M., K.T. and Á.S.-A.; project administration, K.T. and Á.S.-A.; funding acquisition, K.T. and Á.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, grant 2020-231-001UCV (awarded to Á.S.-A.), the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) (20fk0108270h0001, 20fk0108263s0201) and the Research Council of Norway through grant the Norwegian NMR platform (226244).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir and the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) for their financial support. We would like to thank Yoshio Koyanagi and Kazuya Shimura (Kyoto University) for setup and operation of the BSL-3 laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19. Available online: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed on 11 March 2020).
2. WHO. Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (accessed on 2 January 2021).
3. Corman, V.M.; Muth, D.; Niemeyer, D.; Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **2018**, *100*, 163–188. [PubMed]
4. Yang, X.; Yu, Y.; Xu, J.; Shu, H.; Xia, J.; Liu, H.; Wu, Y.; Zhang, L.; Yu, Z.; Fang, M.; et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 475–481. [CrossRef]
5. Shah, S.N.; Bachur, R.G.; Simel, D.L.; Neuman, M.I. Childhood pneumonia. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2017**, *318*, 490. [CrossRef]
6. Brenner, D.R.; McLaughlin, J.R.; Hung, R.J. Previous lung diseases and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17479. [CrossRef] [PubMed]
7. Su, I.C.; Lee, K.L.; Liu, H.Y.; Chuang, H.C.; Chen, L.Y.; Lee, Y.J. Severe community-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* coinfection in an influenza A(H1N1)pdm09 patient. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 365–366. [CrossRef] [PubMed]
8. Chou, C.C.; Shen, C.F.; Chen, S.J.; Chen, H.M.; Wang, Y.C.; Chang, W.S.; Chang, Y.T.; Chen, W.Y.; Huang, C.Y.; Kuo, C.C.; et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 172–199. [CrossRef]
9. Lee, J.Y.; Yang, P.C.; Chang, C.; Lin, I.T.; Ko, W.C.; Cia, C.T. Community-acquired adenoviral and pneumococcal pneumonia complicated by pulmonary aspergillosis in an immunocompetent adult. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 838–839. [CrossRef]
10. Albrich, W.C.; Rassouli, F.; Waldeck, F.; Berger, C.; Baty, F. Influence of Older Age and Other Risk Factors on Pneumonia Hospitalization in Switzerland in the Pneumococcal Vaccine Era. *Front. Med.* **2019**, *6*, 286. [CrossRef]
11. Rothberg, M.B.; Haessler, S.D.; Brown, R.B. Complications of Viral Influenza. *Am. J. Med.* **2008**, *121*, 258–264. [CrossRef]
12. Feikin, D.R.; Schuchat, A.; Kolczak, M.; Barrett, N.L.; Harrison, L.H.; Lefkowitz, L.; McGeer, A.; Farley, M.M.; Vugia, D.J.; Lexau, C.; et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995–1997. *Am. J. Public Health* **2000**, *90*, 223–229.
13. Huttner, B.; Cappello, B.; Cooke, G.; Gandra, S.; Harbarth, S.; Imi, M.; Loeb, M.; Mendelson, M.; Moja, L.; Pulcini, C.; et al. 2019 community-acquired pneumonia treatment guidelines: There is a need for a change toward more parsimonious antibiotic use. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*, 1315–1316. [CrossRef] [PubMed]
14. Bourouiba, L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA* **2020**, *323*, 1837–1838.
15. Orenes-Piñero, E.; Baño, F.; Navas-Carrillo, D.; Moreno-Docón, A.; Marín, J.M.; Misiego, R.; Ramírez, P. Evidences of SARS-CoV-2 virus air transmission indoors using several untouched surfaces: A pilot study. *Sci. Total Environ.* **2021**, *751*, 142317. [CrossRef] [PubMed]
16. van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D.H.; Holbrook, M.G.; Gamble, A.; Williamson, B.N.; Tamin, A.; Harcourt, J.L.; Thornburg, N.J.; Gerber, S.I.; et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1564–1567. [CrossRef] [PubMed]
17. Ong, S.W.X.; Tan, Y.K.; Chia, P.Y.; Lee, T.H.; Ng, O.T.; Wong, M.S.Y.; Marimuthu, K. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1610–1612. [CrossRef]
18. Chin, A.W.H.; Chu, J.T.S.; Perera, M.R.A.; Hui, K.P.Y.; Yen, H.-L.; Chan, M.C.W.; Peiris, M.; Poon, L.L.M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e10. [CrossRef]
19. Vellingiri, B.; Jayaramayya, K.; Iyer, M.; Narayanasamy, A.; Govindasamy, V.; Giridharan, B.; Ganesan, S.; Venugopal, A.; Venkatesan, D.; Ganesan, H.; et al. COVID-19: A promising cure for the global panic. *Sci. Total Environ.* **2020**, *725*, 138277. [CrossRef]
20. American Lung Association. American Lung Association Learn About Pneumonia. Available online: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/pneumonia/learn-about-pneumonia> (accessed on 2 January 2021).
21. Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* **2020**, *87*, 281–286. [CrossRef]

22. Bai, Y.; Yao, L.; Wei, T.; Tian, F.; Jin, D.Y.; Chen, L.; Wang, M. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1406–1407. [CrossRef]
23. Wang, L.; Didelot, X.; Yang, J.; Wong, G.; Shi, Y.; Liu, W.; Gao, G.F.; Bi, Y. Inference of person-to-person transmission of COVID-19 reveals hidden super-spreading events during the early outbreak phase. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–6.
24. Liu, Y.; Ning, Z.; Chen, Y.; Guo, M.; Liu, Y.; Gali, N.K.; Sun, L.; Duan, Y.; Cai, J.; Westerdahl, D.; et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* **2020**, *582*, 557–560. [CrossRef] [PubMed]
25. Richard, M.; Kok, A.; de Meulder, D.; Bestebroer, T.M.; Lamers, M.M.; Okba, N.M.A.; Fentener van Vlissingen, M.; Rockx, B.; Haagmans, B.L.; Koopmans, M.P.G.; et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3496. [CrossRef] [PubMed]
26. Morawska, L.; Cao, J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ. Int.* **2020**, *139*, 105730. [CrossRef] [PubMed]
27. Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. The effect of climate on the spread of the COVID-19 pandemic: A review of findings, and statistical and modelling techniques. *Prog. Phys. Geogr. Earth Environ.* **2020**, *44*, 591–604. [CrossRef]
28. Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. A spatio-temporal analysis for exploring the effect of temperature on COVID-19 early evolution in Spain. *Sci. Total Environ.* **2020**, *728*, 138811. [CrossRef]
29. Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 434–435. [CrossRef]
30. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241. [CrossRef]
31. Tuladhar, E.; de Koning, M.C.; Fundeanu, I.; Beumer, R.; Duizer, E. Different virucidal activities of hyperbranched quaternary ammonium coatings on poliovirus and influenza virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2456–2458. [CrossRef]
32. Schrank, C.L.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Are Quaternary Ammonium Compounds, the Workhorse Disinfectants, Effective against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2? *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1553–1557. [CrossRef]
33. Kratzel, A.; Kratzel, A.; Todt, D.; V'kovski, P.; V'kovski, P.; Steiner, S.; Steiner, S.; Gultom, M.; Gultom, M.; Thao, T.T.N.; et al. Inactivation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 by WHO-Recommended Hand Rub Formulations and Alcohols. Available online: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/7/20-0915_article.htm (accessed on 20 November 2020).
34. Meister, T.L.; Brüggemann, Y.; Todt, D.; Conzelmann, C.; Müller, J.A.; Groß, R.; Münch, J.; Krawczyk, A.; Steinmann, J.; Steinmann, J.; et al. Virucidal Efficacy of Different Oral Rinses Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *J. Infect. Dis.* **2020**, *222*, 1289–1292. [CrossRef]
35. Pannu, J.; Ciotti, S.; Ganesan, S.; Arida, G.; Costley, C.; Affiliations, A. Nanodroplet-Benzalkonium Chloride Formulation Demonstrates In Vitro and Ex-Vivo Broad-Spectrum Antiviral Activity Against SARS-CoV-2 and other Enveloped Viruses Broad-Spectrum Antiviral Activity of Nanodroplet-BZK Key Words Antiviral, Nanoemulsion, Nanodr. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
36. El-Ghazzawy, A.G.; Gupta, N.; Swope, T.J.; Kulkarni, A.D.; Panneton, W.M.; Robinson, S.M.; Niehoff, M.L.; Kaminski, D.L.; Andrus, C.H. Evaluation of benzalkonium chloride chemoneurolytic proximal gastric vagotomy. *Surg. Endosc.* **1998**, *12*, 207–211. [CrossRef] [PubMed]
37. Leung, N.H.L.; Chu, D.K.W.; Shiu, E.Y.C.; Chan, K.H.; McDevitt, J.J.; Hau, B.J.P.; Yen, H.L.; Li, Y.; Ip, D.K.M.; Peiris, J.S.M.; et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 676–680. [CrossRef] [PubMed]
38. De Maio, F.; Palmieri, V.; Babini, G.; Augello, A.; Palucci, I.; Perini, G.; Salustri, A.; De Spirito, M.; Sanguinetti, M.; Delogu, G.; et al. Graphene nanoplatelet and Graphene oxide functionalization of face mask materials inhibits infectivity of trapped SARS-CoV-2. *medRxiv* **2020**. [CrossRef]
39. Kumar, S.; Karmacharya, M.; Joshi, S.R.; Gulenko, O.; Park, J.; Kim, G.-H.; Cho, Y.-K. Photoactive Antiviral Face Mask with Self-Sterilization and Reusability. *Nano Lett.* **2020**. [CrossRef]
40. Tremiliosi, G.; Simoes, L.G.; Minozzi, D.; Santos, R.; Vilela, D.; Durigon, E.L.; Machado, R.R.G.; Medina, D.S.; Ribeiro, L.K.; Rosa, I.L.V.; et al. Ag nanoparticles-based antimicrobial polycotton fabrics to prevent the transmission and spread of SARS-CoV-2. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
41. Zhang, J.; Li, B.; Wu, L.; Wang, A. Facile preparation of durable and robust superhydrophobic textiles by dip coating in nanocomposite solution of organosilanes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11509–11511. [CrossRef]
42. Das, O.; Neisiany, R.E.; Capezza, A.J.; Hedenqvist, M.S.; Försth, M.; Xu, Q.; Jiang, L.; Ji, D.; Ramakrishna, S. The need for fully bio-based facemasks to counter coronavirus outbreaks: A perspective. *Sci. Total Environ.* **2020**, *736*, 139611. [CrossRef]
43. Pelosini, L.; Treffene, S.; Hollick, E.J. Antibacterial activity of preservative-free topical anesthetic drops in current use in ophthalmology departments. *Cornea* **2009**, *28*, 58–61. [CrossRef]
44. WHO. WHO Antibiotic Resistance. Available online: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (accessed on 2 January 2021).
45. Wade, K.C.; Benjamin, D.K. Clinical Pharmacology of Anti-Infective Drugs. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 1160–1211.
46. Lee, J.Y.H.; Monk, I.R.; Gonçalves da Silva, A.; Seemann, T.; Chua, K.Y.L.; Kearns, A.; Hill, R.; Woodford, N.; Bartels, M.D.; Strommenger, B.; et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1175–1185. [CrossRef]
47. Lakhundi, S.; Zhang, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00020-18. [CrossRef] [PubMed]

48. Chessa, D.; Ganau, G.; Spiga, L.; Bulla, A.; Mazzarello, V.; Campus, G.V.; Rubino, S. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 69–76. [[PubMed](#)]
50. Matsuyama, S.; Nao, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Saito, S.; Takayama, I.; Nagata, N.; Sekizuka, T.; Katoh, H.; Kato, F.; et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 7001–7003. [[CrossRef](#)]
51. Martí, M.; Frígols, B.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications. *J. Vis. Exp.* **2018**, e57710. [[CrossRef](#)]
52. Shao, W.; Liu, H.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, J.; Zhang, R.; Min, H.; Huang, M. Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 351–358. [[CrossRef](#)]
53. Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; DeBoy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2426–2438. [[CrossRef](#)]
54. Christensen, G.D.; Bisno, A.L.; Parisi, J.T.; McLaughlin, B.; Hester, M.G.; Luther, R.W. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant Staphylococcus epidermidis. *Ann. Intern. Med.* **1982**, *96*, 1–10. [[CrossRef](#)]
55. Hora, P.I.; Pati, S.G.; McNamara, P.J.; Arnold, W.A. Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2020**, *7*, 622–631. [[CrossRef](#)]
56. Yamanaka, T.; Bannai, H.; Tsujimura, K.; Nemoto, M.; Kondo, T.; Matsumura, T. Comparison of the virucidal effects of disinfectant agents against equine influenza a virus. *J. Equine Vet. Sci.* **2014**, *34*, 715–718. [[CrossRef](#)]
57. Gerba, C.P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Neacșu, I.A.; Nicoară, A.I.; Vasile, O.R.; Vasile, B.Ș. Inorganic micro- and nanostructured implants for tissue engineering. In *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 271–295.

11. ANEXO II

A. Cano-Vicent, A. Tuñón-Molina, M. Martí, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Antiviral Face Mask Functionalized with Solidified Hand Soap: Low-Cost Infection Prevention Clothing against Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2, ACS Omega. (2021).

Antiviral Face Mask Functionalized with Solidified Hand Soap: Low-Cost Infection Prevention Clothing against Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2

Alba Cano-Vicent, Alberto Tuñón-Molina, Miguel Martí, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda, Kazuo Takayama,* and Ángel Serrano-Aroca*



Cite This: *ACS Omega* 2021, 6, 23495–23503



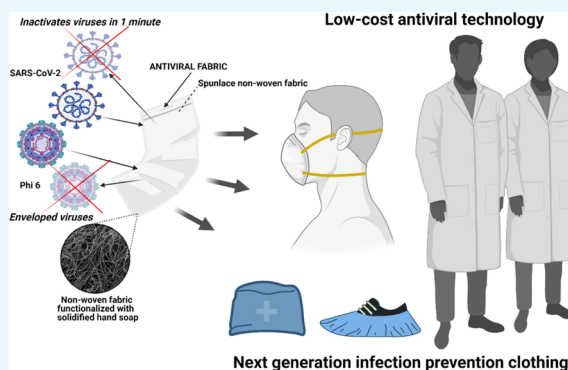
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Infection prevention clothing is becoming an essential protective tool in the current pandemic, especially because now we know that severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) can easily infect humans in poorly ventilated indoor spaces. However, commercial infection prevention clothing is made of fabrics that are not capable of inactivating the virus. Therefore, viral infections of symptomatic and asymptomatic individuals wearing protective clothing such as masks can occur through aerosol transmission or by contact with the contaminated surfaces of the masks, which are suspected as an increasing source of highly infectious biological waste. Herein, we report an easy fabrication method of a novel antiviral non-woven fabric containing polymer filaments that were coated with solidified hand soap. This extra protective fabric is capable of inactivating enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and phage $\Phi 6$ within 1 min of contact. In this study, this antiviral fabric was used to fabricate an antiviral face mask and did not show any cytotoxic effect in human keratinocyte HaCaT cells. Furthermore, this antiviral non-woven fabric could be used for the fabrication of other infection prevention clothing such as caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons, and shoe covers. Therefore, this low-cost technology could provide a wide range of infection-protective tools to combat COVID-19 and future pandemics in developed and underdeveloped countries.



1. INTRODUCTION

The current coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has globally spread around more than 200 countries since December 2019.^{1–5} This new disease is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus^{6,7} classified in the IV Baltimore group.⁸ SARS-CoV-2 continues to globally spread in spite of the strict lockdowns enforced in many countries and the hot season that did not succeed to flatten the global epidemic curve.^{9,10} SARS-CoV-2 has shown stability from some hours to days in different environmental ambients such as aerosols and diverse types of surfaces: metallic, plastic, or cardboard.^{11–15} Therefore, SARS-CoV-2 infections can mainly occur in humans by two main routes: contact with contaminated surfaces or by aerosol transmission, especially in poorly ventilated indoor places.^{11–15} In fact, many studies have shown clear evidence that indoor aerosol transmission is one of the most important transmission ways of SARS-CoV-2, especially through asymptomatic carriers.^{16–18} Thus, many countries have made wearing respiratory face masks covering mouth and nose mandatory

as a demonstrated strategy to fight against SARS-CoV-2.^{19–22} However, commercial face mask fabrics can only partially block the viral particles and are not able to inactivate them when they reach the fabric. Thus, the new generation face mask fabrics must be developed with antimicrobial materials^{23–30} capable of inactivating viruses to increase human protection even more. In this regard, several antiviral face mask materials against SARS-CoV-2 have been recently proposed. All of these studies propose expensive materials such as graphene,^{31,32} graphene oxide and polydopamine,³³ titanium oxide,³⁴ zinc,³⁵ copper,³⁶ silver,³⁷ ZnO nanorods and silver nanoparticles,³⁸ reduced graphene oxide and silver/copper nanoparticles,³⁹ conjugated polymers and oligomers,⁴⁰ and advanced surface coatings^{41–44}

Received: July 5, 2021

Accepted: August 24, 2021

Published: September 2, 2021



that are designed to inactivate the virus. These antiviral composites are produced with complex and costly manufacturing processes, which render them non-viable for a global solution of the current COVID-19 pandemic strongly affecting both developed and underdeveloped countries. Alternative virucidal compounds such as ethanol (70%), povidone-iodine (7.5%), chloroxynol (0.05%), chlorhexidine (0.05%), benzalkonium chloride (0.1%), and hand soap solution (1:49) have shown antiviral activity against SARS-CoV-2.¹⁵ From all these virucidal compounds, the Centers for Disease Control and Prevention has repeatedly recommended that the best and most economical way to prevent the COVID-19 spread of infections and decrease the risk of getting sick is by washing often with hand soap and water.⁴⁵ Furthermore, several commonly available healthcare products have shown virucidal activity with respect to human coronavirus 229e (HCoV-229e), used as a surrogate of SARS-CoV-2, such as Johnson's baby shampoo from Johnson & Johnson Consumer Inc. and crest pro-health toothpaste from Procter & Gamble.⁴⁶ These healthcare commercial products are composed of many active and inactive ingredients. In this regard, we hypothesized here that a very low amount of commercial hand soap could be physically adsorbed and solidified onto the surfaces of the polymer filaments of a non-woven commercial fabric by the dip-coating method.⁴⁷ Thus, we expect that the absorbed hand soap could form a biofunctional coating capable of inactivating SARS-CoV-2. The study also aims to use this antiviral fabric to fabricate an antiviral face mask with non-cytotoxic effects for human keratinocyte cells. Non-woven fabrics are currently manufactured very rapidly and at a very low price, are flexible and lightweight but resilient, provide good breathability and bacterial filtration, and are hygienic as they are made for single-use.⁴⁸ Therefore, we expect to provide here a global solution by developing an antiviral face mask non-woven fabric using low-cost materials that could contribute to reduce the rate of COVID-19 infections. Furthermore, we expect that this antiviral non-woven fabric could be used for the fabrication of other infection prevention clothing such as caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons, and shoe covers.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Fabric Morphology and Characterization.

The electron microscopy morphology of the porous commercial non-woven is shown in Figure 1.

The electron micrographs (Figure 1) and macroscopic images (Figure 2a) of the porous non-woven HS fabric do not show any sign of morphological change after the dip coating process performed on the U fabric.

Therefore, no change of breathability nor bacterial filtration efficiency are expected. In fact, no statistically significant difference of differential pressure (breathability) was found between the U fabric and the HS fabric (Figure 2b). Furthermore, the developed HS fabric showed a differential pressure value that falls in the acceptance level ($<40 \text{ Pa/cm}^2$) to be used in the fabrication of face masks according to the standard EN 14683:2019+AC:2019.

2.2. Antiviral Tests. **2.2.1. Tests with the Biosafe Viral Model of SARS-CoV-2.** We have recently validated the use of phage $\Phi 6$ as a biosafe viral model of SARS-CoV-2 against benzalkonium chloride.⁴⁹ Phage $\Phi 6$ is an enveloped double-stranded RNA bacteriophage that belongs to the group III of the Baltimore classification⁸ and it possesses three-part,

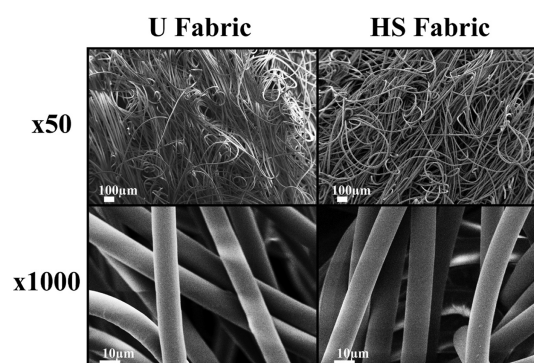


Figure 1. Field emission electron micrographs of the non-woven fabrics. Images of the untreated fabric (U fabric) and fabric with $0.57 \pm 0.03\%$ w/w of a biofunctional solidified commercial hand soap (HS fabric) at two magnifications ($\times 50$ and $\times 1000$).

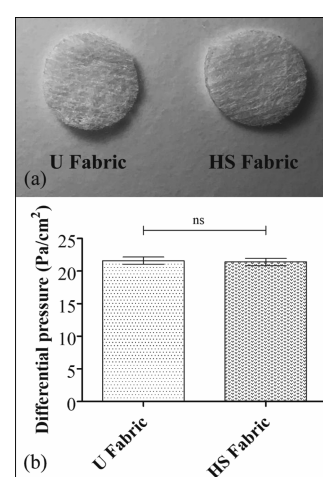


Figure 2. Photographs and differential pressure of the non-woven fabrics: (a) photographs and differential pressure (b) of the untreated fabric (U fabric) and fabric with $0.57 \pm 0.03\%$ w/w of a biofunctional solidified commercial hand soap (HS fabric); ns, not significant.

segmented genome with a total length of ~ 13.5 kb. Thus, this bacteriophage is also proposed here as a biosafe virus model of SARS-CoV-2 against hand soap. RNA extraction and quantification of the phage $\Phi 6$ virus after being in contact with the untreated (U fabric) and treated (HS fabric) materials were performed to demonstrate that the virus does not remain trapped in the pores before the antiviral assays, which could give false results. Thus, Figure 3 shows how the amount of RNA did not significantly decrease after being in contact with the HS fabric or U fabric with respect to control (same amount of virus without being in contact with the fabrics).

Therefore, all the viral particles are released from the fabrics after sonication and vortexing. The results of the antiviral tests showed that the HS fabric possesses potent antiviral activity (100% of viral inhibition, see Figure 4) even with just 1 min of contact with the phage $\Phi 6$.

Thus, after 1, 10, or 30 min of contact between the HS fabric and the SARS-CoV-2 viral model, bacterial lawns grew in the plate without plaques (see Figure 4). In contrast, the U fabric showed similar results to control (without being in contact with any fabric) of no antiviral activity as expected. The plaque-forming units per mL (PFU/mL) of phage $\Phi 6$ after being in contact with the HS fabric is shown and compared with the U fabric and control in Table 1.

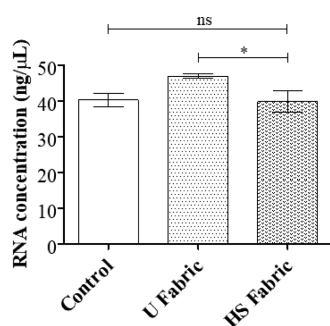


Figure 3. RNA extraction and quantification of the phage $\Phi 6$ virus: RNA concentration in $\text{ng}/\mu\text{L}$ of the $\Phi 6$ virus measured in the control (without being in contact with the fabrics) and the same amount of virus after being in contact with the U fabric and HS fabric for 5 min; $*p > 0.05$; ns, not significant.

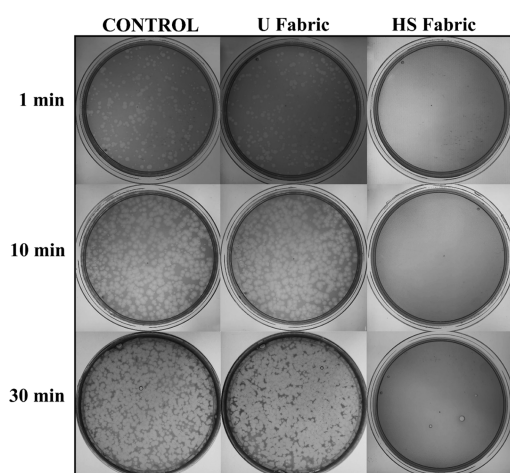


Figure 4. Loss of phage $\Phi 6$ viability measured by the double-layer method: undiluted results without being in contact with any fabric (control) and after being in contact with the untreated polymer fabrics (U fabric) and with the fabric functionalized with solidified commercial hand soap (HS fabric) during 1, 10, and 30 min.

The titers obtained by contacting the phage $\Phi 6$ with the U fabric are similar to the control as expected, within the experimental uncertainty (Table 1). However, the HS fabric exhibited a potent phage inactivation (100% viral of viral inhibition).

Viral particles expelled by infected individuals during breathing, speaking, coughing, or sneezing will come to the developed antiviral fabric in droplets containing high amounts of water.⁵⁰ Therefore, since hand soap is very soluble in water, we believe that viral inactivation will occur very fast as confirmed by the antiviral results, as shown in Figure 4 and Table 1.

Table 1. Infection Titers Obtained by the Double-Layer Method for the Antiviral Assay Performed with Phage $\Phi 6$ Expressed as Mean \pm Standard Deviation, Percentage of Viral Inactivation with Respect to Control without Being in Contact with Any Fabric (Control) and after Being in Contact with the Untreated Fabric (U Fabric), and the Fabric with the Solidified Hand Soap Coating (HS Fabric) for 1, 10 and 30 min

sample	phage $\Phi 6$ at 1 min (PFU/mL)	inactivation at 1 min (%)	phage $\Phi 6$ at 10 min (PFU/mL)	inactivation at 10 min (%)	phage $\Phi 6$ at 30 min (PFU/mL)	inactivation at 30 min (%)
control	$1.6 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^4$		$3.2 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^5$		$1.4 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$	
U fabric	$3.5 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^5$	≈ 0	$2.5 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5$	≈ 0	$4.3 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$	≈ 0
HS fabric	0.0 ± 0.0	100	0.0 ± 0.0	100	0.0 ± 0.0	100

2.2.2. Tests with SARS-CoV-2. The median tissue culture infectious dose (TCID₅₀/mL) test of SARS-CoV-2 showed a significant reduction of infectious titers after being in contact with the HS fabric for 1 min from 5.16 or 5.21 to 3.46 (see Figure 5).

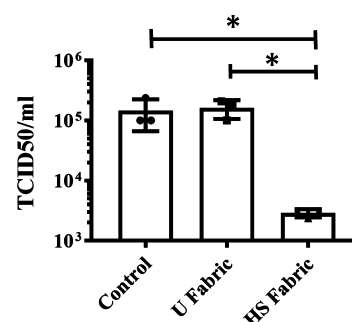


Figure 5. Infectious titers of SARS-CoV-2 after 1 min of contact with the untreated fabric (U fabric) and the fabric functionalized with solidified commercial hand soap (HS fabric) and control (without being in contact with any fabric) by the TCID₅₀/mL method. $*p > 0.05$; ns, not significant.

However, the U fabric and control showed no reduction of titers as expected. These results clearly demonstrate the potent antiviral activity of the HS fabric against SARS-CoV-2 even after 1 min of contact and are in good agreement with those obtained with the enveloped phage $\Phi 6$ (see Figure 4 and Table 1). The infection titers obtained by the TCID₅₀/mL method for SARS-CoV-2 are shown in Table 2.

In this study, two different antiviral test methods have been performed considering the characteristics of each type of virus (phage $\Phi 6$ or SARS-CoV-2). However, these results confirm that the phage $\Phi 6$ is a good biosafe viral model of SARS-CoV-2 against hand soap other than quaternary ammonium salts such as benzalkonium chloride.⁵¹ Thus, this suggests that this viral model could be very useful for researchers working in this field and not having access to a biosafety level 3 laboratory to test other screening agents with potential antiviral activity against SARS-CoV-2 or other enveloped RNA viruses such as influenza.^{52,53}

2.3. Cytotoxicity Tests of the Antiviral Face Mask. The developed antiviral non-woven fabric was used to fabricate an antiviral face mask (see Figure 6).

In order to avoid any direct contact of the antiviral fabric with the face of the user, the fabric was placed in the fourth layer from the inside side in a commercial WottoCare (Quanzhou Huanda Bags Co. Ltd., Quanzhou, China) face mask of five layers. A similar face mask without placing the antiviral fabric inside was used as the control material. Thus, cytotoxicity tests were performed with these face masks

Table 2. Infection Titers and Log Values Obtained by the TCID₅₀/mL Method for SARS-CoV-2 Expressed as Mean ± Standard Deviation and Log Reductions and Percentages of Viral Inactivation with Respect to Control: without Being in Contact with Any Fabric (Control), after 1 min of Contact with the Untreated Fabric (U Fabric), and with the Fabric Functionalized with the Solidified Hand Soap Coating (HS Fabric)

sample	SARS-CoV-2 at 1 min (TCID ₅₀ /mL)	SARS-CoV-2 at 1 min log (TCID ₅₀ /mL)	log reduction	inactivation at 1 min (%)
control	$1.46 \times 10^5 \pm 7.90 \times 10^4$	5.16 ± 0.21		
U fabric	$1.62 \times 10^5 \pm 5.57 \times 10^4$	5.19 ± 0.16	≈0	≈0
HS fabric	$2.90 \times 10^3 \pm 4.56 \times 10^2$	3.46 ± 0.07	1.7	98.0

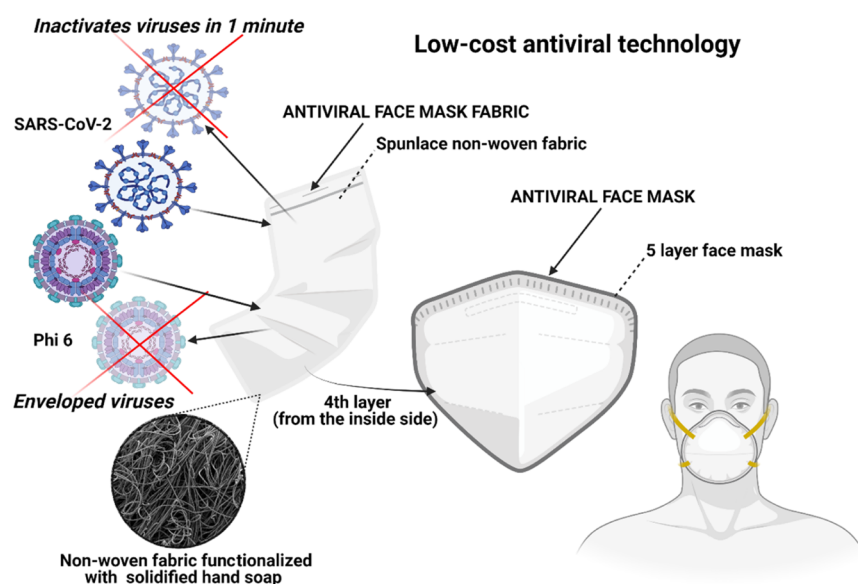


Figure 6. Low-cost face mask produced with an antiviral non-woven fabric functionalized with solidified hand soap capable of inactivating enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and phage Φ6 in 1 min of contact.

produced with (FM) and without the antiviral non-woven fabric (FMC). Figure 7 shows that the antiviral face mask produced in this study does not produce any cytotoxic effect in human keratinocyte cells.

The antiviral action of hand soap is mainly attributed to the surfactant molecules present in the hand soap and its mechanisms of action are attributed to membrane rupture, simple elution mechanism, or viral entrapment.⁵⁴ Thus, in this

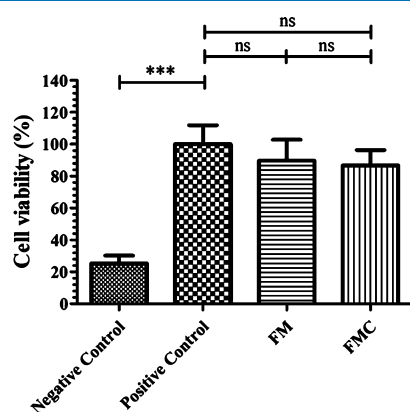


Figure 7. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) cytotoxicity assay of extracts obtained from the 5-layer face mask with (FM) and without (FMC) the antiviral non-woven fabric functionalized with solidified hand soap, positive and negative controls cultured in the presence of human keratinocyte HaCaT cells at 37 °C. *** $p > 0.001$; ns, not significant.

study, we have developed a new low-cost and non-cytotoxic face mask with antiviral properties to reduce COVID-19 infections in both senses, from and to the individuals wearing the mask with the HS fabric. The non-woven fabric has been developed here by a simple, low-cost, reliable and reproducible dip-coating method that uses commercial nonwoven fabric with cylindrical polymer filaments functionalized with solidified hand soap physically absorbed onto the surface of each filament.⁵⁵ The same fabrication procedure could be applied to any type of face mask and other infection prevention clothing such as caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons, and shoe covers, which can be biodegradable or not to inactivate enveloped viruses such as SARS-CoV-2. This easy fabrication procedure opens an increasing number of possible applications in need of new antimicrobial approaches. Nonetheless, despite the results achieved, further research is needed to ensure that this technology is completely safe for the production and commercialization of this antiviral non-woven single-use fabric at a large scale depending on the specific application.

3. CONCLUSIONS

An antiviral fabric has been developed with a non-woven fabric containing polymer filaments that were functionalized with solidified commercial hand soap. This antiviral non-woven fabric was capable of inactivating enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and phage Φ6 in just 1 min of contact. These results demonstrate that the phage Φ6 can be successfully used as viral surrogate of SARS-CoV-2. This antiviral fabric was produced by a reproducible, fast, and economic procedure.

Furthermore, we have shown how this antiviral fabric can be used for the fabrication of antiviral face masks with no toxic effects in human keratinocyte cells. The applications of this antiviral non-woven fabric are immense in the infection prevention clothing industry. Therefore, this technology could reduce significantly the COVID-19 global spread and help in future pandemics because it can be fabricated at a very low cost, especially in low- and middle-income countries.

4. EXPERIMENTAL SECTION

4.1. Dip-Coating with a Commercial Hand Soap.

Commercial non-woven spunlace face mask fabric from NV EVOLUTIA were cut in the form of discs ($n = 6$) of approximately 10 mm in diameter to be treated by the dip-coating method.⁴⁷ These fabric discs were immersed in a very diluted (1% w/v) aqueous solution of a commercial liquid hand soap (KYREY dermo, Laboratorios Forenqui, S.A., Picassent, Valencia, Spain) for 30 min at 23 ± 1 °C to achieve gravimetrically a very low content of dry solidified hand soap $0.57 \pm 0.03\%$ w/w (HS fabric). The KYREY dermo healthcare product has been dermatologically tested and presents a common chemical composition approved by the European authorities. Thus, according to the manufacturer, this commercial liquid hand soap is composed of many ingredients: aqua, sodium laureth sulfate, sodium chloride, cocamidopropyl betaine, glycerin, cocamide DEA, disodium EDTA, propylene glycol, styrene/acrylates copolymer, lactic acid, parfum, benzyl alcohol, limonene, linalool, DMDM hydantoin, imidazolidinyl urea, methylchloroisothiazolinone, methylisothiazolinone, and sodium benzoate. Some of these compounds have shown antiviral properties against SARS-CoV-2 such as the surfactant sodium laureth sulfate⁵⁶ and sodium chloride.⁵⁷ Other compounds such as cocamidopropyl betaine or sodium benzoate have been reported as active or inactive ingredients of commercial healthcare products, respectively.⁴⁶

Time and concentration were adjusted to obtain a dip-coating treatment with the optimal antiviral properties and the lowest amount of hand soap. The functionalized fabrics were subsequently dried at 60 °C for 48 h to constant weight to solidify the physically absorbed hand soap onto the surface of the filaments of the non-woven fabrics. Discs ($n = 6$) prepared from the untreated non-woven fabric (U fabric) were prepared as the reference material. Sterilization was subsequently performed by ultraviolet radiation 1 h per side.

4.2. Fabric Morphology and Characterization. A Zeiss Ultra 55 field emission scanning electron microscope (Zeiss Ultra 55 model) was used with an accelerating voltage of 3 kV. Porous morphology of the treated and untreated non-woven fabric was observed at a magnification of 50 times or 1000 times. The fabric samples were prepared to be conductive by platinum coating with a sputter coating unit. The differential pressures of the U fabric and HS fabric were measured according to the standard EN 14683:2019+AC:2019, as a measure of breathability. Thus, five specimens of 4.9 cm² were used in these tests performed at 22 ± 1 °C, 30% relative humidity, and with 8 ± 0.2 L/min air flow.

4.3. Antiviral Test Using Enveloped Phage $\Phi 6$. The Gram-negative *Pseudomonas syringae* (DSM 21482) from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Germany) was grown in solid tryptic soy agar (TSA, Liofilchem) and after that in liquid tryptic soy broth (TSB, Liofilchem) at 25 °C and

a speed of 120 rpm. The enveloped phage $\Phi 6$ (DSM 21518) was propagated according to the specifications provided by the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Germany).

Double-stranded RNA extraction and quantification from the phage $\Phi 6$ were performed to test whether viral particles remain attached to the U fabric and HS fabric materials or not compared to control before the antiviral assays to avoid false results. The amount of virus dispersed on the material discs was 50 μ L of a 1×10^6 PFU/mL phage solution and left to incubate at 25 °C for 5 min in the U fabric and HS fabric. The same volume of 50 μ L of the phage solution was left to incubate at 25 °C for 5 min without being in contact with any fabric (control). After the incubation time, they were introduced into 10 mL of TSB and sonicated for 5 min and vortexed for 45 s. Thus, the next step consisted of extracting the viral RNA using the RNA extraction protocol provided by Norgen Biotek Corp. (Ontario, Canada).⁵⁸ This protocol consists of the first step of viral particle-lysing to ensure that the mixture becomes transparent before proceeding to the next step. The second step consists of the viral RNA purification which concerns a series of steps: binding of this molecule to the purification column, washing of the purification column, and elution of the RNA for storage avoiding degradation in a freezer at -70 °C. After the RNA extraction, the amount of RNA present in the samples was quantified using a nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) and the result were expressed in ng/ μ L. These measurements were performed in triplicate to ensure reproducible results.

The antiviral test consisted of adding a volume of 50 μ L of a phage suspension in TSB to each fabric disc at a titer of approximately 1×10^6 PFU/mL to be incubated for 1, 10, and 30 min. Each fabric disc was located in a falcon tube with 10 mL TSB that was sonicated for 5 min at 24 °C and subsequently vortexed for 1 min. Serial dilutions were made with each falcon for phage titration. A volume of 100 μ L of each phage dilution was mixed with 100 μ L of the host strain at $OD_{600nm} = 0.5$. Thus, the infective activity of the phage was determined based on the double-layer method.⁵⁹ 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlau) with 5 mM CaCl₂ was mixed with the phage-bacteria suspension to be finally poured on TSA plates. Then, the plates were incubated in a refrigerated oven at 25 °C for 24–48 h. The phage titer of each type of sample was calculated and expressed in PFU/mL to be compared with the control sample, which consisted of 50 μ L of phage mixed with the bacteria without being in contact with any fabric and without performing sonication/vortexing. The antiviral activity was determined at 1, 10, and 30 min of contact with the virus model. It was checked that the residual amounts of hand soap in the titrated samples did not interfere with the titration procedure, and the sonication/vortexing treatment did not affect the infectious activity of the phage. The antiviral tests were performed in triplicate during two different days ($n = 6$) to ensure reproducible results.

4.4. Antiviral Tests Using SARS-CoV-2. The SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027) were kindly gifted by Dr. Tomohiko Takasaki and Dr. Jun-Ichi Sakuragi (Kanagawa Prefectural Institute of Public Health). The SARS-CoV-2 was stored at -80 °C. A volume of 50 μ L of the phosphate-buffered saline (PBS) containing SARS-CoV-2 (1.3×10^5 TCID₅₀/fabric) was added to each fabric and then incubated for 1 min at 25 °C. Each fabric was vortexed in 1 mL PBS for 5 min at room temperature. Viral titers were measured by the

TCID50 assays. TMPRSS2/Vero cells⁶⁰ (JCRB1818, JCRB Cell Bank), which were cultured with the minimum essential media (MEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S), were seeded into 96-well cell culture plates (Thermo Fisher Scientific). Samples were serially diluted 10-fold from 10⁻¹ to 10⁻⁸ in the MEM containing 5% FBS and 1% P/S. Dilutions were placed onto the TMPRSS2/Vero cells in triplicate and incubated at 37 °C for 96 h. The cytopathic effect was evaluated under a microscope. TCID50 values were calculated using the Reed–Muench method. All SARS-CoV-2 infection experiments were performed at a Biosafety Level 3 laboratory (Kyoto University).

4.5. Toxicological Study of the Face Mask. In order to ensure the safety and correct use of this low-cost technology, the toxicity of the face masks containing the developed antiviral non-woven fabric was studied by the Norm ISO-10993 standard recommendations for face masks. Thus, face mask discs with and without the antiviral non-woven fabric functionalized with the solidified hand soap of about 1 cm in diameter were cut with a cylindrical punch and sterilized under ultraviolet light for 1 h per side. Every disc ($n = 6$) was placed into a well of a 6-well plate with 1 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biowest SAS, France) without FBS (Biowest SAS, France). Thus, a volume ratio of 0.1 g/mL was selected according to the ISO-10993 that recommends this rate for irregular porous materials of low density such as textiles. After incubating the discs in humidified 5% CO₂/95% air ambient for 72 h at 37 °C, the extracts were collected and utilized immediately for the toxicological assay. A cell line of non-tumorigenic immortalized human keratinocyte HaCaT cells was provided from the Medical Research Institute Hospital La Fe, Valencia, Spain. Cell incubation was performed in a mixture of DMEM with 10% FBS, 100 units/mL penicillin (Lonza, Belgium), and 100 mg/mL streptomycin (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), at 37 °C and 5% CO₂. The effect of the treatment with the face mask extracts on cell viability was measured by the MTT assay. The HaCaT cells were planted at 10⁴ cells/well onto 96-well plate. After incubation for 24 h at 37 °C, the medium in each well was replaced with 100 μ L of face mask disc extracts. The medium was also replaced with 100 μ L of the same medium used to produce the face mask disc extracts (positive control), as well as 100 μ L of 1000 μ M zinc chloride ($\geq 97.0\%$, Sigma-Aldrich) solution as negative control because this concentration is highly toxic for the HaCaT cells.⁶¹ Cell incubation was performed with 5 mg/mL MTT in each well for 3 h. Thus, the formazan crystals were dissolved in 100 μ L dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) at ambient temperature and the absorbance was read at 550 nm on a microplate reader (Variokan, Thermo Fisher).

4.6. Statistical Analysis. Student's *t*-test was performed for pair comparisons and one-way analysis of variance for multiple value comparisons followed by Tukey's posthoc test ($*p > 0.05$, $***p > 0.001$) on GraphPad Prism 6 software.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Kazuo Takayama – Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; orcid.org/0000-0002-1132-2457; Email: kazuo.takayama@cira.kyoto-u.ac.jp

Ángel Serrano-Aroca – Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia 46001, Spain; orcid.org/0000-0002-9953-3848; Email: angel.serrano@ucv.es

Authors

Alba Cano-Vicent – Doctoral School, Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia 46001, Spain
Alberto Tuñón-Molina – Doctoral School, Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia 46001, Spain; orcid.org/0000-0003-3819-7390
Miguel Martí – Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia 46001, Spain; orcid.org/0000-0002-1891-8368
Yukiko Muramoto – Laboratory of Ultrastructural Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
Takeshi Noda – Laboratory of Ultrastructural Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acsof.1c03511>

Author Contributions

Á.S.-A. conceived the idea of this work, wrote the original draft manuscript, and performed the figure design. A.C.-V. and A.T.-M. contributed equally to this work. Methodology, validation, and formal analysis: M.M., K.T., and Á.S.-A.; software: K.T. and Á.S.-A.; investigation: M.M., A.T.-M., A.C.-V., Y.M., T.N., K.T., and Á.S.-A.; resources: M.M., K.T., and Á.S.-A.; data curation: A.T.-M., A.C.-V., K.T., and Á.S.-A.; writing-review and editing: A.T.-M., A.C.-V., M.M., K.T., and Á.S.-A.; supervision: M.M., K.T., and Á.S.-A.; project administration: K.T., T.N., and Á.S.-A.; funding acquisition: K.T. and Á.S.-A.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir for their financial support through the grant 2020-231-006UCV and to the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-119333RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) (awarded to Á.S.-A.). This research was also supported by grants from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) (20fk0108533h0001). This work was supported by Joint Usage/Research Center program of Institute for Frontier Life and Medical Sciences Kyoto University and the JST Core Research for Evolutional Science and Technology (JPMJCR20HA). We would like to thank Dr. Yoshio Koyanagi and Dr. Kazuya Shimura (Kyoto University) for setup and operation of the BSL-3 laboratory.

ABBREVIATIONS

COVID-19, coronavirus disease 2019

SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
U fabric, untreated fabric
HS fabric, fabric functionalized with solidified commercial hand soap
FM, face mask with antiviral fabric
FMC, face mask without antiviral fabric
TSA, tryptic soy agar
TSB, liquid tryptic soy broth
PFU/mL, plaque-forming units per mL
TCID₅₀, median tissue culture infectious dose
FBS, fetal bovine serum
MEM, minimum essential media
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium
MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
DMSO, dimethyl sulfoxide

REFERENCES

- (1) WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19—11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed 2021-08-10).
- (2) Hassan, S. S.; Attrish, D.; Ghosh, S.; Choudhury, P. P.; Uversky, V. N.; Aljabali, A. A. A.; Lundstrom, K.; Uhal, B. D.; Rezaei, N.; Seyran, M.; Pizzol, D.; Adadi, P.; Soares, A.; Abd El-Aziz, T. M.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M. M.; Azad, G. K.; Sherchan, S. P.; Baetas-da-Cruz, W.; Lal, A.; Palù, G.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, A.; Barh, D.; Brufsky, A. M. Notable Sequence Homology of the ORF10 Protein Introspects the Architecture of SARS-CoV-2. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *181*, 801–809.
- (3) Hassan, S. S.; Ghosh, S.; Attrish, D.; Choudhury, P. P.; Aljabali, A. A. A.; Uhal, B. D.; Lundstrom, K.; Rezaei, N.; Uversky, V. N.; Seyran, M.; Pizzol, D.; Adadi, P.; Soares, A.; El-Aziz, T. M. A.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M. M.; Azad, G. K.; Sherchan, S. P.; Baetas-da-Cruz, W.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, A.; Chauhan, G.; Palu, G.; Brufsky, A. M. Possible Transmission Flow of SARS-CoV-2 Based on ACE2 Features. *Molecules* **2020**, *25*, 5906.
- (4) Barh, D.; Aljabali, A. A. A.; Tiwari, S.; Tambuwala, M. M. Predicting COVID-19—Comorbidity Pathway Crosstalk-Based Targets and Drugs: Towards Personalized COVID-19 Management. *Biomedicine* **2021**, *9*, 556.
- (5) Hassan, S. S.; Aljabali, A. A. A.; Panda, P. K.; Ghosh, S.; Attrish, D.; Choudhury, P. P.; Seyran, M.; Pizzol, D.; Adadi, P.; Abd El-Aziz, T. M.; Soares, A.; Kandimalla, R.; Lundstrom, K.; Lal, A.; Azad, G. K.; Uversky, V. N.; Sherchan, S. P.; Baetas-da-Cruz, W.; Uhal, B. D.; Rezaei, N.; Chauhan, G.; Barh, D.; Redwan, E. M.; Dayhoff, G. W.; Bazan, N. G.; Serrano-Aroca, A.; El-Demerdash, A.; Mishra, Y. K.; Palu, G.; Takayama, K.; Brufsky, A. M.; Tambuwala, M. M. A Unique View of SARS-CoV-2 through the Lens of ORF8 Protein. *Comput. Biol. Med.* **2021**, *133*, 104380.
- (6) Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; Kuang, L.; Fang, X.; Mishra, N.; Lu, J.; Shan, H.; Jiang, G.; Huang, X. Prolonged Presence of SARS-CoV-2 Viral RNA in Faecal Samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 434–435.
- (7) Seyran, M.; Takayama, K.; Uversky, V. N.; Lundstrom, K.; Palù, G.; Sherchan, S. P.; Attrish, D.; Rezaei, N.; Aljabali, A. A. A.; Ghosh, S.; Pizzol, D.; Chauhan, G.; Adadi, P.; Mohamed Abd El-Aziz, T.; Soares, A. G.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M.; Hassan, S. S.; Azad, G. K.; Pal Choudhury, P.; Baetas-da-Cruz, W.; Serrano-Aroca, A.; Brufsky, A. M.; Uhal, B. D. The Structural Basis of Accelerated Host Cell Entry by SARS-CoV-2. *FEBS J.* **2020**, DOI: 10.1111/febs.15651.
- (8) Baltimore, D. Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241.
- (9) Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. The Effect of Climate on the Spread of the COVID-19 Pandemic: A Review of Findings, and Statistical and Modelling Techniques. *Prog. Phys. Geogr. Earth Environ.* **2020**, *44*, 591.
- (10) Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. A Spatio-Temporal Analysis for Exploring the Effect of Temperature on COVID-19 Early Evolution in Spain. *Sci. Total Environ.* **2020**, *728*, 138811.
- (11) Bourouiba, L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1837–1838.
- (12) Orenes-Piñero, E.; Baño, F.; Navas-Carrillo, D.; Moreno-Docón, A.; Marín, J. M.; Misiego, R.; Ramírez, P. Evidences of SARS-CoV-2 Virus Air Transmission Indoors Using Several Untouched Surfaces: A Pilot Study. *Sci. Total Environ.* **2021**, *751*, 142317.
- (13) van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D. H.; Holbrook, M. G.; Gamble, A.; Williamson, B. N.; Tamin, A.; Harcourt, J. L.; Thornburg, N. J.; Gerber, S. I.; Lloyd-Smith, J. O.; de Wit, E.; Munster, V. J. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1564.
- (14) Ong, S. W. X.; Tan, Y. K.; Chia, P. Y.; Lee, T. H.; Ng, O. T.; Wong, M. S. Y.; Marimuthu, K. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient. *J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1610–1612.
- (15) Chin, A. W. H.; Chu, J. T. S.; Perera, M. R. A.; Hui, K. P. Y.; Yen, H.-L.; Chan, M. C. W.; Peiris, M.; Poon, L. L. M. Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, No. e10.
- (16) Liu, Y.; Ning, Z.; Chen, Y.; Guo, M.; Liu, Y.; Gali, N. K.; Sun, L.; Duan, Y.; Cai, J.; Westerdahl, D.; Liu, X.; Xu, K.; Ho, K.-f.; Kan, H.; Fu, Q.; Lan, K. Aerodynamic Analysis of SARS-CoV-2 in Two Wuhan Hospitals. *Nature* **2020**, *582*, 557–560.
- (17) Richard, M.; Kok, A.; de Meulder, D.; Bestebroer, T. M.; Lamers, M. M.; Okba, N. M. A.; Fentener van Vlissingen, M.; Rockx, B.; Haagmans, B. L.; Koopmans, M. P. G.; Fouchier, R. A. M.; Herfst, S. SARS-CoV-2 Is Transmitted via Contact and via the Air between Ferrets. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3496.
- (18) Morawska, L.; Cao, J. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: The World Should Face the Reality. *Environ. Int.* **2020**, *139*, 105730.
- (19) Matuschek, C.; Moll, F.; Fangerau, H.; Fischer, J. C.; Zänker, K.; Van Griensven, M.; Schneider, M.; Kindgen-Milles, D.; Knoefel, W. T.; Lichtenberg, A.; Tamaskovics, B.; Djepmo-Njanang, F. J.; Budach, W.; Corradini, S.; Häussinger, D.; Feldt, T.; Jensen, B.; Pelka, R.; Orth, K.; Peiper, M.; Grebe, O.; Maas, K.; Gerber, P. A.; Pedoto, A.; Bölke, E.; Haussmann, J. Face Masks: Benefits and Risks during the COVID-19 Crisis. *Eur. J. Med. Res.* **2020**, *25*, 32.
- (20) Howard, J.; Huang, A.; Li, Z.; Tufekci, Z.; Zdimal, V.; van der Westhuizen, H.-M.; von Delft, A.; Price, A.; Fridman, L.; Tang, L.-H.; Tang, V.; Watson, G. L.; Bax, C. E.; Shaikh, R.; Questier, F.; Hernandez, D.; Chu, L. F.; Ramirez, C. M.; Rimoin, A. W. An Evidence Review of Face Masks against COVID-19. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2021**, *118*, e2014564118. DOI: DOI: 10.1073/pnas.2014564118.
- (21) Mitze, T.; Kosfeld, R.; Rode, J.; Wälde, K. Face Masks Considerably Reduce COVID-19 Cases in Germany. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 32293–32301.
- (22) Melayil, K. R.; Mitra, S. K. Wetting, Adhesion, and Droplet Impact on Face Masks. *Langmuir* **2021**, *37*, 2810–2815.
- (23) Serrano-Aroca, Á.; Takayama, K.; Tuñón-Molina, A.; Seyran, M.; Hassan, S. S.; Pal Choudhury, P.; Uversky, V. N.; Lundstrom, K.; Adadi, P.; Palù, G.; Aljabali, A. A. A.; Chauhan, G.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M. M.; Lal, A.; Abd El-Aziz, T. M.; Sherchan, S.; Barh, D.; Redwan, E. M.; Bazan, N. G.; Mishra, Y. K.; Uhal, B. D.; Brufsky, A. Carbon-Based Nanomaterials: Promising Antiviral Agents to Combat COVID-19 in the Microbial-Resistant Era. *ACS Nano* **2021**, *15*, 8069–8086.
- (24) Sun, D.; Babar Shahzad, M.; Li, M.; Wang, G.; Xu, D. Antimicrobial Materials with Medical Applications. *Mater. Technol.* **2015**, *30*, B90–B95.
- (25) Palza, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2099–2116.

- (26) Salesa, B.; Martí, M.; Frígols, B.; Serrano-Aroca, Á. Carbon Nanofibers in Pure Form and in Calcium Alginate Composites Films: New Cost-Effective Antibacterial Biomaterials against the Life-Threatening Multidrug-Resistant *Staphylococcus Epidermidis*. *Polymers* **2019**, *11*, 453.
- (27) Frígols, B.; Martí, M.; Salesa, B.; Hernández-Oliver, C.; Aarstad, O.; Teialeret Ulset, A.-S.; Sætrom, G. I. G. I.; Aachmann, F. L.; Serrano-Aroca, Á. Graphene Oxide in Zinc Alginate Films: Antibacterial Activity, Cytotoxicity, Zinc Release, Water Sorption/Diffusion, Wettability and Opacity. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0212819.
- (28) Elias, L.; Taengua, R.; Frígols, B.; Salesa, B.; Serrano-Aroca, Á. Carbon Nanomaterials and LED Irradiation as Antibacterial Strategies against Gram-Positive Multidrug-Resistant Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3603.
- (29) Hans, M.; Erbe, A.; Mathews, S.; Chen, Y.; Solioz, M.; Mücklich, F. Role of Copper Oxides in Contact Killing of Bacteria. *Langmuir* **2013**, *29*, 16160–16166.
- (30) Lakshmi Prasanna, V.; Vijayaraghavan, R. Insight into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO: Surface Defects Mediated Reactive Oxygen Species Even in the Dark. *Langmuir* **2015**, *31*, 9155–9162.
- (31) Zhong, H.; Zhu, Z.; Lin, J.; Cheung, C. F.; Lu, V. L.; Yan, F.; Chan, C.-Y.; Li, G. Reusable and Recyclable Graphene Masks with Outstanding Superhydrophobic and Photothermal Performances. *ACS Nano* **2020**, *14*, 6213–6221.
- (32) Bhattacharjee, S.; Joshi, R.; Chughtai, A. A.; Macintyre, C. R. Graphene Modified Multifunctional Personal Protective Clothing. *Adv. Mater. Interfaces* **2019**, *6*, 1900622.
- (33) Kasbe, P. S.; Gade, H.; Liu, S.; Chase, G. G.; Xu, W. Ultrathin Polydopamine-Graphene Oxide Hybrid Coatings on Polymer Filters with Improved Filtration Performance and Functionalities. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 5180.
- (34) Abbas, W. A.; Shaheen, B. S.; Ghanem, L. G.; Badawy, I. M.; Abodouh, M. M.; Abdou, S. M.; Zada, S.; Allam, N. K. Cost-Effective Face Mask Filter Based on Hybrid Composite Nanofibrous Layers with High Filtration Efficiency. *Langmuir* **2021**, *37*, 7492–7502.
- (35) Gopal, V.; Nilsson-Payant, B. E.; French, H.; Siegers, J. Y.; Yung, W.-s.; Hardwick, M.; Te Velthuis, A. J. W. Zinc-Embedded Polyamide Fabrics Inactivate SARS-CoV-2 and Influenza A Virus. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 30317–30325.
- (36) Jung, S.; Yang, J.-Y.; Byeon, E.-Y.; Kim, D.-G.; Lee, D.-G.; Ryoo, S.; Lee, S.; Shin, C.-W.; Jang, H. W.; Kim, H. J.; Lee, S. Copper-Coated Polypropylene Filter Face Mask with SARS-COV-2 Antiviral Ability. *Polymers* **2021**, *13*, 1367.
- (37) Blevens, M. S.; Pastrana, H. F.; Mazzotta, H. C.; Tsai, C. S.-J. Cloth Face Masks Containing Silver: Evaluating the Status. *ACS Chem. Health Saf.* **2021**, *28*, 171–182.
- (38) Karagoz, S.; Kiremitler, N. B.; Sarp, G.; Pekdemir, S.; Salem, S.; Goksu, A. G.; Onses, M. S.; Sozdutmaz, I.; Sahmetlioglu, E.; Ozkara, E. S.; Ceylan, A.; Yilmaz, E. Antibacterial, Antiviral, and Self-Cleaning Mats with Sensing Capabilities Based on Electrospun Nanofibers Decorated with ZnO Nanorods and Ag Nanoparticles for Protective Clothing Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 5678–5690.
- (39) Bhattacharjee, S.; Joshi, R.; Yasir, M.; Adhikari, A.; Chughtai, A. A.; Heslop, D.; Bull, R.; Willcox, M.; Macintyre, C. R. Graphene- and Nanoparticle-Embedded Antimicrobial and Biocompatible Cotton/Silk Fabrics for Protective Clothing. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 6175–6185.
- (40) Monge, F. A.; Jagadesan, P.; Bondu, V.; Donabedian, P. L.; Ista, L.; Chi, E. Y.; Schanze, K. S.; Whitten, D. G.; Kell, A. M. Highly Effective Inactivation of SARS-CoV-2 by Conjugated Polymers and Oligomers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 55688–55695.
- (41) Hosseini, M.; Behzadinasab, S.; Benmamoun, Z.; Ducker, W. A. The Viability of SARS-CoV-2 on Solid Surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2021**, *55*, 101481.
- (42) Behzadinasab, S.; Chin, A.; Hosseini, M.; Poon, L.; Ducker, W. A. A Surface Coating That Rapidly Inactivates SARS-CoV-2. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 34723–34727.
- (43) Balagna, C.; Perero, S.; Percivalle, E.; Nepita, E. V.; Ferraris, M. Virucidal Effect against Coronavirus SARS-CoV-2 of a Silver Nanocluster/Silica Composite Sputtered Coating. *Open Ceram.* **2020**, *1*, 100006.
- (44) Hosseini, M.; Chin, A. W. H.; Behzadinasab, S.; Poon, L. L. M.; Ducker, W. A. Cupric Oxide Coating That Rapidly Reduces Infection by SARS-CoV-2 via Solids. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 5919–5928.
- (45) USFDA. Q&A for Consumers: Hand Sanitizers and COVID-19; United States Food and Drug Administration (FDA), 2020.
- (46) Meyers, C.; Robison, R.; Milici, J.; Alam, S.; Quillen, D.; Goldenberg, D.; Kass, R. Lowering the Transmission and Spread of Human Coronavirus. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 1605–1612.
- (47) Zhang, J.; Li, B.; Wu, L.; Wang, A. Facile Preparation of Durable and Robust Superhydrophobic Textiles by Dip Coating in Nanocomposite Solution of Organosilanes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11509–11511.
- (48) Das, O.; Neisiany, R. E.; Capezza, A. J.; Hedenqvist, M. S.; Försth, M.; Xu, Q.; Jiang, L.; Ji, D.; Ramakrishna, S. The Need for Fully Bio-Based Facemasks to Counter Coronavirus Outbreaks: A Perspective. *Sci. Total Environ.* **2020**, *736*, 139611.
- (49) Martí, M.; Tuñón-Molina, A.; Aachmann, F.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. *Polymers* **2021**, *13*, 207.
- (50) Stadnytskyi, V.; Anfinrud, P.; Bax, A. Breathing, Speaking, Coughing or Sneezing: What Drives Transmission of SARS-CoV-2? *J. Intern. Med.* **2021**, DOI: 10.1111/JOIM.13326.
- (51) Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9518.
- (52) Turgeon, N.; Toulouse, M.-J.; Martel, B.; Moineau, S.; Duchaine, C. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4242–4250.
- (53) Adcock, N. J.; Rice, E. W.; Sivaganesan, M.; Brown, J. D.; Stallknecht, D. E.; Swayne, D. E. The Use of Bacteriophages of the Family Cystoviridae as Surrogates for H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Persistence and Inactivation Studies. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2009**, *44*, 1362–1366.
- (54) Chaudhary, N. K.; Chaudhary, N.; Dahal, M.; Guragain, B.; Rai, S.; Chaudary, R.; Sachin, K. M.; Khadka, R. L.; Bhattarai, A. Fighting the SARS CoV-2 (COVID-19) Pandemic with Soap. *Preprints* **2020**, *60*, 1–19.
- (55) Neacșu, I. A.; Nicoară, A. I.; Vasile, O. R.; Vasile, B. Ș. Inorganic Micro- and Nanostructured Implants for Tissue Engineering. In *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*; Elsevier Inc., 2016; pp 271–295.
- (56) Jahromi, R.; Mogharab, V.; Jahromi, H.; Avazpour, A. Synergistic Effects of Anionic Surfactants on Coronavirus (SARS-CoV-2) Virucidal Efficiency of Sanitizing Fluids to Fight COVID-19. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *145*, 111702.
- (57) Machado, R. R. G.; Glaser, T.; Araujo, D. B.; Petiz, L. L.; Oliveira, D. B. L.; Durigon, G. S.; Leal, A. L.; Pinho, J. R. R.; Ferreira, L. C. S.; Ulrich, H.; Durigon, E. L. R.; Guzzo, C. R. Hypertonic Saline Solution Inhibits SARS-CoV-2 in Vitro Assay. *bioRxiv* **2020**, 2020.08.04.235549.
- (58) Norgen Biotek Corporation. Total RNA Purification Kit. <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/Total%20RNA%20Purification%20Kit%20Insert%20PI17200-34.pdf> (accessed Aug 10, 2021).
- (59) Kropinski, A. M.; Mazzocco, A.; Waddell, T. E.; Lingohr, E.; Johnson, R. P. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 69–76.

(60) Matsuyama, S.; Nao, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Saito, S.; Takayama, I.; Nagata, N.; Sekizuka, T.; Katoh, H.; Kato, F.; Sakata, M.; Tahara, M.; Kutsuna, S.; Ohmagari, N.; Kuroda, M.; Suzuki, T.; Kageyama, T.; Takeda, M. Enhanced Isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-Expressing Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 7001–7003.

(61) Frígols, B.; Martí, M.; Salesa, B.; Hernández-Oliver, C.; Aarstad, O.; Teialeret Ulset, A.-S.; Sætrom, G. I.; Aachmann, F. L.; Serrano-Aroca, Á. Graphene Oxide in Zinc Alginate Films: Antibacterial Activity, Cytotoxicity, Zinc Release, Water Sorption/Diffusion, Wettability and Opacity. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0212819.

12. ANEXO III

K. Takayama, A. Tuñón-Molina, A. Cano-Vicent, Y. Muramoto, T. Noda, J.L. Aparicio-Collado, R. Sabater I Serra, M. Martí, Á. Serrano-Aroca, Non-Woven Infection Prevention Fabrics Coated with Biobased Cranberry Extracts Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria, *Int J Mol Sci.* 22 (2021).



Non-Woven Infection Prevention Fabrics Coated with Biobased Cranberry Extracts Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria

Kazuo Takayama ¹, Alberto Tuñón-Molina ², Alba Cano-Vicent ², Yukiko Muramoto ³, Takeshi Noda ³, José Luis Aparicio-Collado ⁴, Roser Sabater i Serra ^{4,5}, Miguel Martí ² and Ángel Serrano-Aroca ^{2,*}

¹ Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; kazuo.takayama@cira.kyoto-u.ac.jp

² Biomaterials and Bioengineering Lab, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, c/Guillem de Castro 94, 46001 Valencia, Spain; alberto.tunon@ucv.es (A.T.-M.); alba.cano@mail.ucv.es (A.C.-V.); miguel.marti@ucv.es (M.M.)

³ Laboratory of Ultrastructural Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; muramo@infront.kyoto-u.ac.jp (Y.M.); t-noda@infront.kyoto-u.ac.jp (T.N.)

⁴ Centre for Biomaterials and Tissue Engineering, Universitat Politècnica de València, 46022 València, Spain; joapcol@upvnet.upv.es (J.L.A.-C.); rsabater@die.upv.es (R.S.i.S.)

⁵ CIBER-BBN, Biomedical Research Networking Centre in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, 46022 València, Spain

* Correspondence: angel.serrano@ucv.es; Tel.: +34-9636-37412 (ext. 5256)

Citation: Takayama, K.;

Tuñón-Molina, A.; Cano-Vicent, A.;

Muramoto, Y.; Noda, T.;

Aparicio-Collado, J.L.;

Sabater i Serra, R.; Martí, M.;

Serrano-Aroca, Á. Non-Woven

Infection Prevention Fabrics Coated

with Biobased Cranberry Extracts

Inactivate Enveloped Viruses Such

as SARS-CoV-2 and Multidrug-

Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.*

2021, 22, 12719.

<https://doi.org/10.3390/ijms222312719>

Academic Editor: Young-Jin Kim

Received: 7 October 2021

Accepted: 22 November 2021

Published: 24 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic is demanding the rapid action of the authorities and scientific community in order to find new antimicrobial solutions that could inactivate the pathogen SARS-CoV-2 that causes this disease. Gram-positive bacteria contribute to severe pneumonia associated with COVID-19, and their resistance to antibiotics is exponentially increasing. In this regard, non-woven fabrics are currently used for the fabrication of infection prevention clothing such as face masks, caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons and shoe covers as protective tools against viral and bacterial infections. However, these non-woven fabrics are made of materials that do not exhibit intrinsic antimicrobial activity. Thus, we have here developed non-woven fabrics with antimicrobial coatings of cranberry extracts capable of inactivating enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and the bacteriophage phi 6 (about 99% of viral inactivation in 1 min of viral contact), and two multidrug-resistant bacteria: the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. The morphology, thermal and mechanical properties of the produced filters were characterized by optical and electron microscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry and dynamic mechanical thermal analysis. The non-toxicity of these advanced technologies was ensured using a *Caenorhabditis elegans* in vivo model. These results open up a new prevention path using natural and biodegradable compounds for the fabrication of infection prevention clothing in the current COVID-19 pandemic and microbial resistant era.

Keywords: SARS-CoV-2; enveloped viruses; bacteriophage phi 6; multidrug-resistant; bacteria; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; non-woven fabric; cranberry extract; antimicrobial activity; infection prevention clothing

1. Introduction

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the third human coronavirus [1–4] that is much more contagious than SARS-CoV and MERS-CoV [5–12]. This rapid transmission rate has provoked the current Coronavirus Disease (COVID-19) pandemic. SARS-CoV-2 is a highly pathogenic enveloped positive-sense single-stranded RNA virus [13–15] that belongs to the Baltimore group IV [16]. This global life-threatening situation needs the development of new antimicrobial approaches that could treat or

prevent COVID-19 infections [17–22]. In this regard, non-woven fabrics are currently used for the fabrication of infection prevention clothing such as face masks, caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons, and shoe covers. These infection prevention tools are needed specially in hospitals during surgical operations, in microbiological and biomedical biosafety laboratories and also, in the case of face masks, by most citizens as a demonstrated prevention tool in the current COVID-19 pandemic [23]. Nevertheless, these infection prevention clothing are produced with materials that do not possess antimicrobial properties, and some progress has been achieved so far in the development of antimicrobial prevention fabrics [24]. Many disinfectants such as household bleach, hand soap solution, ethanol, povidone-iodine, chloroxylenol, chlorhexidine and benzalkonium chloride have shown potent antiviral activity against SARS-CoV-2 so far [25]. Thus, non-woven fabrics for the fabrication of face masks and face shields have been treated with benzalkonium chloride to produce antimicrobial infection prevention tools [26,27]. Very recently, non-woven fabrics have been coated with solidified hand soap to produce antimicrobial face masks capable of inactivating SARS-CoV-2 in one min of contact [28]. Other authors have produced next generation infection prevention materials using other antimicrobial agents such as antimicrobial polymers, salts, carbon nanomaterials, metals or metal oxides [24,29–31]. However, very few studies about the use of natural and biodegradable compounds such as cranberry extracts have been reported [24]. Cranberry extracts have shown antiviral activity against other enveloped viruses such as the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) due to the presence of antimicrobial A-type proanthocyanidins (PACs) that provoke alterations of their envelope glycoproteins. However, although HSV-1 and HSV-2 belong to a different Baltimore group I [16] than SARS-CoV-2 because they are double-stranded DNA viruses, they are also enveloped viruses like SARS-CoV-2. A cranberry extract has also exhibited antiviral activity against influenza virus (IFV) [32]. IFV is a negative-sense single-stranded RNA virus that belongs to the Baltimore group V [16]. However, it is also enveloped like HSV-1 and HSV-2. Therefore, since it seems that the PACs present in cranberry extracts effectively interact with the envelope glycoproteins achieving viral inhibition, we hypothesize here that a commercial non-woven fabric treated with two different commercial extracts produced with different cranberries will show antiviral activity against the enveloped SARS-CoV-2 and bacteriophage phi 6. The bacteriophage phi 6 is also an enveloped double-stranded RNA virus (group III of the Baltimore classification [16]) that can be used as surrogate of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses such as influenza due to biosafety reasons [26]. Furthermore, atypical viral pneumonia is associated with SARS-CoV-2 infection [2,33] and can increase its risk by co-infection with bacteria [34–37], including clinically relevant antibiotic-resistant strains. Additionally, bacterial resistance to pneumonia treatments is increasing at an alarming rate [38,39]. Since the PACs present in cranberry extracts are well-known for their antibacterial properties against Gram-negative *Escherichia coli* [40] and antifungal activity against *Candida albicans* [41], we hypothesize here also that the two non-woven fabrics dip-coated with cranberry extracts will show also antibacterial activity against two Gram-positive multidrug-resistant bacteria, the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). These advanced fabrics will be characterized by optical and electron microscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, dynamic mechanical thermal analysis and their toxicological aspects will be analyzed using a *Caenorhabditis elegans* in vivo model.

2. Results and Discussion

2.1. Fabric Morphology

The optical microscopy images at two magnifications and the macroscopic photographs of the non-woven fabrics treated with and without cranberry extracts are shown in Figure 1.

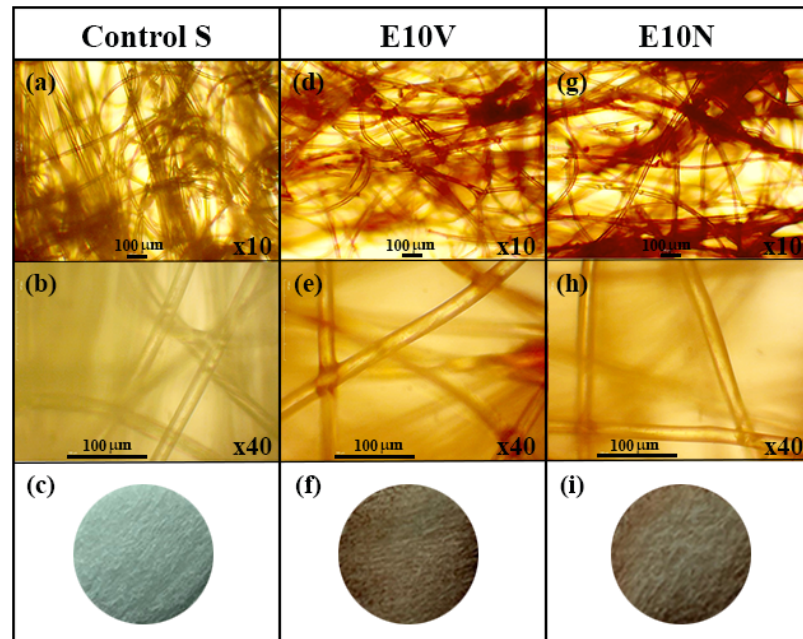


Figure 1. Optical microscopy images at two magnifications ($\times 10$ and $\times 40$) and the macroscopic photographs of the neat non-woven fabric (Control S) before (a,b,c) and after the treatment with the VITAFAIR cranberry extract (E10V) (d,e,f) or the NUTRIBIOLITE cranberry extract (E10N) (g,h,i).

Both optical microscopy images and macroscopic photographs (Figure 1c,f,i) show that only a very thin reddish coating of cranberry extract is formed onto the fibers of the non-woven fabrics. In addition, the surface morphology of the fabric samples was analyzed by electron microscopy (Figure 2). Before treatment, the fabrics present a smooth surface, with some little particles on the surface which may have arisen due to the spinning process (Figure 2a,b). After the treatment with the extracts, the fibers' morphology and the overall porosity of the non-woven fabrics do not change substantially (Figure 2c,e), in good agreement with the results obtained from optical microscopy. The $\times 1000$ magnification images show the fibers coated with the extracts (Figure 2d,f). The coating can be clearly observed (see Figure 2f), forming a layer that wraps the fibers. The surface of the fibers remains smooth, although a greater quantity of small particles deposited on the surface can be observed, probably due to the formation of small aggregates during the drying process after the dip-coating with the two cranberry extracts. Therefore, no substantial change of porosity or fiber arrangement is observed, which suggests no change of breathability or bacterial filtration efficiency required for certain infection prevention clothing applications.

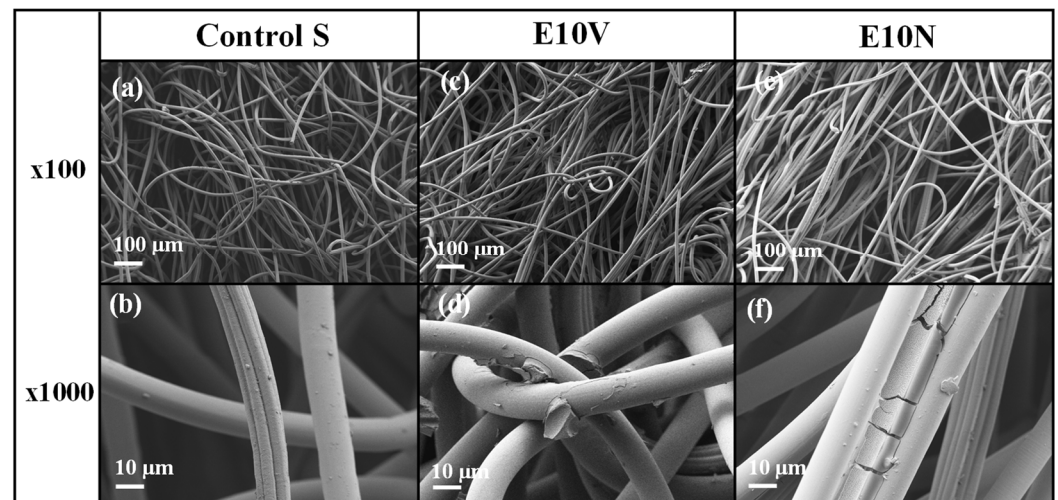


Figure 2. High-resolution field-emission scanning electron microscope (HR-FESEM) images of the non-woven fabric before (a,b) and after the treatment with the VITAFAIR cranberry extract (E10V) (c,d) or the NUTRIBIOLITE cranberry extract (E10N) (e,f).

2.2. Physico-Chemical Characterization

The thermal degradation profile of the neat non-woven sample (Control S) and the samples after dip-coating with the cranberry extracts (E10N and E10V), analyzed by thermogravimetry can be observed in Figure 3a. After an initial loss weight at temperatures below 100 °C, probably due to the evaporation of residual moisture, the degradation process began at temperatures above 220 °C and occurred in three stages. The degradation profile in the first and the second stage, between 220–360 °C and 360–450 °C, respectively, did not show large differences between the fabrics treated with the extracts and the untreated fabrics. However, at temperatures above 450 °C, the weight loss was approximately 10% lower in the samples treated with the cranberry extracts. The residual weight at the end of the assay (700 °C) remained with the same difference (10%) between the treated fabrics and the untreated fabric. In addition, the calorimetry results on heating, depicted in Figure 3b, showed that the treatment with the cranberry extracts did not affect the thermal behavior in a range of temperatures (from 0 to 80 °C) suitable for their application in infection prevention clothing.

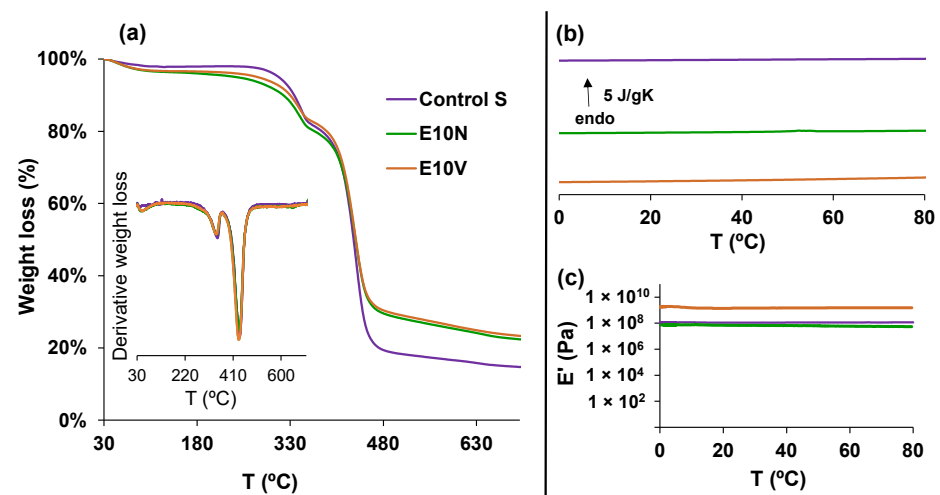


Figure 3. (a) Thermogravimetry (TGA) analysis. Weight loss and temperature derivative of the weight loss versus temperature. (b) Differential scanning calorimetry (DSC). Normalized heat flow

on heating at 20 °C/min. (c) Dynamic mechanical thermal analysis (DMTA). Storage modulus (E') vs. temperature at 1 Hz.

Dynamic mechanical thermal analysis (DMTA) was also carried out between 0 and 80 °C to study the mechanical properties. These results show that the treatment with NUTRIBIOLITE extract (E10N) hardly modified the storage modulus of the untreated fabric. However, the storage modulus increased from $1.1 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^6$ Pa to $1.52 \times 10^9 \pm 1.37 \times 10^8$ Pa after the treatment with the VITAFAIR extract (E10V). These different effects of the treatments with the NUTRIBIOLITE and VITAFAIR extracts on the mechanical properties could be related to the different additives present in both commercial products.

These results provide evidence that the treatment with the cranberry extracts affects both the thermal and mechanical performance of the fabric, although not in the same manner.

2.3. Antiviral Results

The results achieved with SARS-CoV-2 after 1 min of contact with the non-woven fabric treated with cranberry extracts and the controls are shown in Figure 4.

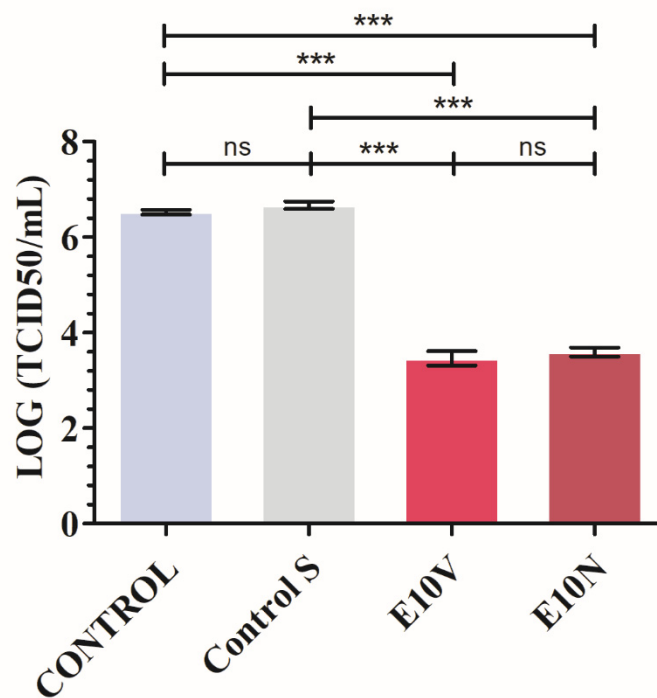


Figure 4. Reduction of infectious titers of SARS-CoV-2 after 1 min of contact evaluated by the median tissue culture infectious dose per mL (TCID50/mL) method. Viruses without being in contact with any fabric (CONTROL), untreated non-woven fabric (Control S), and non-woven fabric with a biofunctional coating of cranberry extracts of VITAFAIR (E10V) or NUTRIBIOLITE (E10N) at 1 min of viral contact. Three independent replicates ($n = 3$) were performed. Significant differences with respect to control were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons: *** $p > 0.001$; ns, not significant. Data are represented as means \pm SD.

By using non-woven fabric E10V and E10N, the median tissue culture infectious dose (TCID50) value was significantly reduced by a percentage of 99.91 ± 0.02 and 99.88 ± 0.02 , respectively. Prolonged contact of SARS-CoV-2 with non-woven fabric E10V and E10N may allow more virus inactivation. Similar experiments would be needed using other SARS-CoV-2 variants such as Delta, Kappa and Lambda. Therefore, the non-woven fabric E10V and E10N showed strong antiviral activity against SARS-CoV-2. The antiviral results performed with the bacteriophage phi 6 are shown in Figure 5.

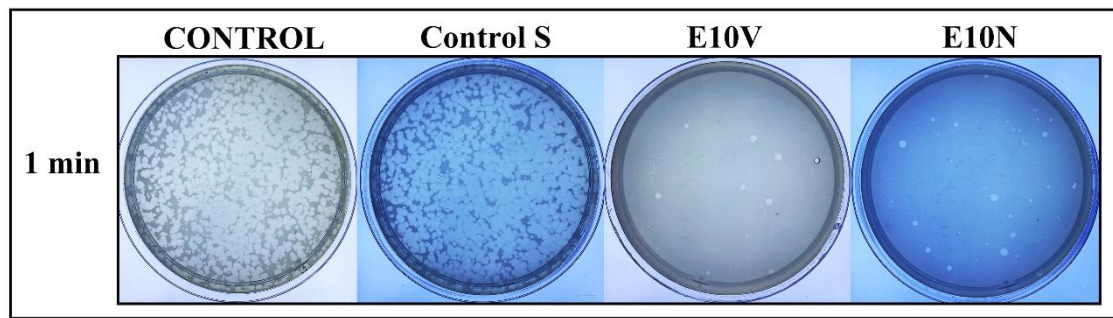


Figure 5. Bacteriophage phi 6 viability determined by the double-layer method. Titration images of undiluted samples for control, untreated non-woven fabric (Control S), and cranberry extract samples with biofunctional coating of cranberry extract of VITAFAIR (E10V) or NUTRIBIOLITE (E10N) at 1 min of viral contact. These images show that after the virus is in contact with the fabrics E10V and E10N for 1 min, most of them are inactivated, reducing very significantly the infection capacity (white spots).

Thus, the bacteriophage phi 6 loses infectivity after being in contact with both types of antimicrobial fabrics for 1 min and thus very few plaques are observed on the bacterial lawns. However, a similar amount of plaques is observed in the control and untreated fabric on the bacterial lawns after the same time of contact (see Figure 5). The phage titers in PFU/mL of each type of sample were calculated and compared with the control in log reductions (see Figure 6).

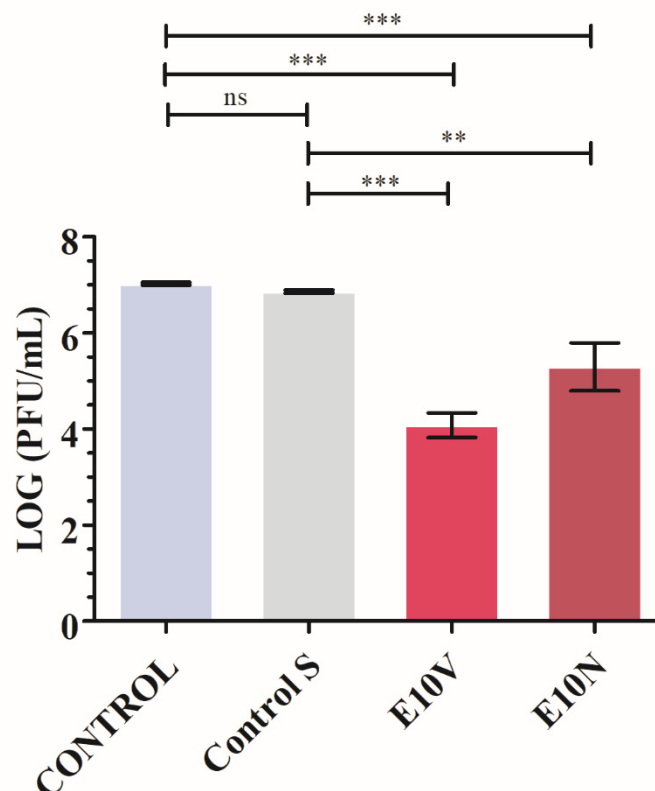


Figure 6. Reduction of infection titers of the bacteriophage phi 6 in logarithm of plaque-forming units per mL ($\log(\text{PFU}/\text{mL})$) and in PFU/mL measured by the double-layer method. Bacteriophages without being in contact with any fabric (CONTROL), untreated non-woven fabric (Control S), and non-woven fabric with biofunctional coating of cranberry extract of VITAFAIR (E10V) or NUTRIBIOLITE (E10N) at 1 min of viral contact. Three independent antiviral tests were performed in two different days ($n = 6$). Significant differences with respect to control were determined by one-

way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons: *** $p > 0.001$; ** $p > 0.01$; ns, not significant.

Figure 6 shows that the titers obtained by contacting the phages with the Control S for 1 min are similar to the CONTROL. However, the phages in contact with the fabrics containing cranberry extract (E10V and E10N) for 1 min displayed a statistically significant phage infectivity reduction of $99.87 \pm 0.07\%$ and $97.39 \pm 1.95\%$, respectively. Therefore, these results of SARS-CoV-2 and the bacteriophage phi 6 clearly show the potent antiviral activity of the cranberry extracts independently of the commercial brand confirming our first hypothesis of antiviral activity.

Cranberry extracts are well known for their pharmacological potential [42–45]. Furthermore, the natural product proanthocyanidins present in the cranberry extracts are widely used as cosmetic, suggesting a potential use as disinfectant for external use [46]. Su et al. showed the antiviral activity of the cranberry juice and PACs against different virus, including human enteric virus surrogates, murine norovirus, feline calicivirus, bacteriophage MS2 (ssRNA), and bacteriophage phiX-174 (ssDNA) [47]. They demonstrated a very significant reduction of virus titers after 1 h of viral contact with the cranberry juice and the PACs. However, in the present study, we have shown the inactivation of SARS-CoV-2 and bacteriophage phi 6 (about 99% of viral inactivation) in much lower time (1 min), because the goal of this project was to achieve a bio-based coating capable of inactivating enveloped viruses such as SAR-CoV-2 and bacteriophage phi 6 as fast as possible to provide higher protection in their application as infection prevention clothing such as face masks. This fast antiviral activity can be attributed to the high surface/volume ratio of these composite materials formed by coated fibers.

Regarding the antiviral mechanism of action, Mirandola et al. attributed the antiviral activity of the cranberry extracts against Hazara virus to the target of early stages of the viral replication cycle, including the initial adsorption to target cells [48]. There are different hypotheses about how cranberry extracts or the PACs affect viruses. The PACs could act by binding and destroying the viral capsid structure or could cause inhibition of key enzymes involved in viral replication [49]. A recent study on the discovery of SARS-CoV-2 channel inhibitors as antiviral candidates, has shown that PACs directly bound to 2-E channel with binding affinity (KD) of $22.14 \mu\text{M}$ in surface plasmon resonance assay [46]. In addition, some studies have shown that PACs exposure prevents some bacteriophages from attaching to their bacterial host [50].

2.4. Antibacterial Results

The antibacterial results obtained by the disc diffusion test are shown in Figure 7.

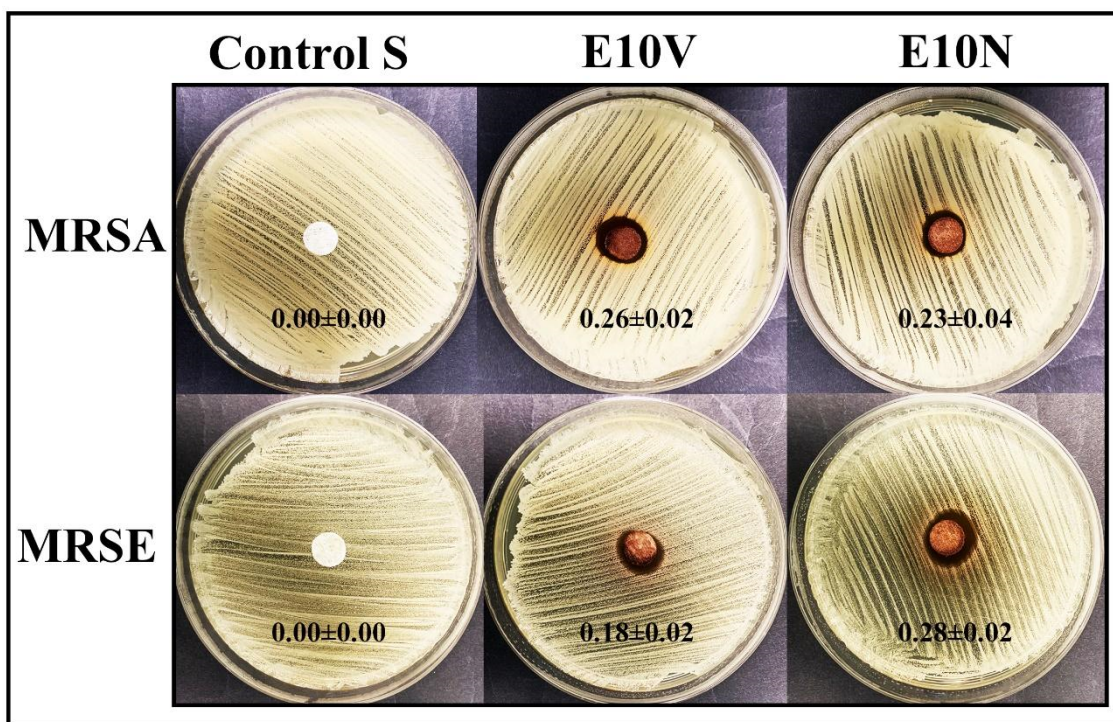


Figure 7. Agar disc diffusion tests with the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Control sample (Control S), and the fabrics treated by dip-coating with the two cranberry extracts: VITAFAIR (E10V) and NUTRIBIOLITE (E10N). Aerobic incubation for 24 h at 37 °C. The normalized widths of the antibacterial halos (nw_{halo}) calculated with equation (1) are shown as mean \pm standard on each image. These images show how the E10V and E10V fabric disks produce a significant bacterial inhibition zone around them after 24 h of bacterial culture.

Cranberry extracts and PACs can help to prevent and reduce the recurrence of urinary tract infections by decreasing bacterial adhesion [51]. Figure 7 shows that the E10V and E10N fabric possess potent antibacterial activity against both MRSA and MRSE pathogens. Treatment of *S. aureus* with cranberry extracts revealed a transcriptional signature typical of PG-acting antibiotics, that reveals inhibition of bacterial peptidoglycan biosynthesis [52]. Furthermore, it is well-known that cranberry extracts and PACs affect more Gram-negative bacteria than Gram-positive bacteria because they can more easily damage their membranes and walls [51].

Therefore, both non-woven fabrics with biofunctional coatings of cranberry extract showed potent antibacterial properties against MRSA and MRSE confirming our second hypothesis of antibacterial activity.

2.5. In Vivo Toxicity

In vivo toxicity was studied with the *C. elegans* model, which is a nematode that can be handled at low cost using standard in vitro techniques [53]. Two thirds of human proteins have *C. elegans* homologs, and about 80% of genes for human inborn errors of metabolism have *C. elegans* homologs [54,55]. It has also been described that *C. elegans* alimentary system has many facets that are comparable to that of mammals [56,57] and over 70% of human lipid genes are conserved in *C. elegans*, and 20% of *C. elegans* lipid genes are orthologs of human metabolic disease genes [58]. Moreover, *C. elegans*' genomics has been used to study human development and disease [54]. Furthermore, it presents fewer ethical problems and shares many genes and signaling pathways with humans. Unlike cytotoxicity assays, *C. elegans* toxicity tests provide data from a whole animal with intact and metabolically active digestive, reproductive, endocrine, sensory and neuromuscular systems [59]. Thus, survival rate, growth and reproduction of *C. elegans* was analyzed after an exposure of 24 h to the extracts of the antimicrobial fabrics (see

Figure 8). An exposure of 24 hours is long enough for their application for face masks manufacture because they should be worn for no longer than 4 h according to the recommendations of the World Health Organization (WHO) [60].

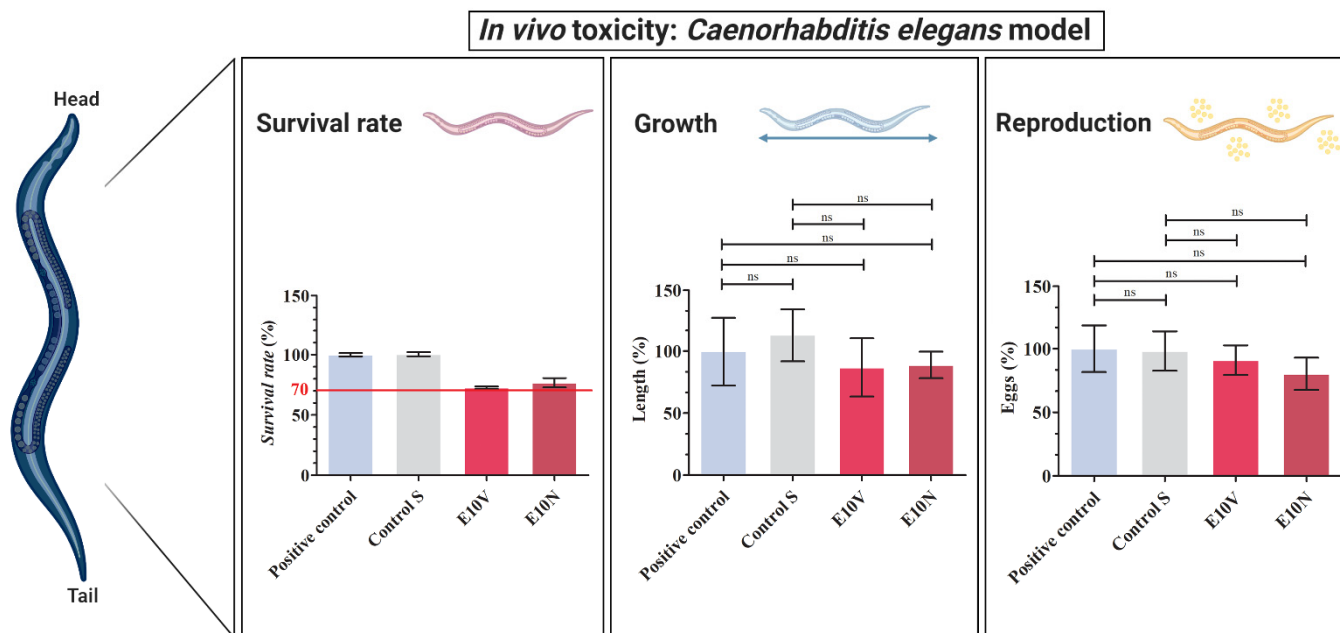


Figure 8. In vivo toxicity in *Caenorhabditis elegans* model: survival rate, growth and reproduction after exposure with the extracts of the untreated non-woven fabric (Control S), the extracts of the non-woven fabric treated with the VITAFAIR cranberry extract (E10V) and the extracts of the non-woven fabric treated with the NUTRIBIOLITE cranberry extract (E10N) with respect to the positive control (100%). Five independent replicates ($n = 5$) were conducted for this assay. Results are shown as mean \pm standard; Significant differences with respect to control were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons: ns, not significant.

Both antimicrobial fabrics (E10V and E10N) showed a survival reduction lower than 30% in comparison with *C.elegans* in the optimal growth conditions (positive control). Furthermore, the extracts of the E10V and E10V non-woven fabrics did not show any effect on growth or reproduction showing the nematodes similar length and number of eggs after 24 h of exposure. Therefore, these composite materials can be considered non-toxic, especially for infection prevention clothing applications where the materials are used outside the body. It is of note that the antimicrobial non-woven fabrics developed in this study have been produced with cranberries, which are natural and biodegradable products that can be easily grown and thus provide great promise in the fight against SARS-CoV-2. Thus, the fabrication procedure presented here can be used to produce many types of biobased face masks and other next-generation infection prevention clothing such as caps, scrubs, shirts, trousers, disposable gowns, overalls, hoods, aprons and shoe covers to inactivate enveloped viruses such as SARS-CoV-2 (see Figure 9).

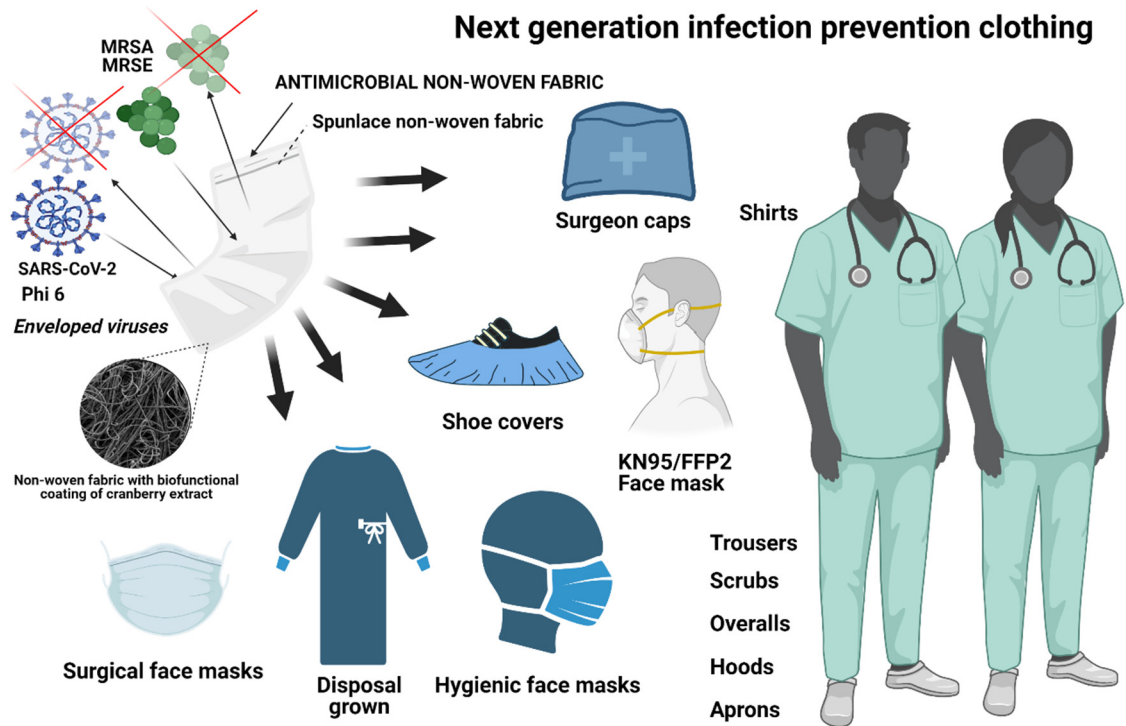


Figure 9. Antiviral infection prevention clothing produced with the developed antiviral low-cost technology capable of inactivating enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and phi 6, and the methicillin-resistant bacteria *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) bacteria. Created with BioRender.com.

3. Materials and Methods

3.1. Fabric Preparation

Cranberry extracts with a concentration of 10% *w/v* were prepared using ethanol as extracting solvent and two different types of commercial cranberry powders of *Vaccinium macrocarpon*: VITAFAIR (Whitewall GmbH, Berlin, Germany) and NUTRIBIOLITE (Urtractin, Valladolid, Spain). According to the VITAFAIR and NUTRIBIOLITE manufacturers, the cranberry powders have a proanthocyanidins content of 25 and 30% *w/w*, respectively. Thus, 10 g of cranberry powder was mixed with 100 mL of absolute ethanol ($\geq 99.8\%$, AnalaR Normapur, VWR chemicals, Radnor, PA, USA) under magnetic stirring for 30 min at 24 ± 1 °C sealed with parafilm. After that, the extract was left overnight to decant the solid phase. After 12 h, the supernatant was centrifuged at 10,000 r.p.m. ($16,993 \times g$) in a Centrifuge Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 30 min to ensure complete phase separation of the liquid cranberry extract from the solid phase. After centrifugation, extract was left overnight to decant possible solid phase remaining. The day after, supernatant was removed with a 25 mL serological pipette (LABCLINICS, Barcelona, Spain) and filtered with a non-sterile 0.2 μm filter. After filtering, extract was centrifuged again at 10,000 r.p.m. ($16,993 \times g$) for 30 min to ensure complete solid phase separation from the liquid phase. Thus, commercial non-woven spunlace fabric (NV EVOLUTIA, Valencia, Spain) was prepared in the form of discs of approximately 10 mm in diameter. After that, they were treated with the two different cranberry extracts by the dip-coating method [61]. Thus, the non-woven fabrics were immersed in the cranberry extracts (10% *w/v*) solutions for 30 min at 24 ± 1 °C sealed with parafilm. After that, the prepared samples were dried at 60 °C for 48 h to solidify the physically absorbed cranberry extract to form the coating and ensure complete evaporation of the ethanol phase. The non-woven fabrics treated with VITAFAIR and NUTRIBIOLITE cranberry extracts will be named hereafter as E10V and E10N, respectively. The discs were sterilized by ultraviolet radiation for one hour per side. Discs prepared from the non-woven fabrics treated with only the absolute ethanol ($\geq 99.8\%$,

AnalaR Normapur, VWR chemicals, Radnor, PA, USA) solvent under magnetic stirring for 30 min at 24 ± 1 °C (Control S) were prepared as reference material.

3.2. Physicochemical Characterization

3.2.1. Fabric Morphology

The morphology of the non-woven fabrics treated with and without cranberry extracts was observed by optical microscopy (Motic BA410E) and was photographed at 10× and 40× magnifications with the Moticam 580 5.0MP. The images were processed by the Motic Images Plus 3.0 software (Motic, Barcelona, Spain). Macroscopic photographs of the fabrics were also performed with a 64MP Xiaomi camera with a Sony IMX682 sensor and a f/1.89 opening. Scanning electron microscopy was used to analyze in greater detail the morphology of the fibers of the non-woven fabric (porous structure). Untreated and treated non-woven fabrics samples were observed at a magnification of ×100 and ×1000 with a GeminiSEM 500 high-resolution field-emission scanning electron microscope (HR-FESEM) (Zeiss-Oxford Instruments, Abingdon, UK) with an accelerating voltage of 1.5 kV. The samples were previously coated with a platinum layer by an EM MED020 sputter coater (Leica).

3.2.2. Thermal Degradation and Thermal Behavior

Thermal gravimetric analysis (TGA) was carried out on a Mettler Toledo TGA 2 (SF system) (Mettler Toledo, Columbus, USA). Dried samples (between 5–10 mg) were placed on the balance and the weight loss of the sample was measured as a function of temperature. The samples (~10 mg) were heated from 25 to 700 °C at a heating rate of 20 °C/min.

Differential scanning calorimetry (DSC) was performed on a PerkinElmer DSC 8000 (PerkinElmer, Waltham, USA) under a flowing nitrogen atmosphere on samples between 5 and 10 mg. Vacuum-dried samples were subjected to a cooling scan down to 0 °C, followed by a heating scan up to 80 °C, both at a rate of 20 °C/min.

3.2.3. Mechanical Properties

Dynamic mechanical thermal analysis was carried out with a DMA 8000 (PerkinElmer, Waltham, USA) at a frequency of 1 Hz on sample bars ($20 \times 5 \times 0.01$ mm). The temperature dependence of the storage modulus (E'), loss modulus (E''), and loss tangent ($\tan \delta$) was measured in the temperature range 0 to 80 °C at a heating rate of 3 °C/min under nitrogen atmosphere. Three independent experiments were performed to ensure reproducible results.

3.3. Antiviral Test against SARS-CoV-2

The SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027) was provided by Dr. Tomohiko Takasaki and Dr. Jun-Ichi Sakuragi (Kanagawa Prefectural Institute of Public Health). A volume of 100 µL of a SARS-CoV-2 suspension in phosphate buffered saline (PBS) was added to each disc at a titer dose of 5.0×10^6 TCID₅₀/disc, and then incubated for 1 min at room temperature. A volume of 900 µL PBS was added to each disc (Control S, E10V and E10N), and then vortexed for 5 min. After that, each disc was vortexed for 5 min. Briefly, TMPRSS2/Vero cells (JCRB1818, JCRB Cell Bank, Osaka, Japan) were cultured with the Minimum Essential Media (MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (P/S) on the 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were serially diluted 10-fold from 10^{-1} to 10^{-8} in the MEM containing 5% FBS and 1% P/S. Dilutions were placed onto the TMPRSS2/Vero cells in triplicate and incubated at 37 °C for 96 h. Cytopathic effects were evaluated under a microscope. TCID₅₀/mL were calculated using the Reed-Muench method. The SARS-CoV-2 infection experiments were conducted at a Biosafety Level 3 laboratory at Kyoto University. Three independent replicates ($n = 3$) were performed for this assay.

3.4. Antiviral Test against Bacteriophage Phi6

Pseudomonas syringae (DSM 21482) is the host of the bacteriophage phi 6. This Gram-negative bacterium was purchased from the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell cultures GmbH (Braunschweig, Germany). This microorganism was cultured in solid tryptic soy agar (TSA, Liofilchem, Teramo, Italy) and, after that, in liquid tryptic soy broth (TSB, Liofilchem, Teramo, Italy) at a speed of 120 r.p.m. at 25 °C. The Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH specifications were followed to propagate the bacteriophage phi 6 (DSM 21518). The antiviral assay was performed with a dispersion of 50 µL of TSB with phages placed onto each sample (Control S, E10V and E10N) at a titer of approximately 1×10^6 plaque-forming units per mL (PFU/mL) and incubated for 1 min. A falcon tube was used to place each disc with 10 mL TSB to be sonicated and vortexed for 5 and 1 min, respectively, at ambient temperature (24 ± 1 °C). Phage titration by serial dilutions of each falcon sample was performed and 100 µL of each phage dilution was mixed with 100 µL of the bacterial host at $OD_{600nm} = 0.5$. The infective capacity of the bacteriophage phi 6 was analyzed based on the double-layer method [62]. Thus, a volume of 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlau) and 5 mM calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to the phage dispersion mixed with the bacteria, and then poured on TSA plates for incubation for 18–24 h in a refrigerated oven at 25 °C. Phage titers in PFU/mL of each sample were compared with control (CONTROL), which consisted of 50 µL of phage added directly to the bacterial culture without being in contact with any type of disc and without the sonication/vortexing treatment. The antiviral activity of the discs coated with cranberry extract or not was determined at 1 min of contact with the bacteriophage phi 6 in log reductions of titers. It was made sure that the sonication/vortexing treatment did not affect the infectious activity of the bacteriophage phi 6 and that the residual disinfectants of the titrated samples did not interfere with the titration process. Three independent antiviral tests were performed in two different days ($n = 6$) to ensure reproducibility.

3.5. Antibacterial Tests

Lawns of MRSA, COL [63], and MRSE, RP62A [64], were used to perform the antibacterial assays by the agar disc diffusion tests [65,66] at a concentration of approximately 1.5×10^8 colony forming units per mL (CFU/mL) in tryptic soy broth, and then cultivated on trypticase soy agar plates. Incubation was performed aerobically at 37 °C for 24 h with the sterilized samples treated with (E10V and E10N) and without cranberry extract (Control S) placed upon them. The inhibition zone (or halo) was normalized according to Equation (1) [65].

$$nw_{halo} = \frac{d_{iz} - d}{2d} \quad (1)$$

In this equation, nw_{halo} expresses the normalized width value of the antibacterial inhibition zone, d_{iz} indicates the diameter of the inhibition zone and the term d represents the diameter of the disc. The diameter of the disc was measured by image software analysis (Image J, Wayne Rasband (NIH), USA, Bethesda, MD, USA). Three independent antibacterial assays were performed in two different days ($n = 6$) to provide reproducible results.

3.6. In Vivo Toxicity Tests

In vivo toxicity was studied in the *Caenorhabditis elegans* model. Extractions from the non-woven fabrics with (Control S) and without (E10V and E10N) cranberry extract treatment were accomplished following the ISO-10993 standard recommendations. Thus, spunlace fabrics treated with and without cranberry extracts were subjected to sterilization under ultraviolet light (1 h per side). A 6-well plate was used to place every piece of fabric into a well with 2 mL of potassium medium (2.36 g potassium chloride, 3 g sodium chloride in 1 L distilled water, autoclaved). A volume ratio of 0.1g/mL was selected according to the ISO-10993 that recommends this rate for irregular porous

materials of low density such as textiles. After incubating for 24 h at 25 °C, extracts were collected in 1.5 mL eppendorf tubes. The worms were maintained and propagated on OP50 *E. coli* seeded nematode growth medium (NGM) prepared according to Stiernagle, T. [67] at 25 °C. An N2 strain was used in these experiments, provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC, Minneapolis, MN, USA). The worms and eggs were washed off NGM plates using 5 mL of distilled water and collected in 15 mL falcon tubes to prepare an L1 stage-synchronized *C. elegans* population. Tubes were centrifuged at 1300 r.p.m. (2209× *g*) for 3 min and supernatant was moved away. *C. elegans*' pellet was resuspended in 100 µL of dH₂O and transferred to eppendorf tubes adding 700 µL of a 5% bleaching solution. This mixture was incubated for 15 min while vortexing every 2 min. After the last vortexing procedure, eppendorf tubes were centrifuged at 700× *g* for 3 min. Supernatant was moved away, and the pellet was washed in 800 µL of dH₂O. This step was carried out two more times. After the last washing step, the pellet was resuspended in 100 µL of dH₂O and transferred to NGM plates seeded with 100 µL of an OP50 *E. coli* culture. Eggs were incubated for 72 h at 25 °C. Centrifugation at 1300 r.p.m. (2209× *g*) for 3 min was performed to pellet the L1 staged populations and subsequent resuspension in 3 mL of potassium medium was performed. A 48-well plate was used to prepared wells with 62.5 µL of a 1:250 suspension of cholesterol (5 mg/mL in ethyl alcohol) in sterile potassium medium, 62.5 µL of a 50× concentrated OP50 *E. coli* culture with an OD of 0.9, pelleted by centrifugation at 4000 r.p.m. (6797× *g*) for 10 min and resuspended in potassium medium, 115 µL of potassium medium and 250 µL of the pertinent cranberries extract. A volume of K medium containing 50–100 worms was then added. 48-well plates were sealed with parafilm and placed in an orbital shaker at 25 °C and 120 r.p.m. for 24 h. In order to determine the survival rate of *C. elegans*, the volume of each well of the 48-well plates was divided in 10 drops of 50 µL and placed under the microscope (Motic BA410E including Moticam 580 5.0MP) in order to count the number of living *C. elegans* and deceased ones. The growth in the medium and in bleach were used as a positive and negative control, respectively. To analyze reproduction, three worms were placed into a new OP50 seeded NGM plate and allowed to lay eggs for 48 h. Then, eggs were counted by using the microscope. Growth was assessed in heat-killed samples by measurement the body length in a picture taken under the microscope with Motic Images Plus 3.0 software. Five independent replicates (*n* = 5) were conducted for this assay.

3.7. Statistical Analysis

The ANOVA statistical analysis followed by Tukey's post hoc test (* *p* > 0.05, *** *p* > 0.001) was performed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Three independent replicates (*n* = 3), three independent antiviral tests in two different days (*n* = 6) and five independent replicates (*n* = 5) were performed for the TCID₅₀ assay, the double-layer method, and the in vivo assay, respectively.

4. Conclusions

Two different non-woven fabrics have been developed with two types of commercial biobased cranberry extracts by dip-coating. Both composite fabrics showed no toxicity in a *Caenorhabditis elegans* in vivo model and high antiviral activity (about 99% of viral inactivation) against both enveloped viruses SARS-CoV-2 and bacteriophage phi 6 after just one min of contact. Since cranberry extracts have also exhibited antiviral activity against other enveloped viruses such as HSV-1, HSV-2, and IFV, the idea that PACs produce strong alterations of their envelope glycoproteins achieving their inactivation is becoming more and more consistent. Furthermore, the non-woven antiviral fabrics showed potent antimicrobial activity against the Gram-positive methicillin-resistant bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Optical and electron microscopy did not show any significant changes of morphology of the neat fabric after the dip-coating treatment. However, the treatment with the extracts somehow affected both the thermal and mechanical performance of the neat fabric depending on the type of

commercial extract used. Therefore, further research could elucidate natural and biodegradable broad-spectrum treatments for the next generation of infection prevention clothing in the current COVID-19 pandemic and for future microbial threats.

Author Contributions: Á.S.A. and M.M. conceived the idea of this work; conceptualization, methodology, validation and formal analysis: R.S.i.S., M.M., K.T. and Á.S.-A.; software: R.S.i.S., K.T. and Á.S.-A.; investigation: A.T.-M., A.C.-V., M.M., Y.M., T.N., J.L.A.-C., R.S.i.S., K.T. and Á.S.-A.; resources: R.S.i.S., M.M., K.T. and Á.S.-A.; data curation, R.S.i.S., A.T.-M., A.C.-V., K.T., J.L.A.-C. and Á.S.-A.; visualization: R.S.i.S., K.T. and Á.S.-A.; writing—original draft preparation: Á.S.-A.; writing—review and editing: R.S.i.S., A.T.-M., A.C.-V., M.M., K.T. and Á.S.-A.; supervision, R.S.i.S., M.M., K.T. and Á.S.-A.; project administration, Á.S.-A.; funding acquisition, R.S.i.S., K.T. and Á.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Grant 2020-231-006UCV and by the Ministerio de Ciencia e Innovación: project PID2020-119333RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 (awarded to Á.S.-A.) and project RTI2018-097862-B-C21 (awarded to R.S.i.S. including FEDER funding). CIBER-BBN is an initiative funded by the VI National R&D&I Plan 2008–2011, Iniciativa Ingenio 2010, Consolider Program. CIBER Actions are financed by the Instituto de Salud Carlos III with assistance from the European Regional Development Fund. This research was also supported by grants from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) (20fk0108533h0001), and the JST Core Research for Evolutional Science and Technology (JPMJCR20HA). This work was supported by the Joint Usage/Research Center program of Institute for Frontier Life and Medical Sciences Kyoto University.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Japan Agency for Medical Research and Development for their financial support. We would like to thank Yoshio Koyanagi and Kazuya Shimura (Kyoto University) for the setup and operation of the BSL-3 laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Corman, V.M.; Muth, D.; Niemeyer, D.; Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*; 2018; Volume 100, pp. 163–188.
2. Yang, X.; Yu, Y.; Xu, J.; Shu, H.; Xia, J.; Liu, H.; Wu, Y.; Zhang, L.; Yu, Z.; Fang, M.; et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 475–481.
3. Hassan, S.S.; Attrish, D.; Ghosh, S.; Choudhury, P.P.; Uversky, V.N.; Aljabali, A.A.A.; Lundstrom, K.; Uhal, B.D.; Rezaei, N.; Seyran, M.; et al. Notable sequence homology of the ORF10 protein introspects the architecture of SARS-CoV-2. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *181*, 801–809.
4. Hassan, S.S.; Aljabali, A.A.A.; Panda, P.K.; Ghosh, S.; Attrish, D.; Choudhury, P.P.; Seyran, M.; Pizzol, D.; Adadi, P.; Abd El-Aziz, T.M.; et al. A unique view of SARS-COV-2 through the lens of ORF8 protein. *Comput. Biol. Med.* **2021**, *133*, 104380.
5. Vellingiri, B.; Jayaramayya, K.; Iyer, M.; Narayanasamy, A.; Govindasamy, V.; Giridharan, B.; Ganesan, S.; Venugopal, A.; Venkatesan, D.; Ganesan, H.; et al. COVID-19: A promising cure for the global panic. *Sci. Total Environ.* **2020**, *725*, 138277.
6. American Lung Association. Learn About Pneumonia. Chicago, IL, USA. Available online: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/pneumonia/learn-about-pneumonia#:~:text=What%20is%20Pneumonia%3F,to%20get%20into%20your%20bloodstream>. (accessed on 23 November 2021).
7. Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* **2020**, *87*, 281–286.
8. Bai, Y.; Yao, L.; Wei, T.; Tian, F.; Jin, D.Y.; Chen, L.; Wang, M. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1406–1407.
9. Wang, L.; Didelot, X.; Yang, J.; Wong, G.; Shi, Y.; Liu, W.; Gao, G.F.; Bi, Y. Inference of person-to-person transmission of COVID-19 reveals hidden super-spreading events during the early outbreak phase. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5006, 1–6.
10. Liu, Y.; Ning, Z.; Chen, Y.; Guo, M.; Liu, Y.; Gali, N.K.; Sun, L.; Duan, Y.; Cai, J.; Westerdahl, D.; et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature* **2020**, *582*, 557–560.

11. Richard, M.; Kok, A.; de Meulder, D.; Bestebroer, T.M.; Lamers, M.M.; Okba, N.M.A.; Fentener van Vlissingen, M.; Rockx, B.; Haagmans, B.L.; Koopmans, M.P.G.; et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3496, 1–6.
12. Morawska, L.; Cao, J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ. Int.* **2020**, *139*, 105730.
13. Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 434–435.
14. Seyran, M.; Takayama, K.; Uversky, V.N.; Lundstrom, K.; Palù, G.; Sherchan, S.P.; Attrish, D.; Rezaei, N.; Aljabali, A.A.A.; Ghosh, S.; et al. The structural basis of accelerated host cell entry by SARS-CoV-2. *FEBS J.* **2020**, *288*, 5010–5020.
15. Hassan, S.S.; Ghosh, S.; Attrish, D.; Choudhury, P.P.; Aljabali, A.A.A.; Uhal, B.D.; Lundstrom, K.; Rezaei, N.; Uversky, V.N.; Seyran, M.; et al. Possible Transmission Flow of SARS-CoV-2 Based on ACE2 Features. *Molecules* **2020**, *25*, 5906.
16. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241.
17. Zelikin, A.N.; Stellacci, F. Broad-Spectrum Antiviral Agents Based on Multivalent Inhibitors of Viral Infectivity. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2001433.
18. Ruiz-Hitzky, E.; Darder, M.; Wicklein, B.; Ruiz-Garcia, C.; Martín-Sampedro, R.; del Real, G.; Aranda, P. Nanotechnology Responses to COVID-19. *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, 2000979.
19. Ho, W.; Gao, M.; Li, F.; Li, Z.; Zhang, X.Q.; Xu, X. Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2001812.
20. Mehta, A.; Michler, T.; Merkel, O.M. siRNA Therapeutics against Respiratory Viral Infections—What Have We Learned for Potential COVID-19 Therapies? *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2001650.
21. Dobrowolski, C.; Paunovska, K.; Hatit, M.Z.C.; Lokugamage, M.P.; Dahlman, J.E. Therapeutic RNA Delivery for COVID and Other Diseases. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2002022.
22. Vu, M.N.; Kelly, H.G.; Tan, H.X.; Juno, J.A.; Esterbauer, R.; Davis, T.P.; Truong, N.P.; Wheatley, A.K.; Kent, S.J. Hemagglutinin Functionalized Liposomal Vaccines Enhance Germinal Center and Follicular Helper T Cell Immunity. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2002142.
23. Xiao, Y.; Torok, M.E. Taking the right measures to control COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 523–524.
24. Tuñón-Molina, A.; Takayama, K.; Redwan, E.M.; Uversky, V.N.; Andrés, J.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Masks: Current Status and Future Trends. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**. DOI: 10.1021/acsami.1c12227
25. Chin, A.W.H.; Chu, J.T.S.; Perera, M.R.A.; Hui, K.P.Y.; Yen, H.-L.; Chan, M.C.W.; Peiris, M.; Poon, L.L.M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e10.
26. Martí, M.; Tuñón-Molina, A.; Aachmann, F.L.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Polymers* **2021**, *13*, 207.
27. Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9518.
28. Cano-Vicent, A.; Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antiviral face mask functionalized with solidified hand soap: Low-cost infection prevention clothing against enveloped viruses such as SARS-CoV-2. *ACS Omega* **2021**, *6*, 23495–23503.
29. Serrano-Aroca, Á.; Takayama, K.; Tuñón-Molina, A.; Seyran, M.; Hassan, S.S.; Pal Choudhury, P.; Uversky, V.N.; Lundstrom, K.; Adadi, P.; Palù, G.; et al. Carbon-Based Nanomaterials: Promising Antiviral Agents to Combat COVID-19 in the Microbial-Resistant Era. *ACS Nano* **2021**, *15*, 8069–8086.
30. Sanmartín-Santos, I.; Gandía-Llop, S.; Salesa, B.; Martí, M.; Lillelund Aachmann, F.; Serrano-Aroca, Á. Enhancement of Antimicrobial Activity of Alginate Films with a Low Amount of Carbon Nanofibers (0.1% w/w). *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2311.
31. Serrano-Aroca, Á.; Ferrandis-Montesinos, M.; Wang, R. Antiviral Properties of Alginate-Based Biomaterials: Promising Antiviral Agents against SARS-CoV-2. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 5897–5907.
32. Lukanini, A.; Terlizzi, M.E.; Catucci, G.; Gilardi, G.; Maffei, M.E.; Gribaudo, G. The cranberry extract oximacro® exerts in vitro virucidal activity against influenza virus by interfering with hemagglutinin. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1826.
33. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6.
34. Su, I.C.; Lee, K.L.; Liu, H.Y.; Chuang, H.C.; Chen, L.Y.; Lee, Y.J. Severe community-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* coinfection in an influenza A(H1N1)pdm09 patient. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 365–366.
35. Chou, C.C.; Shen, C.F.; Chen, S.J.; Chen, H.M.; Wang, Y.C.; Chang, W.S.; Chang, Y.T.; Chen, W.Y.; Huang, C.Y.; Kuo, C.C.; et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 172–199.
36. Lee, J.Y.; Yang, P.C.; Chang, C.; Lin, I.T.; Ko, W.C.; Cia, C.T. Community-acquired adenoviral and pneumococcal pneumonia complicated by pulmonary aspergillosis in an immunocompetent adult. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 838–839.
37. Albrich, W.C.; Rassouli, F.; Waldeck, F.; Berger, C.; Baty, F. Influence of Older Age and Other Risk Factors on Pneumonia Hospitalization in Switzerland in the Pneumococcal Vaccine Era. *Front. Med.* **2019**, *6*, 286.
38. Feikin, D.R.; Schuchat, A.; Kolczak, M.; Barrett, N.L.; Harrison, L.H.; Lefkowitz, L.; McGeer, A.; Farley, M.M.; Vugia, D.J.; Lexau, C.; et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995–1997. *Am. J. Public Health* **2000**, *90*, 223–229.

39. Huttner, B.; Cappello, B.; Cooke, G.; Gandra, S.; Harbarth, S.; Imi, M.; Loeb, M.; Mendelson, M.; Moja, L.; Pulcini, C.; et al. 2019 community-acquired pneumonia treatment guidelines: There is a need for a change toward more parsimonious antibiotic use. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*, 1315–1316.
40. Howell, A.B.; Reed, J.D.; Krueger, C.G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D.G.; Leahy, M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2281–2291.
41. Rane, H.S.; Bernardo, S.M.; Howell, A.B.; Lee, S.A. Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 428–436.
42. Howell, A.B. Update on health benefits of cranberry and blueberry. *Acta Hort.* **2009**, *810*, 779–784, doi:10.17660/actahortic.2009.810.104.
43. Su, X.; Howell, A.B.; D'Souza, D.H. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates—A time dependence study in vitro. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 985–991, doi:10.1016/j.fm.2010.05.027.
44. Santhi, V.P.; Sriramavaratharajan, V.; Murugan, R.; Masilamani, P.; Gurav, S.S.; Sarasu, V.P.; Parthiban, S.; Ayyanar, M. Edible fruit extracts and fruit juices as potential source of antiviral agents: A review. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 5181–5190.
45. Su, X.; Sangster, M.Y.; D'Souza, D.H. In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral surrogates. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 1473–1479, doi:10.1089/fpd.2010.0583.
46. Wang, Y.; Fang, S.; Wu, Y.; Cheng, X.; Zhang, L. ke; Shen, X. rui; Li, S. qu; Xu, J. rong; Shang, W. juan; Gao, Z. bing; et al. Discovery of SARS-CoV-2-E channel inhibitors as antiviral candidates. *Acta Pharmacol. Sin.* **2021**, *42*, 1–7, doi:10.1038/s41401-021-00732-2.
47. Su, X.; Howell, A.B.; D'Souza, D.H. The effect of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on the infectivity of human enteric viral surrogates. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 535–540, doi:10.1016/j.fm.2010.01.001.
48. Mirandola, M.; Salvati, M.V.; Rodigari, C.; Appelberg, K.S.; Mirazimi, A.; Maffei, M.E.; Gribaudo, G.; Salata, C. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract impairs nairovirus infection by inhibiting the attachment to target cells. *Pathogens* **2021**, *10*, 1025, doi:10.3390/pathogens10081025.
49. Cannon, J.L.; Papafragkou, E.; Park, G.W.; Osborne, J.; Jaykus, L.A.; Vinjé, J. Surrogates for the study, of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2761–2765, doi:10.4315/0362-028X-69.11.2761.
50. Lipson, S.M.; Sethi, L.; Cohen, P.; Gordon, R.E.; Tan, I.P.; Burdowski, A.; Stotzky, G. Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 23–30, doi:10.1016/j.phymed.2006.11.009.
51. Wu, V.C.H.; Qiu, X.; Bushway, A.; Harper, L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT—Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1834–1841, doi:10.1016/j.lwt.2008.01.001.
52. Diarra, M.S.; Block, G.; Rempel, H.; Oomah, B.D.; Harrison, J.; McCallum, J.; Boulanger, S.; Brouilletter, É.; Gattuso, M.; Malouin, F. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with β -lactams against *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 90, doi: 10.1186/1472-6882-13-90.
53. Hunt, P.R. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.* **2017**, *37*, 50–59.
54. Kuwabara, P.E.; O'Neil, N. The use of functional genomics in *C. elegans* for studying human development and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2001**, *24*, 127–138.
55. Sonnhammer, E.L.L.; Durbin, R. Analysis of Protein Domain Families in *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **1997**, *46*, 200–216. <https://doi.org/10.1006/GENO.1997.4989>.
56. Chauhan, V.M.; Orsi, G.; Brown, A.; Pritchard, D.I.; Aylott, J.W. Mapping the pharyngeal and intestinal pH of *Caenorhabditis elegans* and real-time luminal pH oscillations using extended dynamic range pH-sensitive nanosensors. *ACS Nano* **2013**, *7*, 5577–5587.
57. Stutz, K.; Kaech, A.; Aebi, M.; Künzler, M.; Hengartner, M.O. Disruption of the *C. elegans* Intestinal Brush Border by the Fungal Lectin CCL2 Phenocopies Dietary Lectin Toxicity in Mammals. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0129381.
58. Zhang, Y.; Zou, X.; Ding, Y.; Wang, H.; Wu, X.; Liang, B. Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 164.
59. Yin, J.; Hong, X.; Ma, L.; Liu, R.; Bu, Y. Non-targeted metabolomic profiling of atrazine in *Caenorhabditis elegans* using UHPLC-QE Orbitrap/MS. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *206*, 111170.
60. WHO, Rational Use of Personal Protective Equipment (PPE) for Coronavirus Disease (COVID-19)-Interim Guidance 19 March 2020. Available online: <https://covid19-evidence.paho.org/handle/20.500.12663/840> (accessed on 10 November 2021).
61. Zhang, J.; Li, B.; Wu, L.; Wang, A. Facile preparation of durable and robust superhydrophobic textiles by dip coating in nanocomposite solution of organosilanes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11509–11511.
62. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 69–76.
63. Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; DeBoy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2426–2438.
64. Christensen, G.D.; Bisno, A.L.; Parisi, J.T.; McLaughlin, B.; Hester, M.G.; Luther, R.W. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Intern. Med.* **1982**, *96*, 1–10.
65. Martí, M.; Frígols, B.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications. *J. Vis. Exp.* **2018**, *138*, e57710.

66. Shao, W.; Liu, H.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, J.; Zhang, R.; Min, H.; Huang, M. Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 351–358.
67. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook 2006*, 1-11. DOI:10.1895/wormbook.1.101.1. <http://www.wormbook.org>.

13. ANEXO IV

A. Tuñón-Molina, M. Martí, Y. Muramoto, T. Noda, K. Takayama, Á. Serrano-Aroca, Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 9518. 22 (2021) 9518.



Article

Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria

Alberto Tuñón-Molina ^{1,†} , Miguel Martí ^{1,†} , Yukiko Muramoto ² , Takeshi Noda ² , Kazuo Takayama ^{3,*} and Ángel Serrano-Aroca ^{1,*}

- ¹ Biomaterials and Bioengineering Lab., Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, c/Guillem de Castro 94, 46001 Valencia, Spain; alberto.tunon@ucv.es (A.T.-M.); miguel.marti@ucv.es (M.M.)
- ² Laboratory of Ultrastructural Virology, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; muramo@infront.kyoto-u.ac.jp (Y.M.); t-noda@infront.kyoto-u.ac.jp (T.N.)
- ³ Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan
- * Correspondence: kazuotakayama@cira.kyoto-u.ac.jp (K.T.); angel.serrano@ucv.es (Á.S.-A.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Transparent materials used for facial protection equipment provide protection against microbial infections caused by viruses and bacteria, including multidrug-resistant strains. However, transparent materials used for this type of application are made of materials that do not possess antimicrobial activity. They just avoid direct contact between the person and the biological agent. Therefore, healthy people can become infected through contact of the contaminated material surfaces and this equipment constitute an increasing source of infectious biological waste. Furthermore, infected people can transmit microbial infections easily because the protective equipment do not inactivate the microbial load generated while breathing, sneezing or coughing. In this regard, the goal of this work consisted of fabricating a transparent face shield with intrinsic antimicrobial activity that could provide extra-protection against infectious agents and reduce the generation of infectious waste. Thus, a single-use transparent antimicrobial face shield composed of polyethylene terephthalate and an antimicrobial coating of benzalkonium chloride has been developed for the next generation of facial protective equipment. The antimicrobial coating was analyzed by atomic force microscopy and field emission scanning electron microscopy with elemental analysis. This is the first facial transparent protective material capable of inactivating enveloped viruses such as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in less than one minute of contact, and the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Bacterial infections contribute to severe pneumonia associated with the SARS-CoV-2 infection, and their resistance to antibiotics is increasing. Our extra protective broad-spectrum antimicrobial composite material could also be applied for the fabrication of other facial protective tools such as such as goggles, helmets, plastic masks and space separation screens used for counters or vehicles. This low-cost technology would be very useful to combat the current pandemic and protect health care workers from multidrug-resistant infections in developed and underdeveloped countries.

Keywords: face shield; facial protective equipment; SARS-CoV-2; phage phi 6; MRSA; MRSE; polyethylene terephthalate; benzalkonium chloride; COVID-19; multidrug-resistant bacteria



Citation: Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9518. <https://doi.org/10.3390/ijms22179518>

Academic Editor: Sotiris Hadjidakou

Received: 13 August 2021

Accepted: 24 August 2021

Published: 1 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Even though the severe lockdowns carried out in many countries of the world, the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is still increasing the number of global deaths in most countries [1–3]. The causative agent of this disease is the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is an enveloped positive-sense

single-stranded RNA virus [4] that belongs to the IV Baltimore group [5]. SARS-CoV-2 causes atypical viral pneumonia [6,7] which death risk increases by co-infection with bacteria such as *Streptococcus pneumoniae* [8–11].

The emergence of highly pathogenic viruses, such as SARS-CoV-2, that can co-infect with other viruses or bacteria [12], including antibiotic-resistant strains, constitutes one of the most current threatening to humans in this century. Additionally, bacterial resistance to antibiotics in pneumonia treatment is increasing at an alarming rate [13,14]. SARS-CoV-2 showed high stability in different material surfaces, including the surface of metals, plastics and cardboard [15–19]. Therefore, in addition to the aerosol transmission route, SARS-CoV-2 can be transmitted by contact with material surfaces contaminated with this pathogen [15–20]. In fact, it can spread faster than its two ancestors SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome coronavirus [21] through coughing, sneezing, touching or breathing [22] and more easily through asymptomatic carriers [23,24].

Influenza virus (IFV) affects the nasal mucosa in the course of infections that simultaneously affect other sectors of the respiratory tract, including the lower tract [25]. IFV is also an enveloped single-stranded RNA virus-like SARS-CoV-2 [26]. Another important global risk is caused by respiratory infections caused by bacteria such as *S. pneumoniae* that is the most frequently isolated organism with the highest mortality [27]. This pathogen is the cause of many respiratory processes such as pneumonia, otitis, sinusitis, complicated with sepsis, meningitis and abscesses [28,29]. Apart from the therapeutic therapies aimed at combating these diseases and in those cases in which there are no effective therapies for the treatment of the infections caused by these pathogens, facial protection equipment acquires great importance. Facial protection equipment against infectious biological agents includes those with eye and/or respiratory protection (nose and mouth) to prevent the entry of microorganisms, splashes and biological aerosols through the respiratory or mucous tract.

The choice of a specific type of protection resides in the choice of equipment according to its application. Thus, there is protective equipment such as face masks that are made by porous fabric that filtrates the air and impede the pass of most of the microbial particles [30]. Another option of protective equipment is commonly called as face shields made of transparent plastic materials [31]. This type of protective equipment acts by forming a barrier between the wearer of the screen and the biological agent, thus avoiding, in the best of cases, the entry of the agent through the respiratory and mucosal tracts. Even though its effectiveness in combination with other protection measures is not questioned, by itself, this type of protection is not totally effective as many of the infectious biological agents are capable of surviving on its surface for a long time. Even though all the devices developed to date fulfill the function of acting as a barrier against direct exposure of the infectious biological agent, they may not be entirely effective, since the device has not been fabricated with antimicrobial materials capable of inactivating infectious agents when they are in contact with the material surface. Furthermore, this contaminated biological waste constitutes an environmental risk associated with the waste management of these protective systems.

Polyethylene terephthalate (PET) is a commercial low-cost transparent and recyclable polyester that is commonly used for the fabrication of facial protective equipment such as face shields [32]. However, this plastic material does not possess antimicrobial properties.

In this regard, quaternary ammonium compounds such as benzalkonium chloride (BAK) have been confirmed to be capable of inactivating enveloped RNA viruses [33] and Gram-positive multidrug-resistant bacteria [34]. In fact, this chemical compound is widely used as a disinfectant against bacteria, viruses, pathogenic fungi and mycobacteria [35].

The goal of this work consisted of producing a transparent face shield capable of providing extra-protection by acting as a physic barrier with intrinsic antimicrobial activity against enveloped viruses such as SARS-CoV-2 and bacteriophage phi 6, and multidrug-resistant bacteria.

2. Results and Discussion

2.1. Composite Material Morphology

Atomic force microscopy (AFM) and field emission scanning electron microscope (FESEM) with elemental analysis were performed in order to characterize the BAK micro-coating formed onto the PET surface. Figure 1 shows the AFM images of the treated and untreated PET plastics over a scan area of $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

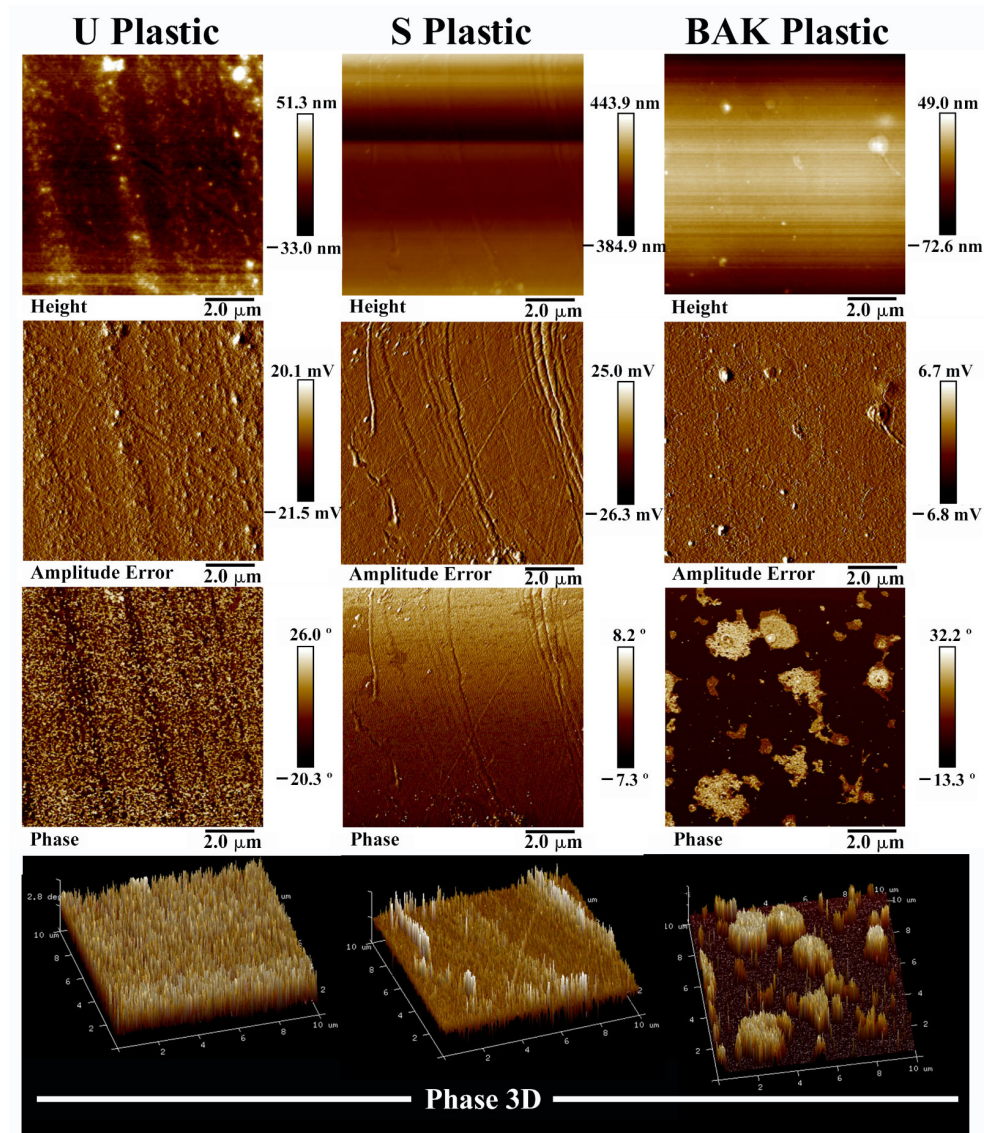


Figure 1. AFM topography images (height, amplitude error and phase images) and phase 3D representation recorded in tapping mode of the Untreated plastic (U Plastic), plastic treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S Plastic) and filter with the biofunctional benzalkonium chloride (BAK) coating (BAK Plastic) scanning a $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ area. These images show how the BAK coating was formed on the polyethylene terephthalate surface after the dip-coating treatment. The U Plastic shows some impurities on its surface which disappear after immersion in ethanol (S Plastic). Thus, the clean S Plastic shows some surface imperfections (irregular stripes) which disappear after the BAK coating (BAK Plastic). The BAK plastic shows slightly higher zones observed as white zones in the phase image.

The 2D phase provides images whose contrast is produced by differences in the adhesion and viscoelastic properties of the sample surface [36]. Thus, the pictures of the topography and phase angle clearly indicated that a BAK coating was formed onto the

PET surface (BAK Plastic) after the dip-coating treatment with the solvent containing BAK (Figure 1). It can be clearly observed that the untreated plastic (U Plastic) possesses some impurities on its surface which disappear after immersing the disk in ethanol 70% for 1 min. Thus, the surface imperfections produced by the plastic fabrication procedure can be clearly observed in the 2D phase image of the PET plastic treated by dip coating with the absolute ethanol/distilled water (70/30 *v/v*) solvent mixture (S Plastic). However, the AFM images of the BAK Plastic clearly show that a BAK coating was formed covering all the imperfections observed in the 2D phase image of the S Plastic sample. This coating presents slightly higher zones that are observed white zones in the phase images. These results are in good agreement with the FESEM images shown in the following Figure 2.

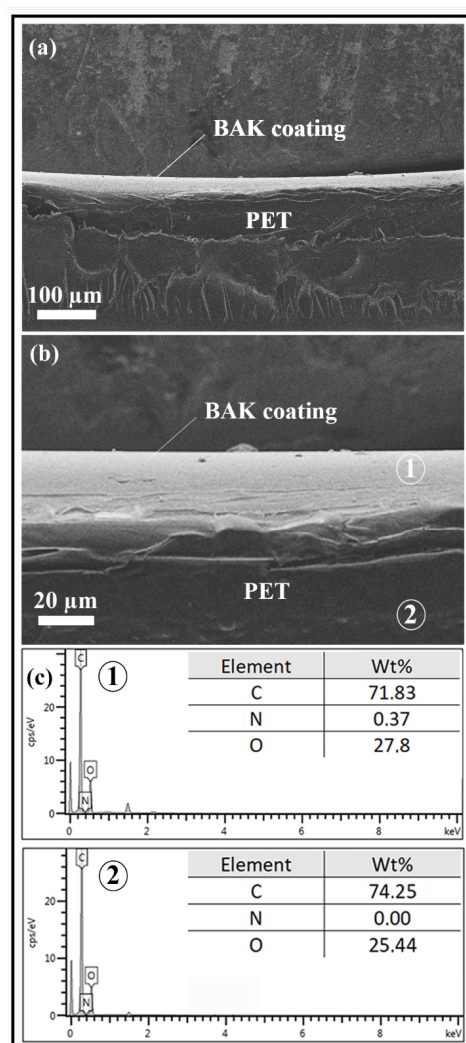


Figure 2. Morphology of the biofunctional coating of BAK onto the PET surface by Field Emission Scanning Electron Microscopy with energy-disperse X-ray spectroscopy (EDS) for elemental analysis: PET with $0.182 \pm 0.034\%$ *w/w* of biofunctional BAK coating (BAK Plastic) at two magnifications: (a) $\times 150$ and (b) $\times 720$, and (c) EDS elemental analysis of the coating and PET matrix.

The FESEM micrographs show clearly how a microcoating of BAK (light grey phase) is formed onto the PET surface (dark grey phase) with a thickness of approximately 25 μm (see Figure 2). Furthermore, the energy-disperse X-ray spectroscopy (EDS) analysis shows a nitrogen content of 0.37% weight on the BAK coating in good agreement with the nitrogen atom present in the BAK compound [34]. However, the EDS analysis on the PET matrix (polymer without nitrogen atoms) does not show any nitrogen content as expected.

2.2. Opacity

Figure 3 shows that there are no statistically significant differences of opacity (or transparency), calculated with Equation (1), of the PET disks before and after the treatments with solvent or the dip-coating treatment with BAK, which is essential to be used as transparent facial protective equipment (face shield screens, plastic masks, protective screens, protective glasses, etc.).

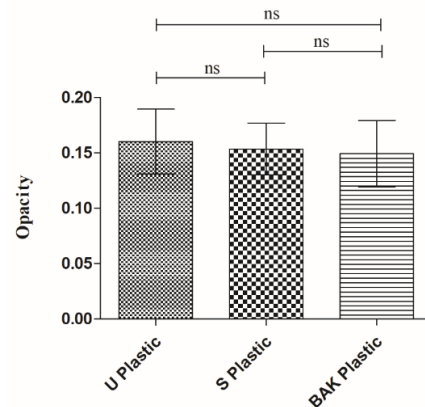


Figure 3. Opacity results of the Untreated PET (U Plastic), PET treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S Plastic) and PET with the biofunctional BAK coating (BAK Plastic). The ANOVA results are indicated in this plot; ns: not significant.

2.3. Antibacterial Activity

Figure 4 shows the antibacterial results achieved with the U Plastic, the S Plastic and the BAK Plastic against two multidrug-resistant bacteria: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE).

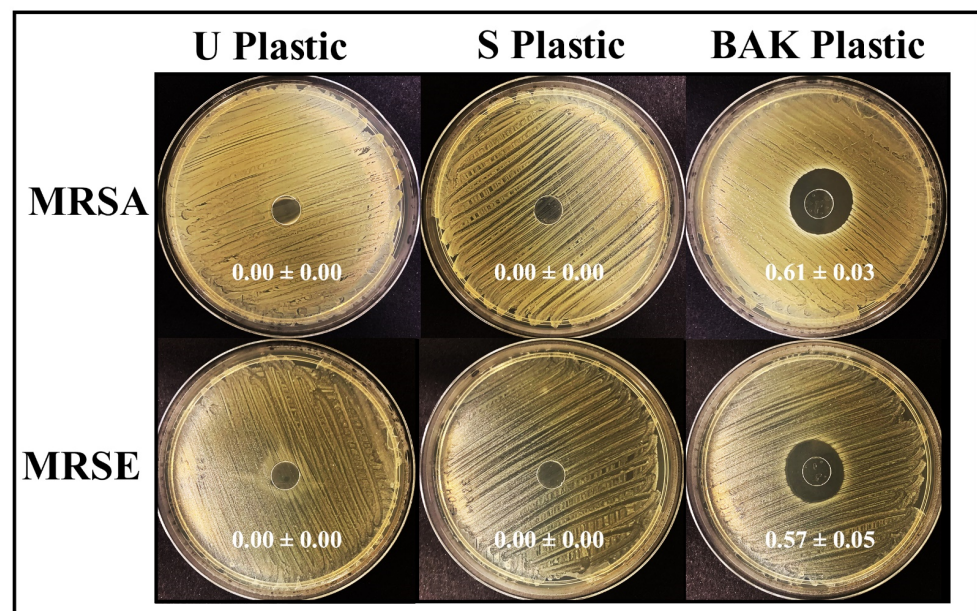


Figure 4. Antibacterial agar disk diffusion tests with two multidrug-resistant bacteria: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Untreated PET (U Plastic), PET treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S Plastic) and the PET with the biofunctional BAK coating (BAK Plastic) after 24 h of incubation at 37 °C. The normalized widths of the antibacterial halos, expressed as mean ± standard deviation and calculated with equation (1), are shown in each image.

Therefore, we can observe that the plastic with the biofunctional coating of BAK showed potent antibacterial activity against MRSA and MRSE with similar normalized antibacterial halos of 0.61 ± 0.03 and 0.57 ± 0.05 , respectively.

2.4. Antiviral Activity

The phage phi 6, which is an enveloped double-stranded RNA virus (group III of the Baltimore classification [5]), was used as biosafe viral model of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses such as influenza due to safety reasons.

The BAK Plastic showed potent antiviral activity against phage phi 6 (100% of viral inhibition, see Figure 5).

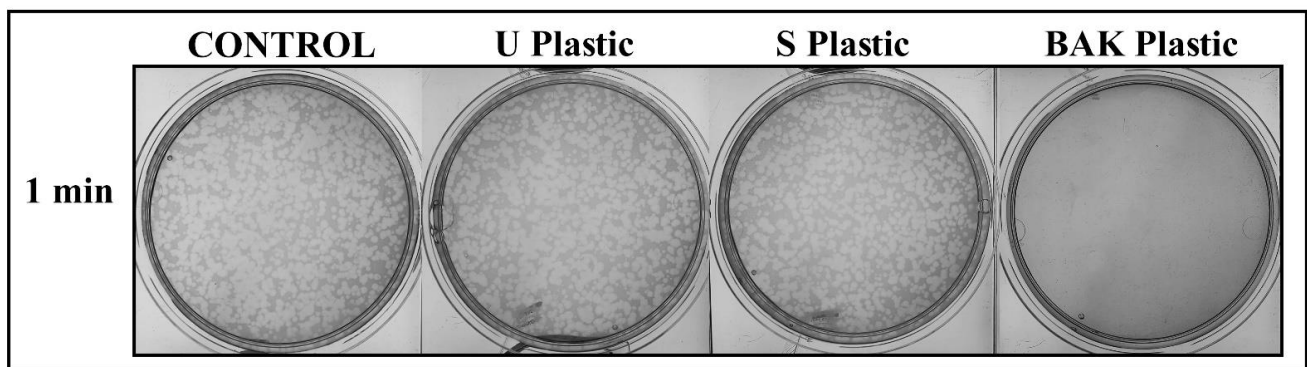


Figure 5. Loss of phage phi 6 viability measured by the double-layer method. Phage phi 6 titration images of undiluted samples for control, untreated PET (U Plastic), PET treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S plastic) and PET with the biofunctional BAK coating (BAK plastic) at 1 min of viral contact.

Thus, no plaques were produced on the bacterial lawns after 1 min of contact between the BAK Plastic and the biosafe viral model. However, similar plaques to control can be observed on the bacterial lawns after 1 min of contact between the U Plastic or S Plastic and the biosafe viral model (see Figure 5). The phage titers of each type of sample were calculated and compared with the control (Table 1).

Table 1. Reduction of infection titers in plaque-forming units per mL (PFU/mL) determined by the double-layer assay for the phage phi 6. Logarithm of plaque-forming units per mL ($\log(\text{PFU/mL})$) of the control, untreated PET (U Plastic), PET treated by dip coating with the ethanol-based solvent (S Plastic) and PET with the biofunctional BAK coating (BAK Plastic) at 1 min of viral contact.

Sample	Phi 6 at 1 min (PFU/mL)
Control	$4.36 \times 10^6 \pm 2.92 \times 10^5$
U Plastic	$4.38 \times 10^6 \pm 1.98 \times 10^5$
S Plastic	$4.23 \times 10^6 \pm 1.36 \times 10^6$
BAK Plastic	0.00 ± 0.00

Table 1 shows that the titers obtained by contacting the phages with the U or S Plastic are similar to the control. However, the BAK plastic displayed a strong phage inactivation. The results achieved with SARS-CoV-2 after 1 min of contact with the U Plastic, the S Plastic and the BAK Plastic containing the biofunctional coating are shown in Figure 6.

These results clearly demonstrate that the BAK Plastic is very effective against SARS-CoV-2 even after 1 min of contact. This is also in good agreement with the antiviral results of the biosafe viral model used in this study (see Figure 5 and Table 1). However, since BAK is highly water-soluble and therefore could come out when the PET sheet with the BAK coating is in contact with water, the antiviral and antibacterial tests were performed again after washing with distilled water to analyze the antimicrobial durability of the BAK

coating to water. The results of these experiments (results not shown) showed that the antimicrobial BAK coating dissolves really fast in distilled water and loses its antimicrobial activity as expected. However, the developed antimicrobial face shield is presented here as a single-use face protective equipment for the current and future microbial menaces.

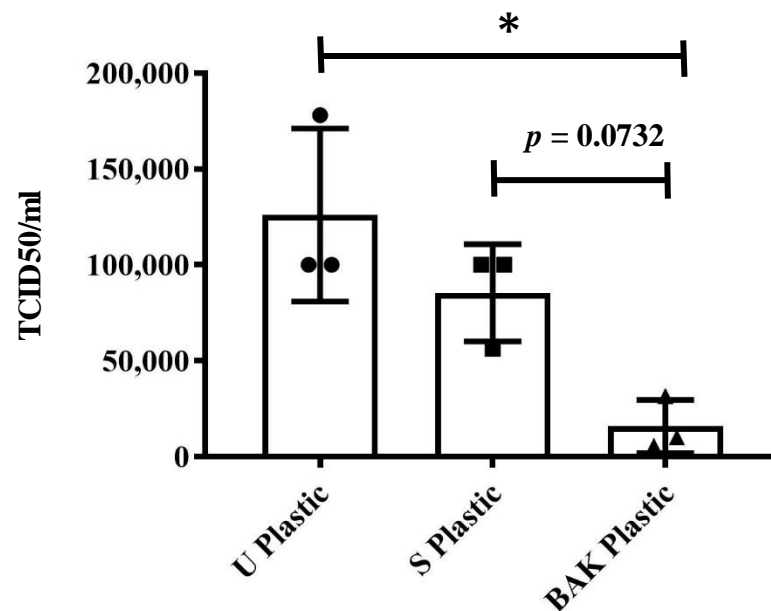


Figure 6. Reduction of infectious titers in PFU/mL of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) after 1 min of contact determined by the median tissue culture infectious dose per mL (TCID₅₀/mL) method. Untreated PET (U plastic), PET treated with the ethanol solvent (S Plastic) and the PET with the biofunctional BAK coating (BAK Plastic). A dot, square and triangle plot is a data set based on the value of each point. * $p < 0.05$.

These advanced face shields can provide superior protection to virologists working with highly infective pathogens in high-level biosafety labs, surgeons and healthcare workers in general. Furthermore, the proposed PET plastic is a recyclable material that can be reutilized [32] and thus contribute to decrease the increasing amount of this type of waste generated in the current pandemic. Furthermore, the antimicrobial coating can be produced easily as many times as necessary as a reusability characteristic of this technology. The BAK coating can be performed onto the outside side only for people not infected or also on the inside side if the protective equipment is going to be used for infected patients. It could also be performed on other types of transparent synthetic polymers such as polycarbonate, polymethyl methacrylate, poly (2-hydroxyethyl methacrylate), on non-transparent materials or on biodegradable polymers that would provide a solution to the need for bio-based protective tools for environmental reasons [37]. This next generation equipment will significantly reduce the increasing generation of infectious biological waste. These new technologies could revolutionize the face protective tool industry because other face protective equipment could be developed applying the same low-cost technology providing high antimicrobial activity (see Figure 7).

The antimicrobial mechanism of action of BAK against both bacterial and enveloped viruses is attributed to its positively charged nitrogen atoms that can eradicate the bacterial surface or disrupt the phospholipid bilayer membrane, the glycoproteinaceous envelope, and the spike glycoproteins of viruses such as phi6, SARS-CoV-2 and IFV [38,39]. BAK is a Food and Drug Administration-approved product for a broad-range of disinfecting applications such as additives in soaps and hand sanitizers [40–42]. We have demonstrated here that these transparent PET-based composites possess high antiviral and antibacterial activity to reduce the spread of COVID-19 and methicillin-resistant bacteria. This extra-protective composite material has been developed by a low-cost method of dip coating that

let BAK to physically adsorbed [43] onto the surface of a commercial PET plastic commonly used for the fabrication of face shields and other protective equipment providing high antimicrobial activity. Nonetheless, further research is necessary to overcome the possible shortfalls on the applicability of this coating technology to other protective tools and to other types of transparent materials. The effect of packing, storage and transportation on the antimicrobial properties of the BAK coating need also to be studied before applying this technology at large-scale.

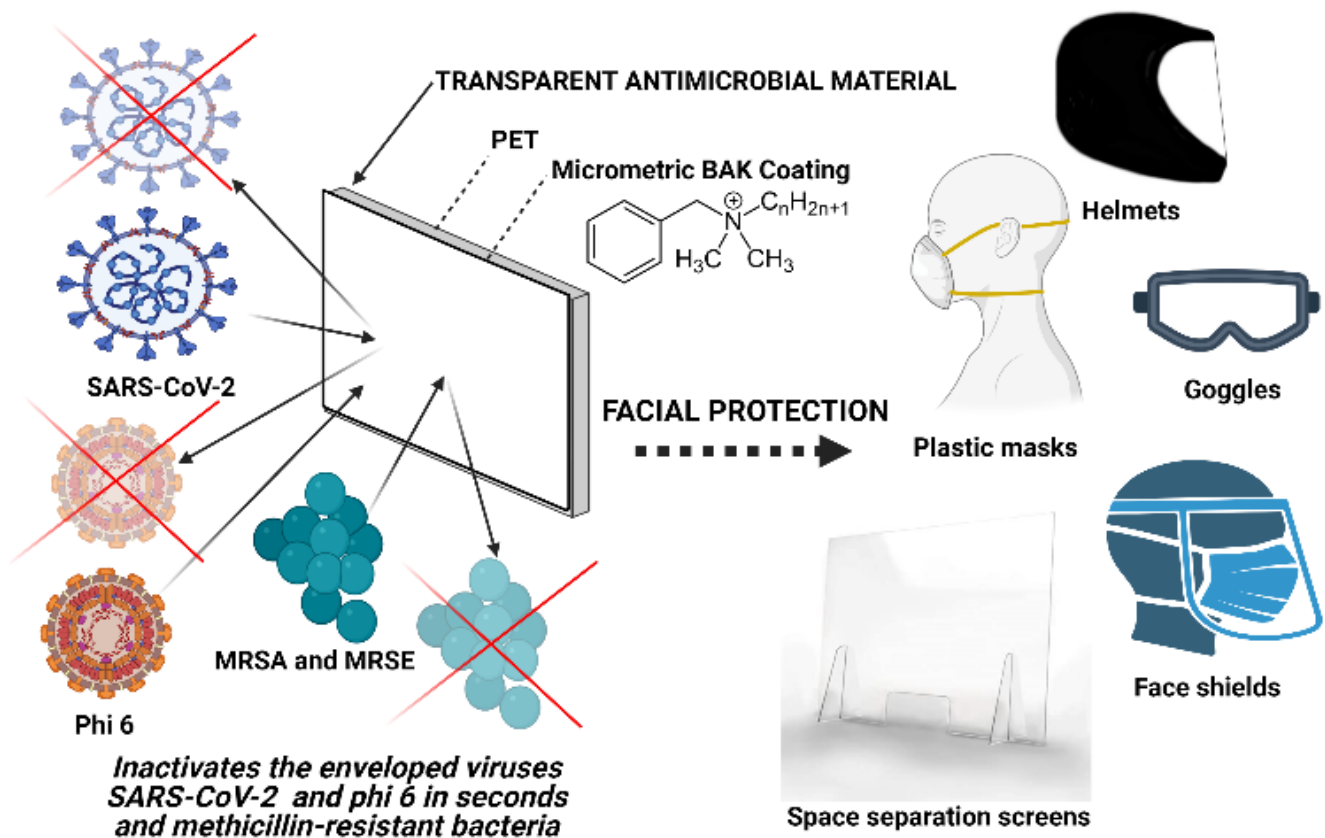


Figure 7. Applications of the coating technology of transparent polyethylene terephthalate (PET) with an antimicrobial coating of benzalkonium chloride (BAK) for the next generation of facial protective equipment: face shields, plastic masks, helmets, goggles, helmets and space separation screens.

3. Materials and Methods

3.1. Dip Coating Treatment with Benzalkonium Chloride

Sheets of PET with a thickness of 0.3167 ± 0.0408 mm used for the fabrication of commercial face shields were purchased from Plasticos Villamarchante S.L [44] (Valencia, Spain). Six disk specimens ($n = 6$) of approximately 10 mm in diameter of these transparent PET sheets (BAK Plastic) were treated with 70% ethyl alcohol with 0.1% *w/w* BAK (Montplet, Barcelona, Spain) by the dip-coating method [45] for 1 min at 25 °C to achieve a dry BAK content of $0.182 \pm 0.034\%$ *w/w* determined gravimetrically. Six more PET disks ($n = 6$) were subjected to the same dip-coating treatment but using only an absolute ethanol/distilled water solution (70/30% *v/v*) without BAK for 1 min at 25 °C (S Plastic). Untreated PET disks (U Plastic) disks ($n = 6$) were produced as reference material. The disks were subsequently dried at 60 °C for 48 h and sterilized under UV radiation for 1 h per disk side. The BAK used in this study was previously characterized by nuclear magnetic resonance on a BRUKER AVIIIHD 800 MHz (Bruker BioSpin AG, Fälladen, Switzerland) equipped with a 5 mm cryogenic CP-TCI [34].

3.2. Atomic Force Microscopy

Atomic force microscopy (AFM) was performed with a Bruker MultiMode 8 scanning probe microscope (SPM, Karlsruhe, Germany) operating in tapping mode in air and with the NanoScope V Controller and NanoScope 8.15 software version (Bruker, Karlsruhe, Germany). An antimony (n) doped silicon cantilever from Bruker was used with a scan rate of 0.500 Hz. The phase signal was set to zero at the resonance frequency of the tip. The tapping frequency was 5–10% lower than the resonance frequency. The drive amplitude and amplitude setpoints were 308.5 and 644.8 mV, respectively, and the aspect ratio was 1.00.

3.3. Electron Microscopy

A Zeiss Ultra 55 field emission scanning electron microscope (FESEM, Jena, Germany) was operated at an accelerating voltage of 10 kV to observe the biofunctional coating morphology of the treated PET surface at a magnification of $\times 150$ and $\times 720$. The plastic samples were prepared to be conductive by platinum coating with a sputter coating unit. This FESEM microscope is equipped with energy-disperse X-ray spectroscopy (EDS) for elemental ratio estimation at 2.00 kV.

3.4. Opacity

The opacity of the synthesized films was evaluated according to the spectrophotometric method utilized by Park and Zhao [46]. Thus, rectangular specimens (4 mm \times 50 mm) of the dry films were directly placed in a spectrophotometer cell to measure the absorbance at 600 nm with a UV/VIS Nanocolor UV0245 spectrophotometer (Macherey-Nagel, Düren, Germany). An empty cell was utilized as a reference. After that, the opacity (O) of the films can be determined with Equation (1), in which Abs600 is the absorbance value at 600 nm and x is film thickness in mm.

$$O = \frac{\text{Abs}_{600}}{x} \quad (1)$$

The measurements were performed with three specimens of each material and were reported as absorbance divided by film thickness (mean \pm standard deviation).

3.5. Phage Host Culture

The phage phi 6 host is *Pseudomonas syringae* (DSM 21482). This Gram-negative bacterium was purchased from the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Germany). *P. syringae* was cultured in solid tryptic soy agar (TSA, Liofilchem, Teramo, Italy). After that, the microorganism was cultured in liquid tryptic soy broth (TSB, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) incubated in an orbital shaker (CERTOMAT IS, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) at 25 °C and 120 rpm.

3.6. Phage Propagation

The specifications provided by the Leibniz Institute DSMZ–German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH were followed to propagate the phage phi 6 (DSM 21518) by using the double agar layer technique with top and bottom agar, which allows to perform lysis in bacterial host cultures [47].

3.7. Antiviral Test with the Biosafe Viral Model

50 μ L of TSB with phages was placed onto each material disk at a titer of about 1×10^6 plaque-forming units per mL (PFU/mL) and allowed to incubate for 1 min. Each material disk was placed in a falcon tube with 10 mL TSB, and subsequently sonicated for 5 min and vortexed for 1 min at room temperature (24 ± 1 °C).

Phage titration was performed by serial dilutions of each falcon sample. 100 μ L of each phage dilution was mixed with 100 μ L of the host strain at $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.5$.

The infective activity of the phage phi 6 was measured based on the double-layer method [48]. Thus, 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlau) and 5 mM CaCl₂ were added to the mixture containing phages and bacteria, which was then poured on TSA plates. Incubation of the plates was performed for 24–48 h in a refrigerated oven at 25 °C. Phage titers of each sample were calculated in PFU/mL and compared with a control consisting of 50 µL of phage added directly to the bacterial culture without being in contact with any type of disk and without sonication or vortexing.

The antiviral activity of the material disks was estimated at 1 min of contact with the biosafe virus model in log reductions of titers. It was ensured that the residual disinfectants present in the titrated samples did not interfere with the titration process. It was also checked that sonication and vortexing did not affect the infectious activity of the phage phi 6. The antiviral assays were carried out three times during two different days (n = 6) to ensure reproducible results.

3.8. Antiviral Tests Using SARS-CoV-2

The SARS-CoV-2 strain (SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-027) was provided to us by Dr. Tomohiko Takasaki and Dr. Jun-Ichi Sakuragi from the Kanagawa Prefectural Institute of Public Health. SARS-CoV-2 was plaque-purified, propagated in Vero cells and stored at –80 °C. 50 µL of a virus suspension in phosphate-buffered saline (PBS) was placed onto each material disk at a titer of 1.3×10^5 median tissue culture infectious dose (TCID50) per disk, and then incubated for 1 min of contact at ambient temperature. After that, 1 mL PBS was added to each disk, and then vortexed for 5 min. After that, each tube was vortexed for 5 min at ambient temperature. Viral titers were determined by the TCID50 assay performed in a Biosafety Level 3 laboratory at Kyoto University. Thus, TMPRSS2/Vero cells [49] (JCRB1818, JCRB Cell Bank), cultured with the minimum essential media (MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin, were seeded into 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Serial dilutions of 10-fold (from 10⁻¹ to 10⁻⁸) were performed in the culture medium. These dilutions were placed onto the TMPRSS2/Vero cells in triplicate and incubated at 37 °C for 96 h. Cytopathic effect was evaluated under a microscope and TCID50/mL was calculated using the Reed–Muench method [50].

3.9. Antibacterial Tests

The antibacterial activity was studied by the agar disk diffusion tests [51,52]. Thus, lawns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), COL [53] and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), RP62A [54], in a concentration of approximately 1.5×10^8 colony forming units per mL (CFU/mL) in tryptic soy broth, were cultivated on trypticase soy agar plates. The lawns of bacteria were incubated aerobically at 37 °C for 24 h with the sterilized disks placed upon them. The antibacterial disks showed an inhibition zone (or *halo*) that can be normalized using Equation (1) [51].

$$nw_{halo} = \frac{d_{iz} - d}{2d} \quad (2)$$

The term nw_{halo} represents the normalized width of the antibacterial inhibition zone, d_{iz} is the inhibition zone diameter and d indicates the material disk diameter. The material disk diameter was measured by image software analysis (Image J, Wayne Rasband (NIH), USA). The antibacterial tests were performed three times during two different days (n = 6) to ensure reproducible results.

3.10. Antimicrobial Durability of the BAK Coating to Water

The antiviral and antibacterial tests were performed again after washing 1 cm disks of the PET/BAK composite material (BAK Plastic) by immersion in 100 mL of distilled water during 1 min at 24 ± 1 °C to analyze the antimicrobial durability of the BAK coating to water.

3.11. Statistical Analysis

The statistical analyses were performed by ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p > 0.05$, *** $p > 0.001$) using the GraphPad Prism software (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4. Conclusions

A single-use antimicrobial face shield has been developed as the next generation of face protective equipment capable of inactivating enveloped viruses such as phage phi 6 and SARS-CoV-2 after 1 min of contact and multidrug-resistant bacteria such as MRSA and MRSE. This antimicrobial composite material was fabricated by a low-cost procedure consisting of dip-coating of polyethylene terephthalate with benzalkonium chloride. The formation of the antimicrobial coating was demonstrated by atomic force microscopy and field emission scanning electron microscopy with elemental analysis. This composite material avoids viral and bacterial inhalation and entry into the body through the respiratory tract or by splashing (in a surgical operation for example), providing an extra biosafety due to its capacity of inactivating the infectious microorganisms as soon as they are in contact with the protective element. Furthermore, this antimicrobial material is recyclable, and it reduces the generation of infectious biological waste. This antimicrobial material can be used for the fabrication of other face protective equipment such as goggles, helmets, plastic masks and space separation counter or vehicles screens and thus are very promising for the current and future microbial menaces. Nonetheless, further research is needed to contribute significantly on the up-scaling of this technology.

5. Patents

Facial protection element against risks of exposure to infectious biological agents (Utility model). U202130782. 15 April 2021.

Author Contributions: Á.S.-A. conceived the idea of this work; conceptualization, methodology, validation and formal analysis: M.M., K.T. and Á.S.-A.; software: K.T. and Á.S.-A.; investigation: A.T.-M., M.M., Y.M., T.N., K.T. and Á.S.-A.; resources: M.M., K.T. and Á.S.-A.; data curation, A.T.-M., K.T. and Á.S.-A.; visualization: K.T. and Á.S.-A.; writing—original draft preparation: Á.S.-A.; writing—review and editing: A.T.-M., M.M., K.T. and Á.S.-A.; supervision, M.M., K.T. and Á.S.-A.; project administration, K.T. and Á.S.-A.; funding acquisition, K.T. and Á.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Grant 2020-231-006UCV and by the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-119333RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) (awarded to Á.S.-A). This research was also supported by grants from the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) (20fk0108533h0001), and the JST Core Research for Evolutional Science and Technology (JPMJCR20HA). This work was supported by Joint Usage/Research Center program of Institute for Frontier Life and Medical Sciences Kyoto University.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to express their gratitude to the Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Japan Agency for Medical Research and Development for their financial support. We would like to thank Yoshio Koyanagi and Kazuya Shimura (Kyoto University) for setup and operation of the BSL-3 laboratory.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19. 11 March 2020. Available online: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---11-march-2020> (accessed on 19 May 2021).
2. Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. The effect of climate on the spread of the COVID-19 pandemic: A review of findings, and statistical and modelling techniques. *Prog. Phys. Geogr. Earth Environ.* **2020**, *44*, 591–604. [[CrossRef](#)]
3. Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. A spatio-temporal analysis for exploring the effect of temperature on COVID-19 early evolution in Spain. *Sci. Total Environ.* **2020**, *728*, 138811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wu, Y.; Guo, C.; Tang, L.; Hong, Z.; Zhou, J.; Dong, X.; Yin, H.; Xiao, Q.; Tang, Y.; Qu, X.; et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 434–435. [[CrossRef](#)]
5. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 235–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281–292.e6. [[CrossRef](#)]
7. Yang, X.; Yu, Y.; Xu, J.; Shu, H.; Xia, J.; Liu, H.; Wu, Y.; Zhang, L.; Yu, Z.; Fang, M.; et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 475–481. [[CrossRef](#)]
8. Su, I.C.; Lee, K.L.; Liu, H.Y.; Chuang, H.C.; Chen, L.Y.; Lee, Y.J. Severe community-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* coinfection in an influenza A(H1N1)pdm09 patient. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 365–366. [[CrossRef](#)]
9. Chou, C.C.; Shen, C.F.; Chen, S.J.; Chen, H.M.; Wang, Y.C.; Chang, W.S.; Chang, Y.T.; Chen, W.Y.; Huang, C.Y.; Kuo, C.C.; et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 172–199. [[CrossRef](#)]
10. Lee, J.Y.; Yang, P.C.; Chang, C.; Lin, I.T.; Ko, W.C.; Cia, C.T. Community-acquired adenoviral and pneumococcal pneumonia complicated by pulmonary aspergillosis in an immunocompetent adult. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2019**, *52*, 838–839. [[CrossRef](#)]
11. Albrich, W.C.; Rassouli, F.; Waldeck, F.; Berger, C.; Baty, F. Influence of Older Age and Other Risk Factors on Pneumonia Hospitalization in Switzerland in the Pneumococcal Vaccine Era. *Front. Med.* **2019**, *6*, 286. [[CrossRef](#)]
12. Wu, X.; Cai, Y.; Huang, X.; Yu, X.; Zhao, L.; Wang, F.; Li, Q.; Gu, S.; Xu, T.; Li, Y.; et al. Co-infection with SARS-CoV-2 and influenza a virus in patient with pneumonia, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 1324–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Feikin, D.R.; Schuchat, A.; Kolczak, M.; Barrett, N.L.; Harrison, L.H.; Lefkowitz, L.; McGeer, A.; Farley, M.M.; Vugia, D.J.; Lexau, C.; et al. Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995–1997. *Am. J. Public Health* **2000**, *90*, 223–229.
14. Huttner, B.; Cappello, B.; Cooke, G.; Gandra, S.; Harbarth, S.; Imi, M.; Loeb, M.; Mendelson, M.; Moja, L.; Pulcini, C.; et al. 2019 community-acquired pneumonia treatment guidelines: There is a need for a change toward more parsimonious antibiotic use. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *201*, 1315–1316. [[CrossRef](#)]
15. Bourouiba, L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. *JAMA* **2020**, *323*, 1837–1838. [[PubMed](#)]
16. Orenes-Piñero, E.; Baño, F.; Navas-Carrillo, D.; Moreno-Docón, A.; Marín, J.M.; Misiego, R.; Ramírez, P. Evidences of SARS-CoV-2 virus air transmission indoors using several untouched surfaces: A pilot study. *Sci. Total Environ.* **2021**, *751*, 142317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. van Doremalen, N.; Bushmaker, T.; Morris, D.H.; Holbrook, M.G.; Gamble, A.; Williamson, B.N.; Tamin, A.; Harcourt, J.L.; Thornburg, N.J.; Gerber, S.I.; et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1564–1567. [[CrossRef](#)]
18. Ong, S.W.X.; Tan, Y.K.; Chia, P.Y.; Lee, T.H.; Ng, O.T.; Wong, M.S.Y.; Marimuthu, K. Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a Symptomatic Patient. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1610–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chin, A.W.H.; Chu, J.T.S.; Perera, M.R.A.; Hui, K.P.Y.; Yen, H.-L.; Chan, M.C.W.; Peiris, M.; Poon, L.L.M. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e10. [[CrossRef](#)]
20. USFDA. Q&A for Consumers: Hand Sanitizers and COVID-19. *United States Food Drug Adm.* 2020. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/information-drug-class/qa-consumers-hand-sanitizers-and-covid-19> (accessed on 19 May 2021).
21. Vellingiri, B.; Jayaramayya, K.; Iyer, M.; Narayanasamy, A.; Govindasamy, V.; Giridharan, B.; Ganesan, S.; Venugopal, A.; Venkatesan, D.; Ganesan, H.; et al. COVID-19: A promising cure for the global panic. *Sci. Total Environ.* **2020**, *725*, 138277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. American Lung Association Learn About Pneumonia | American Lung Association. Available online: <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/pneumonia> (accessed on 19 May 2021).
23. Singhal, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr.* **2020**, *87*, 281–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bai, Y.; Yao, L.; Wei, T.; Tian, F.; Jin, D.Y.; Chen, L.; Wang, M. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2020**, *323*, 1406–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Skevaki, C.L.; Papadopoulos, N.G.; Tsakris, A.; Johnston, S.L. Microbiologic diagnosis of respiratory illness: Practical applications. In *Kendig and Chernick's Disorders of the Respiratory Tract in Children*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 399–423.

26. Hodinka, R.L. Respiratory RNA Viruses. In *Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host*; ASM Press: Washington, DC, USA, 2016; pp. 233–271.
27. Kadioglu, A.; Weiser, J.N.; Paton, J.C.; Andrew, P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 288–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Weisfelt, M.; De Gans, J.; Van Der Poll, T.; Van De Beek, D. Pneumococcal meningitis in adults: New approaches to management and prevention. *Lancet Neurol.* **2006**, *5*, 332–342. [[CrossRef](#)]
29. Thorrington, D.; Andrews, N.; Stowe, J.; Miller, E.; van Hoek, A.J. Elucidating the impact of the pneumococcal conjugate vaccine programme on pneumonia, sepsis and otitis media hospital admissions in England using a composite control. *BMC Med.* **2018**, *16*, 1–14. [[CrossRef](#)]
30. Feng, S.; Shen, C.; Xia, N.; Song, W.; Fan, M.; Cowling, B.J. Rational use of face masks in the COVID-19 pandemic. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 434–436. [[CrossRef](#)]
31. Amin, D.; Nguyen, N.; Roser, S.M.; Abramowicz, S. 3D Printing of Face Shields During COVID-19 Pandemic: A Technical Note. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2020**, *78*, 1275–1278. [[CrossRef](#)]
32. Shukla, S.R.; Palekar, V.; Pingale, N. Zeolite catalyzed glycolysis of polyethylene terephthalate bottle waste. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *110*, 501–506. [[CrossRef](#)]
33. Bélec, L.; Tevi-Benissan, C.; Bianchi, A.; Cotigny, S.; Beumont-Mauviel, M.; Si-Mohamed, A.; Malkin, J.E. In vitro inactivation of Chlamydia trachomatis and of a panel of DNA (HSV-2, CMV, adenovirus, BK virus) and RNA (RSV, enterovirus) viruses by the spermicide benzalkonium chloride. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 685–693. [[CrossRef](#)]
34. Martí, M.; Tuñón-Molina, A.; Aachmann, F.L.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Polymers* **2021**, *13*, 207. [[CrossRef](#)]
35. McDonnell, G.; Russell, A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 147–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sanjeeva Murthy, N. Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography. In *Surface Modification of Biomaterials: Methods Analysis and Applications*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 232–255.
37. Das, O.; Neisiany, R.E.; Capezza, A.J.; Hedenqvist, M.S.; Försth, M.; Xu, Q.; Jiang, L.; Ji, D.; Ramakrishna, S. The need for fully bio-based facemasks to counter coronavirus outbreaks: A perspective. *Sci. Total Environ.* **2020**, *736*, 139611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Schrank, C.L.; Minbiole, K.P.C.; Wuest, W.M. Are Quaternary Ammonium Compounds, the Workhorse Disinfectants, Effective against Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2? *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1553–1557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hora, P.I.; Pati, S.G.; McNamara, P.J.; Arnold, W.A. Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2020**, *7*, 622–631. [[CrossRef](#)]
40. Yamanaka, T.; Bannai, H.; Tsujimura, K.; Nemoto, M.; Kondo, T.; Matsumura, T. Comparison of the virucidal effects of disinfectant agents against equine influenza A virus. *J. Equine Vet. Sci.* **2014**, *34*, 715–718. [[CrossRef](#)]
41. Gerba, C.P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tuladhar, E.; de Koning, M.C.; Fundeanu, I.; Beumer, R.; Duizer, E. Different virucidal activities of hyperbranched quaternary ammonium coatings on poliovirus and influenza virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2456–2458. [[CrossRef](#)]
43. Neacșu, I.A.; Nicoară, A.I.; Vasile, O.R.; Vasile, B.Ş. Inorganic micro- and nanostructured implants for tissue engineering. In *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 271–295.
44. Plásticos Villamarchante | Empresa de Moldeo por Inyección de Plástico | Fabricación de Piezas de Plástico. Available online: <http://plasticosvillamarchante.com/> (accessed on 19 May 2021).
45. Zhang, J.; Li, B.; Wu, L.; Wang, A. Facile preparation of durable and robust superhydrophobic textiles by dip coating in nanocomposite solution of organosilanes. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11509–11511. [[CrossRef](#)]
46. Llorens-Gámez, M.; Salesa, B.; Serrano-Aroca, Á. Physical and biological properties of alginate/carbon nanofibers hydrogel films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 499–507. [[CrossRef](#)]
47. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Available online: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-21518> (accessed on 23 August 2021).
48. Kropinski, A.M.; Mazzocco, A.; Waddell, T.E.; Lingohr, E.; Johnson, R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 69–76. [[PubMed](#)]
49. Matsuyama, S.; Nao, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Saito, S.; Takayama, I.; Nagata, N.; Sekizuka, T.; Katoh, H.; Kato, F.; et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2- expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 7001–7003. [[CrossRef](#)]
50. Lin, H.T.; Tsai, H.Y.; Liu, C.P.; Yuan, T.T.T. Comparability of bovine virus titers obtained by TCID₅₀/ml and FAID₅₀/ml. *J. Virol. Methods* **2010**, *165*, 121–124. [[CrossRef](#)]
51. Martí, M.; Frígols, B.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Characterization of Advanced Materials for Bioengineering Applications. *J. Vis. Exp.* **2018**, 57710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Shao, W.; Liu, H.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, J.; Zhang, R.; Min, H.; Huang, M. Development of silver sulfadiazine loaded bacterial cellulose/sodium alginate composite films with enhanced antibacterial property. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 351–358. [[CrossRef](#)]

-
53. Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; DeBoy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2426–2438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 54. Christensen, G.D.; Bisno, A.L.; Parisi, J.T.; McLaughlin, B.; Hester, M.G.; Luther, R.W. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Intern. Med.* **1982**, *96*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. ANEXO V

A. Tuñón-Molina, A. Cano-Vicent, Á. Serrano-Aroca, Antimicrobial Lipstick: Bio-Based Composition against Viruses, Bacteria, and Fungi, ACS Appl Mater Interfaces. (2022).

Antimicrobial Lipstick: Bio-Based Composition against Viruses, Bacteria, and Fungi

Alberto Tuñón-Molina, Alba Cano-Vicent, and Ángel Serrano-Aroca*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsami.2c19460>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



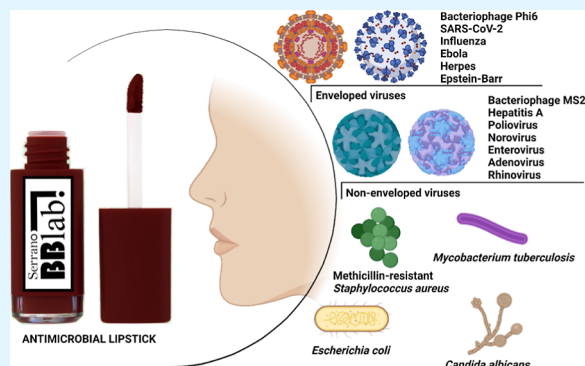
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The COVID-19 pandemic has speeded up the race to find materials that could help limit or avoid the spread of SARS-CoV-2, while infections by multidrug-resistant bacteria and fungi are now becoming a serious threat. In this study, we developed a novel bio-based lipstick containing cranberry extract, a substance able to inactivate a broad range of microorganisms: enveloped viruses such as bacteriophage $\Phi 6$, a surrogate of SARS-CoV-2; non-enveloped viruses including bacteriophage MS2; multidrug-resistant bacteria like methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Mycobacterium smegmatis*, a surrogate of *Mycobacterium tuberculosis*; and the *Candida albicans* fungus. The proposed antimicrobial lipstick offers a new form of protection against a broad range of microorganisms, including enveloped and non-enveloped viruses, bacteria, and fungi, in the current COVID-19 pandemic and microbial-resistant era.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, COVID-19, cranberry, bacteriophage $\Phi 6$, bacteriophage MS2, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*



INTRODUCTION

The current SARS-CoV-2 pandemic has revealed the need to develop new antimicrobial techniques to prevent or treat COVID-19. This pathogen is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus^{1,2} that has killed more than 6.5 million people worldwide.³ Face masks are one of the most widely used personal protection equipment around the globe, with very efficient results.^{4–6} Other infection prevention devices have been used such as caps, disposable gowns, shoe covers, face shields, and so forth.^{7,8} Nevertheless, all of these are not usually manufactured with materials with antimicrobial properties, and so viruses or bacteria that get in contact with them are not destroyed and could infect healthy people. Many researchers have focused their efforts on searching for materials with the necessary properties to destroy microbes, such as benzalkonium chloride,^{9,10} hand soap,¹¹ metal compounds,^{12–15} carbon materials,^{16–18} or natural materials,^{19–22} which have been used for protective equipment.⁶ However, few studies on cranberry extract have been reported,⁶ and only one face mask filter with this extract has been shown to possess antiviral activity against enveloped viruses and multidrug-resistant bacteria.²³ The antimicrobial activity can be explained by the presence of A-type proanthocyanidins (PACs), a class of polyphenols that interact with the viral envelope and modify its glycoproteins.²³ It has also been shown that cranberry extract has a potent antibacterial activity against *Escherichia coli*²⁴ and antifungal properties versus *Candida albicans*.²⁵

Infectious diseases such as COVID-19, tuberculosis, yeast infections, or diseases caused by multi-drug-resistant bacteria are a global threat that scientists are always trying to solve. Until the COVID-19 pandemic²⁶ in 2020, 1.5 million people died of tuberculosis, representing the 13th leading cause of death.²⁷ *C. albicans* can cause an invasive candidiasis, which is often related to high rates of mortality, estimated to be 19–24%.^{28,29} Multidrug-resistant bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are also a serious problem. In 2019, multidrug-resistant bacteria caused more than 4.95 million deaths, of which 1.27 million were directly related to antimicrobial resistance.^{30,31} The World Health Organization has already warned that by 2050, deaths caused by multidrug-resistant bacteria could exceed those caused by other illnesses such as cancer.³²

Lipsticks are usually associated with higher physical, sexual, and social attractiveness^{33–39} and are not generally made of antimicrobial materials. However, some natural products have now been introduced in lipstick manufacture to avoid possible secondary effects on consumers such as skin irritation.⁴⁰

Received: October 31, 2022

Accepted: November 11, 2022

Previous reports have shown that natural colorants like red dragon fruit or other herbs like *Randia spinosa*, *Tagetes erecta*, or *Iris germanica* can provide lipsticks with antimicrobial activity against bacteria such as *Salmonella aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, or *Klebsiella*.^{40,41}

Considering the existing published work, we hypothesized that we could develop an antimicrobial lipstick containing bio-based cranberry extract to help prevent infections produced by enveloped and non-enveloped viruses, multidrug-resistant bacteria, mycobacteria, and fungi.

MATERIALS AND METHODS

Lipstick Preparation. According to the manufacturer, the cream stick (CIEN, Cosmolux Deutschland GmbH, Pulheim, Deutschland)

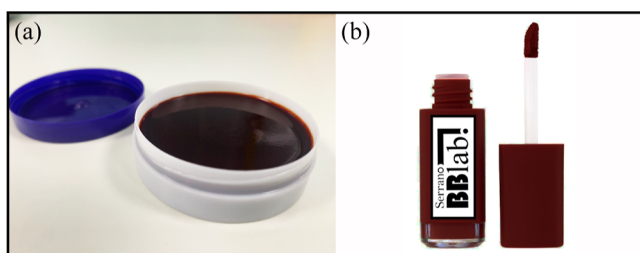


Figure 1. Cranberry cream after all the production procedure (a) and commercial lipstick developed by Serrano Biomaterials and Bioengineering Lab (BBlab) (b).

we used as the base material in this work is composed of shea butter, vitamin E, provitamin B5, babassu oil, and avocado oil.

To prepare antimicrobial lipstick, 5 g of NUTRIBIOLITE cranberry extract (Urtractin, Valladolid, Spain) was dissolved in 100 mL of ethanol 100% (VWR, Llinars del Vallès, Spain) and was stirred in a magnetic shaker at 750 rpm for 5 min. 4.8 g of the cream stick was added, and stirring continued until the cream dissolved completely, when the dilution was kept at 37 °C until the ethanol was totally evaporated (5–7 days) (see Figure 1).

Antiviral Tests against Bacteriophage $\Phi 6$. *Pseudomonas syringae* (DSM 21482) is the bacterial host of the bacteriophage $\Phi 6$. This Gram-negative bacterium was purchased from the Leibniz Institute DSMZ—German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Germany). The bacterium was cultured in solid tryptic soy agar (TSA, Scharlab, Barcelona, Spain) and then in liquid tryptic soy broth (TSB, Scharlab, Barcelona, Spain) at a speed of 240 rpm at 25 °C. The producer's specifications were followed to propagate the $\Phi 6$ bacteriophage (DSM 21518). The antiviral assay was carried out by mixing a dispersion of 50 μ L of TSB in an Eppendorf tube with phages at a titer of approximately 1×10^6 plaque-forming units per mL (PFU/mL) with 50 μ L of cranberry cream dilution in TSB (3, 4, 5, 6 and 10%) and incubated for 1 min at 25 °C. A Falcon tube was used to place 50 μ L of each mixture with 10 mL of TSB to be vortexed for 1 min at ambient temperature (24 ± 1 °C). Phage titration was performed by serial dilutions of each falcon sample, and 100 μ L of each phage dilution was mixed with 100 μ L of the bacterial host at $OD_{600nm} = 0.5$. $\Phi 6$ infective capacity was analyzed by the double-layer method.⁴² A volume of 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlab) and 5 mM calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to the phage dispersion mixed with the bacteria, which was then poured onto TSA plates for incubation in a thermostatic oven at 25 °C. Phage titers in PFU/mL of each sample were compared with those of the control (CONTROL), which consisted of 50 μ L of the phage added directly to the bacterial culture without being in contact with any cranberry cream and without vortexing. The sample titers were compared with those of the control cream (CONTROL C), which consisted of 50 μ L of the phage mixed with 50 μ L of a 10% dilution of cream with no cranberry treatment in TSB. The antiviral activity of the cranberry

Table 1. Antiviral Results of Cranberry Cream against Bacteriophage $\Phi 6$ after 1 min of Contact^a

sample	virus concentration (PFU/mL)	log reduction	viral inactivation (%)
CONTROL (TSB)	$6.32 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$		
CONTROL C (cream with no treatment)	$2.76 \times 10^6 \pm 3.96 \times 10^5$	~0	~0
CREAM 10%	0.00 ± 0.00	~6	100
CREAM 6%	0.00 ± 0.00	~6	100
CREAM 5%	0.00 ± 0.00	~6	100
CREAM 4%	0.00 ± 0.00	~6	100
CREAM 3%	0.00 ± 0.00	~6	100

^aVirus concentration in PFU/mL, log reduction, and percentage of viral inactivation.

cream dilutions was determined after 1 min of contact with the bacteriophage $\Phi 6$ in log reductions of titers after ensuring that the infectious activity of the bacteriophage $\Phi 6$ was not affected by vortexing and that the residual disinfectants of the titrated samples did not interfere with the titration process. Three independent antiviral tests were performed on two different days ($n = 6$) to ensure reproducibility.

Antiviral Tests against Bacteriophage MS2. *E. coli* (DSM 5695) is the bacterial host of the MS2 bacteriophage. This bacterium was cultured in solid TSA (Scharlab, Barcelona, Spain) and in liquid TSB (Scharlab, Barcelona, Spain) at a speed of 240 rpm at 37 °C. The Leibniz Institute DSMZ—German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH specifications were pursued to propagate the MS2 bacteriophage (DSM 13767). The antiviral assay was carried out by mixing a dispersion of 50 μ L of TSB in an Eppendorf tube with phages at a titer of approximately 1×10^6 PFU/mL with 50 μ L of a cranberry cream dilution in TSB (3, 4, 5, 6, and 10%) and incubating for 1 min at 37 °C. A Falcon tube was used to place 50 μ L of each mixture with 10 mL of TSB to be vortexed for 1 min at ambient temperature (24 ± 1 °C). Phage titration by serial dilutions of each falcon sample was performed, and 100 μ L of each phage dilution was mixed with 100 μ L of the bacterial host at $OD_{600nm} = 0.13$. MS2's infective capacity was analyzed by the double-layer method.⁴² A volume of 4 mL of top agar (TSB + 0.75% bacteriological agar, Scharlab) and 5 mM calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to the phage dispersion mixed with the bacteria and poured onto TSA plates for incubation for 18–24 h at 37 °C. Phage titers in PFU/mL of each sample were compared with those of the control (CONTROL), which consisted of 50 μ L of phage added directly to the bacterial culture without being in contact with any type of cranberry cream dilution and without the vortexing treatment. Comparison with the control cream (CONTROL C) consisted of 50 μ L of the phage mixed with 50 μ L of a 10% dilution of cream with no cranberry treatment in TSB. The antiviral activity of the cranberry cream dilutions was determined after 1 min of contact with the MS2 bacteriophage in log reductions of titers. It was ensured that vortexing did not affect its infectious activity and that the residual disinfectants of the titrated samples did not interfere with the titration process. Three independent antiviral tests were performed on two different days ($n = 6$) to ensure reproducibility.

Antimicrobial Tests. Antibacterial assays were performed with MRSA COL;⁴³ *E. coli* (CECT 101); and *Mycobacterium smegmatis* (CECT 3032). Antifungal tests against *C. albicans* (CECT 1394) were also performed. *E. coli*, *M. smegmatis*, and *C. albicans* were obtained from the Spanish Type Culture Collection of the University of Valencia.

Bacteria were cultured to an OD_{540} of 0.2 for MRSA in TSB medium; 0.13 for *E. coli* in TSB medium; and 2 for *M. smegmatis* in Difco Middlebrook 7H9 broth medium (BD, Sparks, MD, USA) supplied with 0.5% Tween 80 and 0.4% glycerol. All these measurements of OD_{540} were for a concentration of approximately 1×10^8 CFU/mL. *C. albicans* was cultured in Sabouraud broth

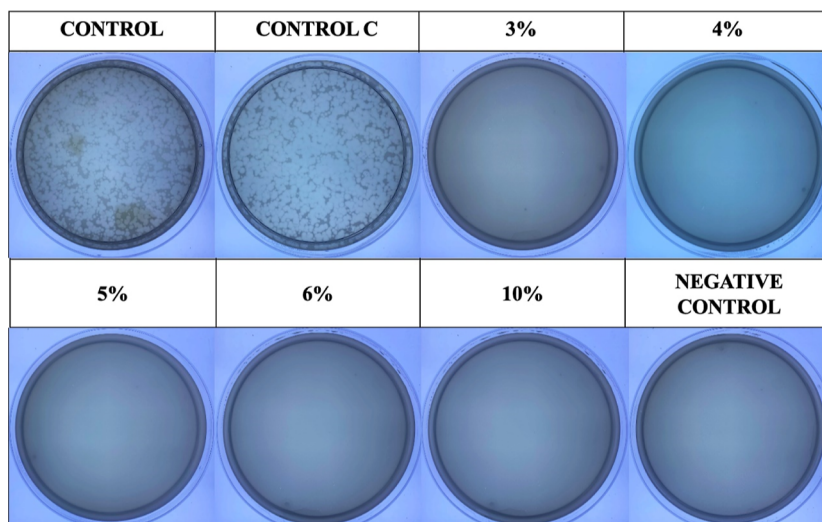


Figure 2. Bacteriophage $\Phi 6$ viability determined by the double-layer method after 1 min of contact. Titration images of undiluted samples for TSB (CONTROL), 10% dilution cream with no treatment (CONTROL C), 3% dilution of cranberry cream in TSB (3%), 4% dilution of cranberry cream in TSB (4%), 5% dilution of cranberry cream in TSB (5%), 6% dilution of cranberry cream in TSB (6%), 10% dilution of cranberry cream in TSB (10%), and TSB with no phage to control possible contamination (negative control). Images show a clear reduction of bacteriophage $\Phi 6$ infection capacity (clear spots) after treatment with diluted cranberry cream after 1 min contact.

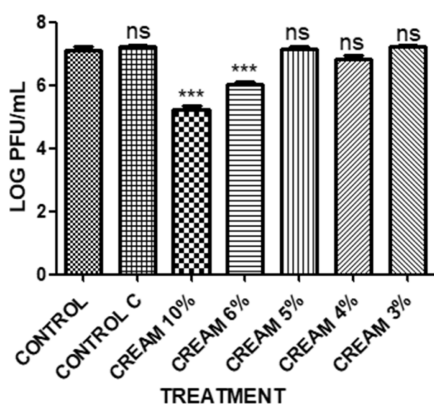


Figure 3. Reduction of infection titers of bacteriophage MS2 in the logarithm of plaque-forming units per mL (LOG PFU/mL) measured by the double-layer method. Bacteriophages in contact with TSB (CONTROL), 10% dilute cream with no treatment (CONTROL C), 10% dilute cream in TSB (10%), 6% dilute cream in TSB (6%), 5% dilute cream in TSB (5%), 4% dilute cream in TSB (4%), and 3% dilute cream in TSB (3%). Three separate antiviral tests were performed on two different days ($n = 6$). Significant differences with respect to the control were determined by one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons: *** $p > 0.05$; ns, not significant.

(Scharlab, Barcelona, Spain) to an OD_{540} of 2, at a concentration of approximately 1×10^8 CFU/mL.

10 μ L of the assayed bacteria or fungi was mixed with 990 μ L of each cranberry cream dilution (3, 4, 5, 6, and 10%), 990 μ L of a 10% cream dilution with no cranberry treatment, or 990 μ L of dilution medium. Dilutions were prepared in TSB for MRSA and *E. coli*, Middlebrook 7H9 broth (0.5% Tween 80 and 0.4% glycerol) for *M. smegmatis*, or Sabouraud broth for *C. albicans*. Bacteria and fungi were grown in an orbital shaker at a speed of 240 rpm at 37 °C. Serial dilutions were prepared until a 10^{-10} dilution was reached. 100 μ L of each dilution was placed onto a TSA Petri dish for MRSA and *E. coli*; agar Sabouraud for *C. albicans*; and Middlebrook 7H10 agar (Millipore, MERCK, Darmstadt, Germany) supplied with 0.5% Tween 80 and 0.4% glycerol in case of *M. smegmatis* and extended with a spreader for incubation for 16–24 h in an oven at 37 °C. The

Table 2. Antiviral Results of Cranberry Cream against Bacteriophage MS2 after 1 min of Contact^a

treatment	virus concentration (PFU/mL)	log reduction	viral inactivation (%)
CONTROL (TSB)	$1.29 \times 10^7 \pm 4.38 \times 10^6$		
CONTROL C (cream with no treatment)	$1.70 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^6$	0	~0
CREAM 10%	$1.77 \times 10^5 \pm 4.77 \times 10^4$	~2	98.6
CREAM 6%	$1.12 \times 10^6 \pm 1.47 \times 10^5$	~1	91.3
CREAM 5%	$1.43 \times 10^7 \pm 2.95 \times 10^6$	~0	~0
CREAM 4%	$6.93 \times 10^6 \pm 1.55 \times 10^6$	~0	~0
CREAM 3%	$1.65 \times 10^7 \pm 1.80 \times 10^6$	~0	~0

^aVirus concentration in PFU/mL, log reduction, and percentage of viral inactivation.

colonies in CFU/mL of each sample were compared with those of the medium dilution control and the cream dilution with no cranberry treatment control. The antimicrobial activity was determined after different contact times (1, 2, 5, 15, and 24 h).

RESULTS AND DISCUSSION

Antiviral Results. The results obtained with the $\Phi 6$ bacteriophage showed clear phage inactivation after 1 min of contact. Viral inactivation was totally achieved (0.00 ± 0.00 PFU/mL, see Table 1) by the cranberry-based cream diluted at a concentration of 3, 4, 5, 6, and 10%.

The results of the test of a 10% cream dilution with no cranberry extract (CONTROL C) showed a viral concentration of $2.76 \times 10^6 \pm 3.96 \times 10^5$ PFU/mL, similar to those of the control test with no cream ($6.32 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$ PFU/mL). These results suggest a highly potent antiviral activity of the cranberry cream against enveloped viruses such as the Φ bacteriophage (see also the titration images in Figure 2), which is a good surrogate of SARS-CoV-2, confirming our hypothesis of antiviral activity.

Cranberry cream was also tested against a model of non-enveloped viruses such as bacteriophage MS2. After 1 min

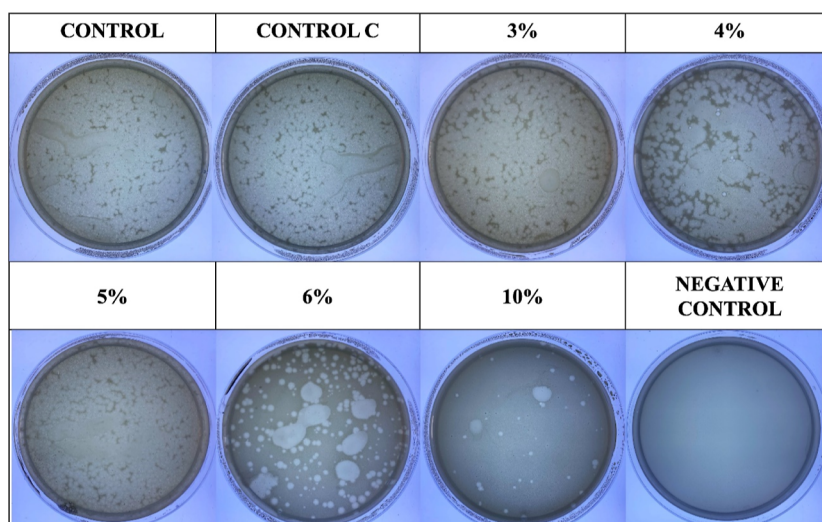


Figure 4. Bacteriophage MS2 viability determined by the double-layer method after 1 min of contact. Titration images of undiluted samples for TSB (control), 10% dilute cream with no treatment (CONTROL C), 3% dilute cranberry cream in TSB (3%), 4% dilute cream in TSB (4%), 5% dilute cream in TSB (5%), 6% dilute cream in TSB (6%), 10% dilute cream in TSB (10%), and TSB with no phage to control possible contaminations (negative control). Images show a clear reduction of MS2 infection capacity (clear spots) when treated with dilute cranberry cream after 1 min of contact.

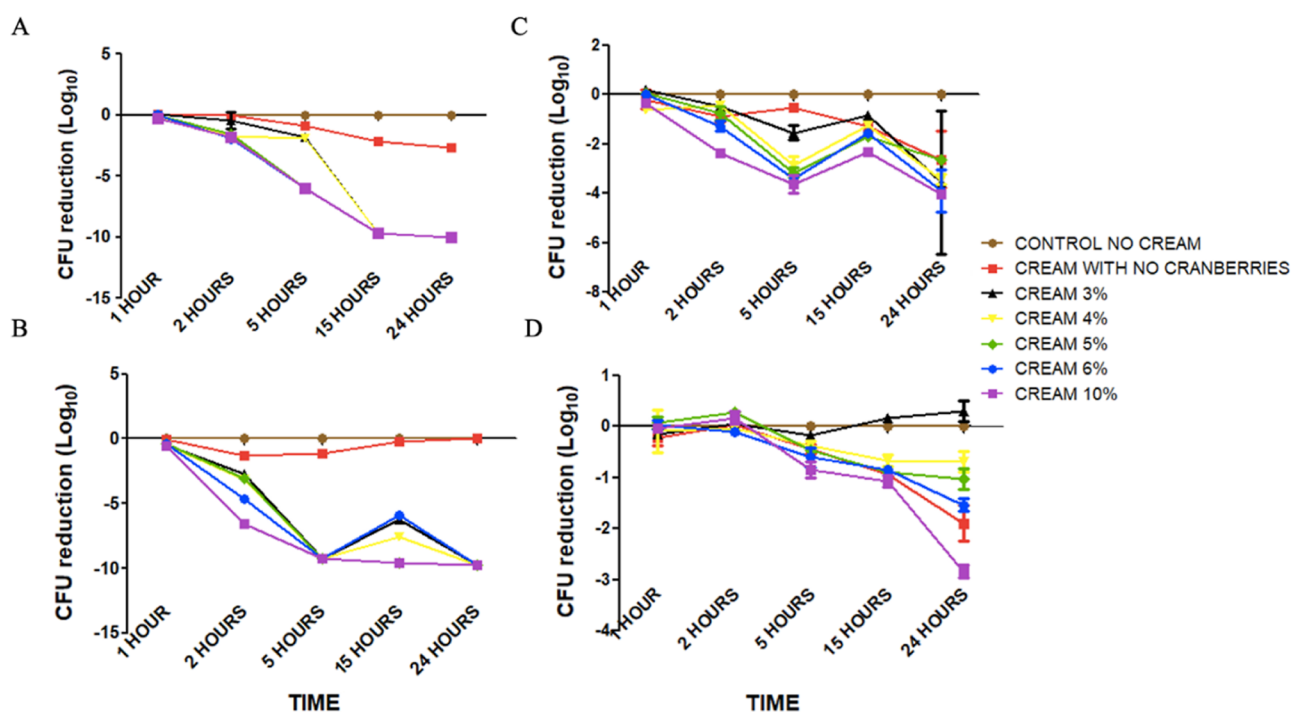


Figure 5. Antibacterial results of cranberry cream against MRSA (A); *E. coli* (B); *M. smegmatis* (C); and *C. albicans* (D). Results are shown as a logarithm of colony forming unit (CFU)/mL reduction.

contact, 10 and 6% dilute cranberry cream reduced the viral activity of MS2 by 98.63 and 91.32%, respectively (Figure 3).

Plaque-forming units were greatly reduced after exposing bacteriophage MS2 to 10 and 6% dilute cranberry cream ($1.77 \times 10^5 \pm 4.77 \times 10^4$ and $1.12 \times 10^6 \pm 1.47 \times 10^5$ PFU/mL, respectively) (Table 2).

The control tests showed $1.29 \times 10^7 \pm 4.38 \times 10^6$ PFU/mL and $1.70 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^6$ PFU/mL for the control with TSB and the control with 10% dilute cream without cranberry extract, respectively (Figure 4).

After 1 min of contact, 5, 4, and 3% dilute cranberry cream were not able to inactivate bacteriophage MS2 after 1 min of contact (Table 2 and Figure 4).

The pharmacological potential of cranberry extract has been established^{44–47} besides its use in the cosmetics industry, where it has been suggested as a disinfectant.⁴⁸ Its antiviral activity against non-enveloped viruses such as bacteriophage MS2, which is an ssRNA virus, was shown after 1 h of contact.⁴⁹ In the present study, we found that the cream can inactivate non-enveloped viruses such as bacteriophage MS2 in less than 1 min, much faster than in any previous study.

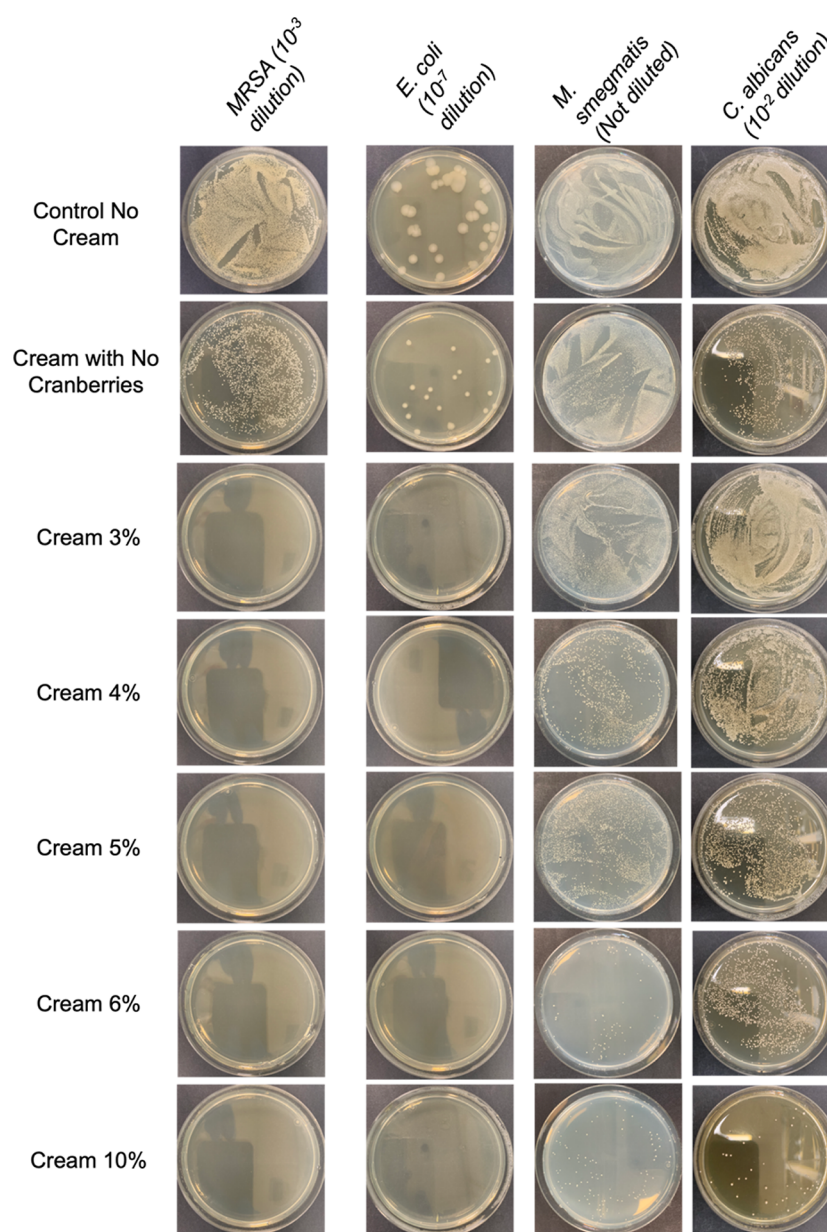


Figure 6. Reduction of bacterial and fungal colonies in antibacterial and antifungal tests after 24 h of contact with the cranberry extract lipstick.

Antiviral activity can be explained by PACs binding and destroying the viral capsid configuration or inhibiting the action of the key enzymes involved in viral replication.⁵⁰ Different studies have shown that PACs prevent bacteriophages from attaching to their hosts.⁵¹

Antimicrobial Results. The antimicrobial results versus MRSA, *E. coli*, *M. smegmatis*, and *C. albicans* obtained by the colony-counting method are shown in Figure 5.

Figure 5 reveals cranberry cream's potent antibacterial activity against both Gram-positive MRSA and Gram-negative *E. coli*. High dilutions of this cream (5, 6, and 10%) show a strong antibacterial response (>5 logarithm reduction, equal to $\approx 100\%$ bacterial inactivation) against MRSA after only 5 h of contact. All cream dilutions reduce the *E. coli* CFU by more than 2 logarithms after only 2 h of contact, which means that more than 99.79% of the bacteria are inactivated after 2 h of contact.

Antimicrobial activity also exists for *M. smegmatis* and *C. albicans*. *M. smegmatis* was reduced after 5 h of contact with 4, 5, and 6% cream dilutions, rising to a >4 logarithm reduction after 24 h of contact. Significant results were obtained for *C. albicans* after 15 h of contact, when 10% dilute cream reduced 1 logarithm of the fungal concentration. After 24 h of contact, concentrations up to 5% showed a significant reduction of the fungal concentration.

Figure 6 gives the results of antibacterial and antifungal tests after 24 h of contact. Figure 5 clearly shows a severe reduction of bacterial and fungal colonies, resulting in bacterial or fungal death when in contact with the cranberry extract lipstick. The reduction of bacterial and fungal colonies after 1, 2, 5, and 15 h of contact is provided in the Supporting Information (Figures S1–S4, respectively).

CONCLUSIONS

The antimicrobial lipstick developed and described in this study has been shown to inactivate enveloped viruses such as SARS-CoV-2, herpes, and Epstein–Barr and non-enveloped viruses such as hepatitis A in less than 1 min of contact, which is a much shorter time than in any other previously published study. We developed a novel bio-based lipstick containing cranberry extract, a substance with antiviral activity against other viruses such as herpes type 1, herpes type 2, or influenza. These findings reinforce the idea that PACs could affect the viral capsid and alter its glycoproteins, leading to complete viral inactivation. The antibacterial activity of the novel lipstick has also been demonstrated against multidrug-resistant bacteria such as MRSA or other bacteria such as *E. coli*, indicating the ability of cranberry cream to eliminate bacteria dangerous to human beings. Furthermore, the antimicrobial lipstick developed in this work also offers protection against *M. smegmatis*, a surrogate of *Mycobacterium tuberculosis* and the *C. albicans* fungus.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.2c19460>.

Reduction of bacterial and fungal colonies after 1, 2, 5, and 15 h of contact (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Ángel Serrano-Aroca – Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, 46001 Valencia, Spain; orcid.org/0000-0002-9953-3848; Email: angel.serrano@ucv.es

Authors

Alberto Tuñón-Molina – Doctoral School and Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, 46001 Valencia, Spain; orcid.org/0000-0003-3819-7390

Alba Cano-Vicent – Doctoral School and Biomaterials and Bioengineering Laboratory, Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, 46001 Valencia, Spain; orcid.org/0000-0001-7662-7748

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.2c19460>

Author Contributions

Á.S.-A.: conceived the idea for this work, designed the experimental procedure, supervised, funded acquisition, investigated, administered project, resourced, wrote the draft manuscript, prepared figures, performed major editing, reviewed, and proofread the manuscript. A.T.-M.: investigated, curated data, performed experiments, wrote the draft manuscript, and prepared figures. A.C.-V.: investigated and performed experiments.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the *Fundación Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir* for grant no. 2020-231-006UCV and to the Spanish Ministry of Science and Innovation (PID2020-119333RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) for their financial support (awarded to Á.S.-A.).

REFERENCES

- (1) Morawska, L.; Cao, J. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: The World Should Face the Reality. *Environ. Int.* **2020**, *139*, 105730.
- (2) Hassan, S. S.; Ghosh, S.; Attrish, D.; Choudhury, P. P.; Aljabali, A. A. A.; Uhal, B. D.; Lundstrom, K.; Rezaei, N.; Uversky, V. N.; Seyran, M.; Pizzol, D.; Adadi, P.; Soares, A.; El-Aziz, T. M. A.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M. M.; Azad, G. K.; Sherchan, S. P.; Baetas-da-Cruz, W.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á.; Chauhan, G.; Palu, G.; Brufsky, A. M. Possible Transmission Flow of SARS-CoV-2 Based on ACE2 Features. *Molecules* **2020**, *25*, 5906.
- (3) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard/WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. <https://covid19.who.int/> (accessed Sept 26, 2022).
- (4) Robinson, J. F.; Rios de Anda, I. R. d.; Moore, F. J.; Gregson, F. K. A.; Reid, J. P.; Husain, L.; Sear, R. P.; Royall, C. P. How Effective Are Face Coverings in Reducing Transmission of COVID-19? *Aerosol Sci. Technol.* **2022**, *56*, 473–487.
- (5) Mello, V. M.; Eller, C. M.; Salvio, A. L.; Nascimento, F. F.; Figueiredo, C. M.; Silva, E. S. R. F.; Sousa, P. S. F.; Costa, P. F.; Paiva, A. A. P.; Mares-Guias, M. A. M. M.; Lemos, E. R. S.; Horta, M. A. P. Effectiveness of Face Masks in Blocking the Transmission of SARS-CoV-2: A Preliminary Evaluation of Masks Used by SARS-CoV-2-Infected Individuals. *PLoS One* **2022**, *17*, No. e0264389.
- (6) Tuñón-Molina, A.; Takayama, K.; Redwan, E. M.; Uversky, V. N.; Andrés, J.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Masks: Current Status and Future Trends. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 56725–56751.
- (7) Li, D. T. S.; Samaranyake, L. P.; Leung, Y. Y.; Neelakantan, P. Facial Protection in the Era of COVID-19: A Narrative Review. *Oral Dis.* **2021**, *27*, 665–673.
- (8) Morales, M. B.; Ortiz-Muñoz, L.; Duarte Anselmi, G.; Rada, G. Use of Gloves for the Prevention of COVID-19 in Healthy Population: A Living Systematic Review Protocol. *Health Sci. Rep.* **2021**, *4*, No. e255.
- (9) Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9518.
- (10) Martí, M.; Tuñón-Molina, A.; Aachmann, F.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcus Epidermidis*. *Polymers* **2021**, *13*, 207.
- (11) Cano-Vicent, A.; Tuñón-Molina, A.; Martí, M.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Takayama, K.; Serrano-Aroca, Á. Antiviral Face Mask Functionalized with Solidified Hand Soap: Low-Cost Infection Prevention Clothing against Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2. *ACS Omega* **2021**, *6*, 23495–23503.
- (12) Jung, S.; Yang, E. Y.; Byeon, D. G.; Kim, D. G.; Lee, S.; Ryou, S.; Lee, C. W.; Shin, H. W.; Jang, J. Y.; Kim, H. J.; Lee, S. Copper-Coated Polypropylene Filter Face Mask with SARS-COV-2 Antiviral Ability. *Polymers* **2021**, *13*, 1367.
- (13) Borkow, G.; Lustiger, D.; Melamed, E.; Herrera, V.; Ackerman, D.; Reid, S. P.; Santarpiá, J. Copper-Oxide Impregnated Respiratory Masks May Significantly Reduce the Risk of SARS-CoV-2 Cross-Contamination. *Res. Sq.* **2020**, 1–8.
- (14) Ananth, A.; Dharaneedharan, S.; Heo, M. S.; Mok, Y. S. Copper Oxide Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Structure-Specific Antibacterial Performance. *Chem. Eng. J.* **2015**, *262*, 179–188.

- (15) Assis, M.; Simoes, L. G. P.; Tremiliosi, G. C.; Coelho, D.; Minozzi, D. T.; Santos, R. I.; Vilela, D. C. B.; Santos, J. R. d.; Ribeiro, L. K.; Rosa, I. L. V.; Mascaro, L. H.; Andrés, J.; Longo, E. Sio2-Ag Composite as a Highly Virucidal Material: A Roadmap That Rapidly Eliminates Sars-Cov-2. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 638.
- (16) Serrano-Aroca, Á.; Takayama, K.; Tuñón-Molina, A.; Seyran, M.; Hassan, S. S.; Pal Choudhury, P.; Uversky, V. N.; Lundstrom, K.; Adadi, P.; Palù, G.; Aljabali, A. A. A.; Chauhan, G.; Kandimalla, R.; Tambuwala, M. M.; Lal, A.; Abd El-Aziz, T. M.; Sherchan, S.; Barh, D.; Redwan, E. M.; Bazan, N. G.; Mishra, Y. K.; Uhal, B. D.; Brufsky, A. Carbon-Based Nanomaterials: Promising Antiviral Agents to Combat COVID-19 in the Microbial-Resistant Era. *ACS Nano* **2021**, *15*, 8069–8086.
- (17) Papi, M.; Palmieri, V.; Bugli, F.; De Spirito, M.; Sanguinetti, M.; Ciancico, C.; Braidotti, M. C.; Gentilini, S.; Angelani, L.; Conti, C. Biomimetic Antimicrobial Cloak by Graphene-Oxide Agar Hydrogel. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 12.
- (18) Hu, W.; Peng, C.; Luo, W.; Lv, M.; Li, X.; Li, D.; Huang, Q.; Fan, C. Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4317–4323.
- (19) Ashfaq, U. A.; Masoud, M. S.; Nawaz, Z.; Riazuddin, S. Glycyrrhizin as Antiviral Agent against Hepatitis C Virus. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 112.
- (20) Tong, T.; Hu, H.; Zhou, J.; Deng, S.; Zhang, X.; Tang, W.; Fang, L.; Xiao, S.; Liang, J. Glycyrrhizic-Acid-Based Carbon Dots with High Antiviral Activity by Multisite Inhibition Mechanisms. *Small* **2020**, *16*, 1906206.
- (21) Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Chandra, P.; Rabenau, H.; Doerr, H. W. Glycyrrhizin, an Active Component of Licorice Roots, and Replication of SARS-Associated Coronavirus. *Lancet* **2003**, *361*, 2045–2046.
- (22) Bailly, C.; Vergoten, G. Glycyrrhizin: An Alternative Drug for the Treatment of COVID-19 Infection and the Associated Respiratory Syndrome? *Pharmacol. Ther.* **2020**, *214*, 107618.
- (23) Takayama, K.; Tuñón-Molina, A.; Cano-Vicent, A.; Muramoto, Y.; Noda, T.; Aparicio-Collado, J. L.; Sabater i Serra, R.; Marti, M.; Serrano-Aroca, A. Non-Woven Infection Prevention Fabrics Coated with Biobased Cranberry Extracts Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12719.
- (24) Howell, A. B.; Reed, J. D.; Krueger, C. G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D. G.; Leahy, M. A-Type Cranberry Proanthocyanidins and Uropathogenic Bacterial Anti-Adhesion Activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2281–2291.
- (25) Rane, H. S.; Bernardo, S. M.; Howell, A. B.; Lee, S. A. Cranberry-Derived Proanthocyanidins Prevent Formation of Candida Albicans Biofilms in Artificial Urine through Biofilm- and Adherence-Specific Mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 428–436.
- (26) Global tuberculosis report 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021> (accessed Sept 26, 2022).
- (27) Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (accessed Sept 26, 2022).
- (28) Statistics/Invasive Candidiasis/Candidiasis/Types of Diseases/Fungal Diseases/CDC. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html> (accessed Sept 26, 2022).
- (29) Morgan, J.; Meltzer, M. I.; Plikaytis, B. D.; Sofair, A. N.; Huie-White, S.; Wilcox, S.; Harrison, L. H.; Seaberg, E. C.; Hajjeh, R. A.; Teutsch, S. M. Excess Mortality, Hospital Stay, and Cost Due to Candidemia: A Case-Control Study Using Data from Population-Based Candidemia Surveillance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2005**, *26*, 540–547.
- (30) Thompson, T. The Staggering Death Toll of Drug-Resistant Bacteria. *Nature* **2022**, DOI: 10.1038/D41586-022-00228-X.
- (31) Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carvalho, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Khorana, M.; Kisson, N.; Kobeissi, E.; Kostyanov, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Mussi-Pinhata, M. M.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Olivares-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thaiprakong, A.; Thwaites, G.; Turner, C.; Turner, P.; van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vu, H.; Walsh, T.; Waner, S.; Wangrangsimakul, T.; Wozniak, T.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655.
- (32) Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (accessed Sept 26, 2022).
- (33) Guéguen, N.; Jacob, C. Lipstick and Tipping Behavior: When Red Lipstick Enhance Waitresses Tips. *Int. J. Hosp. Manag.* **2012**, *31*, 1333–1335.
- (34) Cash, T. F.; Dawson, K.; Davis, P.; Bowen, M.; Galumbeck, C. Effects of Cosmetics Use on the Physical Attractiveness and Body Image of American College Women. *J. Appl. Soc. Psychol.* **1989**, *129*, 349–355.
- (35) Cox, C. L.; Glick, W. H. Resume Evaluations and Cosmetics Use: When More Is Not Better. *Sex Roles* **1986**, *14*, 51–58.
- (36) Graham, J. A.; Jouhar, A. J. The Effects of Cosmetics on Person Perception. *Int. J. Cosmet. Sci.* **1981**, *3*, 199–210.
- (37) Nash, R.; Fieldman, G.; Hussey, T.; Lévêque, J. L.; Pineau, P. Cosmetics: They Influence More than Caucasian Female Facial Attractiveness. *J. Appl. Soc. Psychol.* **2006**, *36*, 493–504.
- (38) Mulhern, R.; Fieldman, G.; Hussey, T.; Leveque, J. L.; Pineau, P. Do Cosmetics Enhance Female Caucasian Facial Attractiveness? *Int. J. Cosmet. Sci.* **2003**, *25*, 199–205.
- (39) Workman, J. E.; Johnson, K. K. P. The Role of Cosmetics in Impression Formation. *Cloth. Text. Res. J.* **1991**, *10*, 63–67.
- (40) Azwanida, N. N.; Normasarah, N.; Afandi, A. Utilization and Evaluation of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (Hylocereus Polyrhizus) as a Natural Colorant for Lipstick. *J. Teknol.* **2014**, *69*, 2180–3722.
- (41) Dwivedi, S. Formulation, Evaluation and Antimicrobial Activity of Herbal Lipstick. *Recent Advances in Prospects and Potential of Medicinal Plants*; Gayatri Publication, 2009; pp 39–43.
- (42) Kropinski, A. M.; Mazzocco, A.; Waddell, T. E.; Lingohr, E.; Johnson, R. P. Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *501*, 69–76.
- (43) Gill, S. R.; Fouts, D. E.; Archer, G. L.; Mongodin, E. F.; DeBoy, R. T.; Ravel, J.; Paulsen, I. T.; Kolonay, J. F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Dodson, R. J.; Daugherty, S. C.; Madupu, R.; Angiuoli, S. v.; Durkin, A. S.; Haft, D. H.; Vamathevan, J.; Khouri, H.; Utterback, T.; Lee, C.; Dimitrov, G.; Jiang, L.; Qin, H.; Weidman, J.; Tran, K.; Kang, K.; Hance, I. R.; Nelson, K. E.; Fraser, C. M. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant Staphylococcus Epidermidis Strain. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2426–2438.
- (44) Howell, A. B. Update on Health Benefits of Cranberry and Blueberry. *Acta Hort.* **2009**, *810*, 779–785.

(45) Su, X.; Howell, A. B.; D'Souza, D. H. Antiviral Effects of Cranberry Juice and Cranberry Proanthocyanidins on Foodborne Viral Surrogates—a Time Dependence Study in Vitro. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 985–991.

(46) Santhi, V. P.; Sriramavaratharajan, V.; Murugan, R.; Masilamani, P.; Gurav, S. S.; Sarasu, V. P.; Parthiban, S.; Ayyanar, M. Edible Fruit Extracts and Fruit Juices as Potential Source of Antiviral Agents: A Review. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 5181–5190.

(47) Su, X.; Sangster, M. Y.; D'Souza, D. H. In Vitro Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Surrogates. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, *7*, 1473–1479.

(48) Wang, Y.; Fang, S.; Wu, Y.; Cheng, X.; Zhang, L. k.; Shen, X. r.; Li, S. q.; Xu, J. r.; Shang, W. j.; Gao, Z. b.; Xia, B. q. Discovery of SARS-CoV-2-E Channel Inhibitors as Antiviral Candidates. *Acta Pharmacol. Sin.* **2022**, *43*, 781–787.

(49) Su, X.; Howell, A. B.; D'Souza, D. H. The Effect of Cranberry Juice and Cranberry Proanthocyanidins on the Infectivity of Human Enteric Viral Surrogates. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 535–540.

(50) Cannon, J. L.; Papafragkou, E.; Park, G. W.; Osborne, J.; Jaykus, L. A.; Vinjé, J. Surrogates for the Study of Norovirus Stability and Inactivation in the Environment: AA Comparison of Murine Norovirus and Feline Calicivirus. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2761–2765.

(51) Lipson, S. M.; Sethi, L.; Cohen, P.; Gordon, R. E.; Tan, I. P.; Burdowski, A.; Stotzky, G. Antiviral Effects on Bacteriophages and Rotavirus by Cranberry Juice. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 23–30.

