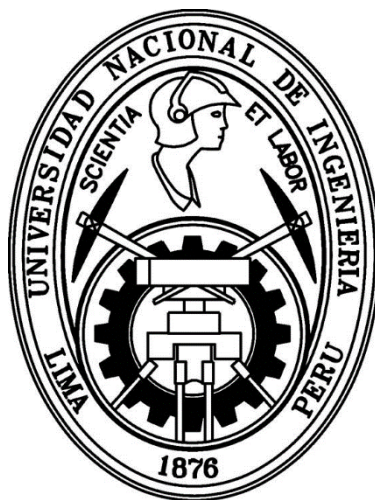


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**



**Tesis para optar el título profesional de:  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**Título:**

Electrodos modificados con quitosano y partículas de platino para la  
determinación rápida de *Escherichia coli*.

**Presentado por:**

B.Sc. Lucy Linders Coria Oriundo

**Profesor Asesor:**

Dr. Adolfo La Rosa Toro Gómez

Lima- Perú

**2014**

*Dedicado a mi hermano, mi abuela Maruja y a mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar deseo expresarle mi amor y gratitud a mi familia por ser la inspiración de cada paso dado día a día durante toda mi carrera, por su apoyo incondicional de cumplir con una de mis más grandes metas; al Dr. Adolfo La Rosa Toro por todo el apoyo brindado durante todo el proceso de desarrollo de este trabajo de investigación, así como ofrecerme su grandiosa amistad en todo momento; a mis grandes amigos Juan, Pilar y Pamela que siempre estuvieron conmigo empujándome a seguir adelante.*

*También quiero agradecer de manera muy especial a; Pilar García por su estupendo apoyo y enseñanza en los ensayos microbiológicos; al Dr. Alcides López y al Dr. José Solís por su apoyo en los análisis de microscopía de fuerza atómica.*

*A todos aquellos que fueron y serán siempre grandes maestros: toda la plana docente de la Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias y al personal de almacén: Amed, Sebastián, Sofía y Zoila, por su amistad y su posición siempre presta de ayuda.*

## RESUMEN

La contaminación de agua es uno de los más grandes problemas de la actualidad, y debido a esto es considerado como uno de los principales factores causante de muerte y enfermedades en todo el mundo. Sin embargo la contaminación del agua no solo está involucrada con respecto a contaminantes químicos, sino también a sedimentos y sólidos suspendidos, nutrientes, y contaminantes biológicos.

Los contaminantes biológicos son microorganismos (bacterias, virus, protozoarios y helmintos) que son peligrosos para el ser humano; una incontable cantidad de éstos existen en el medio ambiente, y además en el cuerpo de los seres humanos y los animales. Muchas enfermedades infecciosas son causadas por contaminantes biológicos, tales como la tifoidea y la cólera, son las más común y el más grande riesgo de la salud pública asociada con el agua potable.

Existen diversas bacterias patógenas causantes de estas enfermedades, la presencia de bacterias coliformes, y en especial el *Escherichia coli*, pueden indicar la presencia de organismos peligrosos. El método más común usado para la determinación de este tipo de bacterias es el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas, luego del sembrado de una muestra en caldo nutritivo y su incubación por 24 horas.

En este trabajo se estudia el comportamiento de un compuesto de un biopolímero y un metal noble, preparado in situ, frente a la presencia de bacterias *Escherichia coli*, para así poder determinar de manera rápida y efectiva la concentración de éstas (UFC) en muestras de agua. El biopolímero estudiado es el quitosano, uno del más ampliamente investigado debido a sus excelentes propiedades como por ejemplo la no toxicidad y la biocompatibilidad, así como su capacidad de absorción de metales pesados y su poder bactericida.

Aprovechamos estas dos últimas propiedades, y su poder reductor para aumentar la conductividad del quitosano introduciendo en la red polimérica átomos metálicos que pueden crecer en el rango de los nanómetros según el método usado.

Si bien es cierto que el quitosano llega a ser un conductor iónico debido a la protonación y desprotonación de sus grupos amino, es necesario el uso de partículas metálicas como el platino, que mejoran la conductividad del mismo y además aportan con su actividad electrocatalítica.

Experimentalmente se ha comprobado que la interacción biológica entre el quitosano en medio ácido y la bacteria produce la inhibición del crecimiento de bacterias atribuyéndole actividad bactericida al quitosano, lo cual ya ha sido estudiado en la literatura, donde se indica que los grupos amino del quitosano interactúan electrostáticamente con la carga negativa de la pared celular, asociada a fosfolípidos y polifosfatos.

De esta manera a partir de estos resultados, se preparan nuevos electrodos modificados usando una película de quitosano como matriz y depositando sobre ella partículas de platino las cuáles proporcionan una mayor conductividad y área superficial así como su propiedad electrocatalítica. La determinación cuantitativa se realiza por potenciometría en donde se encuentra la relación lineal entre el potencial medido y el logaritmo de la concentración (mediante recuento en placas) con factores de correlación entre 0.97096 y 0.99811. Se realiza una comparación del comportamiento individual de cada uno de los compuestos, así como la caracterización estructural y superficial; además de la comparación de respuestas potenciométricas y de las curvas de calibración entre dos ensayos.

Las pruebas experimentales se llevaron a cabo en su mayoría en el Laboratorio de Investigación de Electroquímica Aplicada, mientras que algunas de las pruebas biológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Sección de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Ambiental. El análisis de los electrodos por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) fue realizado en el IPEN.

## ÍNDICE

<b>OBJETIVOS DE LA TESIS .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 AGENTES MICROBIALES EN EFLUENTES ACUOSOS .....	5
1.2. CONTAMINACIÓN BACTERIANA Y EFECTOS EN LA SALUD.....	8
1.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN MICROBIAL EN MUESTRAS DE AGUA.....	9
1.4 LA ELECTROQUÍMICA Y LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRABAJO CONTRA LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.....	14
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
2.1 ESTUDIO DEL <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	18
2.1.1 Propiedades bioquímicas de la envoltura celular del <i>E. coli</i> .....	20
2.1.2 Cuantificación de bacterias ( <i>E. coli</i> ) por recuento en placa .....	23
2.2 ESTUDIO FISICOQUÍMICO DEL QUITOSANO.....	25
2.2.1 Características fundamentales.....	25
2.2.2 Caracterización del quitosano.....	28
2.2.3 Aplicaciones del quitosano y su actividad antibactericida y antimicrobiana.....	33
2.3 ELECTRODOS DE CARBÓN MODIFICADOS CON PLATINO .....	35
2.3.1 Nanoestructuras de platino como sensores electroquímicos y su actividad catalítica.....	36
2.4 DETERMINACIÓN DE E. COLI POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS ..	39
2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ELECTRODOS .....	40
2.5.1 Voltametría cíclica (CV) .....	40
2.5.2 Espectroscopía Infrarrojo (IR).....	43
2.5.3 Espectroscopía RAMAN .....	47
2.5.4 Microscopía de Fuerza atómica (AFM).....	50
2.5.5 Potenciometría.....	53
<b>CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
3.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	57

3.1.1. Materiales .....	57
3.1.2 Equipos.....	57
3.1.3 Reactivos .....	57
PRIMERA PARTE: EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN <i>E. COLI</i> - QUITOSANO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL QUITOSANO....	59
3.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MUESTRA CONTROL DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	60
3.3 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS <i>E. COLI</i> Y QUITOSANO.....	61
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO .....	62
3.4.1 Valoración Conductimétrica .....	62
3.4.2 Espectro IR .....	64
3.5 RESULTADOS .....	64
SEGUNDA PARTE: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS.....	66
3.6 PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS.....	67
3.6.1 Electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano GC/CTS .....	67
3.6.2 Electrodo de carbón vítreo modificados con partículas de platino GC/PtPs.....	67
3.6.3 Electrodo de carbón vítreo modificados con quitosano y partículas de platino GC/CTS/PtPs .....	68
3.7 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS .....	70
3.7.1 Voltametría cíclica del electrodo GC/CTS.....	71
3.7.2 Voltametría cíclica de los electrodos GC/PtPs.....	72
3.7.3 Voltametría cíclica de los electrodos GC/CTS/PtPs.....	74
3.8 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS ELECTRODOS .....	75
3.8.1 Espectroscopía Infrarrojo .....	75
3.8.2 Espectroscopía RAMAN .....	75
3.8.3 Microscopía de fuerza atómica .....	76
TERCERA PARTE: DETERMINACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> POR POTENCIOMETRÍA .....	79
3.9 PROCESO DE OBTENCIÓN DE RESPUESTA POTENCIOMÉTRICA EN FUNCIÓN A LA CONCENTRACIÓN DE <i>E. COLI</i> .....	80

3.9.1 Preparación de medio de cultivo y cepas <i>E. coli</i> .....	80
3.9.2 Sistema de medición potenciométrica .....	80
3.9.3 Sembrado de muestras para la cuantificación de <i>E. coli</i> .....	82
3.10 RESULTADOS DE ENSAYOS REALIZADOS Y CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	83
3.10.1 Primer ensayo.....	83
3.10.2 Segundo ensayo.....	89
CUARTA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	93
3.11 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN <i>E. COLI</i> -QUITOSANO .....	94
3.12 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS .....	95
3.13 RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A CEPAS DE <i>E. COLI</i> .....	102
3.14 CURVAS DE CALIBRACIÓN Y COMPARACIÓN ENTRE ENSAYOS...	104
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES .....</b>	<b>106</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>



## Lista de Figuras

Figura 1. Principales contaminantes en efluentes acuosos. [3] .....	5
Figura 2. Contaminación de agua debido a efluentes acuosos. [4] .....	6
Figura 3. Tamaño y Compatibilidad. [23] .....	16
Figura 4. Representación de una bacteria <i>E. coli</i> . .....	18
Figura 5. Efecto del pH sobre las bacterias <i>E. coli</i> . [25].....	19
Figura 6. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de colonias de <i>E. coli</i> . [25] .....	20
Figura 7. Organización molecular de la membrana exterior de una bacteria Gram-negativa. [28].....	22
Figura 8. Esquema de diluciones en serie para recuento en placa. .....	23
Figura 9. Comparación de las estructuras moleculares de la quitina y el Quitosano. [30].....	26
Figura 10. Protonación de los grupos amino del quitosano en medio acuoso. [31].....	27
Figura 11. Celda unitaria ortorrómbica del quitosano sólido. [32] .....	28
Figura 12. Curva de titulación de una muestra de quitosano tomando medidas de pH. [34] .....	29
Figura 13. Valoración conductimétrica de una muestra de HCl y otra de quitosano disuelto en HCl. [35] .....	30
Figura 14. Espectro FTIR del quitosano con grado de desacetilación del 70%.....	31
Figura 15. Espectro RAMAN de quitosano.[38] .....	32
Figura 16. Señal potencial – tiempo de excitación en un experimento de voltametría cíclica. ....	41
Figura 17. Voltagrama cíclico típico para un proceso redox reversible $O + ne^- \rightleftharpoons R$ . [58].....	42

Figura 18. Distribución de la concentración de las formas reducidas y oxidadas del par redox a diferentes tiempos durante un experimento de voltametría cíclica correspondiente al potencial inicial (a), al potencial formal del par durante los barridos inverso y directo (b, d), y para el logro de la concentración cero del reactante en la superficie (c). [58].....	43
Figura 19. Cambio en el momento dipolar de una molécula diatómica heteronuclear. [59].....	44
Figura 20. Vibraciones de estiramiento y flexión. [59].....	46
Figura 21. Vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico. [59].....	46
Figura 22. Diferentes tipos de vibración de flexión. [59] .....	46
Figura 23. Vibraciones de flexión fuera y en el plano. [59] .....	47
Figura 24. Mecanismo de dispersión Raman. [60].....	48
Figura 25. Movimientos atómicos en modos normales de vibración en el CO <sub>2</sub> . [61] .....	49
Figura 26. Espectro Raman de una molécula de colesterol. Se muestran las típicas bandas vibracionales. [62].....	50
Figura 27. Vista esquemática de un tip de AFM cerca de una muestra. [64] .....	51
Figura 28. Esquema de un AFM. [64] .....	52
Figura 29. Fuerza en función de la distancia entre la punta – muestra. Modos de imagen del AFM basado en la interacción punta/muestra. [64].....	53
Figura 30. Esquema del proceso de valoración potenciométrica del quitosano.....	62
Figura 31. Curva de titulación conductimétrica de una muestra de quitosano en medio ácido con hidróxido de sodio.....	63
Figura 32. Espectro IR de una muestra de Quitosano sólido.....	64
Figura 33. Evaluación del poder bactericida del quitosano. (a) Placa control y (b) Placa usando una solución de quitosano 0.2% w/v. ....	65

Figura 34. Voltagramas obtenidos para la formación de partículas de platino sobre un electrodo de carbón vítreo, en una solución de 2mM de $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ en medio ácido a una velocidad de 50mV/s. ....	68
Figura 35. Voltagramas obtenidos para la formación de partículas de Platino sobre un electrodo de Quitosano 1%, en una solución de 2 mM de $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ en medio ácido a una velocidad de 50 mV/s. ....	69
Figura 36. Voltagrama estabilizado de Platino policristalino en solución de $H_2SO_4$ 0.5M a una velocidad de barrido de 50 mV/s. ....	70
Figura 37. Voltagrama del electrodo de quitosano sobre carbón vítreo en solución de $H_2SO_4$ 0.5M a velocidades de barrido de (a) 100 mV/s y (b) 50 mV/s. ....	71
Figura 38. Gráfico que muestra la variación o dependencia de la corriente de pico con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el electrodo de quitosano en medio ácido. ....	72
Figura 39. Voltagrama estabilizado para el electrodo GC/PtPs (sintetizado a 50 mV/s) en solución ácida $H_2SO_4$ 0.5M a una velocidad de barrido de 100 mV/s. (in situ: voltagrama de un electrodo de platino policristalino en medio ácido). ....	73
Figura 40. Voltagrama estabilizado para el electrodo GC/CTS/PtPs (sintetizado a 50 mV/s) en solución ácida $H_2SO_4$ 0.5M a una velocidad de barrido de 100 mV/s. (in situ: voltagrama de un electrodo de platino policristalino en medio ácido). ....	74
Figura 41. Espectros IR de los electrodos GC/CTS y GC. ....	75
Figura 42. Espectro Raman para los electrodos GC y GC/CTS. ....	76
Figura 43. Imagen AFM del electrodo GC/CTS. ....	77
Figura 44. Imágenes AFM de los electrodos (a) GC/PtPs y (b) GC/CTS/PtPs. ....	78

Figura 45. Sistema de análisis de medición potenciométrica para la determinación de <i>E. coli</i> .....	80
Figura 46. 1° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo <i>E. coli</i> por cada electrodo modificado preparado.....	85
Figura 47. 1° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo <i>E. coli</i> (sin excedente) por cada electrodo modificado preparado.....	86
Figura 48. 1° Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de <i>Escherichia coli</i> usando los electrodos modificados.....	87
Figura 49. 2° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo <i>E. coli</i> por cada electrodo modificado preparado.....	89
Figura 50. 2° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo <i>E. coli</i> (sin excedente) por cada electrodo modificado preparado.....	90
Figura 51. 2° Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de <i>Escherichia coli</i> usando los electrodos modificados.....	91

## Lista de Tablas

Tabla 1: Agentes patógenos y organismos productores de toxinas en aguas superficiales. [5].....	7
Tabla 2: Técnicas de cultivo establecidas. Adaptado de World Health Organization. (Continuación) .....	12
Tabla 3. Bandas de vibración del espectro IR del quitosano. [37] .....	31
Tabla 4. Bandas vibracionales del espectro RAMAN de quitosano. [39] .....	32
Tabla 5. Composición del caldo nutritivo del cultivo madre. ....	60
Tabla 6. Composición de la solución de evaluación del efecto del quitosano.....	61
Tabla 7. Datos para el cálculo del grado de desacetilación del quitosano.....	63
Tabla 8. Resultados de concentración de E. coli de la evaluación del efecto del quitosano. ....	65
Tabla 9. Electrodo usado durante las medidas potenciométricas. (Entre paréntesis se indica la velocidad de barrido a la cual fueron sintetizadas las partículas de platino) .....	81
Tabla 10. Volúmenes de solución madre de bacterias <i>E. coli</i> agregados a la solución de sulfato de sodio estéril.....	82
Tabla 11. Determinación de las concentraciones de bacterias <i>E. coli</i> por cada muestra de solución.....	83
Tabla 12. Medidas potenciométricas recolectadas durante el primer ensayo en función del volumen agregado de la solución madre.....	84
Tabla 13. Bandas vibracionales en el espectro IR del Quitosano. ....	95
Tabla 14. Área superficial real de los electrodos preparados. ....	99
Tabla 15. Bandas vibracionales del electrodo GC/CTS. ....	100
Tabla 16. Bandas vibracionales del espectro RAMAN en los electrodos GC y GC/CTS.....	101
Tabla 17. Datos de las curvas de calibración de los electrodos preparados para los dos ensayos realizados. ....	104

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>AFM</b>	Atomic Force Microscopy (Microscopia de Fuerza atómica)
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Colección de cultivos de tipo americano)
<b>ATP</b>	Adenosin Trifosfato
<b>ASV</b>	Anodic Stripping Voltammetry (Voltametría de Redisolución anódica)
<b>BDD</b>	Boron-doped Diamond (Diamante dopado con boro)
<b>BP</b>	Proteína de Unión de Nutrientes
<b>C</b>	Citosina
<b>CFUME</b>	Ultramicroelectrodo de fibra de carbono
<b>CM</b>	Membrana Citoplasmática
<b>CNT</b>	Nanotubos de carbono
<b>CP</b>	Proteína Portadora
<b>CTS</b>	Quitosano
<b>CV</b>	Voltametría cíclica
<b>DD</b>	Grado de desacetilación
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensayo inmunoenzimático)
<b>FTIR</b>	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier)
<b>G</b>	Guanina
<b>GC</b>	Carbón vítreo
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>LP</b>	Lipo-proteína
<b>LPS</b>	Lipo-polisacárido
<b>LYS</b>	Lisosima

<b>NMP</b>	Número más probable
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAP</b>	p-aminofenol
<b>PAPG</b>	p-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidasa
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PG</b>	Capa de peptidoglicano
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>POL</b>	Sulfato de Polimixina B
<b>PP</b>	Proteína LamB
<b>PPS</b>	Espacio periplásmico
<b>PS</b>	Silicio poroso
<b>PtNPs</b>	Nanopartículas de platino
<b>PtPs</b>	Partículas de platino
<b>TNTC</b>	Too Numbers To Count (Demasiados números para contar)
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>v/v</b>	Porcentaje volumen – volumen.
<b>w/v</b>	Porcentaje peso – volumen.

## **OBJETIVOS DE LA TESIS**



### OBJETIVO GENERAL:

- Proponer un nuevo método de determinación rápida de *Escherichia coli* (UFC) usando mediciones potenciométricas de nuevos electrodos modificados con quitosano y partículas de platino

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluación la interacción química-biológica entre las bacterias *Escherichia coli* – Quitosano.
- Preparación y caracterización de los electrodos:
  - Quitosano sobre carbón vítreo, GC/CTS.
  - Partículas de platino sobre carbón vítreo, GC/PtPs.
  - Partículas de platino sobre quitosano, GC/CTS/PtPs
- Evaluación de la respuesta potenciométrica del sistema usando los electrodos preparados, realizar curvas de calibración y comparar los resultados de los ensayos.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

Para la protección de la salud pública en contra de la infección de bacterias en el agua potable, el control de las bacterias es sumamente necesario. La salud mental y física de los seres humanos depende directamente de la calidad de la comida que éste consume. La determinación e identificación de los microorganismos, en este caso las bacterias, son necesarios para controlar la infestación bacterial en agua y comidas contaminadas. Es así que un método rápido y simple para determinar una especie de vida bacterial es muy esencial. Actualmente, los métodos para la detección de microorganismos, como las bacterias, dependen del análisis de la muestra usando una fuente de luz, un rayo láser, análisis espectroquímico, análisis de crecimiento en medios nutritivos, absorbancia óptica, tratamiento químico y de óxidos semiconductores, los cuáles son caros, tediosos y demandan gran cantidad de tiempo en algunos casos

El uso de *Escherichia Coli* es recomendado por la Organización mundial de la Salud (OMS) como el primer indicador bacterial de calidad para un análisis de rutina, el cual requiere la detección cero de células de *E. Coli* en un volumen de 100 mL de agua potable colectada durante una inspección. [1][2]

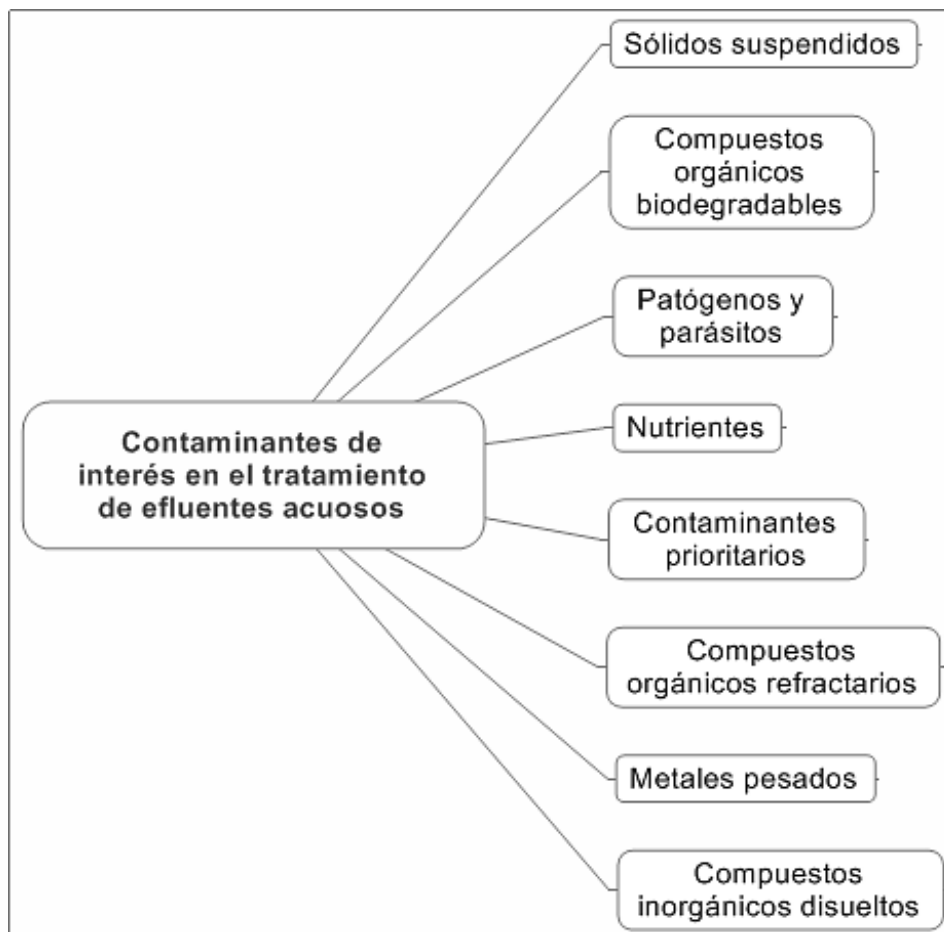
Es así que los métodos electroquímicos se han convertido en uno de los más usados debido a su rapidez y bajos límites de detección, de esta forma se han realizado investigaciones usando óxidos de metales nobles como espinelas de cobalto, nanopartículas de plata, platino, cobre y oro, además de electrodos de diamante dopados con boro (BDD). También se ha planteado usar biopolímeros, como el Quitosano, y nanopartículas de metales nobles, los cuales debido a sus propiedades son muy adecuados para este tipo de análisis.

De esta manera se pueden modificar electrodos con el fin de obtener una respuesta directa a la concentración de *E. coli*, usando un compósito de quitosano y partículas de platino.

## 1.1 AGENTES MICROBIALES EN EFLUENTES ACUOSOS

Las aguas superficiales están expuestas a una amplia gama de factores que pueden alterar su calidad y ocasionar cambios simples o complejos y con diferentes niveles de intensidad. Esta alteración se puede originar en eventos naturales o en actividades antropogénicas, como el uso doméstico del agua y la consiguiente producción de aguas residuales, de la industria, minería y agricultura, entre otras.

Los principales contaminantes encontrados en efluentes acuosos son compuestos orgánicos biodegradables, compuestos orgánicos volátiles, metales tóxicos, sólidos suspendidos, nutrientes (nitrógeno y fósforo), y patógenos microbiales y parásitos como se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Principales contaminantes en efluentes acuosos. [3]

Los microorganismos pueden ingresar al agua junto al polvo del aire o junto a la lluvia que cae, y cuando el agua pasa a través del suelo, es contaminada con residuos animales y humanos. La contaminación de los suministros de agua con aguas residuales sin tratar (desechos domésticos y humanos generados en áreas residenciales) son las rutas más comunes para permitir el ingreso de contaminantes biológicos al agua (Figura 2).



**Figura 2.** Contaminación de agua debido a efluentes acuosos. [4]

En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal.

El uso de aguas superficiales como fuente de agua de bebida implica un riesgo transmisión de enfermedades hídricas. Los agentes patógenos y los organismos que producen toxinas que pueden estar presentes en aguas superficiales y cuya transmisión hídrica está demostrada pertenecen a los grupos que se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Agentes patógenos y organismos productores de toxinas en aguas superficiales. [5]

<b>Bacterias</b>	<i>Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni.</i>
<b>Virus</b>	<i>Enterovirus, Rotavirus, Adenovirus.</i>
<b>Protozoos</b>	<i>Giardia, Cryptosporidium, Entamoeba histolytica, Balantidium coli.</i>
<b>Helmintos</b>	<i>Ascaris, Trichuris, Taenia.</i>
<b>Cyanobacterias</b>	<i>Anabaena, Microcystis.</i>

En las aguas superficiales se encuentra una amplia gama de organismos no perceptibles a simple vista. En condiciones normales, estos organismos permiten el desarrollo de los ciclos biológicos y químicos en el cuerpo del agua y no son necesariamente nocivos para la salud o para el tratamiento de agua.

Los microorganismos y organismos propios de las aguas superficiales están en permanente actividad y ninguno vive aislado. Su existencia depende del medio que los rodea. La supervivencia de los microorganismos propios de las aguas superficiales está ligada a la presencia de ciertos factores tales como temperatura, horas luz e intensidad luz, gas carbónico, nutrientes minerales, entre otros, y precisamente la contaminación del agua altera dichos factores debido a la introducción de sustancias extrañas.

Dentro de los tipos de microorganismos causantes de contaminación en el agua, tenemos:

- Bacterias: Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son las bacterias entéricas que colonizan en el tracto gastrointestinal del hombre y son eliminadas a través de la materia fecal. Cuando estos microorganismos se introducen en el agua, las condiciones ambientales son muy diferentes y por consiguiente su capacidad de reproducirse y de sobrevivir son limitadas. La presencia de coliformes fecales en el agua potable, y el *E. coli* en particular, pueden indicar una posible presencia de organismos dañinos y causantes de enfermedades.

- Virus: Los virus entéricos (intestinales) son producidos por personas infectadas y expulsados en las heces. La contaminación viral puede provenir de los efluentes de aguas residuales o por las heces expulsadas de una persona infectada cuando ésta usa las aguas del río o de un arroyo. Algunos virus entéricos son resistentes a la cloración. Los virus más comunes transmitidos por el agua son el polio, la hepatitis A y rotavirus. La presencia de algún virus entérico en los cuerpos del agua puede ser tomado como indicador de posible presencia de otros virus dañinos.
- Parásitos: los parásitos que son patógenos para el hombre se clasifican en dos grupos: los protozoos y los helmintos. Los protozoos son organismos unicelulares cuyo ciclo de vida influye en forma vegetativa y una forma resistente. El estado de quiste de estos organismos es relativamente resistente a la inactivación por medio de los sistemas de tratamiento convencional de agua residual. Los huevos de helminto son un grupo de organismos que incluyen los nematodos, tremátodos, y cestodos. Las características que hacen de los helmintos patógenos entéricos causantes de infección por contacto con agua contaminada, son su alta persistencia en el medio ambiente, la mínima dosis infecciosa, la baja respuesta inmune y la capacidad de permanecer en el suelo por largos periodos de tiempo. [6]

### 1.2. CONTAMINACIÓN BACTERIANA Y EFECTOS EN LA SALUD

Muchas personas son conscientes del riesgo que las bacterias presentan para la salud humana. Cuando el número de bacterias supera los estándares de salud establecidos, las personas expuestas al agua que contienen bacterias exhibirán fiebre, diarrea, dolores abdominales, dolor de pecho o hepatitis.

La *Escherichia coli* pertenece a un subgrupo de bacterias coliformes fecales. Incluso dentro de esta especie, existe una gran cantidad de cepas diferentes, algunas de las cuales pueden ser dañinas. Sin embargo la liberación de estos organismos en el medio ambiente ocurre de manera natural y generalmente no es causa de alarma. Pero, otras bacterias causantes de enfermedades, las cuales incluyen las cepas patogénicas de *E. coli*, o virus pueden también representar una amenaza para la salud. Existen muchas cepas de *E. coli* que son patógenas a sí mismas.

Uno de éstos que ha recibido mucha atención es la cepa de *E. coli* llamada O517:H7 que vive en el tracto intestinal de las vacas. Esta cepa se propaga principalmente a las personas por alimentos contaminados, carne de res mal cocida, o bebidas de leche no pasteurizadas y éstas generalmente no se encuentran en aguas superficiales.

Sin embargo, algunos investigadores han demostrado la presencia de bacterias patógenas en aguas superficiales, pero no todas las bacterias patógenas que se transmiten por el agua tienen igual significado para la salud. La presencia de algunas representa un serio riesgo y su eliminación del agua de consumo humano es de alta prioridad debido a que su ingestión podría ocasionar una epidemia con consecuencias graves para la salud de la población. Otras se presentan en forma natural en las aguas y normalmente no son patógenas, pero pueden causar enfermedades en personas con ciertas deficiencias orgánicas que facilitan la infección.

Las principales bacterias que tiene un alto significado para la salud se transmiten por vía oral. La mayoría tiene un tiempo de persistencia en el agua que va de corto a moderado, baja resistencia al cloro y una dosis infectiva alta. Uno de los factores que permite la transmisión hídrica es el alto número de bacterias que elimina un individuo enfermo. En el caso de la *E. coli*, elimina  $10^8$  por gramo de heces, otro factor importante es el tiempo de supervivencia en agua: la *E. coli* y la *Salmonella* viven 90 días. Con respecto a la dosis infectiva, factor que debe tenerse en cuenta cuando se trata de interpretar el significado de la presencia de las bacterias en el agua, la de *E. coli* está entre  $10^2$  y  $10^9$ . [7]

### 1.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN MICROBIAL EN MUESTRAS DE AGUA

El monitoreo y la identificación microbial es esencial para identificar fuentes de contaminación y establecer el nivel de tratamiento necesario para garantizar la potabilización del agua. En la detección, identificación y cuantificación de los organismos objetivos algunos enfoques están basados en una sola técnica mientras que otras estrategias toman como ventaja la combinación de diferentes métodos.



Las técnicas de cultivo tradicional son usualmente sensitivas pero la identificación generalmente no es confiable como sería lo deseable. Los métodos basados en biología molecular tienden a ser sensitivos y producen una identificación confiable, sin embargo las técnicas de cultivo siempre muestran los organismos viables mientras que los métodos moleculares generalmente revelan al organismo objetivo muerto o inactivo. Esto es de gran importancia en la desinfección de aguas y debería ser considerado en la interpretación de los resultados.

- Métodos de cultivo: Cada una de las técnicas de cultivo tiene un rango de detección particular dependiendo del volumen de la muestra. Mientras que límites de detección menores depende del máximo volumen de la muestra que se puede procesar, límites mayores pueden ser obtenidos dependiendo de la dilución de la muestra. El test de presencia/ausencia en algunos casos es usado para monitorear la calidad de las muestras cuando la presencia del organismo objetivo es improbable. Esto no proporciona información del nivel de contaminación si es que se obtiene un resultado positivo. En las técnicas basadas en el conteo de colonias la precisión aumenta con el incremento del número total de colonias contadas en cada réplica y a partir de diferentes diluciones. Así mismo, el límite superior de trabajo para una placa en las técnicas de conteo de colonias depende del método (selectividad y distinción del objetivo), el organismo objeto (tamaño de las colonias objetivo) y de la muestra. El balance entre la sensibilidad y selectividad es la razón por la cual estos métodos son aceptados para el análisis de agua potable y aguas altamente contaminadas. [8]

La Tabla 2, muestra los principales métodos de cultivos más usados así como las ventajas y desventajas de los mismos, donde los inconvenientes más comunes es la cantidad de cultivos a realizar, las réplicas, el volumen de muestra y los interferentes.

**Tabla 2:** Técnicas de cultivo establecidas. [9]

Técnica	Ventajas	Desventajas
<p>Número más probable usando un medio líquido (NMP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango de volumen de muestra flexible.</li> <li>- Se aplica a toda clase de muestras.</li> <li>- Permite reanimación y crecimiento del organismo.</li> <li>- Tiempo y esfuerzo mínimo necesario para iniciar el test.</li> <li>- La precisión y sensibilidad varían de acuerdo al volumen de muestra, número de diluciones y número de réplicas.</li> <li>- Barato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La precisión es baja para un número pequeño de réplicas.</li> <li>- Puede involucrar nuevas incubaciones lo que implica más tiempo.</li> <li>- Cuando la selectividad es baja, el organismo objetivo puede ser enmascarado por otros organismos.</li> <li>- La muestra puede contener inhibidores que afecten el crecimiento del organismo objetivo.</li> <li>- Es caro para muestras de gran volumen.</li> </ul>
<p>Vertido en placa</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método simple y barato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volumen máximo de muestra: 1ml.</li> <li>- El choque térmico puede causar la inhibición del organismo.</li> </ul>

**Tabla 2:** Técnicas de cultivo establecidas. Adaptado de World Health Organization. (Continuación)

Técnica	Ventajas	Desventajas
Método de extensión en placa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece para el reconocimiento de organismos aeróbicos.</li> <li>- Fácil diferenciación de las colonias.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volumen máximo de muestra: 1ml.</li> <li>- No es fácil el conteo de las colonias.</li> </ul>
Filtración en membrana.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rango de volumen de muestra flexible.</li> <li>- las impurezas de la muestra que puedan interferir son separadas mediante la filtración.</li> <li>- Buenos resultados cuantitativos y buena precisión.</li> <li>- No es necesario futuros cultivos, disminuyendo costo y tiempo.</li> <li>- La separación de las colonias de la membrana es sencilla.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variación en la calidad de las membranas.</li> <li>- Los sólidos y compuesto químicos adheridos durante la filtración pueden interferir con el crecimiento del organismo objetivo.</li> <li>- No se aplica a muestras turbias.</li> <li>- No siempre es fácil el conteo de las colonias.</li> </ul>

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Desde su invención el PCR ha sido uno de los ensayos bioquímicos más ampliamente usado. El PCR puede amplificar los niveles detectables de ácidos nucleicos asociados con patógenos que podrían estar presentes en pequeñas cantidades de muestra acuosa. Los ensayos detectan bacterias (y/o virus) después de la concentración en grandes volúmenes de muestra (100 a 1500 litros). Esto es usualmente acompañado por los proceso de filtración-adsorción y elución, resultando en un concentrado que contiene bacterias (microbios en general), compuestos orgánicos y sólidos disueltos. El PCR es un proceso en el cual se combinan el ADN objetivo, la enzima polimerasa y las subunidades de ADN en un tubo de ensayo que se somete a cambios de temperatura que estimulan la duplicación del ADN. Por medio de la repetición de este proceso y bajo ciertas condiciones ideales se pueden generar millones de copias a partir de una sola molécula de ADN con 20 o 30 repeticiones de cambio de temperatura (cada repetición requiere aproximadamente un minuto). El ensayo PCR puede amplificar selectivamente una porción del ADN objetivo que permitirá identificar al patógeno. El PCR estándar, sin embargo, solo puede detectar la presencia o ausencia de un ADN patógeno específico, no el estado de infección del organismo. [10]

Dentro del gran grupo de metodologías para cuantificación de organismos microbiales tenemos, habiendo mencionado las más comunes y aceptadas, podemos mencionar los métodos físicos (impedancia, microcalorimetría y citometría), los métodos químicos (Nucleasa termoestable, Lisado de Limulus, Sondas de ácidos nucleicos, Medida de ATP, Radiometría y Substratos Fluoro y Cromogénicos) y los métodos inmunológicos (Anticuerpo fluorescente, Serología de enriquecimiento, Test 1-2 de Salmonella, Radioinmunoensayo, ELISA y difusión en gel) los cuales si bien es cierto proporcionan resultados de mayor precisión, llegan a ser bastante tediosos, con tratamiento previo al análisis y que requieren de instrumentación costosa.

#### 1.4 LA ELECTROQUÍMICA Y LA NANOTECNOLOGÍA EN EL TRABAJO CONTRA LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA

Las bacterias o microbianos patógenos son uno de los enemigos mortales encontrados en biodefensa y bioseguridad. Los métodos estándar de cultivo para identificación de bacterias patógenas no proporcionan resultados suficientemente rápidos para ser usados en una situación de emergencia tal como un ataque biológico. Los transductores electroquímicos han emergido como una excelente opción para aplicaciones de biosensor debido a su bajo costo, miniaturización y portabilidad. En general, requieren un equipamiento simple, son integrados más fácilmente con dispositivos eléctricos, y son menos susceptibles a efectos medioambientales y contaminantes en comparación con otras técnicas. La electroquímica tradicional es llevada a cabo en solución en una celda electroquímica de tres electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contraelectrodo). [11]

En particular, el uso de las técnicas electroquímicas en sensores y biosensores ha sido prominente en la literatura y ha constituido la base de los biosensores con más éxito comercial para la detección de diversos analitos. La mayoría de estos dispositivos utilizan electrodos modificados, material biológico inmovilizado e incluso, muchos se combinan con técnicas de reconocimiento molecular. Sin embargo, en el terreno microbiológico, la aplicación directa de los mecanismos de transducción electroquímica a cultivos microbianos, que resulta una alternativa más económica ha sido menos abordada. Lógicamente, el éxito de las técnicas electroquímicas dependerá de las características de los electrodos empleados en la medición. Como ejemplo, encontramos en investigaciones previamente realizadas, la detección voltamétrica del crecimiento de *E. coli* en base a electrodos de capas delgadas. [12,13]

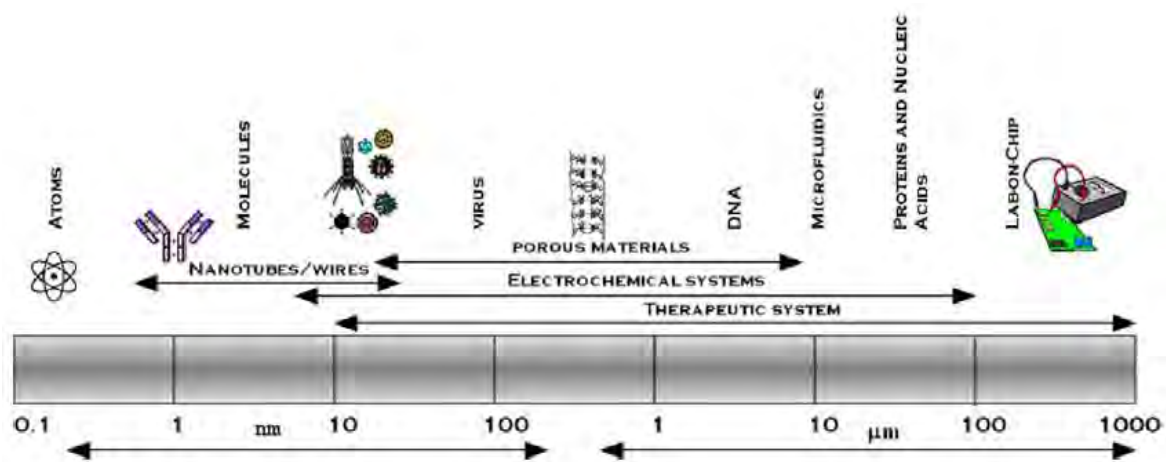
El comportamiento de las células vivientes, así como la existencia de una relación entre las poblaciones de células vivas y el comportamiento de un electrodo, han sido abordados en diferentes publicaciones. La mayoría de los métodos electroquímicos reportados para aplicaciones microbiológicas han sido fundamentalmente aproximaciones impedimétricas y conductimétricas, mientras que las técnicas de potencial variable sólo han sido analizadas por un número limitado de autores.

En la segunda mitad de la década del 70 se inició la detección microbiológica electroquímica usando dos electrodos de platino para determinar potenciométricamente las variaciones de voltaje debido al incremento de hidrógeno molecular producido por los microorganismos. El tiempo transcurrido hasta el inicio del incremento en el voltaje era una función del número de células en el inóculo. Así mismo, en ensayos de Voltametría cíclica con soluciones de levaduras y de bacterias, se han encontrado picos de oxidación a diferentes potenciales, con la sugerencia de que éste método podría servir para la identificación del microorganismo en estudio. [14,15,16,17]

Los ensayos electroquímicos basados en nanopuebas son atractivos debido a su bajo costo, alta sensibilidad, simplicidad, y fácil miniaturización. [18] Los sensores electroquímicos ofrecen una considerable promesa para evaluar el riesgo de contaminación de bacterias de una manera rápida, simple y barata en comparación con los métodos tradicionales. Es así, que los compósitos conductores han sido ampliamente usados como sensores electroquímicos, ya que consisten en método simple de inmovilización de materiales nanoestructurados para propósitos de bio-sensores, a partir de moléculas biológicas de alto peso molecular, nanopartículas metálicas o nanotubos de carbono. [19,20] Además, los sensores electroquímicos presentan algunas ventajas sobre otros sistemas analíticos ya que ellos pueden operar en medios turbios, ofrecen una sensibilidad instrumental comparable y son más factibles a la miniaturización. Las técnicas voltamétricas han sido recientemente usadas en la medición directa de población de microorganismos. Las técnicas electroquímicas en general pueden ser empleadas además como monitores de metabolitos específicos y/o substratos en un medio selectivo. [21]

Los sensores electroquímicos nanoestructurados proporcionan una serie de soluciones a muchos problemas que ocurren en otros ensayos. Muchos métodos diferentes han sido usados para lograr un adecuado sensor electroquímico usando nanopartículas metálicas o por generación de electrodos nanoestructurados. [22] Si hablamos de biosensores, entonces la integración de sistemas biológicos y materiales nanoestructurados requiere que la información sea inducida a través de la interface en un formato consistente y reproducible.

Recientes avances en el campo de la nanotecnología y procesamiento han resultado en biosensores en estado sólido que ofrecen una compatibilidad imprecedentede de materiales inorgánicos, con agentes químico/biológicos y así generar una detección estable, directa y reproducible. La compatibilidad dimensional de materiales nanoestructurados hace de la nanotecnología una opción obvia a partir de su habilidad de detectar 1 UFC/mL. La figura 3 ilustra la compatibilidad dimensional de agentes químicos y biológicos a materiales nanoestructurados y el rango de algunos de los métodos de detección más comunes.



**Figura 3.** Tamaño y Compatibilidad. [23]

Los nanotubos de carbono (CNTs) pueden ser usados para la detección individual de bio-moléculas y otros agentes biológicos. Dado que los CNTs son conductores, estos pueden actuar como electrodos en sistemas electroquímicos. Los biosensores basados en nanopartículas de oro, plata o partículas magnéticas se han usado para la detección de la oxidación de bases de ADN electroactivas, también se han inmovilizado anticuerpos en la superficie de una película delgada de un metal precioso para la detección de bacterias tipo *E. coli*. Además de los nanotubos y las nanopartículas, nuevos materiales tales como silicio poroso (PS) y carbón poroso con tamaños de poro compatible con las dimensiones de los agentes químicos y biológicos han sido usados para aplicaciones como biosensores. [23]

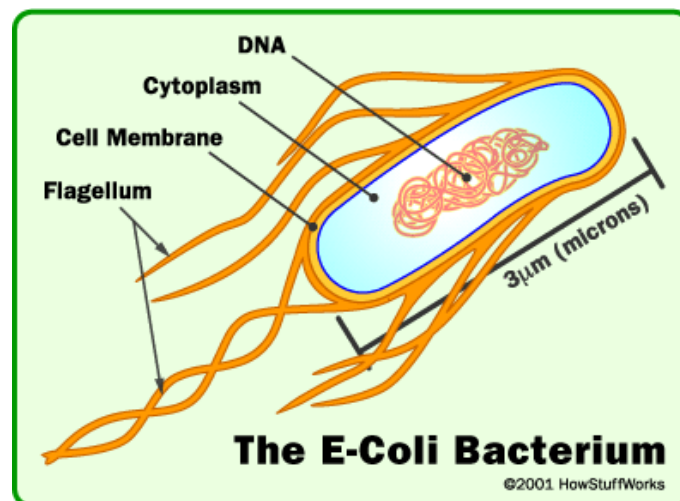
## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**



## 2.1 ESTUDIO DEL *ESCHERICHIA COLI*

La *Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar y en medios simples con o sin agregado de NaCl, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción guanina y citosina (G+C) de 39 a 59% en su ADN. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. [24]

Dado que el *E. coli* comúnmente forma parte de la microflora en el intestino largo, éste está acostumbrado a un medio de pH entre 7 y 8, y temperatura corporal de 37°C. La forma de estas bacterias es cilíndrica y está cubierta por flagelos (Figura 4).

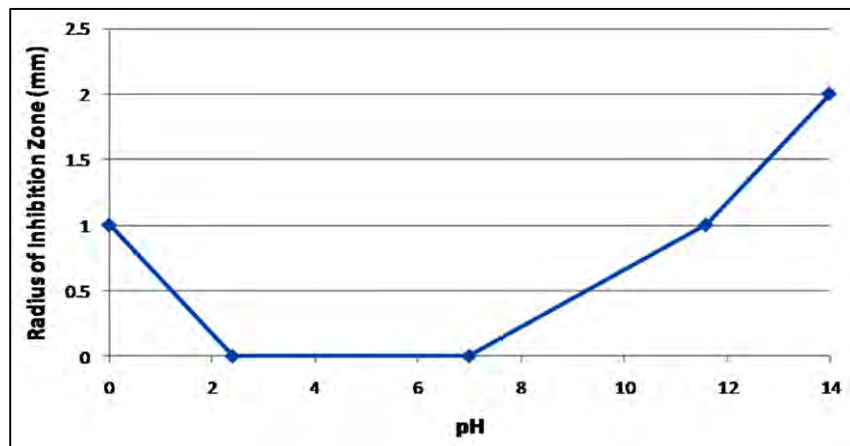


**Figura 4.** Representación de una bacteria *E. coli*.  
(Tomado de HowStuffWorks, 2001)

Las bacterias *E. coli* son procariotas, lo cual significa que no poseen núcleo; en lugar de eso, su ADN es un cromosoma continuo en forma de anillo el cual es llamado plásmido. Debido a que el plásmido se encuentra suspendido en el citoplasma, es muy fácil para la bacteria tomar ADN extraño y fragmentos de ARN, y agregarlos a su genoma.

De acuerdo al pH en el que viven este tipo de bacterias, son clasificadas como neutrófilos, es decir que pueden sobrevivir en medios de pH entre 6 y 8, similarmente de acuerdo a su temperatura óptima, se clasifican como mesófilos.

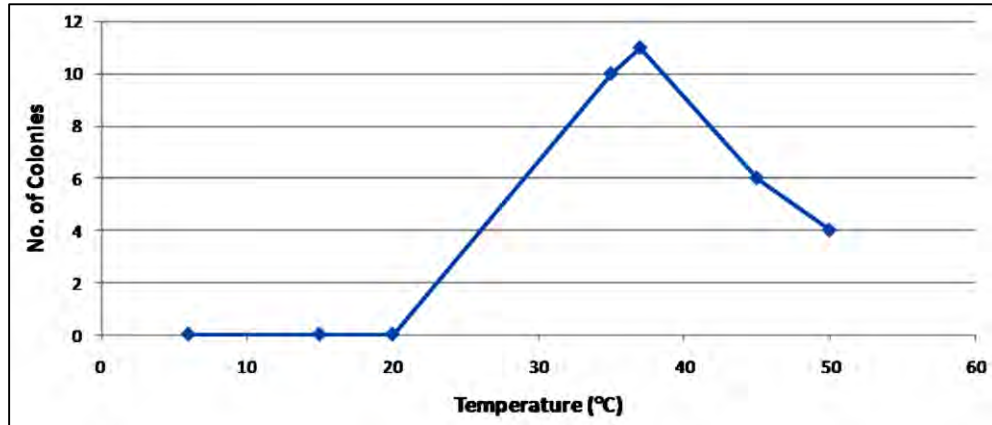
Las bacterias de *E. coli* aparecen más tolerantes a valores de pH medios (Figura 5), la razón por la cual no son hábiles para tolerar medios extremadamente alcalinos o ácidos es debido a que muchas de las enzimas que son parte de los procesos importantes en la bacteria son muy sensibles al pH. Cuando el cambio de pH es extremo, las enzimas en el *E. coli* comienzan a desnaturalizarse y son impedidas de realizar sus funciones. Dependiendo de la enzima, la desnaturalización podría causar todo tipo de interrupciones de los procesos bioquímicos, por lo tanto, la inhibición de las enzimas conduce a la muerte de la bacteria.



**Figura 5.** Efecto del pH sobre las bacterias *E. coli*. [25]

El efecto de la temperatura es similar al del pH, ya que se presenta una mayor cantidad de colonias en placa cuando fueron colocadas en una incubadora a 37°C (Figura 6).

Como en el caso del pH, cuando la temperatura es cambiada a una temperatura fuera del rango tolerable de una enzima, esta comienza a desnaturalizarse y no cumple sus funciones. [26]



**Figura 6.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de colonias de *E. coli*. [25]

### 2.1.1 Propiedades bioquímicas de la envoltura celular del *E. coli*

La envoltura celular de una bacteria Gram-negativa ha sido estudio de diversas revisiones recientemente. Esta envoltura consiste esencialmente de tres capas llamadas, membrana citoplasmática (o interna), la capa peptidoglicano (o mureina) y la membrana externa.

La figura 7 muestra la organización de la membrana exterior de una bacteria. Las posiciones más probables de los constituyentes de la membrana externa son indicadas esquemáticamente. El LPS y las moléculas de fosfolípidos son los mayores constituyentes de la bicapa asimétrica. Se supone que los cationes divalentes (no indicados) juegan un rol importante en interacciones del LPS. Sólo tres tipos de proteínas han sido nombrados como proteínas de poro incluyendo la proteína LamB (PP), proteína OmpA (A) y lipoproteína (LP). Las proteínas de poro han sido dibujadas sin interacciones con el peptidoglicano ni con lipoproteína. También se han indicado otros aspectos de la envoltura celular, como el espacio periplásmico (PPS) con una proteína de unión de nutrientes (BP), la capa de peptidoglicano (PG) y la membrana citoplasmática (CM) con una proteína portadora (CP).

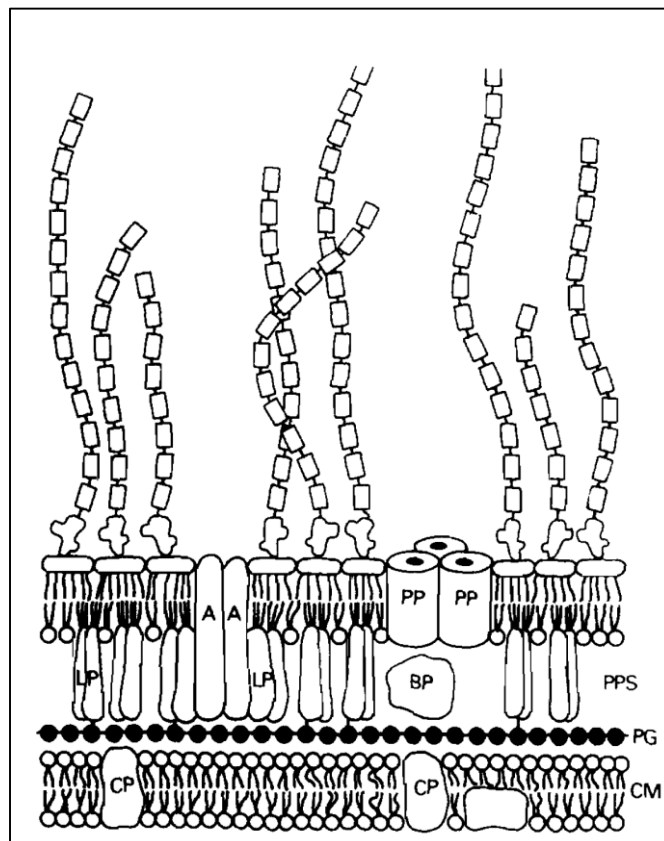
A pesar de que muchas de las proteínas solubles están presentes en el citosol, muchas de ellas están ubicadas entre las dos membranas en un compartimiento conocido como espacio periplásmico. Las dos membranas están interconectadas por las llamadas zonas de adhesión. La membrana externa no siempre es la membrana más externa de la envoltura celular ya que ésta está generalmente cubierta por una capa amorfa o con una llamada capa adicional o capa-A que consiste de un patrón regular de subunidades, usualmente proteínicos en la naturaleza. Ya que la membrana externa y la capa peptidoglicano están cercanamente asociadas una con otra, estas dos son referidas generalmente como la membrana externa de la pared celular.

El interés en particular en la membrana citoplasmática radica en que ésta funciona como la principal barrera de permeabilidad en la célula y además como lugar de organización de muchas enzimas enlazables a la membrana y multienzimas complejas, incluyendo el sistema respiratorio de transporte electrónico. [27]

La membrana citoplasmática contiene fosfolípidos y proteínas en cantidad similares. Ésta juega un rol importante en el transporte de nutrientes, en la fosforilación oxidativa, en la síntesis de fosfolípidos, peptidoglicano, lipopolisacáridos y, vía olisomas unidas a la membrana, proteínas periplásmicas y de la membrana. Además, esta está probablemente involucrada en la división celular y sirve como un ancla para el ADN, por lo menos durante la replicación.

La capa de peptidoglicano consiste en una red en la cual las cadenas lineales de azúcares aminos, conteniendo residuos de *N*- acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, están enlazados covalentemente a cada uno por entrecruzamiento que puede ser formado entre tripéptidos los cuales están adjuntos a los residuos del ácido *N*-acetilmurámico. En este tipo de bacterias, Gram-negativa, una monocapa de peptidoglicano rodea a la membrana citoplasmática. La rigidez de la capa de peptidoglicano permite a la célula mantener la presión osmótica del citoplasma a aproximadamente 3.5 atm.

La membrana externa contiene, además de fosfolípidos y proteínas, lipopolisacáridos (LPS) como mayor constituyente. La membrana está covalentemente enlazada a la capa de peptidoglicano a través de una lipoproteína. La membrana previene la liberación o fuga de las proteínas periplásmicas. Además, protege el contenido de la célula contra el ataque por agentes peligrosos como sales biliares y enzimas. Experimentalmente se ha concluido que la membrana externa o no es una bicapa fosfolípida o que su estructura de bicapa está muy bien protegido del medio. Esencialmente todos los fosfolípidos de la *E. coli* se encuentran en la envoltura celular. La fosfatidietanolamina es la mayor especie presente (90%) en la membrana externa, mientras que también se han encontrado cantidades substanciales de fosfatidiglicerol y difosfatiglicerol (o cardiolipina). [28]

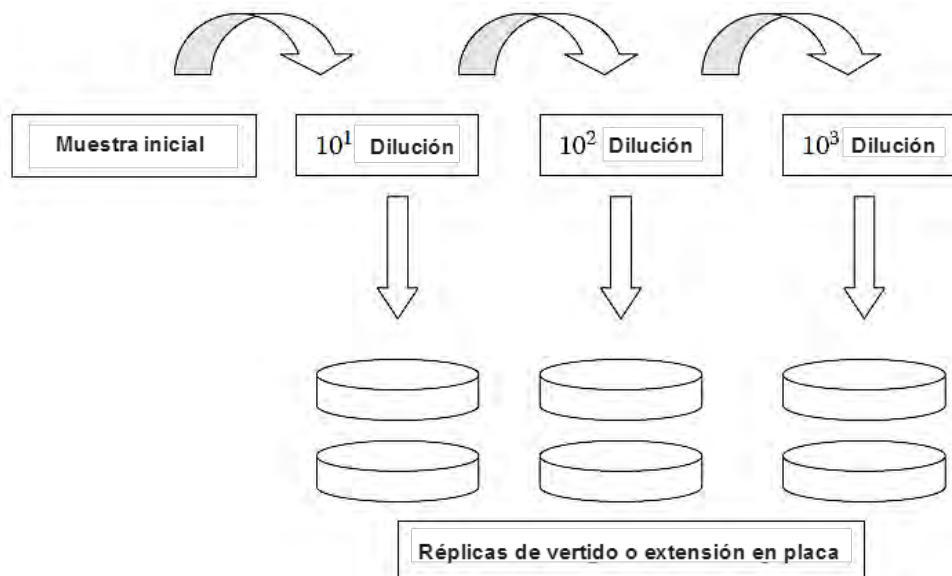


**Figura 7.** Organización molecular de la membrana exterior de una bacteria Gram-negativa. [28]

### 2.1.2 Cuantificación de bacterias (*E. coli*) por recuento en placa

El método de recuento en placa se utiliza principalmente en la enumeración de las muestras con un número de microorganismos o microorganismos que no crecen bien en medio líquidos. Los métodos de recuento en placa se utilizan en las áreas de alimentación, farmacéutica, medioambiental, incluyendo aplicaciones de agua potable y pruebas de biofilm.

El método de recuento en placa se basa en el recuento de células viables. El método de recuento en placa se lleva a cabo mediante la dilución de la muestra original en tubos de dilución en serie, seguido por el agregado de alícuotas de las diluciones preparadas en placas de agar mediante vertido o extensión en placa. La técnica de vertido en placa utiliza agar fundido de recuento en placa el cual es vertido en la respectiva placa y mezclado con una muestra de alícuota diluida en la placa, mientras que la técnica de extensión en placa utiliza la adición y la extensión de la alícuota de la muestra diluida en la superficie de un agar para recuento en placa sólido previamente formado en la placa. Un ejemplo de un esquema de series de diluciones para recuento en placa se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Esquema de diluciones en serie para recuento en placa.

Estas placas de agar de recuento en placa son luego incubadas de manera óptima y las colonias observadas en estas placas de agar de recuento en placa se cuentan como el número de unidades formadoras de colonia (UFC). El recuento de UFC asume que cada colonia está separada y fue fundada por una célula microbiana viable. El número total de colonias obtenidas en UFCs a partir de las placas de agar incubadas y el respectivo factor de dilución usado pueden ser combinados para calcular el número original de microorganismos en la muestra inicial en UFC por mL.

Los rangos de conteo típicos son de 25 a 250 UFC o 30 a 300 UFC por placa de agar estándar. Son tomadas en cuenta algunas consideraciones adicionales para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs) como son el conteo de esparcidos de placa, reportar demasiado números para contar (TNTC, siglas en inglés) en presentación de informes y estadísticas, redondeo y promedio del recuento en placa observado, y límites de detección y de cuantificación de conteo de placas. También existen supuestos de condiciones óptimas para el método de recuento en placa como los cambios en el nivel de recuento en placa de agar nutriente o que la temperatura puede afectar el crecimiento de la superficie de las bacterias.

Los principales equipos y los materiales utilizados para este método son tubos de dilución en serie (o botellas); placas Petri; pipetas; medio de crecimiento específico, diluyentes y reactivos; incubadora y el baño de agua con ajuste de temperatura óptima apropiada; esparcidor de placa o varilla. El medio específico o selectivo de cultivo también se puede utilizar en lugar de los medios de recuento en placa estándar para un recuento en placa de enumeración microbiana más específico.

Las fuentes de error utilizando este método son la preparación incorrecta o inadecuada de las muestras de ensayo, error de dilución en serie, condiciones de incubación óptimas, estimación debido a la agregación de células o aglutinación, y el error analista en el recuento de colonias o el cálculo de los resultados observados. [29]

## 2.2 ESTUDIO FISICOQUÍMICO DEL QUITOSANO

El quitosano es un polisacárido que se obtiene de la quitina parcialmente desacetilada y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$  1-4, cuya denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa (D-Glucosamina GlcN) y 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranosa-N-acetil-glucosamina.

La quitina es el polímero más abundante después de la celulosa. Está presente en la pared celular de los hongos, levaduras y en el exoesqueleto de los invertebrados como cangrejos e insectos. La principal fuente de obtención de la quitina son los desechos de los crustáceos.

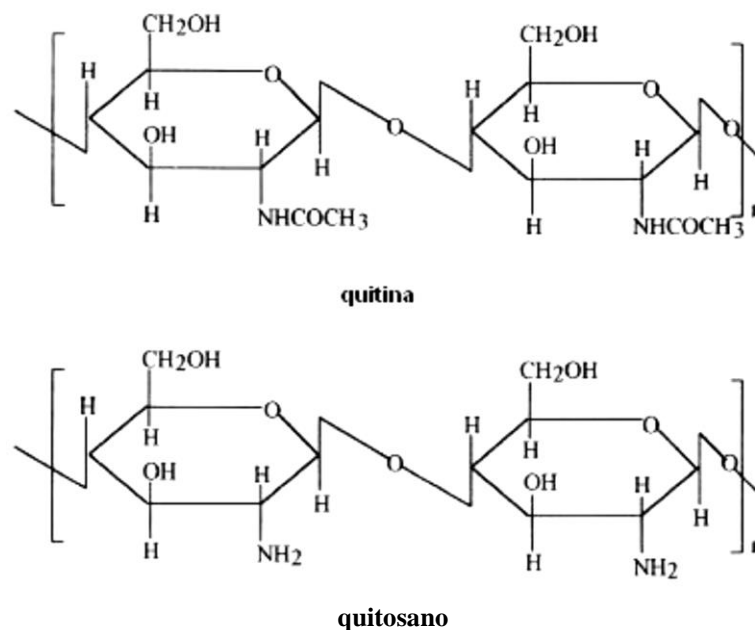
### 2.2.1 Características fundamentales

El quitosano tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7% y posee una distribución regular de los grupos amino libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente lo que le confiere un comportamiento de policación. Este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosano como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como los lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas. Una propiedad importante del quitosano es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puente hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo a Sugimoto (1999), se descompone aproximadamente a 170°C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno.

En cuanto al grado de acetilación se ha establecido, que la quitina con más de un 50% desacetilación debe ser considerada quitosano e incluso algunos investigadores lo definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso de los quitosanos el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60 – 98% (Figura 9).

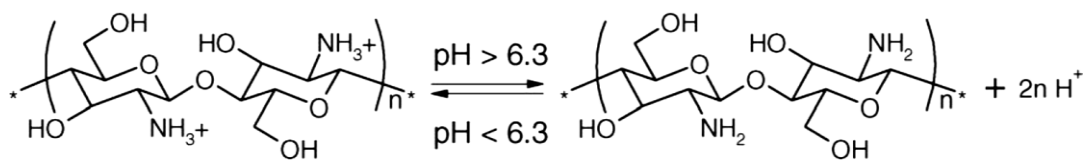


Las diversas funciones reportadas sobre el quitosano están relacionadas principalmente a la presencia de los grupos amino libres en cada residuo monomérico de su molécula. Estas funciones se atribuyen a las tres formas estructurales fundamentales en que se puede encontrar a la molécula: la forma cristalina hidratada, la cristalina no hidratada y la no cristalina o amorfa. Ogaa y Yui (1993), encontraron que muestras de quitosano en cristales anhidros no se disuelven con facilidad en disolventes tales como el ácido acético en solución acuosa; asimismo reportan que los estudios de difracción de rayos X muestran que en un quitosano totalmente desacetilado prevalece la presencia de formas polimórficas hidratadas. A medida que disminuye la desacetilación aparecen en el patrón de rayos X las señales débiles que sugieren la presencia de pequeñas cantidades remanentes de alfa quitina y la aparición de cristales de quitosano no hidratados. En estudios de cristalinidad del quitosano realizados también por Agüero et al. (1989), se obtuvieron resultados concordantes aplicando diferentes métodos analíticos tanto para muestras sólidas como para películas de quitosano. [30]



**Figura 9.** Comparación de las estructuras moleculares de la quitina y el Quitosano. [30]

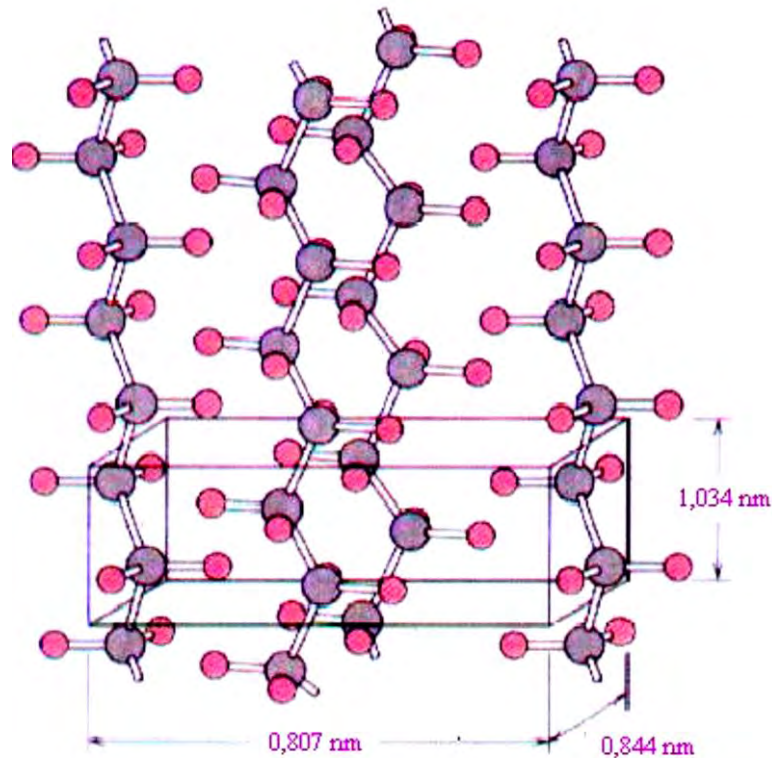
La solubilidad del quitosano es desarrollada normalmente disolviéndola en ácido acético al 1% o 0.1M. A valores de pH más bajos que 6.3 la protonación de los grupos amino conducen a la solubilidad del quitosano en soluciones acuosas. En la figura 10 se muestra el esquema de la protonación del quitosano en medio ácido. En efecto, la solubilidad es un parámetro difícil de ser controlado y está relacionado directamente con la desacetilación, la concentración iónica, pH, naturaleza del ácido usado para la protonación y la distribución de los grupos acetil a lo largo de la cadena, así como, las condiciones de extracción y secado del polisacárido. [31,32]



**Figura 10.** Protonación de los grupos amino del quitosano en medio acuoso. [31]

Las propiedades físicas y usos del quitosano han sido ampliamente investigados debido a que pueden ser químicamente modificados teniendo así diferentes grados de estabilidad, compatibilidad y funcionalidad en distintos sistemas biológicamente relevantes; además éste funciona como un hidrogel debido a su alta porosidad, estos hidrogeles están principalmente constituidos por agua, lo cual proporciona un ambiente biológicamente amigable y de libre difusión para pequeñas moléculas e iones. [30]

En estado sólido, el quitosano es un polímero semicristalino. Su morfología ha sido muy investigada, y se han mencionado muchos polimorfismos en la literatura. Una celda unitaria de quitosano contiene dos cadenas antiparalelas de quitosano y ninguna molécula de agua (Figura 11). La influencia de las condiciones de procesamiento en la cristalinidad también ha sido estudiada. [32]



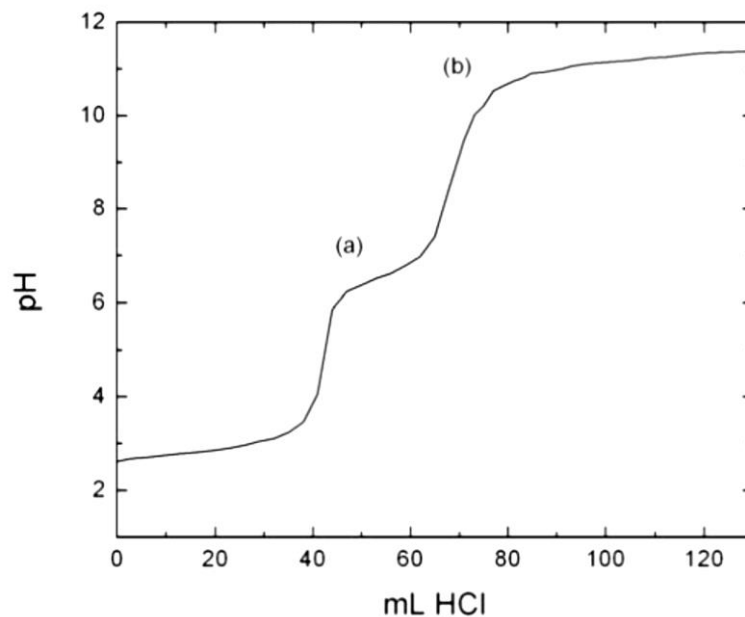
**Figura 11.** Celda unitaria ortorrómbica del quitosano sólido. [32]

### 2.2.2 Caracterización del quitosano

Las propiedades particulares del quitosano se deben a su estructura molecular, su grado de desacetilación y su peso molecular. Para determinar estas características del quitosano es necesario caracterizarlo. Existen diversas técnicas para la caracterización del quitosano, como son: Métodos de titulación (como el Conductimétrico y potenciométrico), hidrolíticos (como el HPLC), espectrométricos (como el infrarrojo y Raman).

- Titulación Potenciométrica: El quitosano se disuelve en un volumen conocido de solución acuosa de HCl ( $0.100 \text{ mol L}^{-1}$ ) y la solución es luego titulada con NaOH  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , mientras se va midiendo el pH de la solución. La figura 12 muestra la variación del pH versus el volumen agregado de base tiene dos puntos de inflexión: el primero corresponde a la neutralización del HCl, y el segundo a la neutralización de los iones amonio del quitosano.

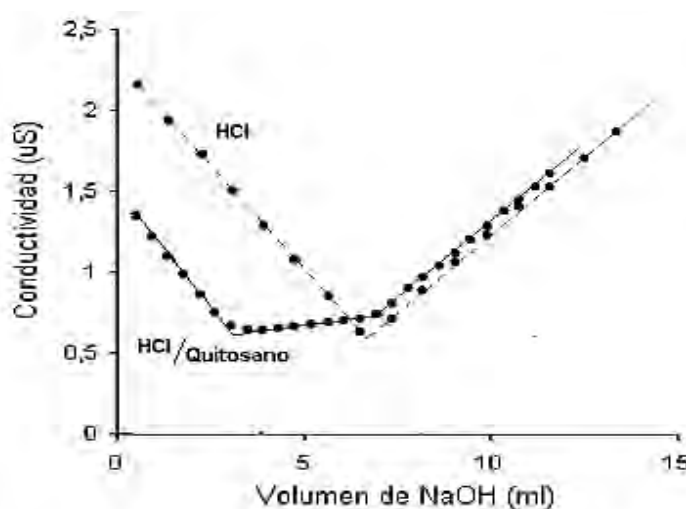
La diferencia entre estos dos puntos de inflexión da la cantidad de grupos amino del quitosano (grado de desacetilación). [33]



**Figura 12.** Curva de titulación de una muestra de quitosano tomando medidas de pH. [34]

- Titulación Conductimétrica: Durante la titulación conductimétrica se mide constantemente la conductividad eléctrica de la solución mientras ocurre la reacción química. Los iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{OH}^-$  contribuyen que la solución presente una buena conductancia ya que son los iones más conductivos. La muestra de quitosano se disuelve en solución de HCl y es titulado con porciones de 0.5 mL de solución de NaOH en intervalos de 20 segundos. Los valores de conductancia ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) son graficados versus los correspondientes valores de volumen de titulante, encontrando una relación lineal antes y después de los puntos de equivalencia (Figura 13). Se observan tres segmentos lineales. La primera línea que desciende rápidamente corresponde a la neutralización del HCl en exceso, el segundo fragmento corresponde a la neutralización de los grupos amonio, y el tercero al exceso de la base.

Los dos puntos estequiométricos se encuentran por intersección de las tres líneas y la diferencia entre estos dos puntos corresponde al volumen de la base requerido para neutralizar los grupos amonio.



**Figura 13.** Valoración conductimétrica de una muestra de HCl y otra de quitosano disuelto en HCl. [35]

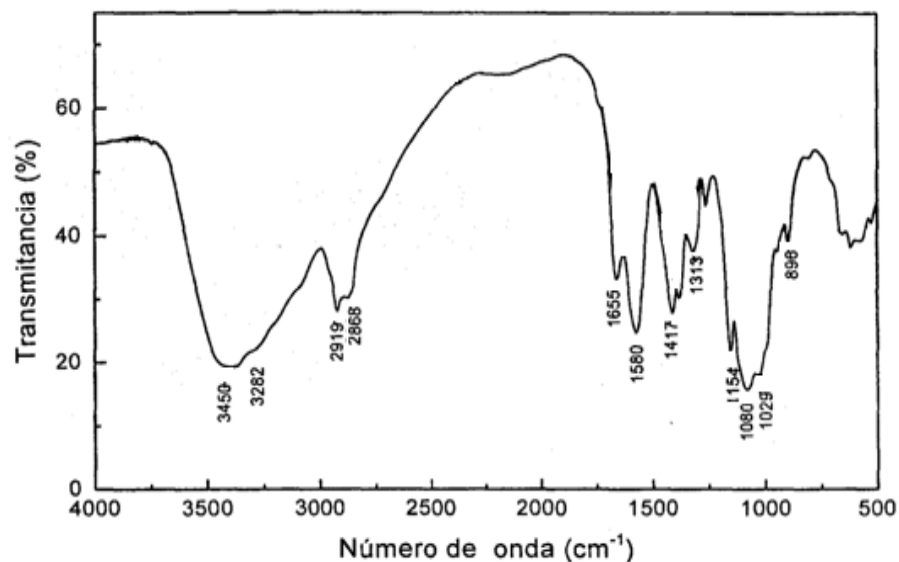
El porcentaje de grupos amino representado por el grado de desacetilación (DD) se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$\%DD = \frac{[base](V_2 - V_1)161}{m}$$

Dónde: [base] es la concentración de la solución de NaOH (en mol L<sup>-1</sup>), V<sub>1</sub> y V<sub>2</sub> son el volumen de NaOH (en mL) usados en la titulación, 161 es la masa molar del monómero (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>N) y m es la masa de quitosano (en mg). [36]

- Espectroscopía Infrarrojo: La espectroscopía de absorción en el infrarrojo puede ser empleada en análisis cuantitativos y determinación de estructura de compuestos. El efecto de que ciertos grupos de átomos presenten bandas en frecuencias del rango infrarrojo y que además éstas sean una especie de huella digital de infrarrojos única de cada molécula permite a los químicos, con la ayuda de otras técnicas, dilucidar la estructura de un compuesto.

El espectro IR puede ser obtenido con un disco de KBr o como película. La caracterización del quitosano mediante esta espectroscopía se realiza en la región de 500 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  como se muestra en la figura 14.



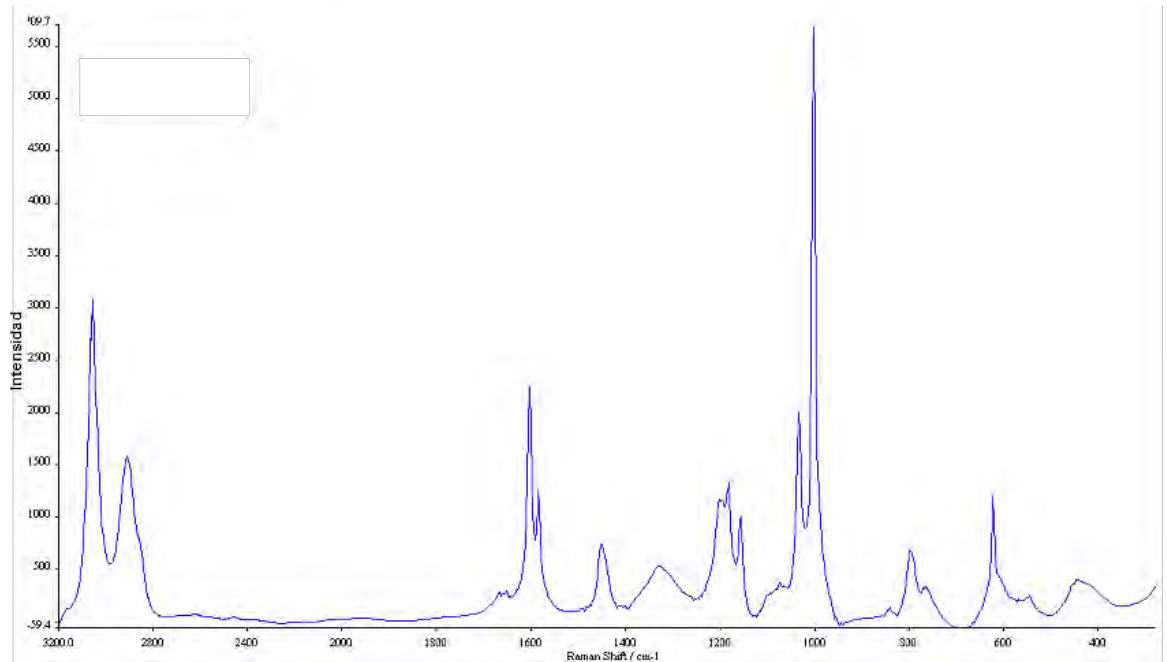
**Figura 14.** Espectro FTIR del quitosano con grado de desacetilación del 70%.

Los bandas de vibración representativos para el quitosano se muestran en la tabla 3:

**Tabla 3.** Bandas de vibración del espectro IR del quitosano. [37]

Vibración	Intensidad / Característica	Número de onda / $\text{cm}^{-1}$
Grupo -OH	Fuerte y variable	3450
Grupo -NH	Fuerte y variable	3282
Grupo -CH	Fuertes	2919 y 2868
Grupo Amida primaria	Media	1655
Grupo -NH <sub>2</sub>	Media	1580
Grupo -CH <sub>2</sub>	Media	1417
Grupo amida terciaria	Fuerte y variable	1313
Grupo C-O-C	Fuerte	1154
Vibraciones del esqueleto	Fuertes y variables	1080 y 1029
Vibración C-H Anoméricos	Media	896

- Espectroscopía RAMAN: El espectro RAMAN del quitosano genera señales bastante similares de los grupos funcionales y en las mismas zonas del espectro. En la figura 15 muestra el espectro RAMAN para una muestra de quitosano donde se puede observar claramente alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  dos bandas correspondientes al grupo acetamido y al grupo amino del quitosano.



**Figura 15.** Espectro RAMAN de quitosano. [38]

La tabla 4 muestra las principales bandas vibracionales observadas en el espectro del quitosano.

**Tabla 4.** Bandas vibracionales del espectro RAMAN de quitosano. [39]

Raman shift / $\text{cm}^{-1}$	Grupo vibracional
3300	Vibración estiramiento N-H en el grupo C=N-H
2920	Vibración asimétrica C-H del $\text{CH}_2\text{OH}$
	Vibración de estiramiento C-O del grupo hidroxilo
1634	Deformación del enlace N-H de la amina
	Vibraciones de estiramiento C=C
1589	Vibración del enlace N-H de la amina
1465	Vibración flexión C-H
1384	Vibración balanceo $\text{CH}_2$

**Tabla 4.** Bandas vibracionales del espectro RAMAN de quitosano.  
(Continuación)

Raman shift / $\text{cm}^{-1}$	Grupo vibracional
1325	Vibración de estiramiento C-N del grupo amino
1188	
1256	Vibración de la deformación del O-H en el grupo $\text{CH}_2\text{OH}$
1188	Vibración de estiramiento simétrico C-O-C
820	Vibración de estiramiento asimétrico C-O-C
935	Enlace C-O-C entra las unidades monoméricas
468	
628	
560	Vibraciones de las unidades cíclicas

### 2.2.3 Aplicaciones del quitosano y su actividad antibactericida y antimicrobiana.

Dado el gran número de trabajos que existen sobre este versátil material se tiene una clasificación por área sobre las aplicaciones que se le han ido dando.

- Agricultura: Recubrimientos de semillas con películas de quitosano para su conservación durante el almacenamiento. Sistemas liberadores de fertilizantes. Agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (inicio de las plantaciones).
- Medicina: Hoy en día se sabe que la quitina y el quitosano han sido usados desde la antigüedad para acelerar el saneamiento de heridas. En la actualidad, es usado en la producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina, de gasas y vendajes tratados y cremas bacterianas para el tratamiento de quemaduras.
- Tratamiento de aguas: Es una de las áreas más importantes debido a que el quitosano es una sustancia “ambientalmente amigable”. Entre los principales usos destacan como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad, floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado, y captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas.



- Cosméticos: Usado en la fabricación de cápsulas para adelgazar, aditivo bactericida en jabones, champús, pasta dental y cremas, agente hidratante para la piel debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la resequedad.
- Biosensores: Existen numerosas aplicaciones en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico. Es usado como sensor de glucosa en sangre humana basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre quitosano, sensor para la detección de fenoles en aguas de desechos en plantas industriales basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa, y sensores basados en la inmovilización de nanopartículas. [40,41,42]

Dentro de las actividades biológicas que presenta el quitosano destacan su actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antimicrobiana. El quitosano inhibe el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Su actividad antibacteriana dependerá de sus propiedades químicas.

La concentración de quitosano es una propiedad química de gran importancia para su actividad antibacteriana.

Se demostró que soluciones de quitosano hasta la concentración de  $0.10 \text{ mg.mL}^{-1}$  inhibieron marcadamente el crecimiento de una bacteria patogénica, a medida que aumentaba la concentración mayor era el efecto inhibitorio del mismo.

Se ha planteado que cuando la carga positiva sobre el C-2 del monómero de glucosamina se encuentra por debajo de pH 6, el quitosano es más soluble y tiene una mejor actividad antimicrobiana que la quitina. El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana de la quitina, el quitosano y sus derivados es aún desconocido, aunque diferentes mecanismos han sido propuestos en uno de ellos se sugiere que la interacción entre la carga positiva de la molécula de quitosano y la carga negativa de las células de la membrana microbiana conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes adicionales; es decir altera su permeabilidad e inhibe el crecimiento de la célula además de romper su pared celular.

Existe una segunda propuesta que implica la unión del quitosano con el ADN celular para inhibir la síntesis del ARN, siendo posible que la actividad biológica del quitosano sea la combinación de ambos mecanismos mencionados.

El quitosano muestra su actividad antibacteriana solamente en medio ácido debido a su pobre solubilidad por encima de pH 6.5. El efecto del peso molecular sobre la actividad antibacterial y antifungicida ha sido explorado. El quitosano con un peso molecular en un rango de 10 000 hasta 100 000 kDa puede ser utilizado para restringir el crecimiento de la bacteria. Además, la actividad antibacterial está influenciada por el grado de desacetilación, su concentración en solución y el pH del medio. [30,43]

### 2.3 ELECTRODOS DE CARBÓN MODIFICADOS CON PLATINO

Los electrocatalizadores más activos utilizados hasta ahora son nanopartículas metálicas del grupo del platino y sus aleaciones. Los electrodos con materiales nanométricos han mostrado un alto desempeño en lo que se refiere a reacciones redox, y esta alta actividad depende no solo del tamaño de las partículas, sino de la naturaleza del soporte y de los métodos de preparación. [44]

Las partículas metálicas nanométricas han tomado gran atención en puntos de vista fundamentales y prácticos. Las propiedades de los metales de transición desde tamaños macro hasta agrupaciones moleculares pueden tener aplicaciones en óptica no lineal, fotónica, detección químicamente selectiva, almacenamiento de información, la catálisis y así sucesivamente. [45]

Ya que la relación superficial del metal en tamaño macro con las respectivas nanopartículas es substancialmente alta en comparación con aquellas que tienen área más extendida; es así que las estructuras electrónicas de su superficie, y por consiguiente su propiedad catalítica serán diferentes a su contraparte macro. [46]

Diversos procedimientos han sido empleados para preparar PtPs soportadas en diferentes materiales, incluyendo impregnación, irradiación microondas, microemulsión, procesos polioles, procesos polioles asistidos con microondas, o pirolisis. Por otro lado, la deposición electroquímica es un método eficiente para preparar partículas metálicas.

Este es ampliamente usado empleando diferentes estrategias/metodologías, tales como voltametría cíclica, deposición de paso de potencial y de doble pulso. Entre estos, la deposición de paso potencial provee una herramienta de control de la cantidad de metal depositado, el número de sitios metálicos y su tamaño a pequeña escala.

Los materiales de carbón son de especial interés en el campo de materiales electródicos debido a sus propiedades, tales como su forma moldeable, tamaño y porosidad, estabilidad química, resistencia a la corrosión, bajo costo, buena resistencia térmica y conductividad eléctrica. Así, la combinación de estas características ha promovido el uso de estos compuestos como electrodos soporte. [47]

### **2.3.1 Nanoestructuras de platino como sensores electroquímicos y su actividad catalítica**

Las nanopartículas sobre electrodos comprenden una clase de material de interés fundamental debido a su aparente dicotomía, la que existe entre su tamaño y sus propiedades químicas y físicas. Por ejemplo, partículas de Pt y Cu pueden ser sintetizadas en diferentes tamaños, que abarcan desde escala macroscópica a escala molecular.

En la electrodeposición de partículas metálicas, el método más común involucra la reducción de una sal metálica apropiada en presencia de estabilizadores tales como polímeros, surfactantes, o ligandos especiales los cuales previenen la formación indeseada del metal macroscópico insoluble. El comportamiento catalítico puede ser considerado uno de las propiedades más conocidas de los metales nobles, debido a su alta actividad catalítica para muchas reacciones químicas.

Las nanopartículas pueden facilitar las reacciones de transferencia electrónica y esto junto con una facilidad de miniaturización de dispositivos sensores a dimensiones de nanoescala hacen a las nanopartículas convenientes para aplicaciones importantes en sensores químicos/bioquímicos.

En particular, las nanopartículas de Pt han sido un tema de investigación intensivo para el diseño de electrodos nanoestructurados. La modificación de la superficie de los electrodos ha sido dirigida hacia diversos objetivos, generalmente involucrando cinética electroquímica y permeoselectividad proporcionando un sitio de enlace para una especie en particular, o actuando como un catalizador para ciertas reacciones electroquímicas.

De esta manera se han hecho investigaciones donde el Pt nanoestructurado es depositado sobre microelectrodos para incrementar el área superficial mejorando las características de transporte de masa y usándolo como sensor amperométrico es posible determinar peróxido de hidrógeno en un gran rango de concentraciones. [48]

Insertar nanopartículas metálicas sobre nanotubos de carbono es de gran interés para obtener materiales híbridos nanotubo/nanopartícula con propiedades útiles. Se han preparado nanopartículas de platino por medio de un diseño a nivel molecular, análogo al procedimiento empleado para dispersar partículas de Pt sobre nanotubos de carbono de pared múltiple para la oxidación de metanol en donde se observa una elevada actividad electrocatalítica la cual es atribuida a la alta dispersión a nanoescala del platino. [49]

Recientemente además, se ha mostrado que las PtNPs pueden degradar alcohol en agua. La actividad catalítica de estas PtNPs se ha reportado como altamente dependientes de la morfología, porosidad, distribución de tamaño y composición de fases. Se ha reportado que se puede obtener un incremento significativo en la actividad catalítica cuando las PtPs monodispersas son unidas a nanoalambres de platino.

Las nanopartículas estabilizadas-soportadas por surfactantes en un estado coloidal han sido extensamente usadas para investigar la actividad catalítica usando reacciones modelos. Las propiedades catalíticas dependen de la forma y el tamaño de las PtNPs coloidales en la reacción de transferencia electrónica entre el hexacianoferrato (III) y el tiosulfato de sodio que fue investigado inicialmente por Spiro et al. su investigación propuso que la actividad catalítica de las PtNPs podría ser debido al cambio

en el tamaño y la forma de las nanopartículas involucrado durante la reacción de transferencia de electrones. Interesantemente, la modificación de las PtNPs ha sido ampliamente estudiada a investigar para nanoestructuras de platino con mayor actividad catalítica y entender su mecanismo en el modelo de reacciones catalíticas. [50]

De esta manera, Zhong-Liang et al. describe la oxidación electrocatalítica y detección voltamperométrica de formaldehído por electrodeposición de nanopartículas de la aleación Pt-Pd sobre una película de Nafion en un electrodo de carbón vítreo usando voltametría cíclica. El electrodo modificado muestra alta sensibilidad y estabilidad: las nanopartículas metálicas tienen una gran área superficial y alta energía de superficie que proporcionan una buena corriente de oxidación y ayuda en la reducción de la utilización de metales costosos; la aleación de Pt-Pd muestra un efecto sinérgico para minimizar la formación del veneno (por reacciones intermediarias, particularmente el CO); el Nafion repele a inferencia de algunos posibles sustancias interferentes de carga negativa y así el Pt y Pd en él pueden mantener su alta actividad catalítica. [51]

Wang y colaboradores reportaron un microelectrodo de fibra de carbón modificado con partículas de platino para la detección de hidracina. Birkin et al. demostró que las PtNPs podían ser usadas en combinación con nanotubos de carbono de pared simple para construir un sensor electroquímico con una sensibilidad notablemente mejorada hacia peróxido de hidrógeno. Ikariyama et al. puso énfasis en la utilidad de las partículas de platino como una matriz para microsensores enzimáticos, mostrando buen desempeño con alta sensibilidad y respuesta rápida. Además, PtNPs fueron electrodepositados sobre un ultramicroelectrodo de fibra de carbono (CFUME) para genera un efecto sinérgico efectivo en incrementar el área superficial con la mejora de las características de transporte de masa, y facilitando la transferencia de electrones directa entre el centro de la enzima electroactivo y los electrodos. Los resultados en general se muestran prometedores para desarrollar biosensores enzimáticos para ensayos biológicos, clínicos y muchos otros campos sin un mediador contaminante. [52]

---

## 2.4 DETERMINACIÓN DE E. COLI POR MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Los estudios para la determinación cuantitativa o cualitativa de *Escherichia coli* han sido investigados desde hace varios años atrás. Si nos enfocamos en aquellos que se usan métodos de transducción electroquímico podemos citar varios autores.

Dixit et. al. en su estudio investigó como influía la deposición de películas poliméricas en vacío para la detección de microorganismos, obteniendo excelentes resultados. El cambio en las características I – V de la película polimérica dependía de la concentración de los microorganismos presentes. Usando los electrodos como sensores de *E. coli* se obtuvieron altas sensibilidades. [53]

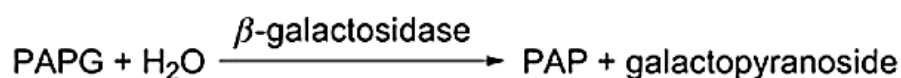
Zhang et. al. sintetizó core-shell bimetálicas de nanopartículas de Cu-Au recubriendo la superficie del cobre con oro, éste material poseía grandes ventajas como por ejemplo su buena actividad voltamétrica y con alta sensibilidad para la detección de *E. coli*. Las nanopartículas Cu-Au fueron determinadas indirectamente por determinación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  después del tratamiento oxidativo en medio ácido. La detección de éstos iones cobre fue realizada usando un electrodo modificado GC/Nafion/Hg como electrodo de trabajo mediante ASV. Estas nanopartículas se encontraban presente únicamente cuando el anticuerpo reaccionaba con el *E. coli*, la determinación de los iones cobre reflejaba la concentración de bacterias. Se encontró una relación linear entre la corriente y el valor logarítmico de la concentración de bacterias en un rango de 50 a  $50 \times 10^4$  UFC/mL. [54]

Hnaiein et. al. desarrolló un inmunosensor conductimétrico para la detección de bacterias de tipo *E. coli* y *S. epidermis*. El inmunosensor conductimétrico consistía de estraptividina funcionalizada con nanopartículas de magnetita inmovilizadas en un transductor electrónico mediante exposición de vapor de glutaraldehído. Los anticuerpos fueron enlazados a través de la fuerte interacción biotina-estraptividina, y la inmunodetección del *E. coli* fue realizada mediante medidas conductimétricas. [55]

Hasebe et. al. empleó el *E. coli* como una bacteria modelo, y la actividad intrínseca de ésta bacteria fue medida usando un electrodo de platino modificado con un película sol-gel híbrida orgánica/inorgánica selectiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los ensayos realizados a un potencial de +0.6 V en solución electrolito de buffer de fosfato (pH

6.5) muestran una disminución de la corriente debido a la disminución de la concentración de peróxido. [56]

Cheng et. al. inmovilizó nanopartículas de platino en la superficie de un electrodo de carbón vítreo para la rápida detección de *E. coli*. Debido a la habilidad electro-catalítica de las nanopartículas de platino hacia el *p*-aminofenol (PAP), se puede lograr la detección sensible del *E. coli*. En la solución de *E. coli*, la galactosidasa se libera del *E. coli* por efecto del sulfato de polimixina B (POL) y la lisosima (LYS), y además se cataliza la hidrólisis del *p*-aminofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidasa (PAPG) para producir PAP según la siguiente ecuación:



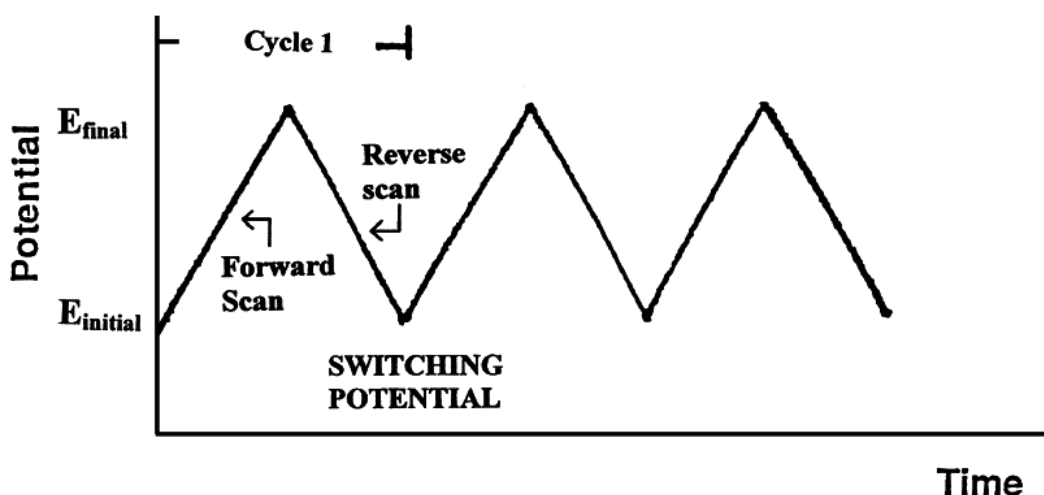
El PAP fue detectado electroquímicamente por un electrodo GC/PtNPs y la respuesta de corriente fue proporcional a la concentración del *E. coli*. [57]

## 2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ELECTRODOS

### 2.5.1 Voltametría cíclica (CV)

La voltametría cíclica es la técnica más ampliamente usada en lo que respecta a la adquisición de información cualitativa sobre reacciones electroquímicas. La CV es usualmente el primer experimento realizado en un estudio electroanalítico. En particular, éste ofrece una rápida ubicación de los potenciales redox de las especies electroactivas, y una evaluación conveniente del efecto del medio sobre el proceso redox.

La CV consiste de un barrido lineal del potencial en un electrodo de trabajo estacionario (en una solución sin agitación) usando una forma de onda de potencial triangular (Figura 16). Dependiendo del barrido de potencial, las medidas del potencióstato muestran como resultado valores de corriente que dependen del potencial aplicado. El gráfico resultante de corriente versus el potencial es llamado voltamograma o voltagrama cíclico. El voltamograma cíclico es una función complicada, dependiente del tiempo, de un gran número de parámetros físicos y químicos.



**Figura 16.** Señal potencial – tiempo de excitación en un experimento de voltametría cíclica.

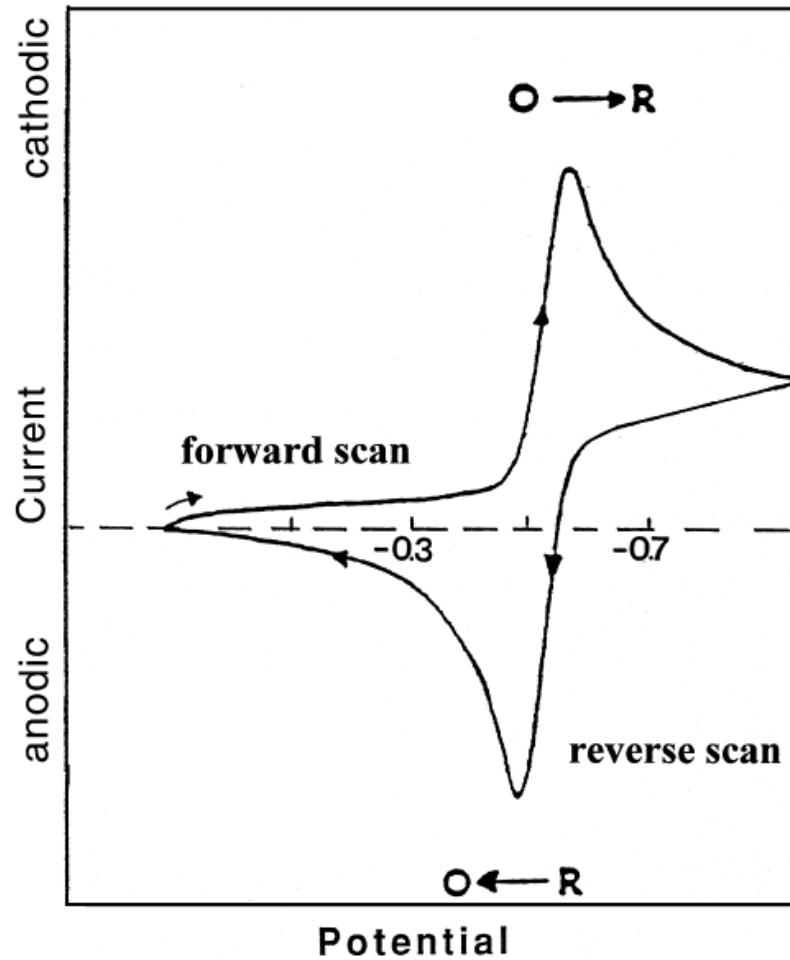
La figura 17 ilustra la respuesta esperada de un par redox reversible durante un solo ciclo de potencial. Esto asume que solo la forma oxidada  $O$  está presente inicialmente. Así, un barrido hacia potenciales negativos es escogido como la primera mitad del ciclo, comenzando a valores de potencial donde no ocurre reducción. Después de pasar por la región de potencial en la cual la reducción toma lugar, la dirección del barrido de potencial es invertida. Durante el barrido inverso, las moléculas  $R$  (generadas en la primera mitad del ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) son oxidadas de nuevo a  $O$ , resultando un pico anódico.

Los picos característicos en un voltograma cíclico son causados por la formación de la capa de difusión cerca de la superficie del electrodo. Éstos pueden ser mejor entendidos examinando cuidadosamente los perfiles de concentración-distancia durante el barrido de potencial.

Por ejemplo, la figura 18 ilustra cuatro gradientes de concentración para el reactante y producto a diferentes tiempos correspondientes a (a) el valor de potencial inicial, (b) y (d) el potencial formal del par (durante los barridos directo e inverso, respectivamente), y (c) para lograr la concentración cero del reactante en la superficie.

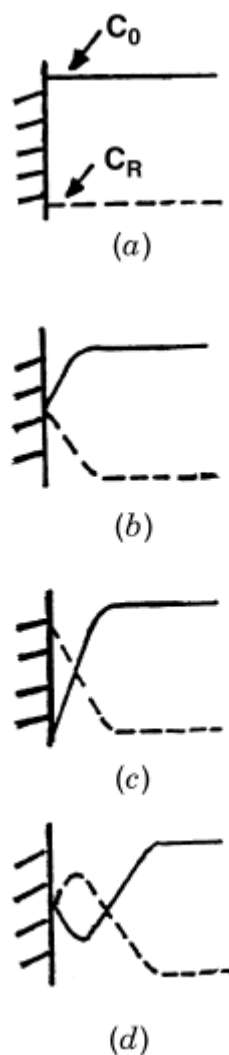


Se debe notar que el cambio continuo en la concentración superficial está acoplado con una expansión del espesor de la capa de difusión.



**Figura 17.** Voltograma cíclico típico para un proceso redox reversible  $O + ne^- \rightleftharpoons R$ . [58]

Las corrientes de pico resultante reflejan así el cambio continuo del gradiente de concentración con respecto al tiempo. Así, el incremento en la corriente de pico corresponde al logro del control de difusión, mientras que la caída de corriente exhibe una dependencia de  $t^{-1/2}$ . [58]



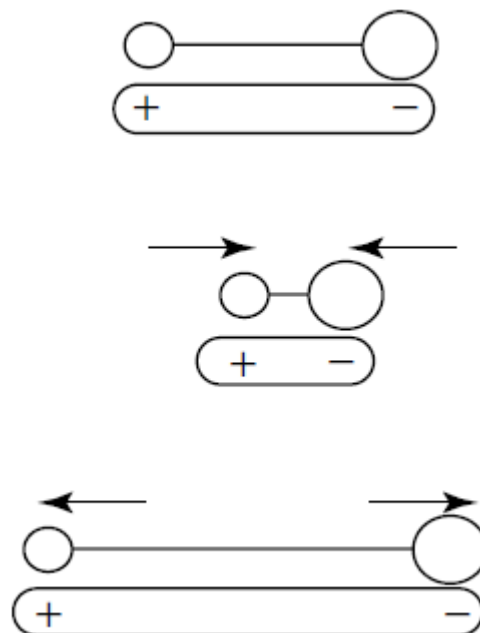
**Figura 18.** Distribución de la concentración de las formas reducidas y oxidadas del par redox a diferentes tiempos durante un experimento de voltametría cíclica correspondiente al potencial inicial (a), al potencial formal del par durante los barridos inverso y directo (b, d), y para el logro de la concentración cero del reactante en la superficie (c). [58]

### 2.5.2 Espectroscopía Infrarrojo (IR)

La espectroscopía infrarrojo es ciertamente una de las técnicas analíticas más importantes disponibles para los científicos de hoy en día. Una de las grandes ventajas de la espectroscopía infrarrojo es que prácticamente cualquier muestra en prácticamente cualquier estado puede ser estudiado.

La espectroscopía infrarrojo es una técnica basada en las vibraciones de los átomos y las moléculas. Un espectro infrarrojo es comúnmente obtenido por el paso de radiación infrarrojo a través de la muestra y determina que fracción de la radiación incidente es absorbida a una energía en particular. La energía a la cual algún pico aparece en el espectro de absorción corresponde a la frecuencia de la vibración de una parte de la molécula de la muestra.

Para una molécula que muestra absorción infrarrojo, ésta debe poseer características específicas, por ejemplo, un momento dipolar de la molécula debe cambiar durante la vibración. La Figura 19 ilustra un ejemplo de una molécula activada a radiación infrarrojo, una molécula diatómica heteronuclear. El momento dipolar de la molécula cambia de acuerdo a como el enlace se contrae o se expande. Por comparación, un ejemplo de una molécula inactiva a radiación infrarrojo es una molécula diatómica homonuclear ya que su momento dipolar es cero sin importar que tan largo es el enlace.



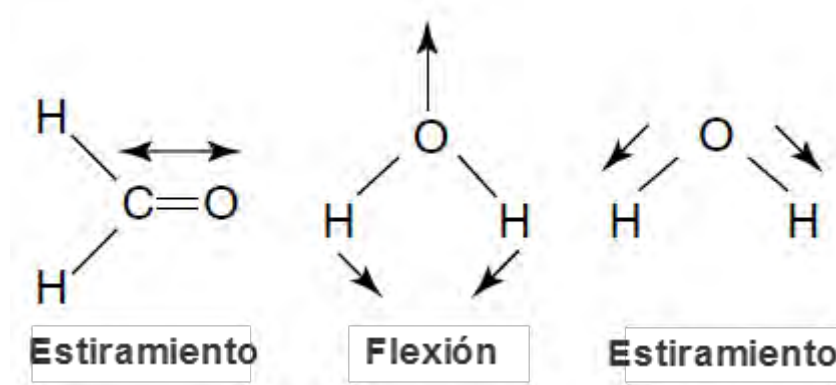
**Figura 19.** Cambio en el momento dipolar de una molécula diatómica heteronuclear. [59]

Las interacciones de la radiación infrarroja con la materia pueden ser entendidas en términos de cambios en los dipolos moleculares asociados a las vibraciones y rotaciones. Considerando un modelo básico, una molécula puede ser considerada como un sistema de masas unidas por enlaces con propiedades tipo muelle. Tomando como primer caso el de las moléculas diatómicas, tales moléculas tienen tres grados de libertad traslacional y dos grados de libertad rotacional. Los átomos en las moléculas pueden además moverse uno con relación a otro, esto es, la longitud de enlace puede variar o un átomo puede moverse fuera de su plano actual. Esta es la descripción de movimientos de estiramiento y flexión que son colectivamente referidos como vibracionales. Para una molécula diatómica, solo es posible una vibración que corresponde al estiramiento y la compresión del enlace.

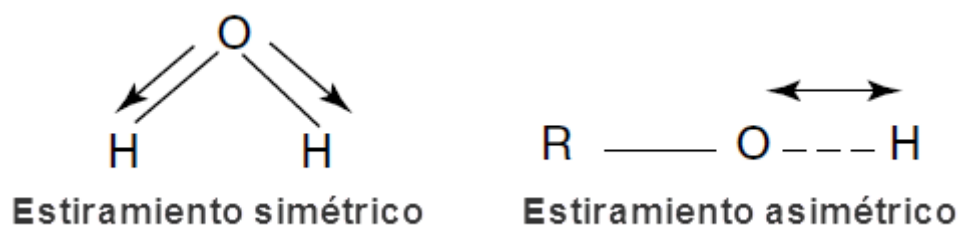
Las moléculas poliatómicas contienen muchos átomos ( $N$ ) que tendrían  $3N$  grados de libertad. En el caso de aquellas que poseen solo tres átomos, se podrían distinguir dos grupos de moléculas triatómicas: lineales y no lineales. Mientras que una molécula diatómica solo tiene un modo de vibración el cual corresponde al movimiento de estiramiento, una molécula triatómica no lineal del tipo B-A-B tiene tres modos, dos de los cuales corresponden a movimientos de estiramiento, y uno correspondiente al movimiento de flexión. Una molécula lineal triatómica tiene cuatro modos, dos de los cuales tienen la misma frecuencia.

Una molécula solo puede absorber radiación cuando la radiación infrarroja entrante es de la misma frecuencia que uno de los modos fundamentales de vibración de la molécula. Esto significa que el movimiento de vibración de una pequeña parte de la molécula aumentará mientras que el resto de la molécula no es afectada.

Las vibraciones pueden involucrar un cambio en la longitud del enlace (estiramiento) o en el ángulo de enlace (flexión) (Figura 20). Algunos enlaces pueden estirarse en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), como se muestra en la figura 21.

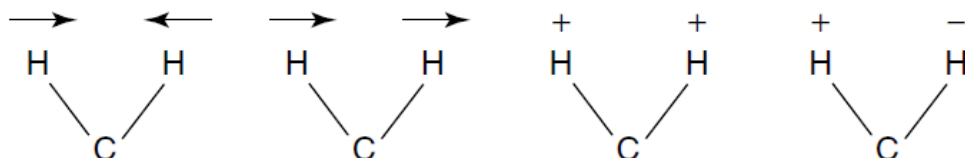


**Figura 20.** Vibraciones de estiramiento y flexión. [59]

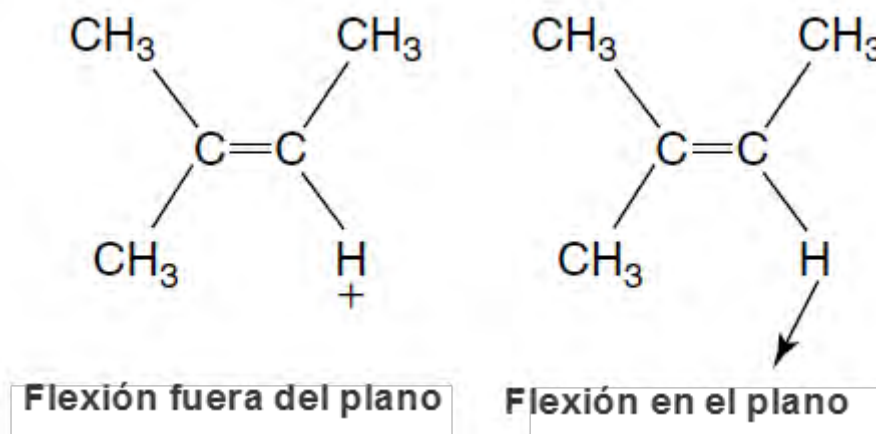


**Figura 21.** Vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico. [59]

Las vibraciones de flexión también contribuyen en el espectro infrarrojo y estas están resumidas en la figura 22. Es mejor considerar que la molécula ha sido cortada por un plano a través de los átomos de hidrógeno y el átomo de carbono. Los hidrógenos pueden moverse en la misma dirección o en dirección opuesta en este plano. Para moléculas más complejas, el análisis llega a ser más simple si se considera a los átomos de hidrógeno aislados debido a que usualmente están unidos a un átomo de mayor masa, así a la parte más rígida de la molécula. Esto resulta en vibraciones de flexión en el plano y fuera del plano, como se ilustra en la figura 23.



**Figura 22.** Diferentes tipos de vibración de flexión. [59]



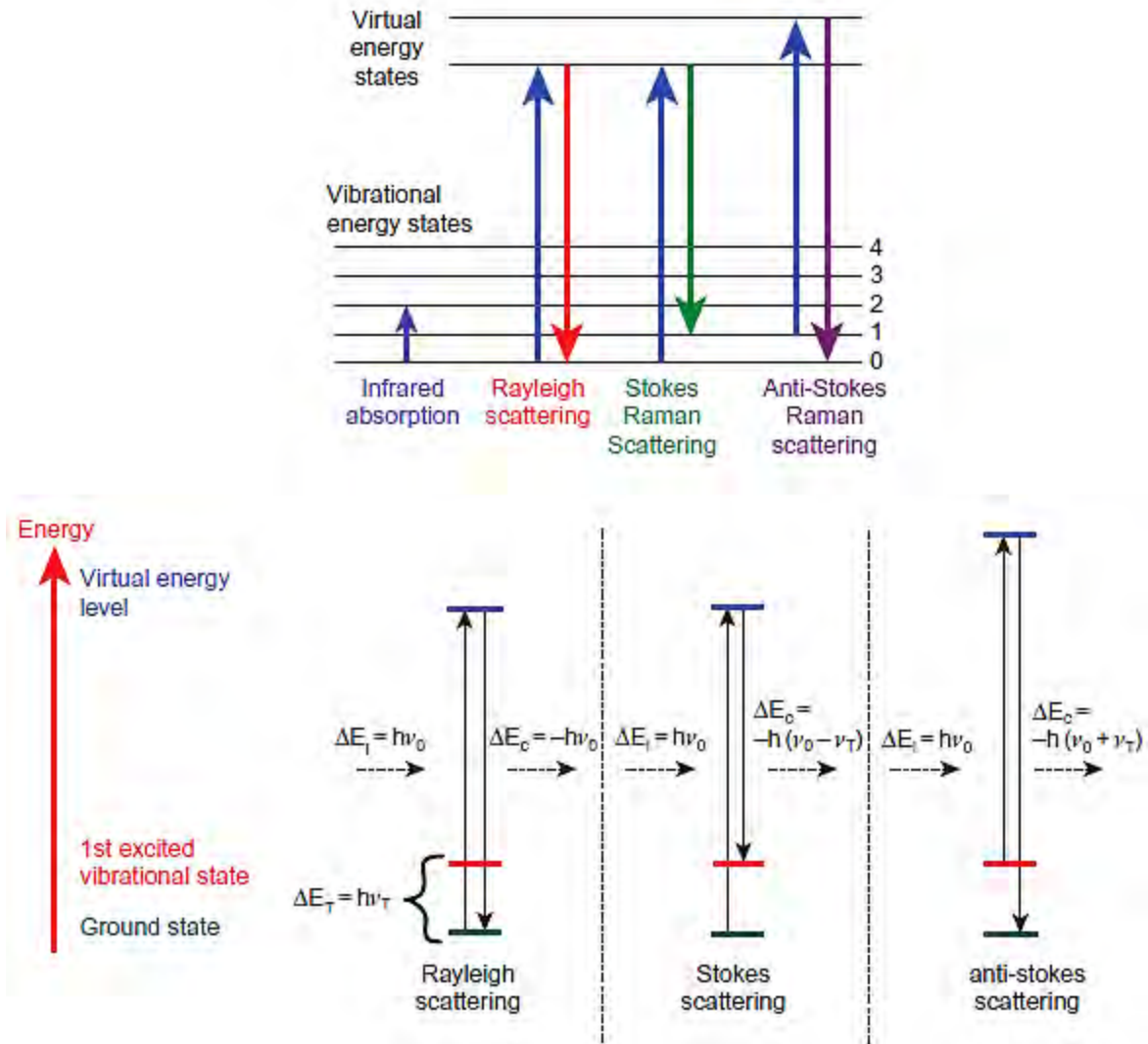
**Figura 23.** Vibraciones de flexión fuera y en el plano. [59]

Habrán muchas y diferentes vibraciones incluso para moléculas simples. La complejidad de un espectro infrarrojo radica en el acoplamiento de las vibraciones sobre una amplia parte o sobre toda la molécula por completo. Tales vibraciones son llamadas vibraciones esqueléticas. Las bandas asociadas con vibraciones esqueléticas son probables a conformar un patrón o huella dactilar de la molécula como un todo, en lugar de un grupo específico dentro de la molécula. [59]

### 2.5.3 Espectroscopía RAMAN

La irradiación de una molécula con una luz monocromática siempre resulta en dos tipos de dispersión de luz, elástica e inelástica. En la dispersión elástica, ocurre sin cambio en la frecuencia del fotón o sin algún cambio en su longitud de onda y energía. De manera inversa, el otro tipo, la dispersión inelástica la cual es acompañada por el cambio en la frecuencia del fotón debido a la excitación o desactivación de las vibraciones moleculares en el cual el fotón podría perder alguna cantidad de energía o ganarla. De esta manera, pueden ocurrir tres tipos de fenómenos (Figura 24).

Primero, cuando la luz incide en una molécula, ésta puede interactuar con la molécula sin embargo el intercambio neto de energía ( $E$ ) es cero. Así la frecuencia de la luz dispersada es la misma de la luz incidente ( $E = E_0$ ), este proceso es conocido como dispersión Rayleigh.



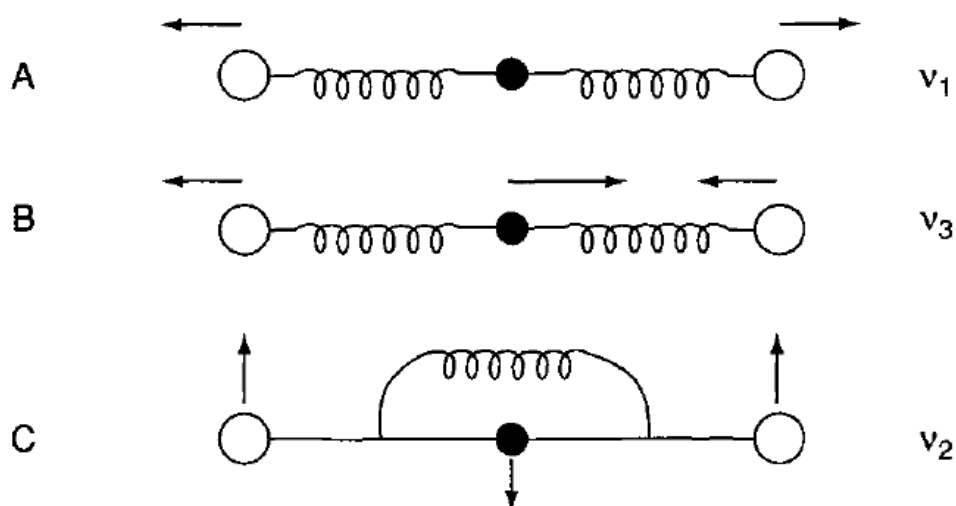
**Figura 24.** Mecanismo de dispersión Raman. [60]

Segundo, la luz puede interactuar con la molécula y el intercambio neto de energía es la energía de una vibración molecular. Si la interacción causa que el fotón de luz gane energía vibracional a partir de la molécula entonces la frecuencia de la luz dispersada será mayor que la de la luz incidente ( $E = E_0 + E_v$ ), conocida como dispersión Raman anti-Stokes.

Tercero, si la interacción causa que la molécula gane energía a partir del fotón entonces la frecuencia de la luz dispersada será menor que la de la luz incidente ( $E = E_0 - E_v$ ), este proceso es conocido como dispersión Raman Stokes. [60]

En moléculas diatómicas, la vibración ocurre a lo largo del enlace químico conectando los núcleos. En moléculas poliatómicas, la situación es complicada ya que todos los núcleos realizarán sus propias oscilaciones armónicas. Sin embargo, estas pueden ser expresadas como una superposición de un número de “vibraciones normales” que son completamente independientes una de otra.

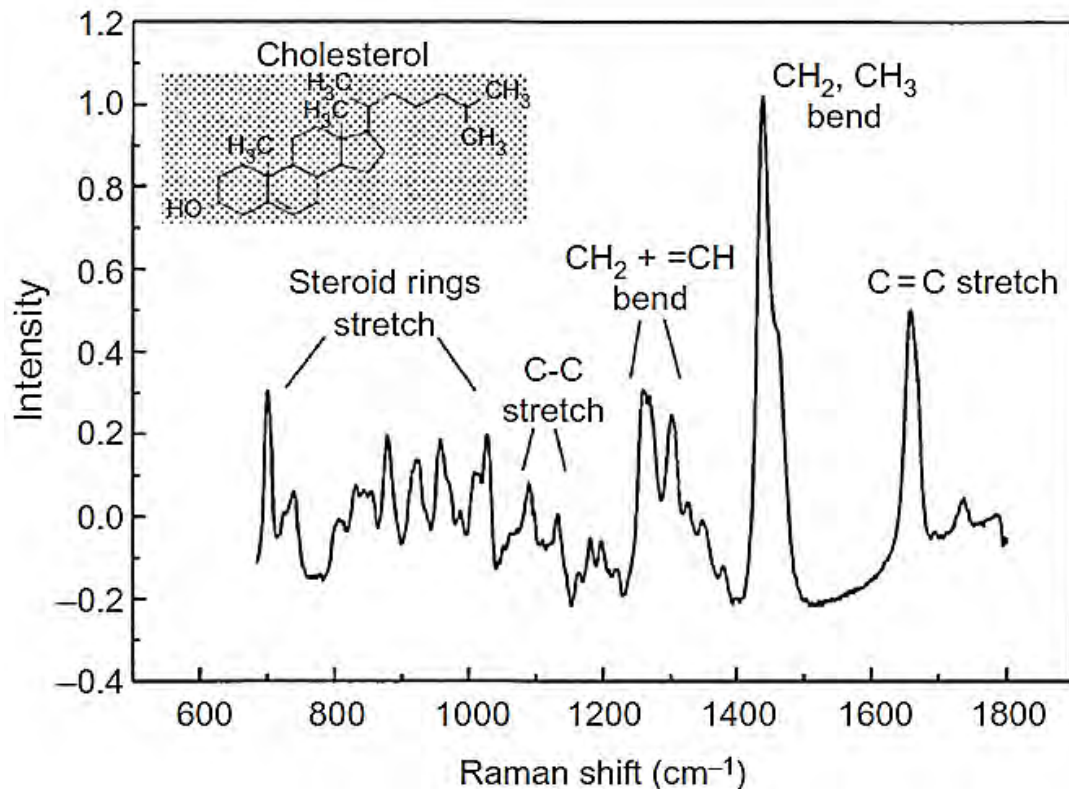
Si consideramos una molécula de  $\text{CO}_2$  como se muestra en la figura 25, así los átomos de C y O están representados por tres esferas con un peso en proporción a su peso atómico, que están conectadas por resortes de una fuerza adecuada en proporción a su constante de fuerza. Suponga que los enlaces C-O son estirados y soltados simultáneamente como se muestra en la figura 24-A. Así, las esferas regresan a lo largo de la dirección del enlace. Esta es una de las vibraciones normales de este modelo y es llamada vibración de estiramiento simétrica (en fase). Luego, si estiramos un enlace C-O y contraemos el otro, y soltamos todas las esferas simultáneamente (Figura 25-B) esta es otra vibración normal y es llamada vibración de estiramiento asimétrica (fuera de fase). Finalmente, si consideramos el caso cuando las tres esferas se mueven en dirección perpendicular y las soltamos simultáneamente, este es el tercer tipo de vibración normal llamada vibración de flexión (simétrica). [61]



**Figura 25.** Movimientos atómicos en modos normales de vibración en el  $\text{CO}_2$ . [61]



La luz dispersada Raman puede ser colectada por un espectrómetro y mostrarse como un espectro de la intensidad versus el cambio de frecuencia. Así cada especie molecular tiene su propio y único conjunto de vibraciones normales, el espectro Raman de una especie en particular consistirá de una serie de picos o bandas, por cada cambio en una de las frecuencias vibracionales características de la molécula (Figura 26). [62,63]

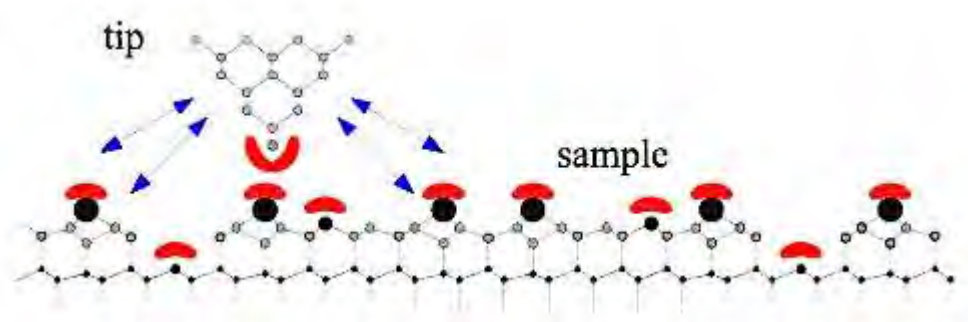


**Figura 26.** Espectro Raman de una molécula de colesterol. Se muestran las típicas bandas vibracionales. [62]

#### 2.5.4 Microscopía de Fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es un estado del arte del sistema de imágenes que utiliza una sonda afilada para explorar toda la superficie de un objeto. La punta de la sonda tiene dimensiones atómicas, lo que significa que la imagen AFM de la superficie de un objeto posee resolución atómica.

Dos grandes ventajas del AFM en comparación con otros métodos (por ejemplo de la microscopía de efecto túnel) son: las muestras en las mediciones no necesitan ser conductoras ya que la punta del AFM responde a las fuerzas interatómicas, un efecto acumulativo de todos los electrones en lugar de corriente túnel, y además el AFM puede funcionar a mucho mayor distancia de la superficie (5-15 nm) de esta manera se previenen los daños a las superficies que sean sensibles (Figura 27). En esta figura se muestran las fuerzas químicas de corto alcance actúan cuando los orbitales del tip y de la muestra (en rojo) se solapan. Las fuerzas químicas de largo alcance (indicada por flechas azules) se originan en todo el volumen y superficie del tip y son una función crítica de la forma mesoscópica del tip.



**Figura 27.** Vista esquemática de un tip de AFM cerca de una muestra. [64]

En el modo dinámico de microscopía de fuerza atómica, la información sobre la superficie de la muestra se obtiene mediante el control de parámetros de vibración (por ejemplo, de amplitud o de fase) de una viga oscilante que interactúa con la superficie de la muestra. El voladizo oscilante del AFM fue desarrollado para producir imágenes de alta resolución de estructuras superficiales de muestras de baja conductividad o aislantes tanto en medios líquidos como en aire. Además, es esencial calcular previamente la respuesta de vibración del voladizo oscilante del AFM durante el procesamiento de la muestra. Los efectos de la deformación de corte transversal y la inercia de rotación se consideran desdeñables en el análisis. Sin embargo, para la nanomecanización mecánica directa del voladizo oscilante del AFM, se llevan a cabo la indentación y toma de muestras de materiales sólidos (por ejemplo de silicio polímero y algunas superficies de metal).

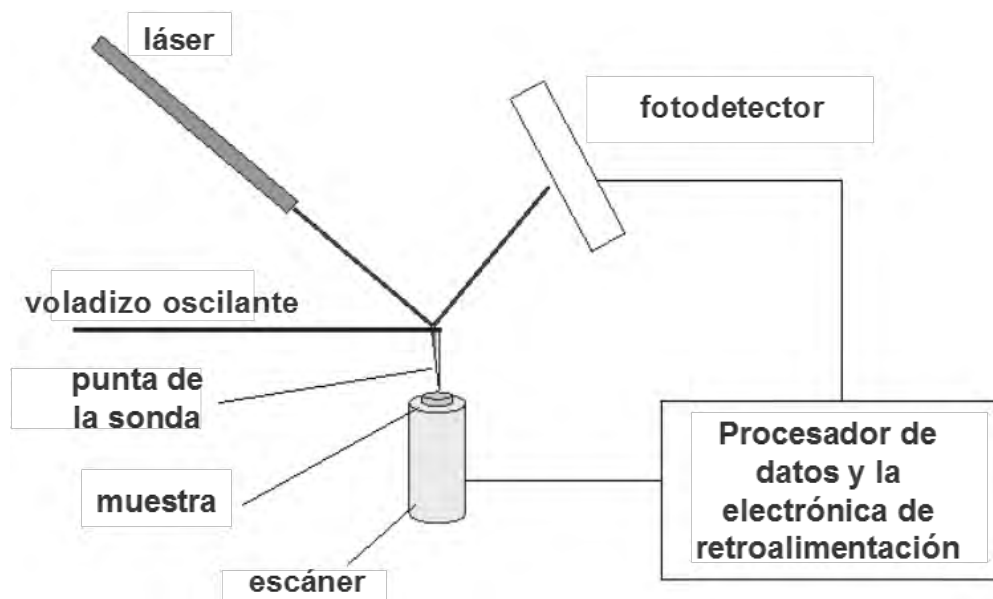
Los efectos de la deformación de corte transversal y la inercia de rotación en el análisis de vibración se deben tomar en cuenta para voladizos cuyas dimensiones en sección transversal sean comparables a las longitudes. Despreciando los efectos de deformación de corte transversal y la inercia rotatoria en el análisis de vibraciones puede resultar en resultados menos precisos.

El AFM proporciona un perfil 3D en una escala nanométrica, mediante la medición de fuerzas entre una sonda afilada (radio inferior a 10 nm) y la superficie a una distancia muy corta (0.2 - 10 nm de separación entre la sonda y la muestra). La sonda está soportada sobre un voladizo flexible y la punta del AFM toca suavemente la superficie y registra la pequeña fuerza entre la sonda y la superficie. Esta fuerza puede ser descrita usando la ley de Hooke:

**Ecuación 1:** 
$$F = -k \cdot x$$

Donde F: fuerza, k: constante elástica y x: desviación del voladizo.

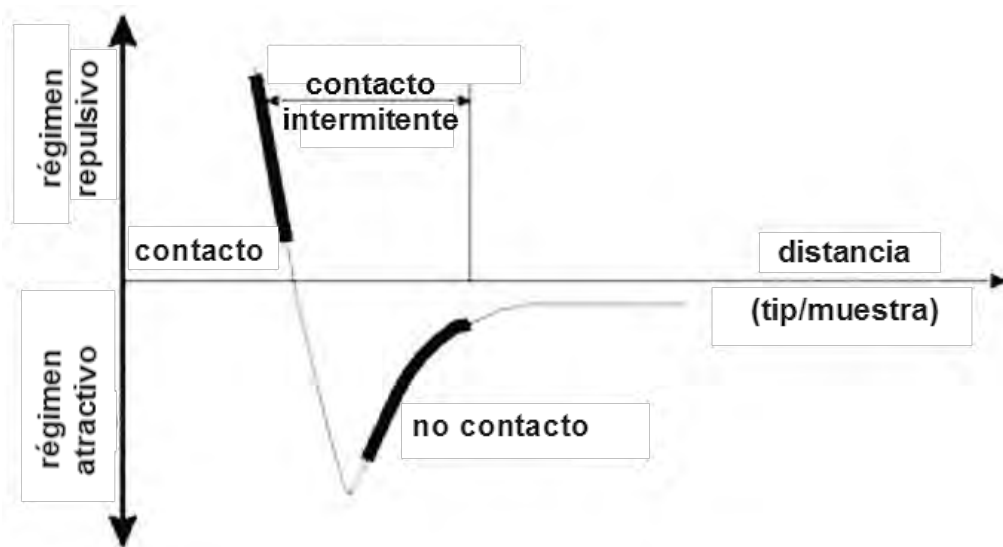
Los componentes básicos de un AFM son la sonda, el voladizo, el escáner, el láser, un procesador de datos y un fotodetector tal como se muestra en la figura 28.



**Figura 28.** Esquema de un AFM. [64]

Si la sonda experimenta fuerzas de repulsión la sonda estará en el modo de contacto de otra manera como la sonda se mueve más lejos de la superficie, las fuerzas de atracción dominan y la sonda será en el modo de no contacto (Figura 29).

Existen tres modos de imagen primaria en AFM: El modo de contacto donde la separación entre la sonda y la superficies es menor a 0.5 nm, el contacto intermitente que ocurre en un rango de 0.5 a 2 nm y el modo de no contacto donde el rango de separación entre la sonda y la superficie es de 0.1 a 10 nm. [64]



**Figura 29.** Fuerza en función de la distancia entre la punta – muestra. Modos de imagen del AFM basado en la interacción punta/muestra. [64]

### 2.5.5 Potenciometría

En potenciometría, la información acerca de la composición de una muestra es obtenida por medio del potencial aparente entre dos electrodos. La potenciometría es una técnica analítica clásica con raíces antes de la vuelta del siglo veinte. Sin embargo, con el desarrollo de nuevos electrodos selectivos y componentes electrónicos más sensibles y estables en los últimos 25 años del siglo XX se ha ampliado enormemente el abanico de aplicaciones de análisis de las mediciones potenciométricas.

Los electrodos selectivos potenciométricos en la actualidad son ampliamente usados en muchos campos, incluyendo diagnóstico clínico, procesos de control industrial, monitoreo medioambiental y fisiología. El desarrollo de todos estos campos es lo que ha convertido a la potencimetría en una técnica de análisis rápida, de bajo costo y de gran precisión. [48]

La potencimetría es adecuada para el análisis de sustancias para las que se establece el equilibrio electroquímico en un electrodo indicador adecuado a corriente cero. Conforme a la ecuación de Nerst, el potencial de un electrodo de este tipo depende de las actividades de las sustancias que provoquen un cambio en el potencial (es decir, este método determina las actividades en lugar de concentraciones).

**Ecuación 2.** 
$$E = E_a^0 = \frac{RT}{z_+ F} \ln a_{M^{z_+}}$$

Como ejemplo, considere la determinación potenciométrica de una concentración  $c_N^{(x)}$  de iones  $N^{z_+}$  en una solución  $E^x$ , que se va a lograr con la ayuda de un electrodo metálico N. Utilizando una celda simple con un electrodo de referencia  $M_R/E_R$ ,



Se encontró que el valor medido de potencial se ve distorsionado por el potencial de difusión  $\varphi_d$  presente entre las soluciones  $E_R$  y  $E_x$ , la cual en muchos casos no puede ser calculada exactamente. Para las determinaciones de actividad también se debe conocer el potencial estándar  $E^0$  del electrodo usado.

Existen ocasiones además en las que las medidas de potencial entre el electrodo de trabajo o indicador y el electrodo de referencia se deben a interacciones entre el material del electrodo y el analito, si la interacción involucra un cambio en la conductividad del material del electrodo indicador ésta se verá reflejada en cambios de potencial directamente proporcionales a la concentración del analito. [65]

**CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y  
DISCUSIONES**

## 3.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

### 3.1.1. Materiales

- Membrana Millipore 47 mm – 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro
- Celda de vidrio de cinco bocas.
- Electrodo de carbón vítreo en soporte de teflón y conexión de acero inoxidable.
- Alambre de platino (Contraelectrodo)
- Electrodo de Referencia Ag/AgCl
- Agitador Magnético.
- Micropipetas
- Vasos de precipitado
- Fiolas

### 3.1.2 Equipos

- Agitador Magnético.
- Autoclave FAMAIC S.A.C
- IR Prestige-21 Shimadzu.
- Conductímetro ORION.
- Incubadora Benchmark Scientific
- Potenciostato / Galvanostato AUTOLAB.
- Espectrómetro RAMAN XPIoRA ONE HORIBA
- IR Prestige-21 Shimadzu
- Sistema MILLIPORE MILLI Q PLUS con una resistividad de 18.2 M $\Omega$ .cm
- pHmetro ORION

### 3.1.3 Reactivos

- Gelatin peptone, pro analysi.
- Beef extract, pro analysi.
- Quitosano, pro analysi, SIGMA.



- Ácido Acético, pro analysi, MERCK.
- Cloruro de Sodio, pro analysi, MERCK.
- Ácido Clorhídrico, pro analysi, MERCK.
- Agar nutritivo, pro analysi, MERCK.
- Ácido Sulfúrico 96%, ultra pure, MERCK
- Nitrato de Plata, pro analysi.
- Hexacloroplatinato ácido hexahidratado, pro analysi.
- Hidróxido de Sodio, pro analysi, MERCK
- Sulfato de sodio anhidro, pro analysi, MERCK

PRIMERA PARTE: EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN *E.COLI*-QUITOSANO Y  
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL QUITOSANO

### 3.2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MUESTRA CONTROL DE *ESCHERICHIA COLI*

Para el análisis de la evaluación de la propiedad bactericida del quitosano se utilizaron bacterias de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922, las cuales fueron sembradas en caldo nutritivo (cultivo madre) de acuerdo a la composición establecida según la tabla 5.

**Tabla 5.** Composición del caldo nutritivo del cultivo madre.

Composición	Concentración
Gelatin peptone	5.0 g/L
Beef extract	3.0 g/L

La preparación se realiza colocando una colonia de *E. coli* ATCC 25922 en agitación por un tiempo de 18 horas a 100 rpm, a temperatura ambiente. El tiempo de supervivencia de la bacteria es amplio, de tal manera que se llegó a mantener la cepa de la bacteria viva hasta 7 días en agua.

Con el fin de evitar la interferencia causada por los componentes del caldo nutritivo de elevadas concentraciones, las bacterias en su respectivo caldo nutritivo fueron filtradas previamente. Para esto se tomaron 50 mL del cultivo madre y se filtró usando filtros de membrana millipore de 47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Luego del filtrado, la membrana fue colocada en un matraz conteniendo 50 mL de agua destilada estéril. Se agita para lavar la membrana y de esta manera se logra desprender las bacterias en el agua esterilizada. De esta manera se obtiene una solución estándar de bacterias. Todo el proceso anterior es llevado a cabo manteniendo estéril el medio y los materiales utilizados.

La muestra de control se preparó mezclando en un tubo de vidrio previamente esterilizado 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la solución de bacterias a partir de la membrana. Se esperó un tiempo de 20 minutos (que sería considerado el tiempo de ataque con el quitosano) y se prepararon soluciones diluidas a partir de ésta, desde concentraciones  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en porcentaje volumen/volumen.

A partir de la solución preparada más diluida ( $10^{-6}$  v/v) se tomaron 0.1 mL y se sembraron en una placa Petri conteniendo agar nutritivo frío. El proceso se realizó por triplicado. Las placas fueron llevadas a la incubadora a 37°C durante 24 horas, luego de las cuales fueron revisadas y se realizó el conteo en placa para determinar la concentración de la solución de bacterias (UFC).

### 3.3 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE BACTERIAS *E. coli* Y QUITOSANO.

Con el fin de evaluar los efectos involucrados al agregar y mantener en contacto solución de quitosano con una solución de bacterias de *E. coli* de concentración determinada por el paso anterior, es realizado el proceso similar para la determinación del cambio en la concentración de *E. coli* luego de un determinado tiempo de ataque o contacto.

Como se ha visto en el marco teórico el quitosano se disuelve en la mayoría de ácidos a temperatura ambiente, por lo cual se preparó una solución de ácido acético 0.2% v/v en la cual se disolvió una cantidad necesaria de quitosano para obtener una concentración de 0.2% w/v de quitosano (todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada estéril).

Considerando la solución estándar de bacterias y la solución de quitosano se prepara una muestra de evaluación de acuerdo a la tabla 6 de un volumen total de 10 mL.

**Tabla 6.** Composición de la solución de evaluación del efecto del quitosano.

Componente	Cantidad (mL)
Agua destilada estéril	8.5
Solución estándar de bacterias	1.0
Solución de quitosano 0.2% w/v	0.5

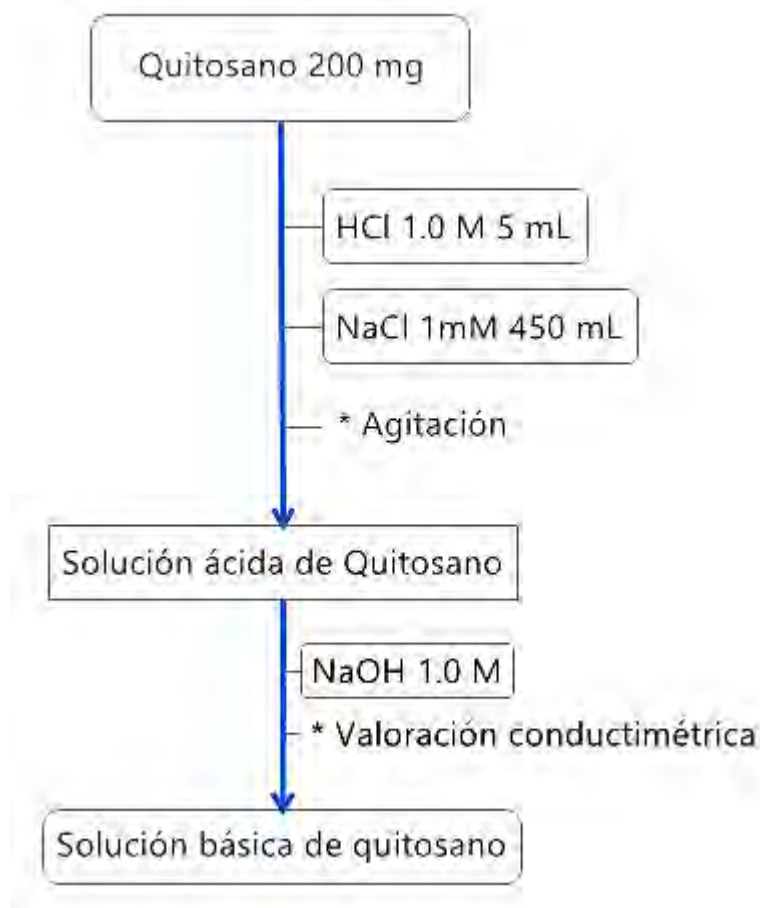
El tiempo de contacto fue de 20 minutos en un tubo de vidrio cerrado una vez agregada la solución de quitosano. Las soluciones fueron diluidas en tubos de ensayos que contenía 9mL de agua destilada estéril, para obtener soluciones más diluidas de concentraciones entre  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$  en porcentaje volumen/volumen.

Se tomaron 0.1 mL de la solución más diluida y se sembraron por triplicado en placas Petri con agar nutritivo frío previamente preparado. Las tres placas fueron envueltas y se colocaron en la incubadora a 37°C por 24 horas. Luego de este tiempo las placas fueron retiradas y se realizó el conteo en placa.

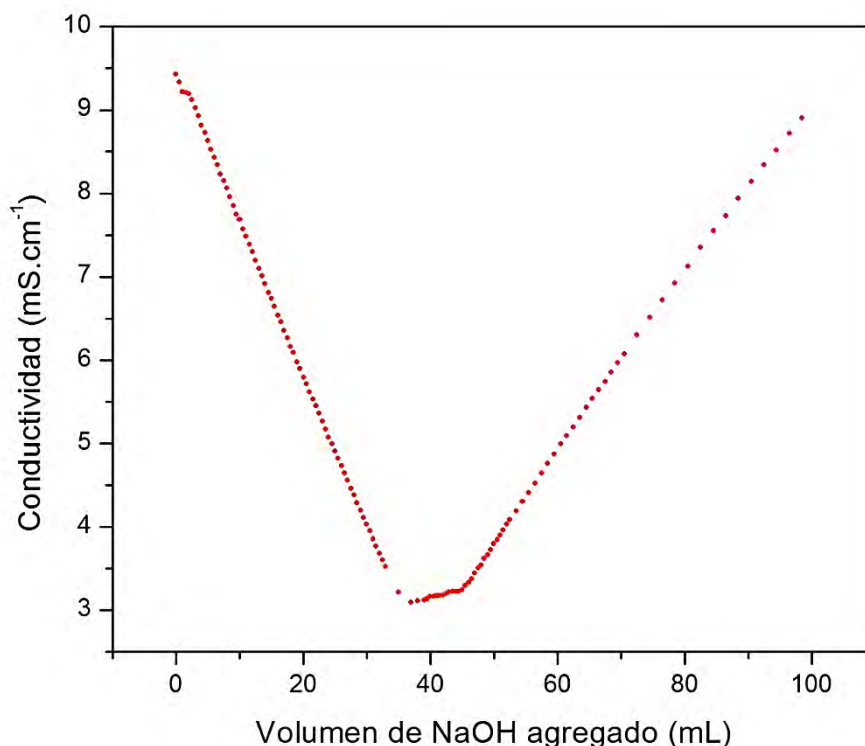
### 3.4 CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSANO

#### 3.4.1 Valoración Conductimétrica

El quitosano usado en todos los procedimientos fue caracterizado por titulación conductimétrica para determinar su grado de desacetilación de acuerdo al esquema mostrado en la figura 30. Por cada adición de la solución alcalina (0.5 mL) se realizaba la medida de conductividad hasta obtener un exceso de base, los datos obtenidos se muestran en la figura 31.



**Figura 30.** Esquema del proceso de valoración potenciométrica del quitosano.



**Figura 31.** Curva de titulación conductimétrica de una muestra de quitosano en medio ácido con hidróxido de sodio.

De acuerdo a la siguiente ecuación para la obtención del grado de desacetilación:

$$\%DD = \frac{[base](V_2 - V_1)161}{m}$$

Donde  $V_2$  y  $V_1$  son las dos intersecciones observadas en la figura 31, junto con los datos recolectados se muestran en la tabla 7:

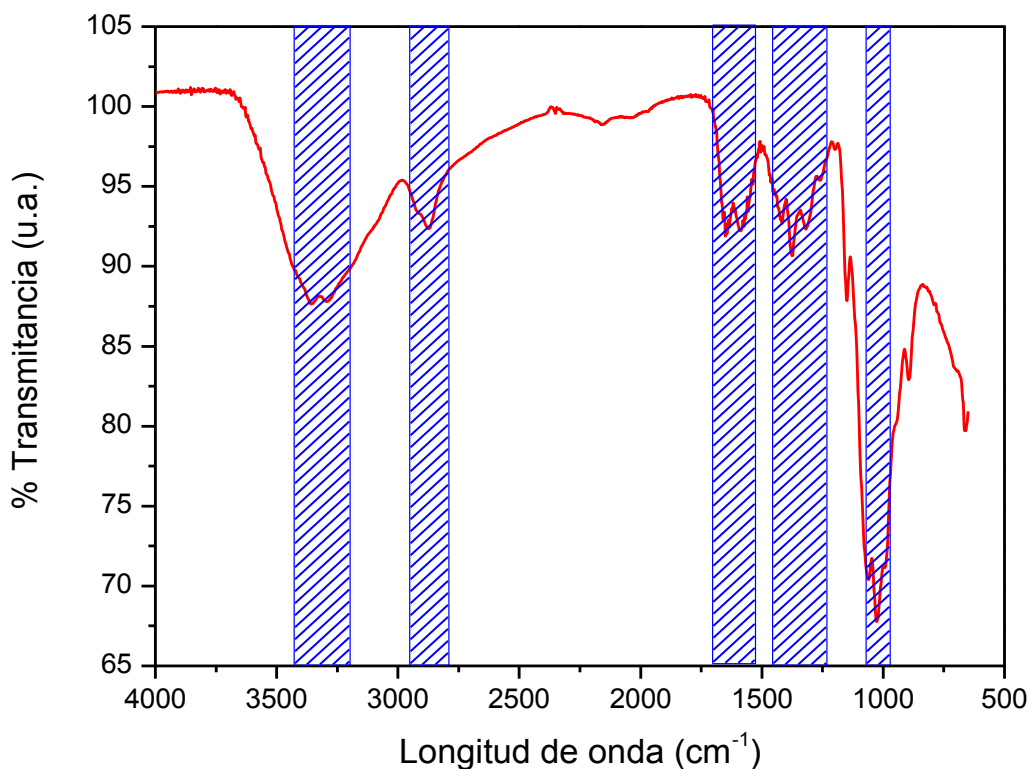
**Tabla 7.** Datos para el cálculo del grado de desacetilación del quitosano.

<b>[base]</b>	0.09885 M
<b><math>W_{\text{quitosano seco}}</math></b>	200.4 mg
<b><math>V_1</math></b>	35.21 mL
<b><math>V_2</math></b>	44.57 mL

De donde se obtiene un grado de desacetilación del **74.33 %**.

### 3.4.2 Espectro IR

Además se realizó un análisis Infrarrojo para la muestra de quitosano sólida usada en todos los ensayos tanto químicos como electroquímicos. El espectro se muestra en la figura 32 donde se muestran picos en zonas similares a referencias ya estudiadas, lo que caracterizaría el quitosano usado.



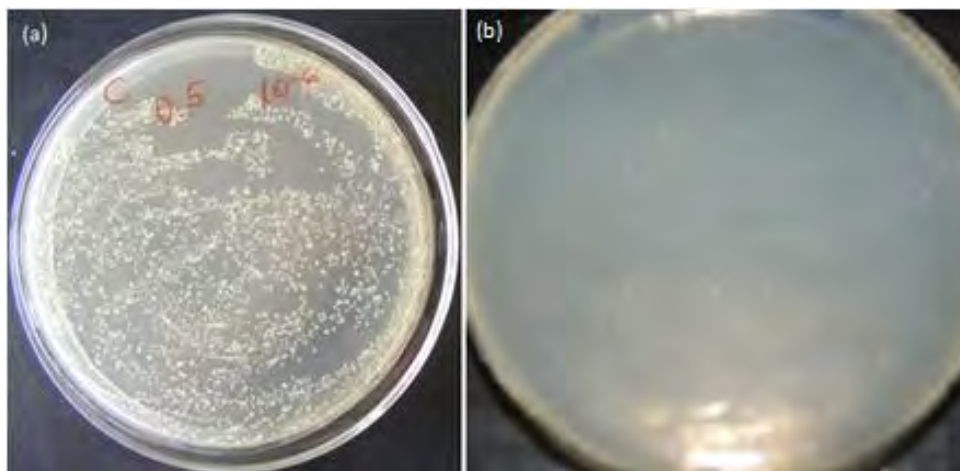
**Figura 32.** Espectro IR de una muestra de Quitosano sólido.

### 3.5 RESULTADOS

La siguiente figura muestra las fotos de las placas Petri en las que fueron sembradas la muestra control de la solución estándar de bacterias y la muestra de evaluación del quitosano. En la figura las colonias de bacterias se presentan como puntos blancos en la superficie del agar nutritivo. La determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinando contando todas las colonias observadas en las placas (recuento en placa).

## Interacción E. coli-Quitosano y caracterización del quitosano

De la figura 33 observamos una gran cantidad de colonias de E. coli en la placa control mientras que en la placa donde fue agregado el quitosano y se mantuvo en contacto por 20 minutos, la cantidad de colonias es considerablemente menor.



**Figura 33.** Evaluación del poder bactericida del quitosano. (a) Placa control y (b) Placa usando una solución de quitosano 0.2% w/v.

De tal forma que al realizar el recuento en placa se determinó que en la placa control se tienen 1 300 UFC, sin embargo considerando las diluciones realizadas la concentración de nuestra solución estándar de bacterias sería de  $1.3 \times 10^9$  UFC.

Realizando el recuento en placa para la placa (b) de acuerdo a la figura se determinó que se tiene 1 UFC, y realizando el mismo proceso anterior debido a las diluciones la concentración de bacterias final por efecto del quitosano a partir de la solución estándar de bacterias fue de  $1 \times 10^7$  UFC (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados de concentración de E. coli de la evaluación del efecto del quitosano.

	Concentración de E. coli (UFC)
Solución estándar	$1.3 \times 10^9$
Solución estándar con quitosano	$1.0 \times 10^7$



SEGUNDA PARTE: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS  
ELECTRODOS

### 3.6 PREPARACIÓN DE LOS ELECTRODOS

Se usó una celda de vidrio de 5 bocas de 100 mL, un burbujeador de doble disposición y un capilar de Luggin. Todos estos materiales se dejaron en solución de permanganato de potasio por 12 horas, se lavaron con una solución ácido sulfúrico–peróxido de hidrógeno (1:3), se hicieron hervir en solución diluida de ácido nítrico y por último en agua ultra pura. Los electrodos de carbón vítreo se pulieron con una lija 1 000, luego con alúmina (0.3 micras) y se colocaron en el sonicador para eliminar los sólidos remanentes. Los electrodos de platino se hacen hervir en solución diluida de ácido nítrico para luego ser sometidos a altas temperaturas usando un soplete. Los barridos voltamétricos se realizan en atmósfera de nitrógeno, éste es burbujeado en la solución antes de realizar los barridos.

#### **3.6.1 Electrodo de carbón vítreo modificado con quitosano GC/CTS**

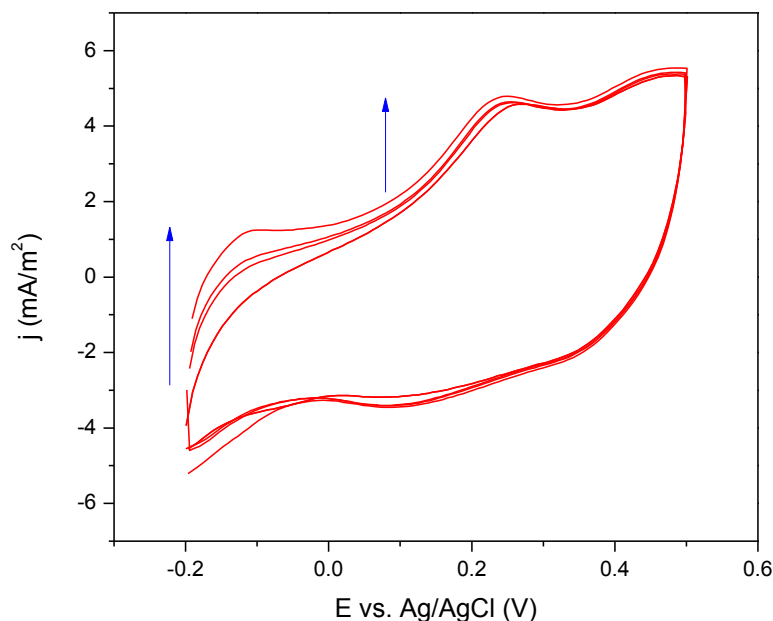
Se preparó una solución de Quitosano 1% w/v en ácido acético 1% v/v como solución precursora para la síntesis de los electrodos de Quitosano. Para su preparación se utilizó la siguiente metodología.

Sobre el electrodo de carbón vítreo, se colocó una gota (20  $\mu$ L) de la solución precursora de Quitosano. El electrodo fue sometido con la solución de quitosano a una temperatura de 60°C por 5 minutos. Los electrodos después del proceso se mantuvieron en medio neutro en una solución de NaCl 2% w/v.

#### **3.6.2 Electrodos de carbón vítreo modificados con partículas de platino GC/PtPs**

La síntesis electroquímica se realizó usando un electrodo de carbón vítreo limpio como electrodo de trabajo, usando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo.

En la figura 34 se muestra la Voltametría cíclica para el proceso de electrodeposición de las partículas de platino sobre el electrodo de carbón vítreo. Este proceso se llevó a cabo en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M que contenía 2.0 mM de la sal de platino, realizando un total de 15 barridos de potencial de -0.2 a 0.5 V a una velocidad de 50 mV/s.



**Figura 34.** Voltagramas obtenidos para la formación de partículas de platino sobre un electrodo de carbón vítreo, en una solución de 2mM de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en medio ácido a una velocidad de 50mV/s.

En estos voltagramas observamos la formación de un pequeño pico en la zona anódica entre valores de potencial de -0.20 y -0.05 que correspondería a la formación de zonas de adsorción y desorción de hidrógeno producidas por la generación de platino durante los barridos.

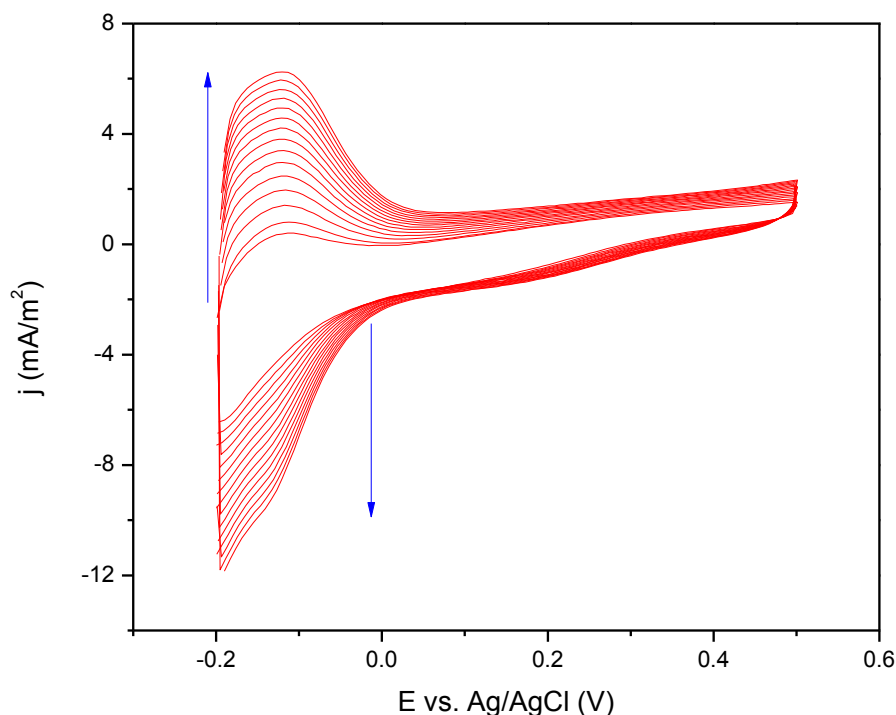
Se realizó el mismo proceso modificando la velocidad de barrido (10, 30 y 50 mV/s) para evaluar los efectos de esta durante la síntesis de las partículas de platino sobre el material base estudiado.

### 3.6.3 Electrodos de carbón vítreo modificados con quitosano y partículas de platino GC/CTS/PtPs

Las partículas de platino fueron depositadas electroquímicamente por Voltametría cíclica usando como electrodo de trabajo el electrodo de Quitosano 1% en una solución 2 mmol de Hexacloroplatinato ácido hexahidratado; un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo.

En la figura 35 se muestra la Voltametría cíclica para el proceso de electrodeposición de las partículas de platino sobre el electrodo de Quitosano preparado previamente.

Este proceso se llevó a cabo en una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M que contenía 2 mM de la sal de platino, realizando un total de 15 barridos de potencial de -0.2 a 0.5 V a una velocidad de 50 mV/s.



**Figura 35.** Voltagramas obtenidos para la formación de partículas de Platino sobre un electrodo de Quitosano 1%, en una solución de 2 mM de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en medio ácido a una velocidad de 50 mV/s.

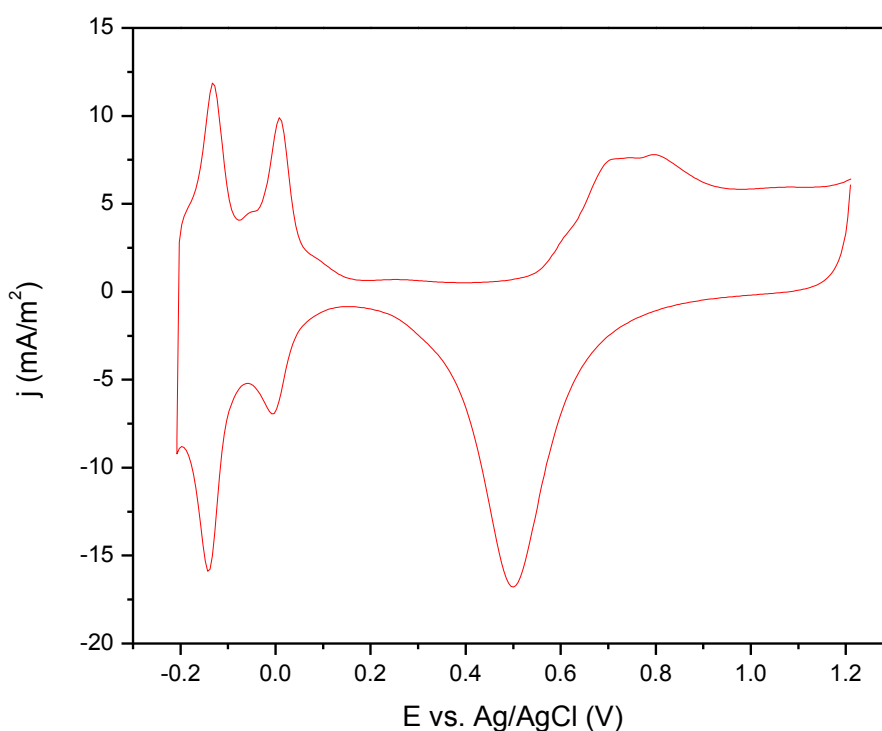
En estos barridos de potencial obtenidos para la electrodeposición de partículas de platino sobre la red de Quitosano, observamos la formación muy pronunciada de un pico en la zona anódica entre valores de potencial de -0.2 y 0.0 V que correspondería a la formación de zonas de adsorción y desorción de hidrógeno producto de la generación de platino durante los barridos.

Se realizó el mismo proceso modificando la velocidad de barrido (10, 30 y 50 mV/s) para evaluar los efectos de esta durante la síntesis de las partículas de platino sobre el material base estudiado.

### 3.7 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LOS ELECTRODOS

La caracterización electroquímica de los electrodos preparados se realizó mediante voltametría cíclica. Previamente a realizar la Voltametría cíclica de los electrodos preparados, se realizó la Voltametría cíclica de Platino policristalino en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M para así asegurar las condiciones óptimas de cada proceso. Además de burbujear nitrógeno por 5 minutos en la celda tanto en la solución como en la superficie, para lograr el desplazamiento del oxígeno.

Se usó un electrodo de platino policristalino como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como contraelectrodo en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M. En la figura 36 se muestra el voltagrama del platino en este sistema, entre potenciales de -0.2 y 1.2 V.



**Figura 36.** Voltagrama estabilizado de Platino policristalino en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

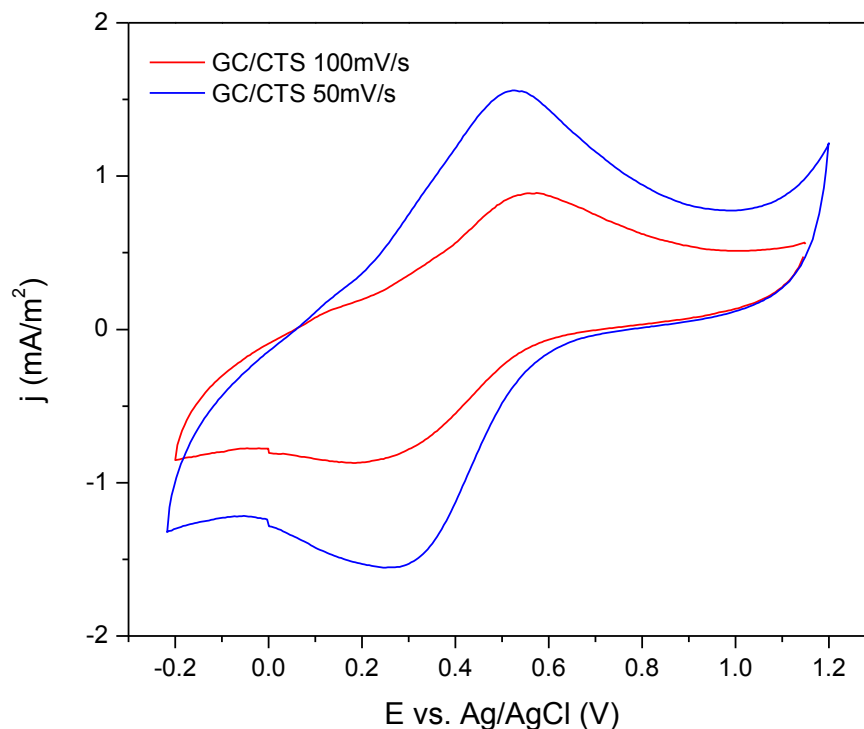
El voltagrama muestra en la zona anódica los picos de adsorción de hidrógeno entre valores de potencial de -0.2 a 0.1 V, a partir de 0.54 V se observa un aumento de la corriente debido a la formación del óxido de platino en la superficie del electrodo y a valores de 1.3 V aproximadamente se da la formación de oxígeno molecular.

En la zona catódica, se observa un pico entre 0.7 y 0.3 V correspondiente a la reducción del óxido formado en el proceso anódico, mientras que entre los valores de 0.1 y -0.2 V se observa los picos correspondientes a la desorción de hidrógeno. A menores valores de potencial se da la formación de hidrógeno molecular. La zona no farádica se muestra como dos líneas en donde la corriente es constante debido al potencial de la doble capa.

### 3.7.1 Voltametría cíclica del electrodo GC/CTS

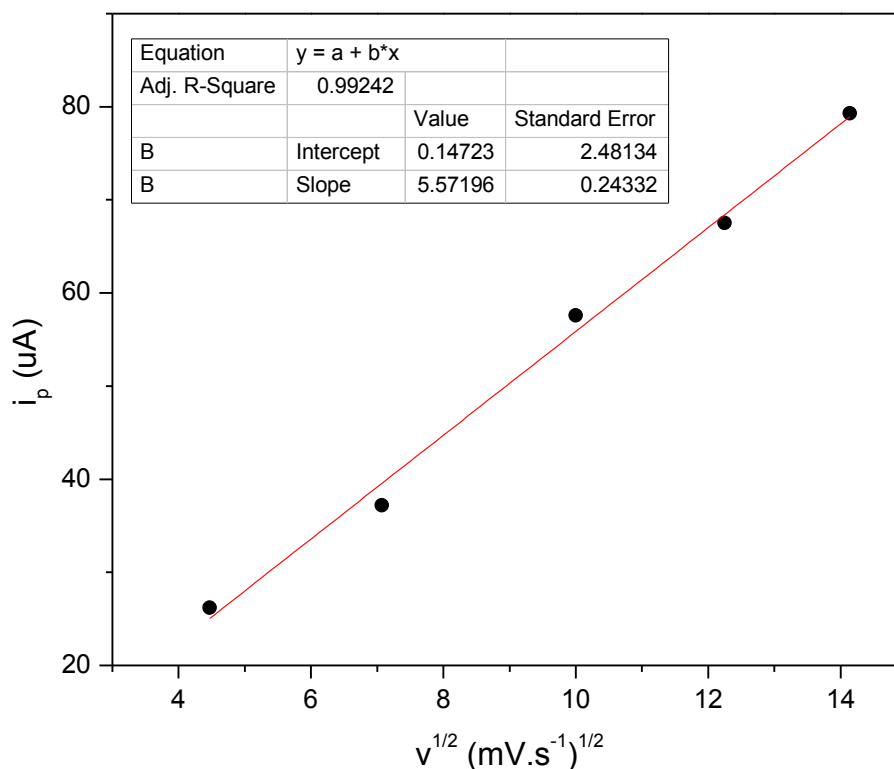
El electrodo preparado según el procedimiento indicado, se usó como electrodo de trabajo en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M usando platino como contraelectrodo y Ag/AgCl como electrodo de referencia.

En la figura 37 se muestra el voltagrama obtenido entre valores de potencial de -0.2 a 1.2 V a velocidades de barrido de 50 y 100 mV/s. Se pueden observar picos de corriente a valores de potencial de 0.55 y 0.25 V en la zona anódica y catódica respectivamente los cuales indican presencia de procesos redox.



**Figura 37.** Voltagrama del electrodo de quitosano sobre carbón vítreo en solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M a velocidades de barrido de (a) 100 mV/s y (b) 50 mV/s.

A partir de los Voltagramas cíclicos para la caracterización del electrodo de quitosano, se realizaron diferentes barridos y fueron determinadas las corrientes de pico. Como resultado se muestra la figura 38 que muestra la dependencia de la corriente de pico versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, la buena dependencia lineal muestra el carácter conductor que tendría el electrodo GC/CTS.



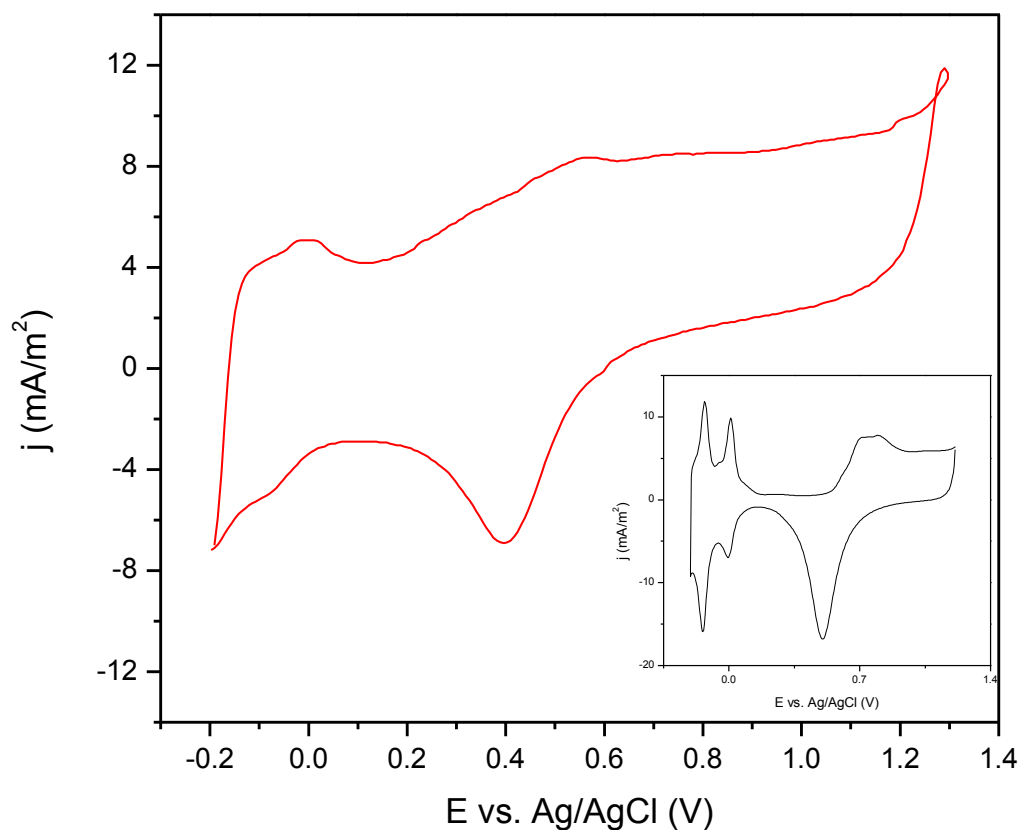
**Figura 38.** Gráfico que muestra la variación o dependencia de la corriente de pico con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para el electrodo de quitosano en medio ácido.

### 3.7.2 Voltametría cíclica de los electrodos GC/PtPs

El electrodo de GC/PtPs, sintetizado a 50 mV/s, fue caracterizado por Voltametría cíclica en una solución ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M usándolo como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo.

La figura 39 muestra el voltograma estabilizado, a una velocidad de barrido de 100 mV/s entre valores de -0.2 a 1.2 V. Se puede observar dos picos pequeño en la zona anódica entre valores de -0.15 y -0.08 V y otro menos pronunciado entre valores de 0.3 V y 0.8 V; mientras en la zona catódica se observa un pico de reducción a aproximadamente 0.41 V y otros dos pequeños picos entre valores de -0.16 y -0.06 V. Estos picos comparados al del Pt policristalino nos indicarían la presencia de platino en la superficie del sustrato.

El área superficial real fue determinada a partir del voltograma cíclico mostrado.



**Figura 39.** Voltograma estabilizado para el electrodo GC/PtPs (sintetizado a 50 mV/s) en solución ácida H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M a una velocidad de barrido de 100 mV/s. (in situ: voltograma de un electrodo de platino policristalino en medio ácido).



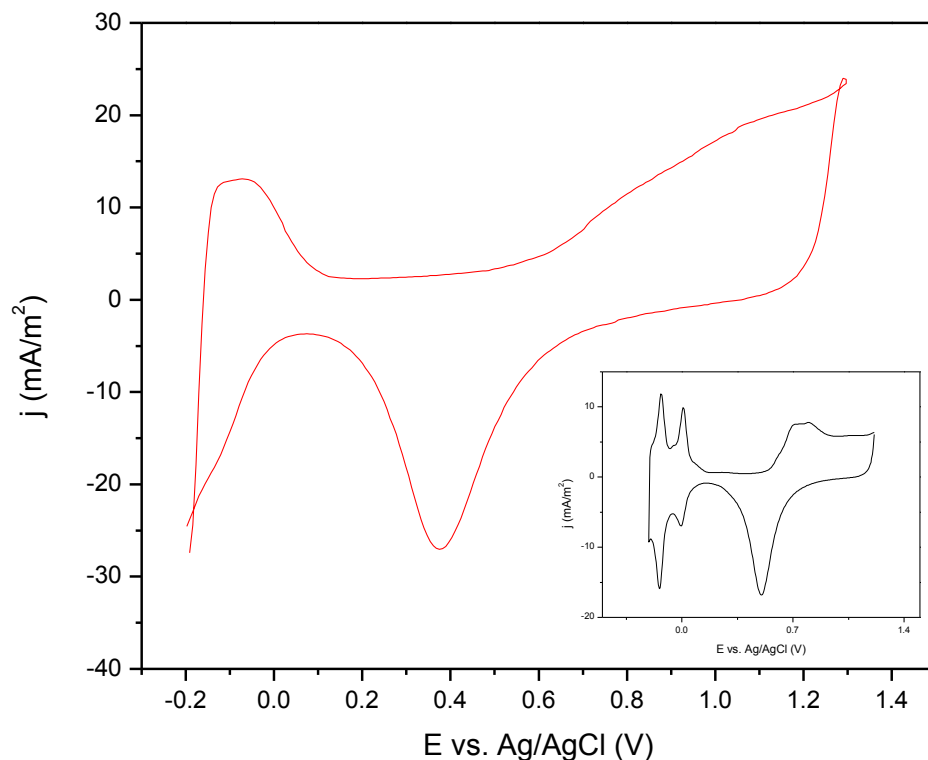
### 3.7.3 Voltametría cíclica de los electrodos GC/CTS/PtPs

El electrodo de GC/CTS/PtPs fue caracterizado por Voltametría cíclica en una solución ácida de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M usándolo como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo.

La figura 40 muestra el voltagrama estabilizado, a una velocidad de barrido de 100 mV/s entre valores de -0.2 a 1.2 V. Se puede observar un pico en la zona anódica entre valores de -0.2 y -0.02 V y otro pico entre valores de 0.6 y 1.2 V; mientras en la zona catódica se observa un pico de reducción a aproximadamente 0.35 V y otro pico entre valores de -0.2 y -0.02 V.

Estos picos comparados al del Pt policristalino nos indicarían la presencia predominante de platino en la superficie del sustrato.

El área superficial real fue determinada a partir del voltagrama cíclico mostrado.



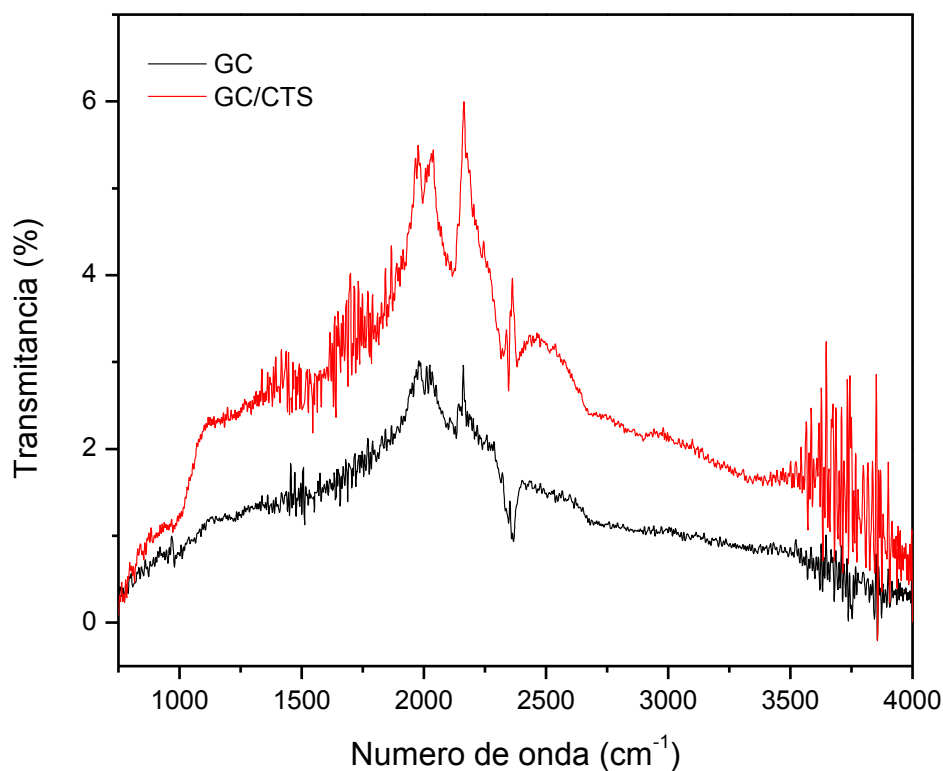
**Figura 40.** Voltagrama estabilizado para el electrodo GC/CTS/PtPs (sintetizado a 50 mV/s) en solución ácida  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5M a una velocidad de barrido de 100 mV/s. (in situ: voltagrama de un electrodo de platino policristalino en medio ácido).

### 3.8 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LOS ELECTRODOS

#### 3.8.1 Espectroscopía Infrarrojo

Se realizó la espectroscopía infrarrojo a los electrodos de quitosano, GC/CTS y un electrodo de carbón vítreo para estudiar las diferencias entre los diferentes espectros obtenidos.

La figura 41 muestra la comparación de los resultados obtenidos para ambos electrodos donde es posible observar ligeras diferencias en comparación al electrodo sustrato de GC como se pueden observar a valores cercanos a 1100 y 2500  $\text{cm}^{-1}$ .

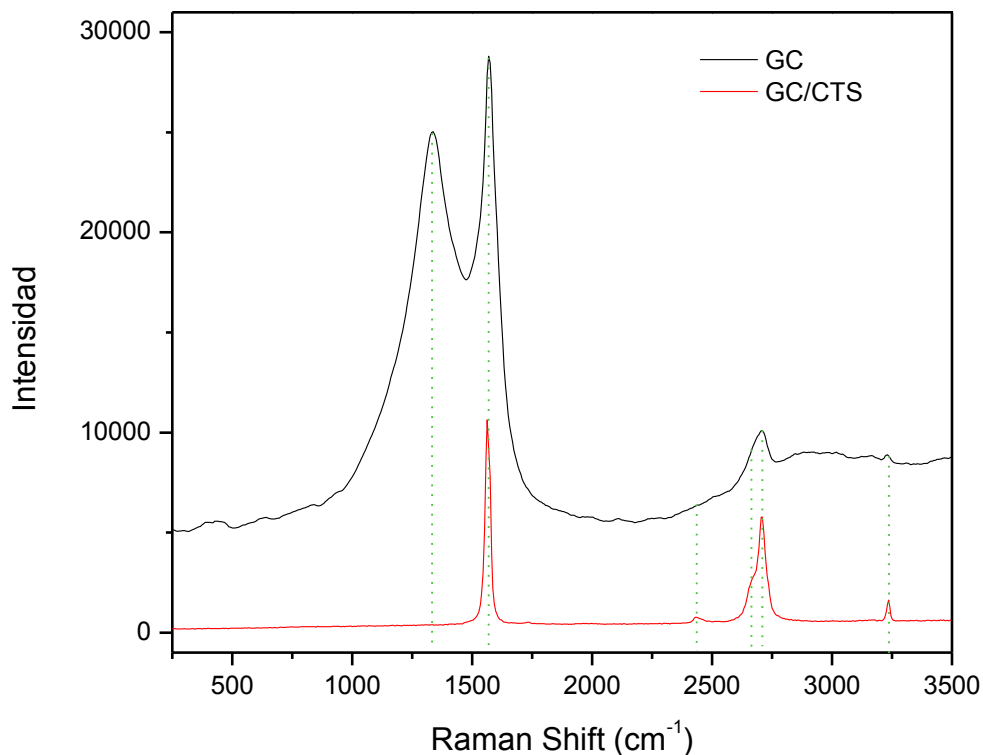


**Figura 41.** Espectros IR de los electrodos GC/CTS y GC.

#### 3.8.2 Espectroscopía RAMAN

Se realizó un análisis RAMAN a los electrodos GC y GC/CTS para poder observar y diferenciar la presencia de quitosano sobre el sustrato tal como se muestra en la figura 42.

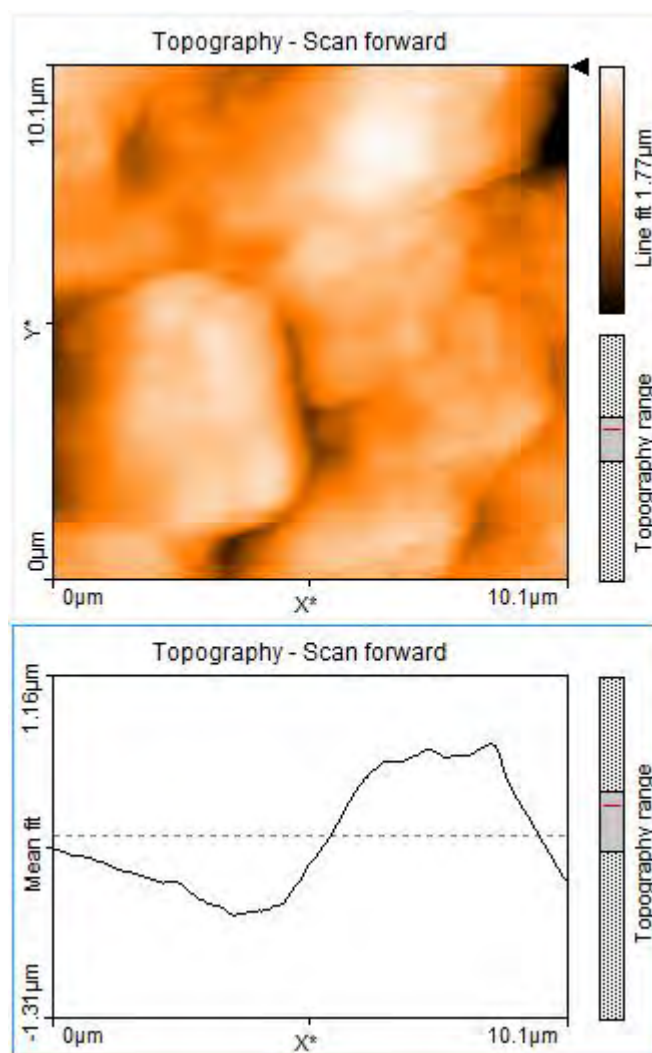
Para el carbón vítreo, son observables dos bandas a 1350 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente de intensidades similares, además de una pequeña banda a 2700  $\text{cm}^{-1}$ . Para el quitosano es observable una banda predominante a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , así como pequeñas bandas a 2400 y 3250  $\text{cm}^{-1}$ .



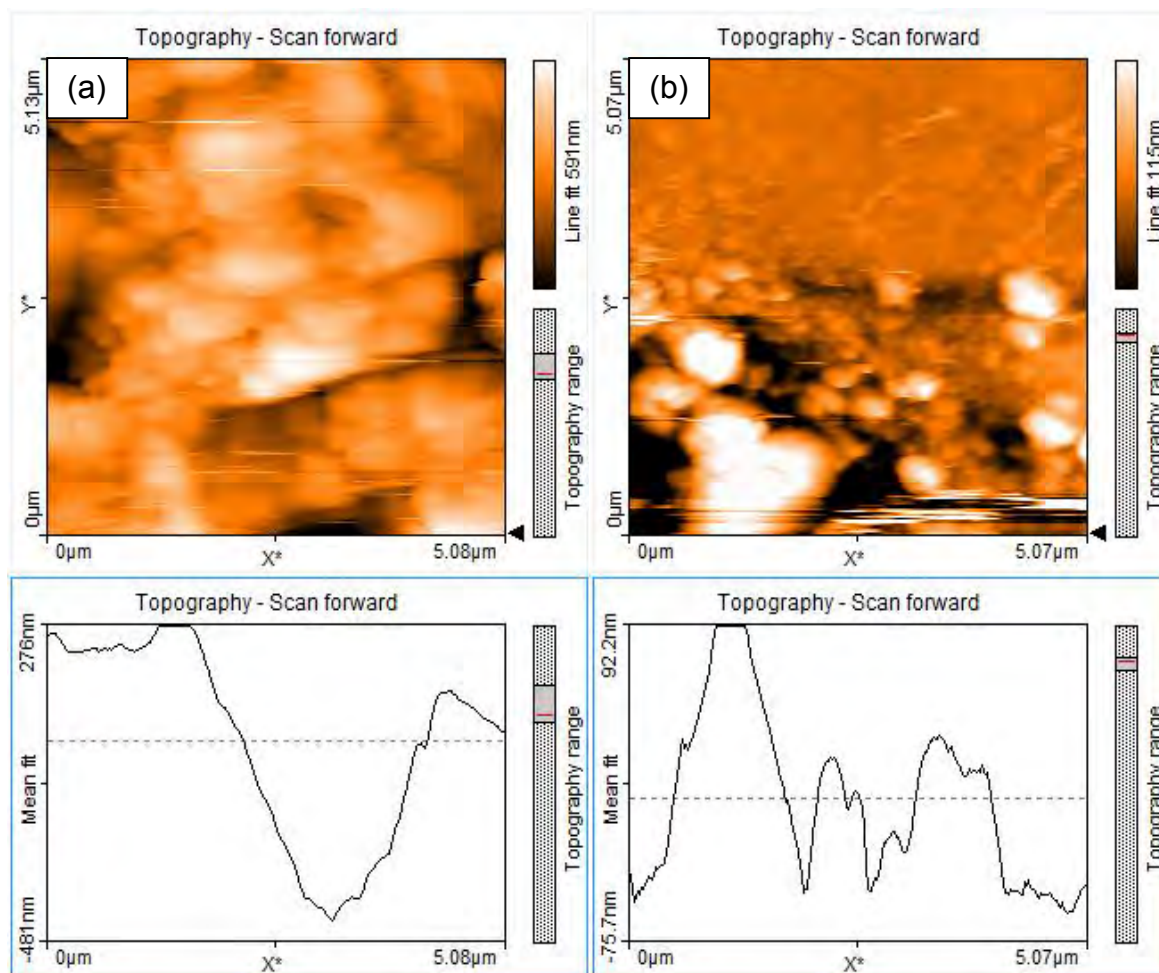
**Figura 42.** Espectro Raman para los electrodos GC y GC/CTS.

### 3.8.3 Microscopía de fuerza atómica

Se realizó la microscopía de fuerza atómica a todos los electrodos preparados con el fin de observar las características superficiales y además poder determinar el tamaño de las partículas de platino depositadas sobre cada uno de los sustratos usando el método propuesto. A partir de estas imágenes podemos observar las diferencias superficiales entre los tres tipos de electrodos, donde para el electrodo GC/CTS se puede observar una especie de red voluminosa sobre el electrodo base (Figura 43); en la figura 44, en el electrodo GC/PtPs se observan pequeñas partículas sobre la superficie y para el electrodo GC/CTS/PtPs se observan pequeñas partículas depositadas tanto en la superficie como sobre la red observada inicialmente en la figura 43.



**Figura 43.** Imagen AFM del electrodo GC/CTS.



**Figura 44.** Imágenes AFM de los electrodos (a) GC/PtPs y (b) GC/CTS/PtPs.

TERCERA PARTE: DETERMINACIÓN DE ESCHERICHIA COLI POR  
POTENCIOMETRÍA

### 3.9 PROCESO DE OBTENCIÓN DE RESPUESTA POTENCIOMÉTRICA EN FUNCIÓN A LA CONCENTRACIÓN DE *E. COLI*.

#### 3.9.1 Preparación de medio de cultivo y cepas *E. coli*

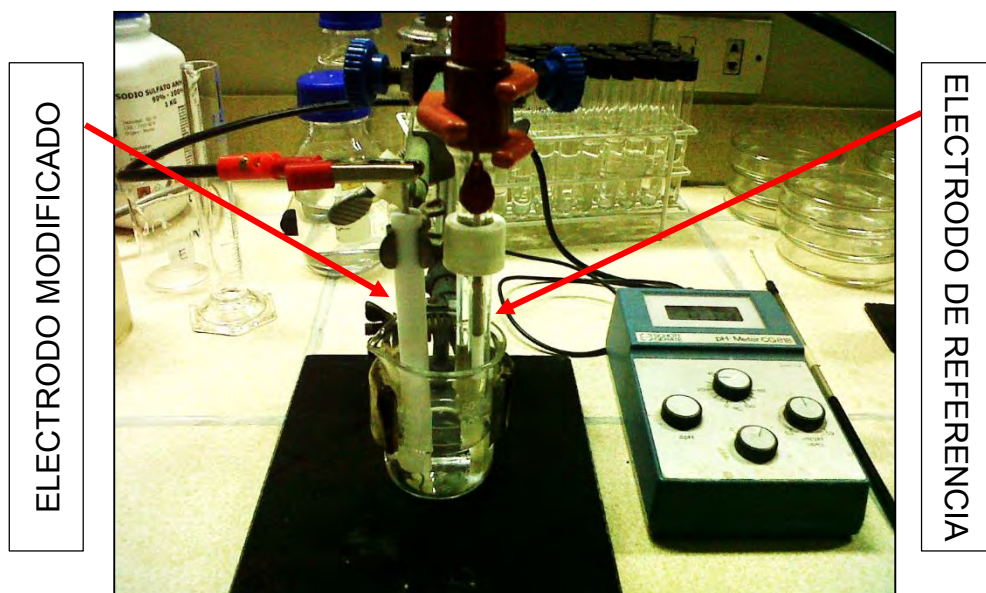
La preparación de medios de cultivo junto con las cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el mismo procedimiento para el estudio del estudio del poder bactericida del quitosano en la sección 3.2 de acuerdo a la Tabla 5.

El filtro obtenido fue suspendido en agua ultrapura por tiempo no menor de 2 días de agitación, luego de los cuales se procedió a la filtración.

Dado que el tiempo de suspensión en el caldo nutritivo fue menor y en consecuencia menor el tiempo de reproducción bacteriana, se trabajó directamente con la solución obtenida a partir del filtro.

#### 3.9.2 Sistema de medición potenciométrica

La medición de los cambios de potencial modificando las concentraciones de *E. coli* se realizó usando el sistema mostrado en la figura 45.



**Figura 45.** Sistema de análisis de medición potenciométrica para la determinación de *E. coli*.

**Tabla 9.** Electrodo usado durante las medidas potenciométricas. (Entre paréntesis se indica la velocidad de barrido a la cual fueron sintetizadas las partículas de platino)

ELECTRODO DE TRABAJO		ELECTRODO DE REFERENCIA
Denominación	Composición	
GC	Carbón vítreo (GC)	Ag/AgCl
H	GC/CTS	
F	GC/PtPs (10 mV/s)	
G	GC/PtPs (30 mV/s)	
D	GC/PtPs (50 mV/s)	
A	GC/CTS/PtPs (10 mV/s)	
B	GC/CTS/PtPs (30 mV/s)	
C	GC/CTS/PtPs (50 mV/s)	

Se midió el valor de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia registrando los valores indicados por el equipo. Se midió el potencial para la solución de sulfato de sodio en ausencia de bacterias.

Luego, se fueron agregando diferentes volúmenes de la solución madre de bacterias preparadas previamente, tal a como se indica en la tabla 10. Luego de cada medida los electrodos fueron lavados con agua destilada estéril para remover las bacterias adsorbidas en la superficie del electrodo.

Se registraron todos los datos de medida de potencial por cada electrodo usado e incluyendo un exceso de solución madre (1000  $\mu$ L) para estudiar los efectos a altas concentraciones de bacterias.



**Tabla 10.** Volúmenes de solución madre de bacterias *E. coli* agregados a la solución de sulfato de sodio estéril.

Muestra N°	Volumen agregado de Solución madre (µL)
1	0
2	50
3	75
4	125
5	175
6	250
7	350
8	500
9	1000

### 3.9.3 Sembrado de muestras para la cuantificación de *E. coli*

Se tomaron muestras de la solución de sulfato de sodio con diferentes volúmenes agregados de la solución madre para determinar la cantidad de bacterias presentes por conteo de placa.

Para lo cual se tomaron alícuotas de 0.5 mL por triplicado, de cada solución generada según la tabla 8; estas alícuotas fueron sembradas sobre placas que contenían agar-agar enfriado.

Las placas, tres por cada solución, fueron empaquetadas y colocadas en la incubadora por 2 horas a 37°C. Luego de este tiempo fueron retiradas y se realizó el recuento de placas. Como resultado final de la cantidad de bacterias se toma el promedio de la cantidad de las 3 placas sembradas, y se expresa el resultado en UFC.

El procedimiento se realizó para los dos ensayos realizados. Los resultados de concentración de *E. coli* se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11.** Determinación de las concentraciones de bacterias *E. coli* por cada muestra de solución.

Muestra N°	Volumen agregado de Solución madre (µL)	Concentración (UFC)	
		1° Ensayo	2° Ensayo
1	0	0	0
2	50	0	1
3	75	1	3
4	125	2	5
5	175	25	20
6	250	50	55
7	350	140	135
8	500	380	360
9	1000	4000	4300

### 3.10 RESULTADOS DE ENSAYOS REALIZADOS Y CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se realizaron dos ensayos en dos días diferentes para evaluar la reproducibilidad, por ello se muestran los datos recolectados por cada ensayo.

La solución madre fue la misma usada en ambos casos, sin embargo es necesario realizar nuevamente un recuento de placas debido a la diferente aglomeración de las bacterias lo que implicaría una diferente concentración.

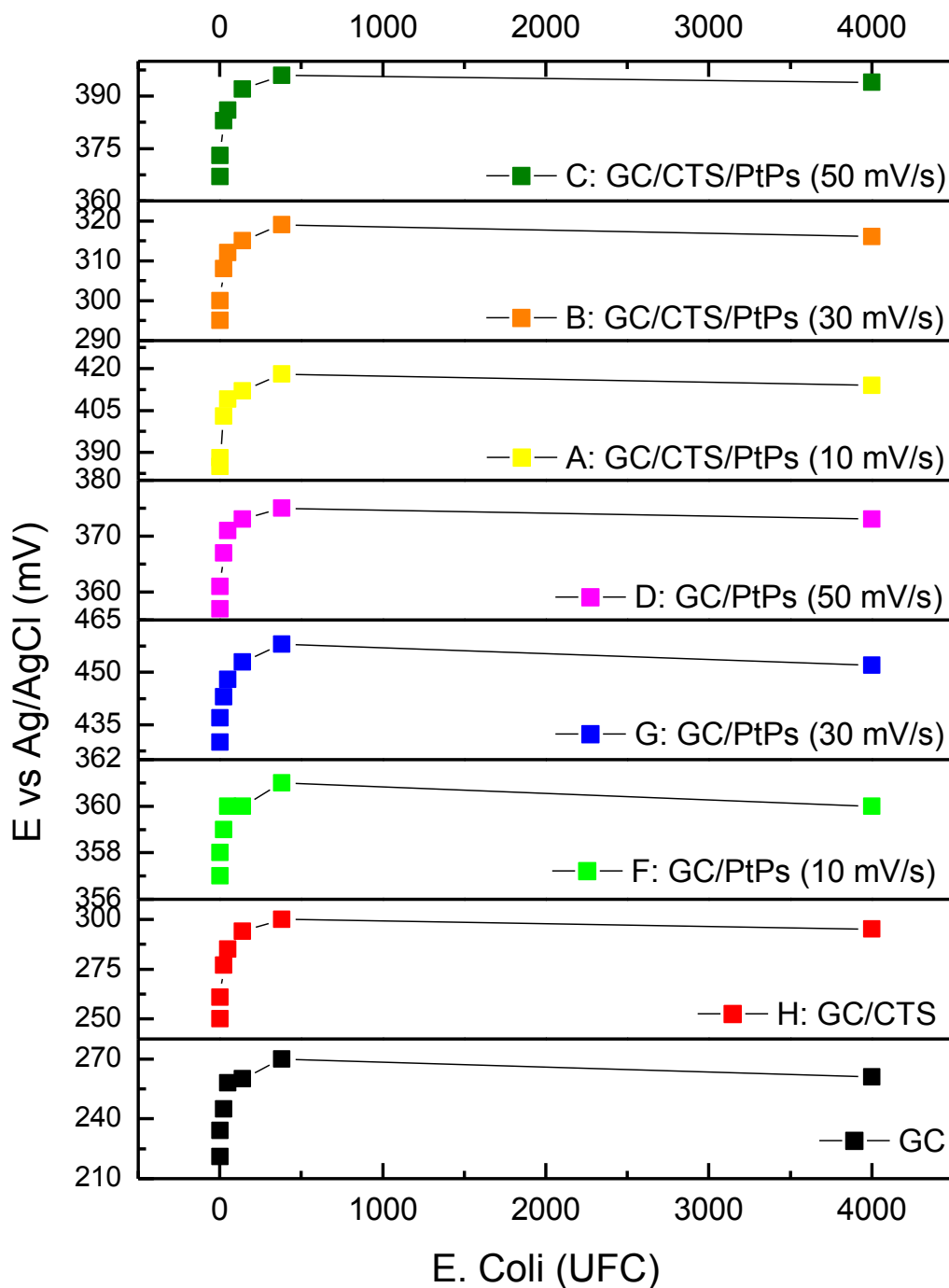
A partir de los valores de concentración de bacterias obtenidas, se realiza un gráfico del potencial versus la concentración y además determina el logaritmo de la concentración de las mismas ya que el potencial resulta ser directamente proporcional al logaritmo de la especie. A partir de la primera relación se puede estudiar los efectos al tener un exceso de bacterias en las muestras.

#### 3.10.1 Primer ensayo

Los resultados de potencial medido y concentración de bacterias se muestran en la tabla 12. A partir de estos resultados se obtienen las gráficas de potencial versus concentración para el primer ensayo por cada electrodo modificado que se muestran en la figura 46. La figura 47 muestra los datos sin el dato de exceso de bacterias.

**Tabla 12.** Medidas potenciométricas recolectadas durante el primer ensayo en función del volumen agregado de la solución madre.

	Concentración (UFC)	Logaritmo Concentración	POTENCIAL vs Ag/AgCl (mV)							
			GC	H	F	G	D	A	B	C
			GC	GC/CTS	GC/PtPs (10 mV/s)	GC/PtPs (30 mV/s)	GC/PtPs (50 mV/s)	GC/CTS/PtPs (10 mV/s)	GC/CTS/PtPs (30 mV/s)	GC/CTS/PtPs (50 mV/s)
1° Ensayo	0	-	100	15	294	398	313	390	80	319
	1	0	221	250	357	430	357	385	295	367
	2	0.3	234	261	358	437	361	388	300	373
	25	1.4	254	277	359	443	367	403	308	383
	50	1.7	258	285	360	448	371	409	312	386
	140	2.1	260	294	360	453	373	412	315	392
	380	2.6	270	300	361	458	375	418	319	396
	4000	3.6	261	295	360	452	373	414	316	394
2° Ensayo	0	-	100	19	293	383	313	387	86	317
	1	0	221	251	357	432	359	379	293	362
	3	0.5	226	258	358	437	360	387	297	367
	5	0.7	237	265	358	438	362	389	299	371
	20	1.3	242	273	359	443	367	395	304	377
	55	1.7	246	286	360	446	370	401	308	382
	135	2.1	260	292	360	454	373	407	313	384
	360	2.6	266	297	361	458	375	414	315	390
	4300	3.6	262	294	360	451	373	410	312	385



**Figura 46.** 1° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo *E. coli* por cada electrodo modificado preparado.

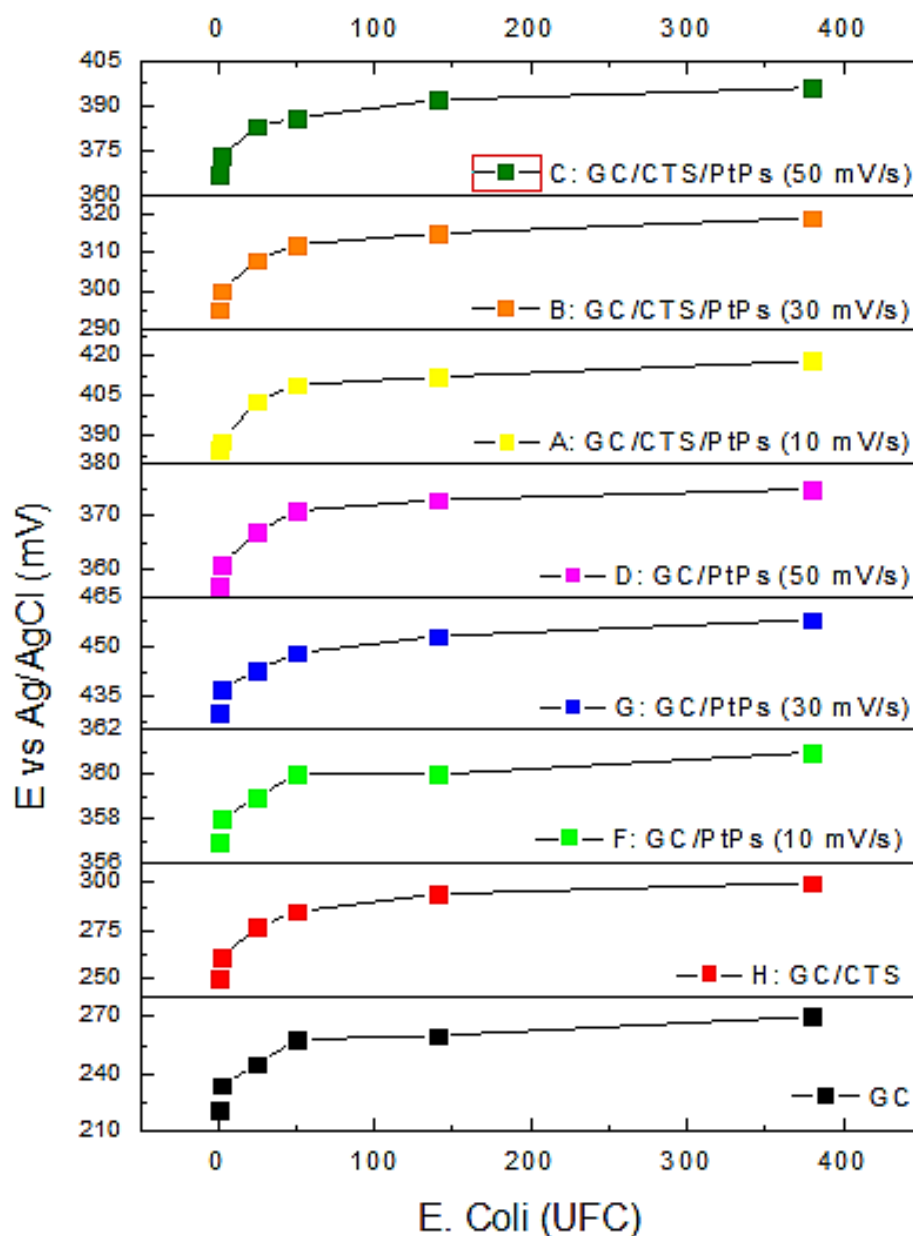


Figura 47. 1° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo *E. coli* (sin excedente) por cada electrodo modificado preparado.

# Determinación de *Escherichia coli* por potenciometría

En función de los datos de logaritmos de concentración y potencial medido según la tabla 12 se construyeron las siguientes curvas de calibración mostradas en la figura 48.

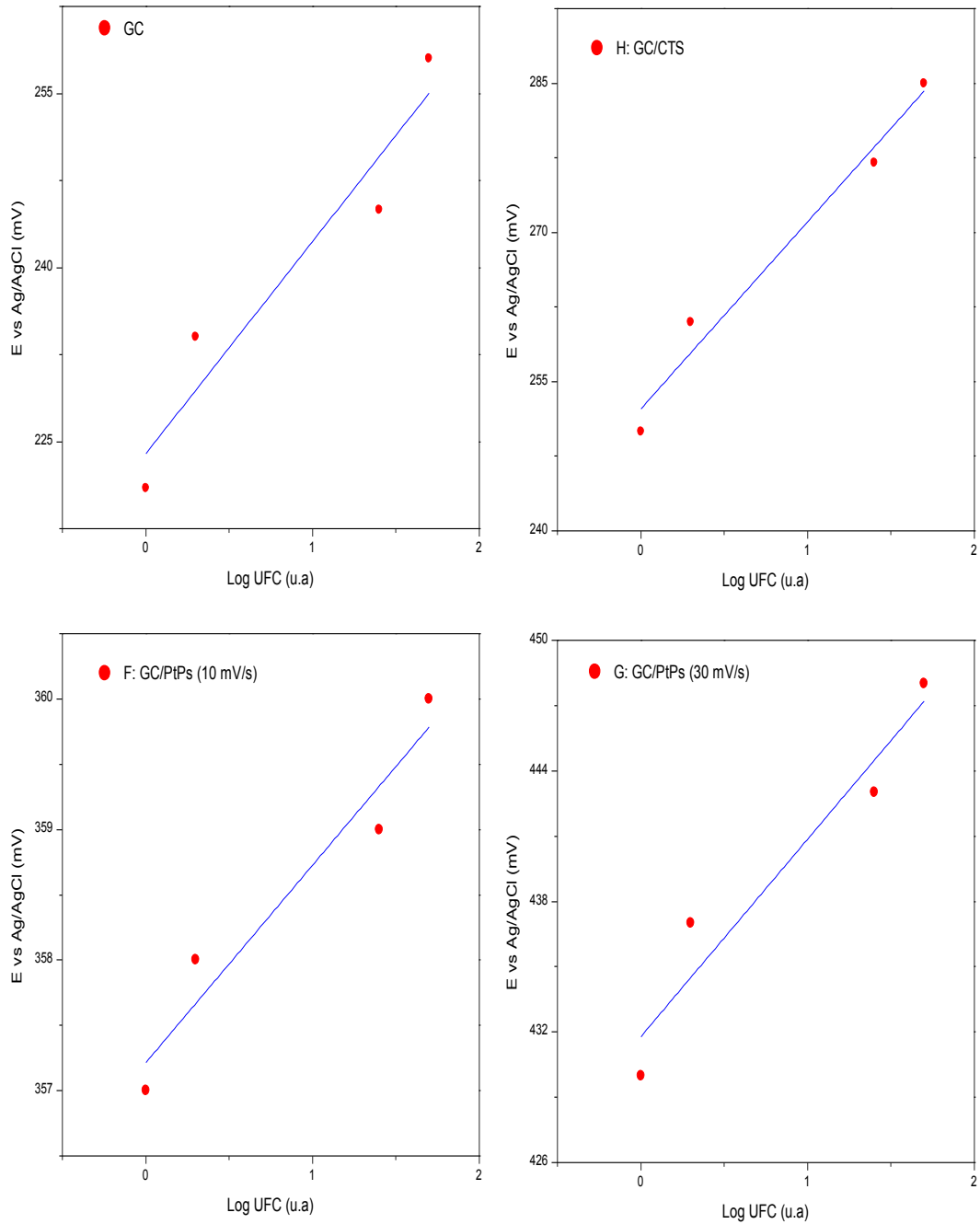
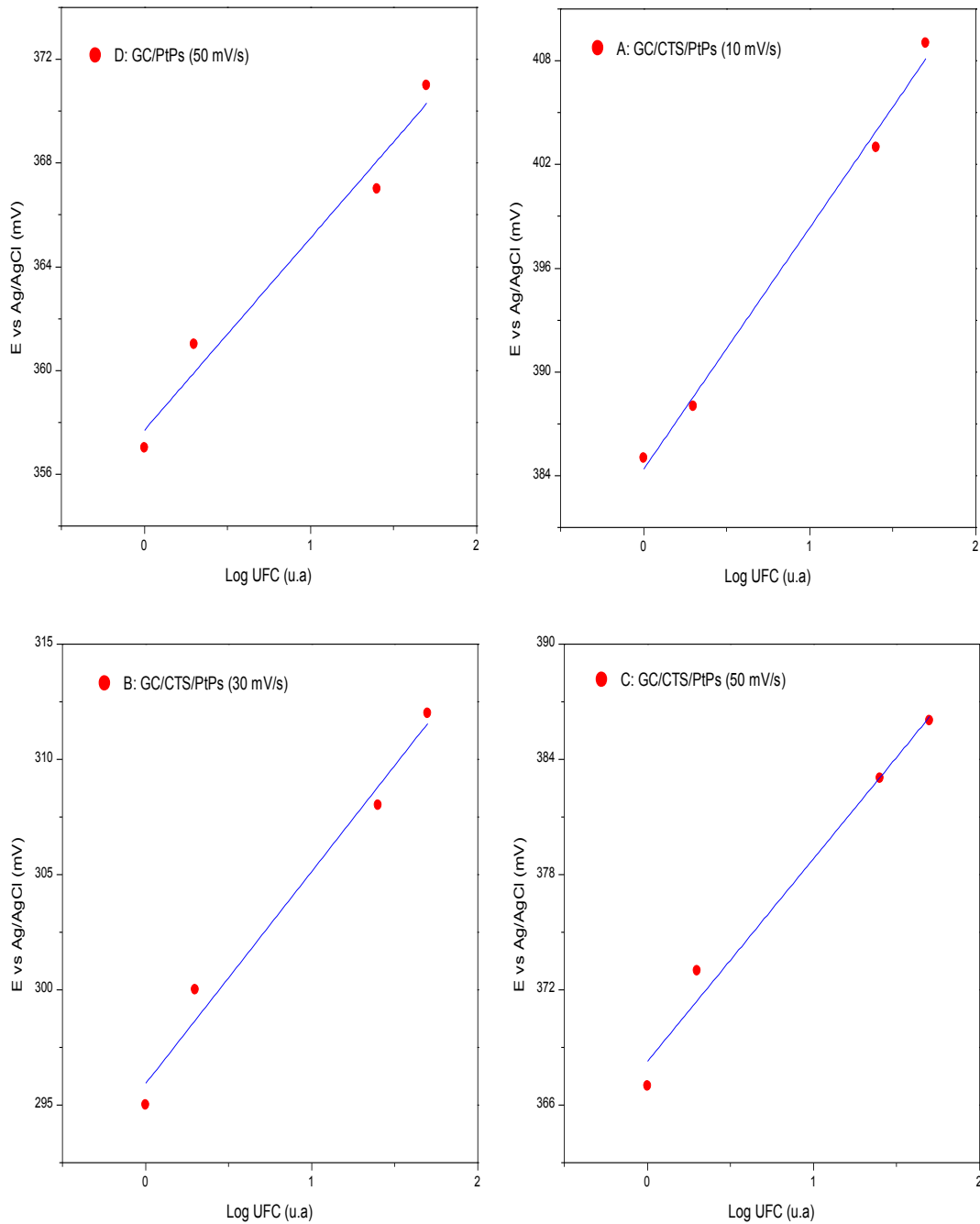


Figura 48. Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de *Escherichia coli* usando los electrodos modificados.

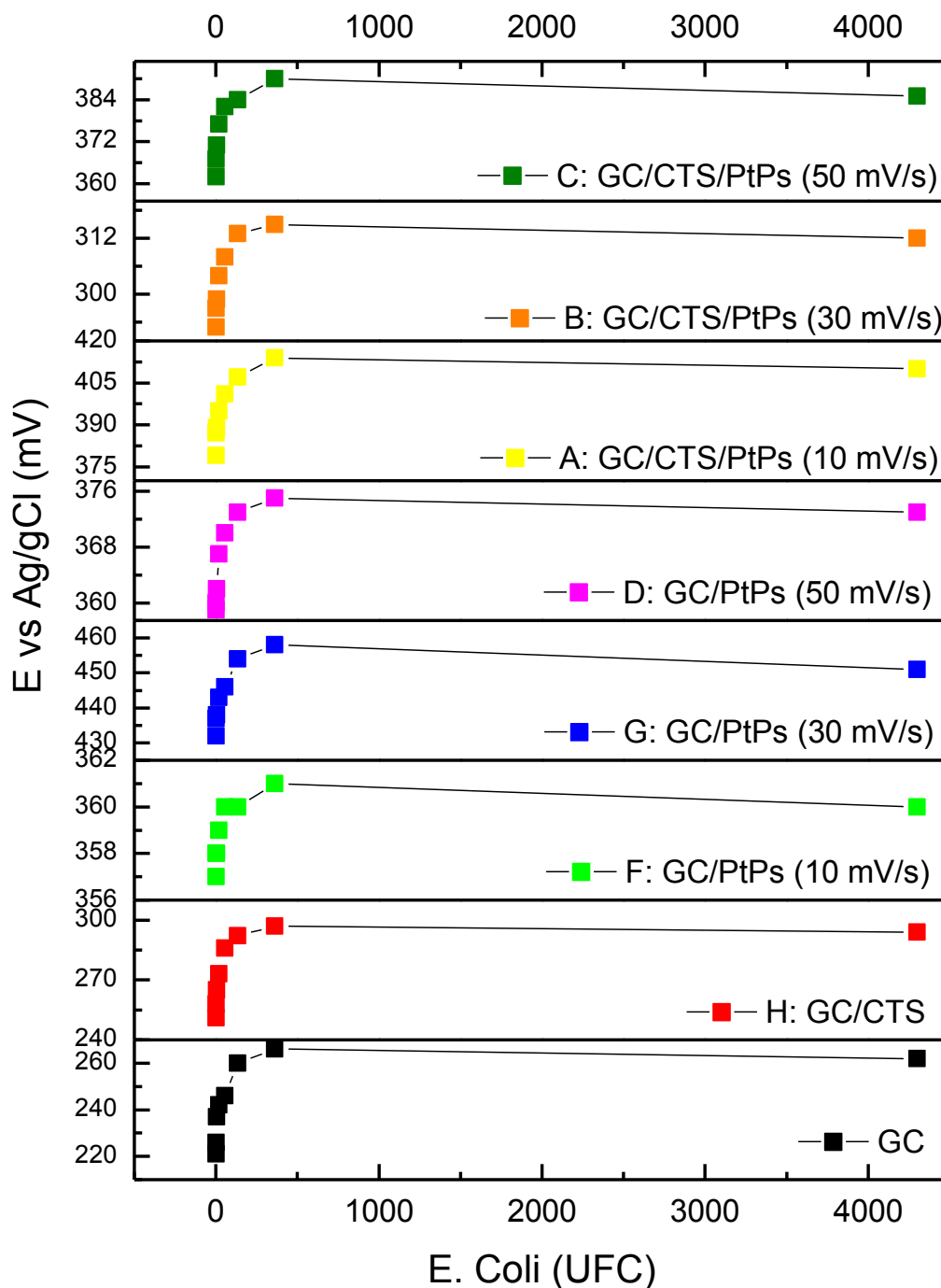




**Figura 48.** 1° Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de *Escherichia coli* usando los electrodos modificados. (Continuación)

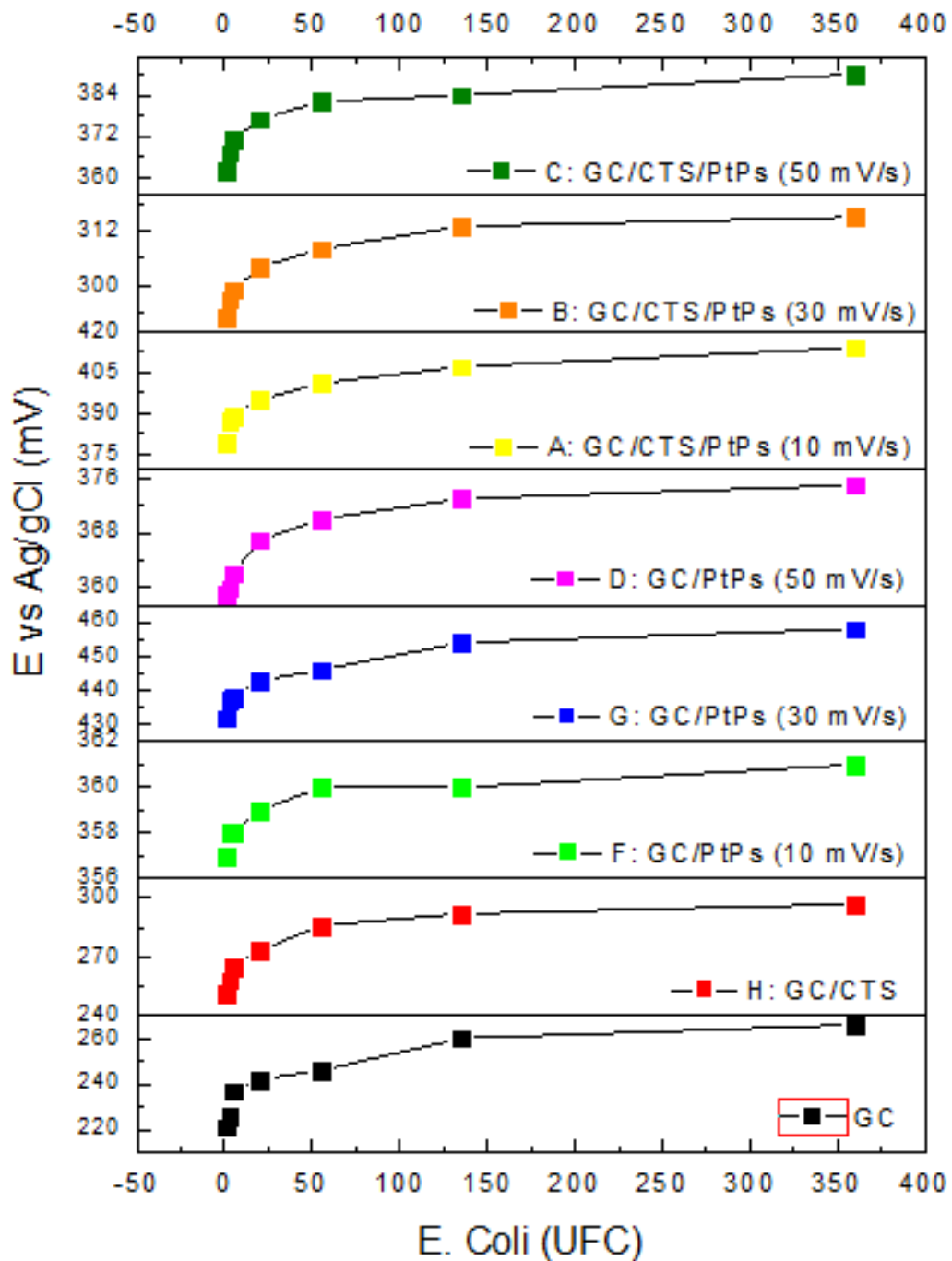
### 3.10.2 Segundo ensayo

Los resultados de potencial medido y concentración de bacterias se muestran en la tabla 12. A partir de estos resultados se obtienen las gráficas de potencial versus concentración para el primer ensayo por cada electrodo modificado que se muestran en las figuras 49 y 50.



**Figura 49.** 2° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterial del tipo *E. coli* por cada electrodo modificado preparado.





**Figura 50.** 2° Ensayo: Gráficas potencial versus concentración de bacterias del tipo *E. coli* (sin excedente) por cada electrodo modificado preparado.

## Determinación de *Escherichia coli* por potenciometría

En función de los datos de logaritmos de concentración y potencial medido según la tabla 12 se construyeron las siguientes curvas de calibración mostradas en la figura 51.

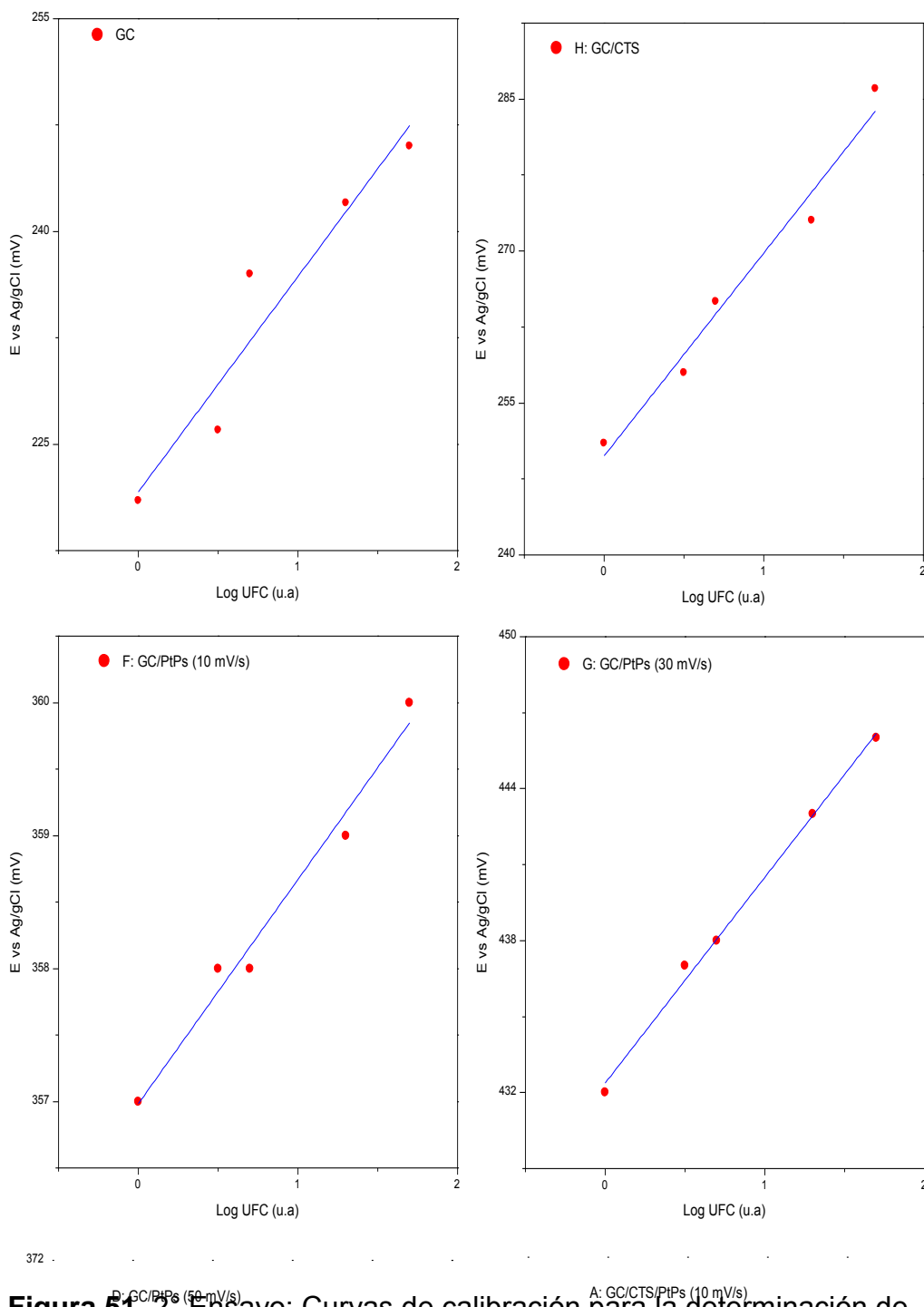
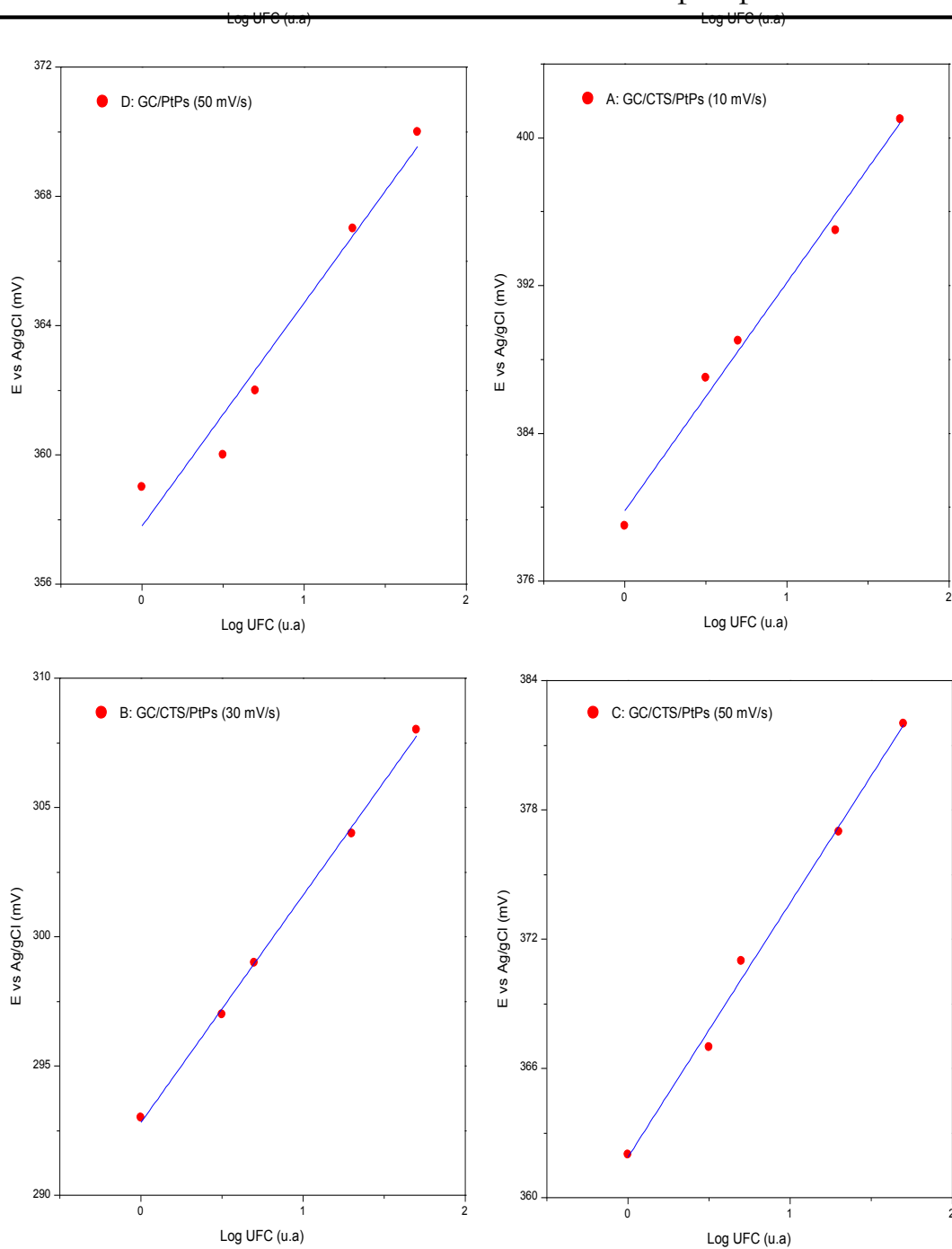


Figura 51. 2 Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de *Escherichia coli* usando los electrodos modificados.

# Determinación de *Escherichia coli* por potenciometría



**Figura 51.** 2° Ensayo: Curvas de calibración para la determinación de *Escherichia coli* usando los electrodos modificados. (Continuación)

## CUARTA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

### 3.11 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN *E. COLI*-QUITOSANO

A partir de estos resultados obtenidos de concentración es posible evidenciar el efecto del quitosano en la disminución considerable de la cantidad de colonias de *E. coli*. El quitosano fue preparado en medio ácido ya que este solubiliza a valores de pH menores a 6.3.

Por lo cual el pH final de la solución de quitosano en presencia de bacterias y agua estéril resultó ser aproximadamente de 5, y considerando que los valores óptimos de crecimiento para el *E. coli* se encuentran entre 6 y 8, se puede asumir un efecto de la inhibición del crecimiento de las bacterias no solo a la presencia del quitosano sino al efecto del medio ácido.

Sin embargo es apreciable la gran disminución en aproximadamente un factor de 200 la inhibición del crecimiento bacteriano (99.92%), debido principalmente al quitosano quien de acuerdo a sus propiedades estructurales y al poseer carga positiva cuando es solubilizado en medio ácido, interactúa con los fosfatos y polifosfatos de la membrana celular de la bacterias alterando la permeabilidad y rompiendo la pared celular dependiendo del tiempo de contacto. Como segundo mecanismo de acción también se plantea el ingreso del quitosano una vez deteriorada la pared celular para que éste reaccione con el ADN inhibiendo la producción de ARN y provocando finalmente la muerte de la bacteria. El quitosano además actúa como agente quelante que se une selectivamente a traza de metales y por consiguiente inhibe la producción de toxinas y el crecimiento micelial; activa algunos procesos de defensa en los tejidos hospederos y actúa inhibiendo varias enzimas. [30,43]

En el espectro IR de la muestra sólida de quitosano se observan dos pequeñas bandas entre 3250 y 3400  $\text{cm}^{-1}$  los cuales corresponden al grupo OH, dos picos semisolapados entre 2800 y 2950  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones del grupo CH, dos bandas entre 1550 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de la amida primaria y al grupo  $\text{NH}_2$ , bandas entre 1250 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de la amida terciaria y el grupo  $\text{CH}_2$  y bandas a 1100  $\text{cm}^{-1}$  aproximadamente correspondiente al grupo CO-C. Los valores de las bandas vibracionales obtenidos experimentalmente se comparan con los indicados según referencia [37] se muestran en la tabla 13.

Estas vibraciones a las respectivas longitudes de onda corroboran la estructura molecular del quitosano usado en cada uno de los ensayos.

**Tabla 13.** Bandas vibracionales en el espectro IR del Quitosano.

Vibración	Intensidad / Característica	Número de onda / cm <sup>-1</sup>	
		Valor Referencial [37]	Valor Experimental
Grupo -OH	Fuerte y variable	3450	3400
Grupo -NH	Fuerte y variable	3282	3300
Grupo -CH	Fuertes	2919 y 2868	2940 y 2890
Grupo Amida primaria	Media	1655	1700
Grupo -NH <sub>2</sub>	Media	1580	1650
Grupo -CH <sub>2</sub>	Media	1417	1400
Grupo amida terciaria	Fuerte y variable	1313	1310
Grupo C-O-C	Fuerte	1154	1150
Vibraciones del esqueleto	Fuertes y variables	1080 y 1029	1080 y 1030
Vibración C-H Anoméricos	Media	896	900

### 3.12 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS

La utilización del quitosano como sustrato base para la preparación de partículas de platino, involucra la evaluación del quitosano como material conductor. Si bien es cierto su utilización en otros campos de la ciencia ha sido ampliamente desarrollada, el uso de éste dentro de electrodos no lleva un largo tiempo. Es por ello que se realiza un estudio de las condiciones más adecuado mediante las cuales es posible obtener un electrodo de carbón vítreo recubierto con quitosano.

El método propuesto para llegar a obtener un electrodo de GC recubierto con quitosano, propone la evaporación del solvente de la solución precursora de quitosano. Es por ello que se coloca un volumen pequeño, suficiente para recubrir la superficie del GC, y luego es sometida a 60°C, temperatura suficiente para evaporar el ácido acético presente en la solución. Sin embargo ya que se tiene una solución bastante diluida y considerando la característica de hidrogel del quitosano, lo que se llega a obtener es la evaporación del ácido acético, mientras que el agua ingresa dentro de la estructura del quitosano formando un hidrogel. [66]

La formación de este hidrogel permite que el quitosano se comporte como un conductor iónico, lo cual se ve reflejado en las figuras 37 y 38.

Durante la voltametría cíclica del electrodo de quitosano formado se pueden observar picos en la zona anódica y catódica, correspondientes a los procesos de desprotonación y protonación del grupo de amino del quitosano. Ya que se trabaja en un medio de ácido sulfúrico, se esperaría que la película se disuelva debido a la protonación del grupo amino, sin embargo este proceso no ocurre ya que el quitosano es insoluble en soluciones diluidas de ácido sulfúrico y además el proceso de protonación y desprotonación de los grupos amino se estaría realizando por medio de las moléculas de agua que se encuentran dentro de la estructura del hidrogel.

El barrido de potencial usando el electrodo de quitosano como electrodo de trabajo a diferentes velocidades de barrido nos muestra una variación en las corrientes de pico asociadas a los procesos redox de protonación desprotonación.

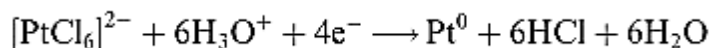
Al analizar la dependencia de estos valores de corriente de pico en función de la velocidad de barrido, encontramos una relación lineal con respecto a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. Esta dependencia lineal corrobora lo planteado en la ecuación de Randles-Servick:

$$i_p = 0.4463nFA(nFvD/RT)^{1/2}$$

Donde,  $i_p$  es la corriente de pico,  $n$  es el número de electrones de intercambio,  $v$  es la velocidad de barrido,  $F$  es la constante de Faraday,  $A$  es el área del electrodo,  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura y  $D$  es el coeficiente de difusión.

Esta buena regresión lineal entre  $i_p$  y  $v^{1/2}$  nos indica que se produce una transferencia electrónica rápida pudiendo considerar al electrodo de quitosano como un electrodo conductor iónico. Sin embargo, debido a la poca conductividad del quitosano es necesario realizar el depósito de algún material conductor, un metal, y aprovechar la superficie porosa del quitosano debido a su red polimérica para mejorar las respuestas de conductividad, corriente o potencial.

La síntesis de partículas metálicas se basa en la generación de núcleos del metal sobre el electrodo de carbono generados por el potencial aplicado el cual reduce los iones platino a platino metálico, tal como se muestra en la siguiente semirreacción:



Los mecanismos de nucleación y crecimiento quedan determinados entonces por la voltametría cíclica ya que en este proceso, tenemos la formación de núcleos que comienzan a crecer sobre la superficie del electrodo, pero se evita el aglomeramiento de los mismos ya que al realizar el barrido en sentido contrario se evita que continúen creciendo los núcleos.

Para la síntesis de partículas de platino sobre los sustratos se utiliza la solución precursora de hexacloroplatinato ácido hexahidratado de baja concentración (2.0 mM) la cual puede contribuir a la formación de partículas de un tamaño del orden de los nanómetros. [67]

Durante las voltametrías cíclicas mostradas en la figura 34 para la electrodeposición de platino sobre carbón vítreo, se observa la formación de un pequeño pico entre valores de potencial de -0.20 y 0.05 V, que corresponden a la formación de una zona de adsorción de hidrógeno, que en comparación con el sustrato utilizado, carbón vítreo, no presenta zonas de adsorción de hidrógeno. Es así que la aparición de zonas de adsorción de hidrógeno es asociada a la formación de platino en la superficie del carbón vítreo en un medio ácido.

De manera similar al realizar la voltametría cíclica usando como sustrato un electrodo de quitosano mostrado en la figura 35, se observa la formación continua de un pico entre -0.2 y 0.02 V, el cual va incrementando su altura conforme se realizan más barridos y se muestra mucho más definido que en el caso anterior. La formación de este pico también nos indica la formación de una zona de adsorción y desorción de hidrógeno asociado a la deposición de partículas de platino sobre la red del quitosano, además cabe precisar que el quitosano no presenta picos de adsorción y desorción de hidrógeno en los rangos de potencial en el cual se realizó la voltametría cíclica y en el medio usado. [57]



La rápida formación de la zona de adsorción y la mayor definición de ésta en comparación con la deposición sobre el carbón vítreo se debería a la mayor distribución de las partículas de platino sobre la red polimérica del quitosano y además sobre los poros del carbón vítreo. La presencia del quitosano en su forma de hidrogel permite la movilidad de los iones dentro de su red y su posterior reducción sobre el quitosano. Es así que el quitosano estaría aportando con una mayor área superficial sobre la cual con depositadas las partículas de platino.

Dado que los procesos de nucleación y crecimiento son determinados por la velocidad del barrido realizado, se realiza un análisis de la influencia de la velocidad de barrido durante la electrodeposición de la PtPs. Las gráficas de síntesis de las PtPs toman la misma forma, es así que su diferencia, tanto usando GC y GC/CTS como sustrato, fueron evaluadas durante las mediciones potenciométricas.

En la caracterización de los electrodos sobre los cuales fueron depositados las PtPs por voltametría cíclica, es posible observar los voltagramas estabilizados y realizar una comparación.

Para el electrodo GC/PtPs en la figura 39, se observa un voltagrama similar al voltagrama característico del platino policristalino, que se muestra insitu, donde es posible reconocer pequeñas zonas de adsorción y desorción de hidrógeno entre valores de  $-0.15$  a  $0.08$  V y  $-0.16$  y  $-0.06$ V respectivamente; así como un incremento poco pronunciado de la corriente en la zona anódica entre  $0.3$  y  $0.8$  V correspondiente a la formación de los óxidos de platino y un pico en la zona catódica a  $0.41$  V aproximadamente correspondiente a la reducción de los óxidos de platino.

En comparación con el platino policristalino las zonas de adsorción y desorción llegan a ser bastante pequeñas lo cual nos indicaría poca presencia de partículas de platino dispersadas sobre la superficie del electrodo, evitando la normal adsorción de platino que resulta en una menor zona de adsorción y posterior desorción. Además, el pico de formación de los óxido de platino es mucho menos pronunciado a pesar de encontrarse a un valor similar en comparación al platino policristalino; y lo que se puede observar claramente es una zona faradaica

bastante estrecha con respecto al potencial y con amplia histéresis lo que indicaría una menor conductividad.

Para el electrodo GC/CTS/PtPs en la figura 40, se observa un voltograma bastante similar al voltograma característico del platino policristalino donde se reconocen las zonas de adsorción y desorción de hidrógeno entre valores de -0.20 a -0.02 V y -0.2 y -0.02V respectivamente; así como un incremento pronunciado de la corriente en la zona anódica entre 0.6 y 1.2 V asociado a la formación de los óxidos de platino y un pico en la zona catódica a 0.35 V aproximadamente correspondiente a la reducción de los óxidos de platino.

En comparación con el platino policristalino se encuentra una mejor correspondencia de las zonas características. Las zonas de adsorción y desorción son bastante amplias sin embargo solo se muestran como un solo pico y no los tres diferentes picos correspondientes a cada una de las caras cristalinas como es en el caso del platino policristalino. Sin embargo en comparación con el electrodo GC/PtPs podríamos decir que se tiene una mayor área superficial, lo cual se comprobó al realizar la determinación del área superficial real mediante las zonas de adsorción y desorción de hidrógeno. [68]

**Tabla 14.** Área superficial real de los electrodos preparados.

<b>Electrodo</b>	<b>Área superficial real (cm<sup>2</sup>)</b>
GC/PtPs	0.16
GC/CTS/PtPs	1.18

Los resultados se muestran en la tabla 14, donde el área superficial del electrodo GC/CTS/PtPs llega a ser 7 veces mayor al área del electrodo GC/PtPs preparados mediante el mismo proceso.

Por otra parte, respecto a la zona no faradaica se tiene una zona más amplia en función al potencial y angosta en función de la corriente, con mayor correspondencia a aquella obtenida para el platino policristalino. El pico correspondiente a los procesos redox del quitosano observados en la figura 37 no llegan a observarse debido al solapamiento de éstos por el voltograma de las PtPs que muestran además mayor respuesta en densidad de corriente con respecto al quitosano.

Los resultados obtenidos síntesis, caracterización electroquímica y la determinación del área superficial real nos indican que el quitosano funciona como un buen sustrato matriz para el crecimiento de las PtPs, ya que se encuentra formando una red polimérica en su forma de hidrogel sobre el carbón vítreo, aumentando la movilidad de los iones para su consecuente reducción, formándose mayor cantidad de núcleos de platino expuestos a la solución ácida y una mayor área superficial. Como resultado se obtendrá una red polimérica recubierta con partículas de platino de alta área superficial. Comparando además los valores involucrados de densidad de corriente durante la caracterización se puede decir que el electrodo GC/CTS/PtPs funciona como mejor conductor que el electrodo GC/PtPs en un medio ácido.

Los espectros IR mostrados en la figura 41, nos indica algunas diferencias entre el carbón vítreo y el quitosano. De acuerdo a la tabla 15, el espectro IR del GC muestra el espectro común así como las contribuciones del CO<sub>2</sub> a 700 y 2350 cm<sup>-1</sup> y del agua alrededor de 1700 y 3750 cm<sup>-1</sup>. En la respuesta del quitosano se pueden observar las bandas características a 1100 cm<sup>-1</sup> aproximadamente (vibración de estiramiento C-O-C) y a 3100 cm<sup>-1</sup> (vibración de estiramiento N-H y O-H) mientras que las otras bandas características no se observan con claridad debido a las contribuciones del agua. Sin embargo estas bandas nos indicarían la presencia del quitosano sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo. [69]

**Tabla 15.** Bandas vibracionales del electrodo GC/CTS.

Grupo	Número de onda / cm <sup>-1</sup>	
	Experimental	Referencia
CO <sub>2</sub>	2200	700 y 2350
H <sub>2</sub> O	1730 y 3700	1700 y 3750
Vibración de estiramiento C-O-C	1100	1154
Vibración de estiramiento N-H y O-H	3100	3282

Los espectros RAMAN de la figura 42 muestran las diferencias entre algunas bandas entre el carbón vítreo y el quitosano. La banda primaria G de fonones se obtiene del estiramiento de la red de carbono dentro del carbón vítreo. El pico característico de la banda G se encuentra generalmente a 1580 cm<sup>-1</sup>. La banda D

se refiere a menudo al modo de desorden o defecto. Los picos de la banda D tienen dos fuentes ópticas. La banda D se encuentra entre 1330 y 1360  $\text{cm}^{-1}$ . La banda 2D es un fonón secundario procedente de los mismos efectos físicos que crean la banda D. La banda 2D se ubica a 2600  $\text{cm}^{-1}$ .

En el espectro obtenido para el carbón vítreo es posible observar cada una de estas bandas en las regiones indicadas según la literatura. Los valores de las bandas predominantes para el electrodo GC y GC/CTS se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Bandas vibracionales del espectro RAMAN en los electrodos GC y GC/CTS

Grupos	Intensidad / Característica	Raman shift / $\text{cm}^{-1}$	
		Referencia	Experimental
Banda G (GC)	Muy fuerte	1580	1580
Banda D (GC)	Muy fuerte	1330	1355
Banda 2D (GC)	Fuerte	2600	2700
Vibración de estiramiento N-H en C=N-H	Fuerte	3300	3250

Para el caso del quitosano, se siguen observando la banda G y la banda 2D, pero además se observa una banda a 3250  $\text{cm}^{-1}$  que correspondería a la vibración de estiramiento del enlace N-H en los grupos C=N-H del quitosano. [70]

Del análisis AFM se tiene que para el electrodo GC/CTS es posible observar la presencia de un sólido sobre la superficie del carbón vítreo que correspondería al quitosano; para el electrodo GC/PtPs se observan pequeñas esferas correspondientes a las partículas de platino depositadas y en el electrodo GC/CTS/PtPs se observan esferas sobre una masa, lo cual representaría la ubicación de las PtPs dispersadas sobre el quitosano que se encuentra recubriendo el GC. A partir de estas imágenes AFM se pudo observar las PtPs y elucidar el tamaño alrededor de 200 nm de diámetro a partir de las imágenes topográficas para el caso del electrodo GC/CTS/PtPs, lo cual nos indicaría que en la superficie del quitosano se han formado micropartículas de platino.

### 3.13 RESPUESTA DE LOS ELECTRODOS MODIFICADOS FRENTE A CEPAS DE *E. COLI*

La medición potenciométrica se realizó usando un electrodo de referencia de Ag/AgCl y como electrodo de trabajo cada uno de los electrodos preparados para poder así comparar sus respuestas frente a las mismas condiciones y concentraciones de bacterias, para luego ajustarlas en una curva de calibración.

Se usa como electrolito sulfato de sodio para proporcionar un medio conductor por lo cual a una concentración de bacterias existirá un valor determinado de potencial constante para cada uno de los electrodos y que variará entre estos dependiendo de sus características. Dado que el quitosano posee carga positiva, los iones sulfato serán atraídos a la superficie del quitosano generando un potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia. La solución usada debe ser esterilizada para asegurarnos de que el único microorganismo presente en la solución sean las bacterias *E. coli*, ya que la presencia de otros puede influir en las mediciones de potencial.

En los ensayos se da inicio a las mediciones potenciométricas variando los volúmenes de la solución madre agregados a la solución de sulfato de sodio, de tal que se obtengan concentraciones bajas y la concentración aumente gradualmente hasta que al final se tenga la presencia de un exceso de bacterias.

La influencia de la concentración frente a cada uno de los electrodos se muestra numéricamente, en la tabla 12 para cada uno de los ensayos, y gráficamente en las figuras 46 y 49, en donde se puede apreciar que para cada uno de los electrodos conforme aumenta la concentración de bacterias (UFC) el potencial medido aumenta gradualmente, además, a un valor alto de concentración de bacterias el potencial disminuye.

Esta caída de potencial registrada a valores de concentración elevada se debe a la saturación de los electrodos debido a la presencia de las bacterias sobre la superficie del electrodo, lo cual impide una transferencia normal de cargas, resultando en un menor potencial. La relación potencial concentración mostrada en las figuras 46 y 49, muestran que existe una correlación entre el cambio de potencial medido y la cantidad de colonias presentes en la muestra.

Es posible identificar una zona de relación lineal entre el potencial y el logaritmo de la concentración, esto se puede observar mejor si no consideramos los puntos con exceso de bacterias tal y como se muestra en las figuras 47 y 50, dónde se tiene una zona lineal entre valores de 0 y 50 para el logaritmo de la concentración.

Los cambios producidos en los electrodos se deberán a la interacción de cada uno de éstos frente a la presencia de las bacterias. En el caso del electrodo de quitosano, la protonación de los grupos amino generará una carga positiva en la superficie del electrodo el cual atraerá a las células bacterianas que poseen una pared celular cargada negativamente debido a la presencia de fosfatos y fosfolípidos. La bacteria interacciona electrostáticamente con la red del quitosano modificando el potencial medido.

En el caso de los electrodos GC/PtPs, el mecanismo de transporte de las bacterias no se realiza por atracción de cargas sino por difusión, la cual de todas maneras genera un cambio en el potencial variándolo de acuerdo a la concentración de bacterias presente.

Si bien es cierto que la interacción electrostática entre el quitosano y el *E. coli* se da en el electrodo GC/CTS, ya que este es muy poco conductor las respuestas no llegan a ser totalmente favorables. Es por ello que para los electrodos del tipo GC/CTS/PtPs se mejora la respuesta de potencial debido a la presencia de las nanopartículas de platino, mientras que el mecanismo de transporte de las células bacterianas continua siendo por atracción electrostática entre su pared celular y el quitosano.

De acuerdo a los estudios ya realizados, es conocido que la técnica de voltametría muestra mejores resultados en comparación con la potenciometría, sin embargo en los ensayos realizados no fue posible por un problema de elevada contaminación durante las pruebas, lo que conducía a no observar cambios aparentes en los voltogramas cíclicos, diferente la situación fue cuando se realizó la potenciometría trabajando en un ambiente estéril evitando la contaminación bacteriana.

### 3.14 CURVAS DE CALIBRACIÓN Y COMPARACIÓN ENTRE ENSAYOS

Las medidas potenciométricas nos proporcionan información de la variación del potencial con respecto a la concentración, sin embargo recordando la ecuación de Nerst, la relación lineal se da entre el potencial medido y el logaritmo de la concentración del “analito”. Por ello son representados el Potencial medido versus el Logaritmo de la concentración de las bacterias, obtenidas mediante recuento en placa, en las figuras 48 y 51. Los valores de potencial obtenidos para un exceso de bacterias no son considerados ya que existe saturación del electrodo de trabajo, además de acuerdo a la dependencia del potencial con el logaritmo de concentración, se selecciona la zona lineal entre valores de 0 y 50 para el logaritmo de la concentración, ya que de esta manera tendremos una mejor dependencia para el análisis cuantitativo.

Se encuentra una buena relación lineal para cada uno de los electrodos en ambos ensayos, los resultados de la curvas de calibración se muestran en la tabla 17. El valor de la pendiente en una curva de calibración es importante ya que este mostrará que tan sensible es el cambio de potencial frente al cambio de la concentración. El valor del  $R^2$  también es importante ya que nos indica la buena correlación lineal entre los datos. El intercepto en cada uno de los electrodos varía y no es igual a cero, ya que se tiene presencia de sulfato el cual implica un valor inicial de potencial medido antes de adicionar las bacterias.

**Tabla 17.** Datos de las curvas de calibración de los electrodos preparados para los dos ensayos realizados.

Electrodo		1° Ensayo			2° Ensayo		
		Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>
GC	GC	223.95	18.293	0.88116	221.64	15.190	0.89393
H	GC/CTS	252.27	18.805	0.96401	249.78	20.022	0.9660
F	GC/PtPs (10mV/s)	357.21	1.5122	0.90634	356.98	1.6853	0.97167
G	GC/PtPs (30mV/s)	431.79	9.0732	0.89857	432.375	8.125	0.99439
D	GC/PtPs (50mV/s)	357.70	7.4146	0.95736	357.80	6.9085	0.9451
A	GC/CTS/PtPs (10mV/s)	384.37	13.976	0.99125	379.81	12.366	0.98667
B	GC/CTS/PtPs (30mV/s)	295.93	9.19512	0.97096	292.81	8.7946	0.99811
C	GC/CTS/PtPs (50mV/s)	368.27	10.561	0.97355	361.89	11.797	0.99248

De acuerdo a la tabla 17, se observa que el quitosano presenta un mayor valor de pendiente en su curva de calibración de aproximadamente entre 18 y 20 mV, sin embargo el valor de  $R^2$  es bajo y no cercano a 1 como para poder considerarlo como una buena correlación lineal; además vemos que aquel que presenta un mayor valor en la pendiente y a la vez un valor de  $R^2$  más cercano a 1 es el electrodo GC/CTS/PtPs sintetizado a una velocidad de barrido de 10 mV/s. Sin embargo se observa una mejor correlación para el segundo ensayo y esto se debe a que en el segundo ensayo se realizaron mayor cantidad de puntos de análisis entre los valores de zona lineal determinados, lo cual disminuye la desviación estándar de los datos y favorece el factor de correlación.

Los electrodos del tipo GC/PtPs muestran una baja pendiente y correlación lineal, el electrodo de GC si bien muestra uno de los mayores valores de pendiente, su factor de correlación llega a ser bastante baja. Todos los electrodos del tipo GC/CTS/PtPs muestran una muy buena correlación lineal entre los datos y unos valores de la pendiente aceptables.

Tomando en cuenta los resultados mostrados en la tabla 17 podemos indicar que los electrodo de mejor características para la determinación de *Escherichia coli* es el electrodo A: GC/CTS/PtPs (10 mV/s) y B: GC/CTS/PtPs (30 mV/s), lo que corroboraría la mejora frente al resto debido a la presencia de quitosano y a la electrodeposición de las PtPs, siendo valores de velocidad bajos mejores para obtener las PtPs de una tamaño apropiado que aporten con una mayor área superficial.



## **CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES**

- Se evaluó la interacción entre las bacterias *Escherichia coli* y quitosano en solución determinándose que éste presenta un poder de inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración de 0.2 % en solución de ácido acético disminuyendo la población bacteriana (UFC) en un 99.92%.
- Se prepararon y caracterizaron los electrodos modificados con Quitosano; Partículas de platino y, Partículas de platino sobre quitosano, éstos dos últimos mediante electrodeposición por voltametría cíclica a diferentes velocidades de barrido. Se caracterizaron los electrodos mediante CV, IR, RAMAN y AFM, comprobando los picos de óxido-reducción, las principales bandas vibracionales así como el tamaño de partícula de platino promedio de alrededor de 200 nm.
- Se realizaron las medidas potenciométricas para cada uno de los electrodos preparados. Se estudió la dependencia directamente proporcional del potencial en función de la concentración de *E. coli*. Se obtuvo una dependencia lineal entre el potencial y el logaritmo de la concentración de bacterias para cada uno de los electrodos, obteniendo buenas correlaciones lineales. El electrodo que presentó mejores características tanto estructurales como de respuesta potenciométrica en la determinación de *E. coli* fue el electrodo GC/CTS/PtPs sintetizado a 10 y 30 mV/s.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- [1] H. Sun, T.S. Choy, D.R. Zhu, W.C. Yam, Y.S. Fung. Nano-silver-modified PQC-DNA biosensor for detecting *E. coli* in environmental water. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1405 – 1410.
- [2] Vivechana, D.; Jagdish, C.; Bindu, S. Detection of *E. coli* in water using semi-conducting polymeric thin film sensor. *Sensors and Actuators B* 120 (2006) 96 – 103.
- [3] Bitton, G. Wastewater Microbiology. Third Edition. Wiley. 2005. Canada. Part B. Public Health Microbiology.
- [4] Asesoría en Tratamientos de Agua. México DF. <http://www.atasa.com.mx/> Recuperado el 17 de Junio del 2014.
- [5] Arauzo de Zumaeta, M. Aspectos biológicos de la calidad de agua. CEPIS. Manual I: Teoría. Tomo I. Lima, 2004, pp. 58-102
- [6] Chalmers, R.; Aird, H.; Boltom, F. Waterborne *Escherichia coli* O517. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 88, 2000. pp. 124S – 132S.
- [7] Buchanan, R.; Doyle, M. Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O517:H7 and Other Enterohemorrhagic *E. coli*. *Foodtechnology* 51:10, 1997, pp. 69 – 76.
- [8] World Health Organization. Organization for Economic Co-operation and Development. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. IWA Publishing. Londres. 2003. Chapter 8: Analytical Methods for Microbiological Water Quality Testing.
- [9] Dufour, A.; Snozzi, M.; Koster, W. Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods. World Health Organization. 2003. Chapter 8: Analytical Methods for microbiological water quality testing.
- [10] Morteza Abbaszadegan. Microbial Detection Methodologies. *Southwest Hydrology*. November/December. 2004, 18 – 35.
- [11] Settrington, E.; Alcocilja, E. Electrochemical Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Magnetically Extracted Bacterial Pathogens. *Biosensors* 2012, 2, 15 – 31.
- [12] Deisingh, A. Biosensors for Microbial Detection. *Microbiologist*, 2003, pp. 30-33.

- [13] Bakker, E. Electrochemical Sensors. *Anal. Chem. Vol. 76, N° 12, 2004*, pp. 3285 – 3298.
- [14] Wilkins, J.R. et. al. Microbial Detection Method Based on Sensing Molecular Hydrogen. *App. Microbiol. Vol. 27, N° 5, 1974*, pp. 949 – 952.
- [15] Wilkins, J.R. Use of Platinum for the Electrochemical Detection of Bacteria. *App. Environ. Microbiol. Vol 36, N° 5, 1978*, pp. 683 – 687.
- [16] Matsunaga, T.; Nakajima, T. Electrochemical Classification of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, Vol 50, N° 2, 1985*, pp. 238 – 242.
- [17] Corton, E. et. al. A Novel Electrochemical Method for the Identification of Microorganisms. *Electroanalysis, Vol 13, N° 12, 2001*, pp. 999 – 1002.
- [18] Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. (2008) Semiconductor Quantum dots for bioanalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. 47: 7602 – 7625*.
- [19] Zacco, E.; Adrian, J.; Galve, R. *Biosensors and Bioelectronics 22, (2007) 2184 – 2191*.
- [20] Lermo, A.; Campoy, S.; Barbé, J. *Biosensors and Bioelectronics 22, (2007) 2010 – 2017*.
- [21] Berettoni, M.; Tonelli, D.; Conti, D.; Electrochemical Sensor for indirect detection of bacterial population. *Sensors and Actuators B 102 (2004) 331 – 335*.
- [22] Davis Holmes, R. Towards a Novel Electrochemical Sensing Platform for Diagnosing Urinary Tract Infections. Tesis presentada para obtener el grado de Magister en Ciencias Aplicadas. Universidad de Toronto. **2012**
- [23] Vaseashta, A.; Dimova-Malinovska, D. Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors. *Science and Technology of Advanced Materials 6 (2005) 312 – 318*.
- [24] Neidhardt FC. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. Segunda Edición. ASM Press, Washington, **1999**.
- [25] Don, S. M. Optimal Conditions for the Growth of E. coli. *Biology EEI. 2008*.
- [26] La Rosa-Toro Gómez. Fabricación y evaluación de electrodos nanoestructurados de óxidos metálicos para la producción eficiente de agua electro-oxidada y su aplicación como bactericida en la potabilización de agua. *PROCYT 2009. 21, 22, 41, 42*

- [27] Spencer, M.; Guest, J. Proteins of the inner membrane of Escherichia coli: Identification of Succinate Dehydrogenase by Polyacrylamide Gel Electrophoresis with sdh Amber Mutants. *Journal of Bacteriology*, Mar. **1974**, p. 947 - 953
- [28] Lugtenberg, B.; Van Alphen, L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane on Escherichia coli and other Gram-negative bacteria. *Biochimica and Biophysica Acta*, 737 (**1983**) 51 – 115
- [29] Goldman E.; Green L. Practical Handbook of Microbiology. Second Edition. CRC Press. 2009. United States of America. Chapter 2: Quantitation of Microorganisms.
- [30] Rodríguez A.; Ramirez, M.; Rivero D.; Bozquez E.; Barrera L.; Bautista S. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura, Vol 15, Núm 3, septiembre-diciembre, 2009*, pp 307-317.
- [31] Rebecca A. Zangmeister. Jung J. Park. Gary W. Rubloff. Michael J. Tarlov. Electrochemical study of chitosan films deposited from solution at reducing potentials. *Electrochimica Acta* 51 (**2006**) 5324–5333.
- [32] Azevedo, V.; Chaves S.; Bezerra D.; Lia M.; Costa A. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materias e Processos. V.2.3 (2007)* 27- 34.
- [33] Zhanga Y.; Zhanga X.; Dinga R.; Zhanga J.; Liub J. Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment. *Carbohydrate Polymers, Vol. 83, (2011)* pp. 813 – 817.
- [34] H. Hernández Cocoltzi, E. Águila Almanza, O. Flores Agustín, E.L. Viveros Nava, E. Ramos Cassellis. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío* 22(3) (**2009**) 57-60.
- [35] Yongmei Xu, Yumin Du. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (**2003**) 250, 215-226.
- [36] De Alvarenga E.; De Oliveira C.; Bellato C. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers, Vol. 80, (2010)* pp. 1155 – 1160.
- [37] A. Baxter, M. Dillo, K. D. A. Taylor y G.A.F. Roberts. Improved method for I.R. Determination of the degree of N-Acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 14, (**1992**) 166 – 169.

- [38] Chávez A.; Colina, M.; Valbuena, A.; López, A. Obtención y Caracterización de papel de quitosano. *Rev. Iberoam. Polim.*, 13(2) (2012), 41 – 51.
- [39] Jha, P.; Halada, G.; McLennan, S. Electrochemical Synthesis of Nitro-Chitosan and Its Performance in Chromium Removal. *Coatings* 2013, 3(3), 140 – 152.
- [40] Gidas M.; Carnier O. *Water Research*, 1, (1999), 47 – 56.
- [41] Kin Y. *Advanced Chitin Science*, 2, (1997), 837 – 844.
- [42] Lárez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros, Volumen 4(2)*, Abril 2003 pp. 91 – 109.
- [43] Ying-Chien Chung, Chih-Yu Chen. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology* 99 (2008) 2806 – 2814.
- [44] Gonzalez R.; Leyva M.; Solorza O. Estudio comparativo de la reducción electrocatalítica de oxígeno sobre rutenio y su desempeño en una celda de combustible con membrana polimérica. *Rev. Soc. Mex.* 2004, 48, 1 – 6.
- [45] Miyasaki A.; Balint I.; Nakano Y. Morphology control of platinum nanoparticles and their catalytic properties. *Journal of Nanoparticle Research* 5, (2003), 69 – 80.
- [46] Honkala K.; Hellman A.; Remediakis I.; Logadottir A.; Caelsson A.; Dahl S.; Christensen C.; Norskov J. *Science* 2005, 307, 555 – 558.
- [47] Dominguez S.; Arias J.; Berenguer A.; Morallon E.; Cazorla D. Electrochemical deposition of platinum nanoparticles on different carbon supports and conducting polymers. *Journal of Applied Electrochemistry*, Volume 38, 2, pp. 259 – 268.
- [48] Thangavelu S.; Ramasamy R. Electrochemically deposited nanostructured platinum on Nafion coated electrode for sensor applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 585 (2005) 290 – 300.
- [49] Dao-Jun G.; Hu-Lin L. High dispersion and Electrocatalytic Properties of Platinum on Functional Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Electroanalysis* 2005, 17, N° 10. 869 – 872.
- [50] Ajit M.; Kiran K.; Anais F. Investigation into the catalytic activity of porous platinum nanostructures. *Langmuir* 2013, 1 – 35.
- [51] Zhong-Liang Z.; Tian-Fang K.; Yan Z.; Shui-Yuan Ch. Electrochemical sensor for formaldehyde based on Pt-Pd nanoparticles and a Nafion-modified glassy carbon electrode. *Microchim Acta* (2009) 164: 133 – 138.

- [52] Zhaoyang W.; Liguó C.; Guoli S.; Ruqin Y. Platinum nanoparticle-modified carbon fiber ultramicroelectrodes for mediator-free biosensing. *Sensors and Actuators B* 119 (2006) 295 – 301.
- [53] Dixit, V.; Tewari, J.; Sharma, B. Detection of *E. coli* in water using semi-conducting polymeric thin films sensor. *Sensor and Actuators B* 120 (2006) 96 – 103.
- [54] Zhang, X.; Geng, P.; Liu H.; Development of an electrochemical immunoassay for rapid detection of *E. coli* using anodic stripping voltammetry based on Cu-Au nanoparticles as antibody labels. *Biosensors & bioelectronics*. (2009) 2155 – 2159.
- [55] Hnaeien, M.; Hassen, M.; Abdelghani, A. A conductimetric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E. coli* detection. *Electrochemistry Communications* 10 (2008) 1152 – 1154.
- [56] Hasebe, Y.; Fuzukawa, M.; Matsuhisa, H. Quantitative determination of *Escherichia coli* based on the electrochemical measurement of bacterial catalase activity using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-selective organic/inorganic-hybrid sol-gel film-modified Pt electrode. *Journal of Environmental Sciences Supplement* (2009) S44 – S47.
- [57] Cheng, Y.; Liu Y.; Huang, J. Platinum nanoparticles modified electrode for rapid electrochemical detection of *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Chemistry*, 2008, 26, 302 – 306.
- [58] Wang, J. Analytical Electrochemistry. Second Edition. Wiley-VCH. New York. 2001. Chapter 2: Study of Electrode Reactions.
- [59] Stuart B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. First Edition. Wiley. 2004. Chapter 1: Introduction.
- [60] Ruchita S.; Agrawal Y. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy* 57 (2011) 163 – 176.
- [61] Ferraro J.; Nakamoto K.; Brown, C. Introductory Raman Spectroscopy. Second Edition. Elsevier. 2003. Chapter 1: Basic Theory.
- [62] E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-W. Koo, et al., *Phys. Med. Biol.* 45 (2000) R1
- [63] Z. Huang, et al., *Int. J. Cancer* 107 (2003) 1047
- [64] Bellito V. Atomic Force Microscopy – Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale. INTECH. 2012. Chapters: 2, 4 y 7.

- [65] Bagotsky V. S. Fundamentals of Electrochemistry. Second Edition. Wiley – Interscience. New Jersey. **2006**. Part III: Applied aspects of electrochemistry. Electrochemical Method of Analysis.
- [66] Ahmed, N.; Mohamed, M. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Int.J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 11194 – 11209.
- [67] Selvaraju, T.; Ramaraj, R. Electrochemically deposited nanostructured platinum on Nafion coated electrode for sensor applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 585 (**2009**) 290 – 300
- [68] Doña, J.; Herrera, J.; Pérez, J. Determination of the Real Surface Area of Pt Electrodes by Hydrogen Adsorption Using Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*. Vol. 77. N°9. September **2000**, 1195 – 1197.
- [69] Tenreiro, J.; Baleanu, D.; Osman, A.; Eksi, H.; Güzel, R. Analysis of the Nano-Surface of a Modified Glassy Electrode by Pseudo Phase Plane Method. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*. Vol. 8, **2011**, 1 – 7.
- [70] Wang, Y.; Alsmeyer D.; McCreery R. Raman Spectroscopy of Carbon Materials: Structural Basis of Observed Spectra. *Chem. Mater.* **1990**, 2, 557 – 563.