

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DIÓXIDO DE TITANIO  
(TiO<sub>2</sub>) SOBRE CEPAS *DE ESCHERICHIA COLI*  
*Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS***



**MÓNICA ANDREA VARGAS URBANO**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA FÍSICA  
INSTITUTO DE POSGRADOS  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
POPAYÁN  
2012**

**EVALUACION DEL EFECTO DEL DIÓXIDO DE TITANIO  
(TiO<sub>2</sub>) SOBRE CEPAS *DE ESCHERICHIA COLI*  
*Y STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**MÓNICA ANDREA VARGAS URBANO**

**Director**

**Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA FÍSICA  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

Este texto es el resultado del Trabajo de Grado, modalidad investigación, para optar al Título de Maestría en Ingeniería Física que ofrece el Instituto de Posgrados de la Universidad del Cauca. El proyecto se desarrolló entre los años 2010 y 2012.

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

**Director** \_\_\_\_\_  
**Dr. Jorge Enrique Rodríguez P.**

**Jurado** \_\_\_\_\_  
**Dra. Claudia Fernanda Villaquirán**

**Jurado** \_\_\_\_\_  
**Dr. Nelson Rojas Martínez**

**Fecha de sustentación: Popayán, 30 de noviembre de 2012**

*Primero y antes que nada, quiero dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.*

*Dedico este trabajo a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, por creer en mí y ayudarme a seguir adelante. A Andrés Mamián, con todo mi amor, por su incesante apoyo.*

*Mi más sincero agradecimiento al Dr. Jorge Enrique Rodríguez, director de este trabajo, por su confianza, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y su amplio conocimiento.*

## *AGRADECIMIENTOS*

Este texto es el resultado del Trabajo de Grado, modalidad investigación, para optar por el Título de Maestría en Ingeniería Física que ofrece el instituto de posgrados de la Universidad del Cauca. El proyecto se desarrollo entre los años 2010 y 2012 bajo la dirección del Dr. Jorge Enrique Rodríguez-Páez, Docente – Investigador del Departamento de Física, a quien agradezco su dedicación y apoyo durante su ejecución. Mis más sinceros agradecimientos al Departamento de Física de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Al Doctor Nelson Rojas, docentes investigador de la Universidad del Cauca, por su valiosa asesoría. A COLCIENCIAS por la financiación del proyecto “Muerte fotocatalítica de células cancerígenas de útero por efecto del Óxido de Titanio ( $TiO_2$ ) y radiación ultravioleta” Contrato RC 512-2009 (registro interno ID 2586) y a los grupos de investigación CYTEMAC y CELMOLEC por permitir el espacio y los equipos de laboratorio necesarios para la ejecución de este trabajo. A mis compañeros de trabajo que me brindaron su ayuda y apoyo incondicionalmente.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>CAPITULO 1. SINTESIS Y CARACTERIZACION DEL DIÓXIDO DE TITANIO (TiO<sub>2</sub>)</b>	17
1.1. El TiO <sub>2</sub> como fotocatalizador: sus propiedades fisicoquímicas	17
1.1.1. Características fisicoquímicas y estructurales del TiO <sub>2</sub>	18
1.2. Obtención del TiO <sub>2</sub>	22
1.2.1. Métodos convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, TiO <sub>2</sub>	22
1.2.1.1. Proceso sulfato	22
1.2.1.2. Proceso cloro	23
1.2.2. Métodos no convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, TiO <sub>2</sub>	23
1.3 Síntesis del TiO <sub>2</sub> por el método sol gel	23
1.3.1. Aspectos generales del método sol gel: ventajas y desventajas	24
1.3.2. Procedimiento experimental	25
1.3.3. Control sobre la formación de la fase estructural en el sólido de TiO <sub>2</sub>	32
1.3.4. Morfología y tamaño de partícula	42
1.3.5. Características adicionales del TiO <sub>2</sub> sintetizado	46
1.3.5.1. Superficie específica	46
1.3.5.2. Potencial Zeta	47
1.3.5.3. Espectroscopia UV- Visible	49
1.4. Conclusiones	51
Bibliografía	53

<b>CAPITULO 2. ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL TiO<sub>2</sub> SINTETIZADO POR EL METODO SOL GEL</b>	<b>57</b>
2.1. El Fenómeno de fotocátalisis en el TiO <sub>2</sub>	55
2.2. Los semiconductores como fotocatalizadores: interface semiconductor / líquido	60
2.3. Uso del TiO <sub>2</sub> fotocatalítico como bactericida	64
2.4. Bacterias	67
2.4.1. Pared celular bacteriana	67
2.4.2. Bacterias de estudio en este trabajo	70
2.5. Factores que afectan la actividad fotocatalítica del TiO <sub>2</sub> cuando se considera su funcionalidad bacteriana	71
2.5.1. Intensidad de luz	72
2.5.2. Fuente de luz y longitud de onda	73
2.5.3. pH del medio	74
2.5.4. La temperatura	75
2.6. Procedimiento experimental	75
2.6.1. Preparación del inóculo	76
2.6.2. Métodos para estudiar la evolución de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	76
2.6.2.1. Protocolo para determinar la actividad degradante del TiO <sub>2</sub>	77
2.6.2.2. Método I: Microdilución	79
2.6.2.3. Curvas de letalidad	79
2.6.3. Variables que se consideraron en el estudio	85
2.6.4. Características de las lámparas UV utilizadas en esta investigación	85
2.6.5. Resultados y discusión de la actividad bactericida del TiO <sub>2</sub> sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	87
2.6.5.1. El cultivo bacteriano	88
2.6.5.2. La reacción fotocatalítica	89
2.6.5.3. Ensayo de viabilidad celular de la cepa de <i>Escherichia coli</i>	89
2.6.6. Resultados y discusión de la actividad bactericida del TiO <sub>2</sub> sobre cepas de <i>Staphylococcus Aureus</i>	100
2.6.6.1. El cultivo bacteriano	100

2.6.6.2. La reacción fotocatalítica	100
2.6.6.3. Ensayo de viabilidad celular de la cepa de <i>Staphylococcus Aureus</i>	101
2.4. Conclusiones	115
Bibliografía	117

## **ANEXOS**

I. Estudio preliminar del efecto bactericida del TiO <sub>2</sub> utilizando curvas de letalidad.	123
---	-----



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.1.</b> Principales características fisicoquímicas del titanio.	19
<b>Tabla 1.2.</b> Propiedades mecánicas del titanio.	19
<b>Tabla 1.3.</b> Características cristalográficas del titanio.	20
<b>Tabla 1.4.</b> Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de TiO <sub>2</sub> , utilizando el método sol gel.	26
<b>Tabla 1.5.</b> Concentraciones molares, en una solución de 50 ml de los diferentes reactivos utilizados en la formación de los soles del sistema de titanio.	28
<b>Tabla 1.6.</b> Valores de superficie específica (BET).	47
<b>Tabla 1.7.</b> Valores de potencial Z y conductividad del sistema de titanio obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h.	49
<b>Tabla 2.1</b> Ensayos para determinar la actividad fotodegradante del TiO <sub>2</sub> .	78
<b>Tabla 2.2.</b> Referencias de las lámparas UV.	86
<b>Tabla 2.3</b> Otras características de las lámparas.	86
<b>Tabla 2.4</b> Especificaciones del montaje en la cabina de flujo laminar.	87
<b>Tabla 2.5.</b> Datos numéricos obtenidos del método de curvas de letalidad de cepas de <i>Escherichia coli</i> al estar expuestas a las diferentes variables de interés por 30,60 y 150 minutos.	96
<b>Tabla 2.6.</b> Datos numéricos obtenidos del método de curvas de letalidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> al estar expuestas a las diferentes variables de interés por 30,60 y 150 minutos.	107

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.1.</b> Estructuras cristalinas del dióxido de titanio.	21
<b>Figura 1.2.</b> Disposiciones de los átomos de Ti y O en las fases anatasa y rutilo del TiO <sub>2</sub> .	21
<b>Figura 1.3.</b> Reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso sol-gel.	27
<b>Figura 1.4.</b> Textura de las suspensiones coloidales obtenidas durante el desarrollo del proceso sol-gel: sin acomplejante (a) relación Ti:AcacH=2:1 (b) y relación Ti:AcacH=3:1.	28
<b>Figura 1.5.</b> Esquema de las etapas del proceso sol-gel utilizado para sintetizar polvos de TiO <sub>2</sub> .	30
<b>Figura 1.6.</b> Seguimiento de la evolución del sistema de titanio y formación de un precipitado en el seno de la solución. Las fotografías se tomaron cada 20 minutos.	
<b>Figura 1.7.</b> Material obtenido al secar a 80° C, la suspensión de titanio obtenida al final del proceso sol – gel.	32
<b>Figura 1.8</b> Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido obtenido del proceso de secado del sistema de titanio.	33
<b>Figura 1.9.</b> Rampa de tratamiento térmico utilizado para obtener los polvos cerámicos de TiO <sub>2</sub> en sus diferentes fases.	34
<b>Figura 1.10.</b> Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas.	35
<b>Figura 1.11.</b> Difractogramas de rayos X de los sólidos del sistema de titanio tratados térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas, donde se destacan: (a) la transición fase amorfa a anatasa y (b) la transición de fase anatasa a rutilo.	
<b>Figura 1.12.</b> Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm <sup>-1</sup> , de muestras sólidas del sistema de titanio tratadas térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas a: (a) 350°C, (b) 380°C y (c) 500°C.	39
<b>Figura 1.13.</b> Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm <sup>-1</sup> , de muestras sólidas del sistema de titanio tratadas térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas a: (a) 625°C, (b) 670°C, (c) 700°C, (d) 750°C y (e) 800°C.	40

<b>Figura 1.14.</b> Evolución del área integrada, Ab/AT, de los modos vibracionales correspondientes a las bandas: (a) 520 y 565 cm <sup>-1</sup> y (b) 640 cm <sup>-1</sup> del sistema de titanio.	41
<b>Figura 1.15.</b> Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, del sistema de titanio tratado térmicamente a: (a) 350°C; (b) 500°C/2h y (c) 700°C /2h.	42
<b>Figura 1.16.</b> Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, de muestras de titanio molido por atricción, durante 4 horas y tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h (amorfo); (b) 450°C/2h (anatasa) y (c) 850°C /2h (rutilo).	43
<b>Figura 1.17.</b> Micrografías obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio obtenido tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h, (b) 450°C/2h y (c) 850°C /2h.	44
<b>Figura 1.18.</b> Espectroscopia de energía dispersiva, obtenida del sólido del sistema de titanio obtenido tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h, (b) 450°C/2h y (c) 850°C/2h.	45
<b>Figura 1.19.</b> Grafica de potencial Z y Conductividad en función del pH del sistema de titanio tratado térmicamente a 450 °C/2h.	49
<b>Figura 1.20.</b> Espectros de absorbancia UV- visible correspondientes a diferentes concentraciones del TiO <sub>2</sub> sintetizado en este trabajo: (a) amorfo (335°C), (b) anatasa (450°C) y (c) rutilo (850°C).	50
<b>Figura 2.1.</b> Esquema del proceso fotocatalítico sobre una partícula semiconductora de TiO <sub>2</sub> .	58
<b>Figura 2.2.</b> Esquema que ilustran: (a) distribución de carga, (b) distribución de densidad de carga, (c) el potencial eléctrico y (d) la curvatura de las bandas de energía en la interfase semiconductor (TiO <sub>2</sub> )/electrolito considerando que no hay carga superficial ni dipolos superficiales presentes.	62
<b>Figura 2.3.</b> Pared celular de la bacteria Gram-negativa.	68
<b>Figura 2.4.</b> Pared celular de la bacteria Gram-positiva.	69
<b>Figura 2.5.</b> Colonia de <i>Staphylococcus aureus</i> , bacteria Gram-positivas.	70
<b>Figura 2.6.</b> <i>Escherichia coli</i> , bacteria Gram-negativa.	71
<b>Figura 2.7.</b> Preparación del inóculo de las cepas; <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	76
<b>Figura 2.8.</b> Adición del medio de cultivo a las celdillas de las microplacas.	79
<b>Figura 2.9.</b> Preparación del Caldo Mueller Hinton.	80

- Figura 2.10.** Preparación de las cajas de petri con agar base sangre. 81
- Figura 2.11.** Disposición de las amparas de UV en la cabina de flujo laminar. 87
- Figura 2.12.** Fotografías obtenidas de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del TiO<sub>2</sub> fases (amorfo, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 30 minutos de iniciados los ensayos.
- Figura 2.13.** Fotografías obtenidas de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del TiO<sub>2</sub> fases (amorfo, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 60 minutos de iniciados los ensayos.
- Figura 2.14.** Fotografías obtenidas de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del TiO<sub>2</sub> fases (amorfo, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 150 minutos de iniciados los ensayos. 94
- Figura 2.15.** Curvas de número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo que indican como varía la población del *E. coli* al someter los cultivos a la acción de un antibiótico (Trimetroprima) y radiación UV (a), a la exposición de TiO<sub>2</sub> sin activar (b) y activado previamente, utilizando radiación UV durante 1 hora (c), considerando diferentes fases presentes en el óxido. La concentración inicial de células en la suspensión fue de  $2.7 \times 10^6$  ufcml<sup>-1</sup>. 97
- Figura 2.16.** Fotografías tomadas a los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la exposición al TiO<sub>2</sub> (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometidas a radiación previa, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 30 minutos de iniciado el ensayo. 102
- Figura 2.17.** Fotografías tomadas a los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la exposición al TiO<sub>2</sub> (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometido a radiación previa, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 60 minutos de iniciado el ensayo. 104
- Figura 2.18.** Fotografías tomadas de los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la presencia del TiO<sub>2</sub> (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometido previamente a la acción de la radiación UV, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 150 minutos de iniciado el ensayo. 105
- Figura 2.19.** Curvas de número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo considerando las diferentes variables de interés que podrían afectar la viabilidad de las células de *S. aureus*: (a) efecto de la radiación y el antibiótico, (b) efecto de la exposición al TiO<sub>2</sub> sin activar y (c) efecto de la exposición al TiO<sub>2</sub> activado previamente, considerando diferentes fases presentes en el óxido. 108

## RESUMEN

Actualmente ha aumentado el interés por el fenómeno de fotocatalisis que presenta el dióxido de titanio,  $\text{TiO}_2$ , por la posibilidad de utilizarlo en la desinfección del agua. En el año de 1985, los investigadores informaron, por primera vez, el efecto microbicida que se genera por el desarrollo de las reacciones fotocatalíticas que presenta el  $\text{TiO}_2$ . Desde entonces, el trabajo de investigación sobre el efecto fotodegradante de este óxido se ha incrementado considerando un amplio espectro de organismos que pueden ser eliminados entre los que se encuentran virus, bacterias, hongos y algas, actividad que ha motivado el desarrollo de este trabajo.

En este trabajo se utilizó el método sol-gel para sintetizar dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), este proceso permitió obtener de manera controlada las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$ , desde muestras con estructura amorfa hasta aquellas que presentaron estructuras tipo anatasa y rutilo. Se determinaron las condiciones de síntesis más adecuadas para obtener cada una de ellas, definiéndose por lo tanto las regiones térmicas de estabilidad de las mismas, garantizando así el control sobre la pureza del óxido y el tamaño de partícula. Los polvos cerámicos obtenidos se caracterizaron utilizando análisis térmico (ATD-TG), para determinar las características que presentan los polvos sintetizados al tratarlos a diferentes temperaturas, además se emplearon las técnicas de espectroscopia IR (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de transmisión (MET) y barrido (MEB). Los polvos sintetizados presentaron fase amorfa hasta una temperatura  $<350^\circ\text{C}$ , fase anatasa entre  $400$  y  $650^\circ\text{C}$  y fase rutilo a temperaturas  $>700^\circ\text{C}$ . Independiente de la fase presente, los polvos obtenidos presentaron tamaño nanométrico ( $<100$  nm).

Además, se realizó el estudio del efecto fotodegradante de estas partículas de  $\text{TiO}_2$ , sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, activando el óxido haciendo incidir sobre ellas radiación UV. El interés de este trabajo de investigación era ayudar a estructurar y consolidar una terapia fotodinámica (PDT de sus siglas en inglés) para fotodegradar bacterias y observar la funcionalidad de las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$  sobre dichas cepas. La prueba de susceptibilidad a esta terapia, con el fin de detectar la resistencia de las bacterias a la acción del  $\text{TiO}_2$  irradiado con UV, se realizó a través de pruebas de Microdilución en Caldo.

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un creciente interés en el desarrollo de nuevos procesos para la desinfección del agua, más si se considera que en ella están presentes gran cantidad de bacterias y que con los procesos tradicionales de purificación se pueden generar subproductos tóxicos. Con el fin de minimizar el riesgo para los seres humanos, por el uso de estas prácticas de desinfección se han propuesto modificaciones a las técnicas convencionales incluyendo, específicamente, la eliminación de los compuestos cloro-orgánicos [1,2].

La cloración ha sido vista como un medio propicio para la desinfección de las aguas de consumo humano, sin embargo, el cloro-orgánico tiene una tendencia a reaccionar con el carbono orgánico disuelto (DOC por sus siglas en inglés), presente en el agua, formando subproductos de desinfección (SPD por sus siglas en inglés) [3,4], entre ellos los trihalometanos (THM) y los ácidos haloacéticos (HAA) [5]. La preocupación por la formación de estos compuestos ha llevado a la realización de estudios cuyos resultados indican que la presencia de algunos de estos SPD producen problemas cardíacos [5,6] y de cáncer en el ser humano [7,8]. Por otro lado, las técnicas estándar de desinfección del agua son a menudo demasiado costosas considerando la inversión de capital, operación y mantenimiento.

Debido a las exigentes normas sobre los niveles permitidos de SPD en el agua potable, esto ha obligado a trabajar en tecnologías alternativas de desinfección capaces de responder a esta normativa. Los procesos de oxidación avanzada (AOPs por sus siglas en inglés) proporcionan una alternativa importante ante la técnica de cloración, como estrategia de desinfección. Los procesos AOPs, como la ozonización y la adición de peróxido de hidrógeno, propician la desinfección pero también presentan limitaciones. Por otro lado, la fotocatalisis ha demostrado poseer una mayor capacidad de desinfección. Concretamente, con relación a las

bacterias, la fotocatalisis con  $\text{TiO}_2$  es una opción atractiva para el tratamiento alternativo de las mismas debido a que presenta una alta citotoxicidad sobre ellas cuando se le hace incidir radiación UV. Este comportamiento ha motivado la realización del presente trabajo, considerando la evaluación de la influencia de la fase cristalina, o no, presente en el óxido de titanio (amorfa, anatasa y rutilo), su tamaño de partícula y la concentración de  $\text{TiO}_2$  utilizada, durante el proceso, sobre el efecto fototóxico de este compuesto en las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Esta información es muy valiosa para optimizar la acción bactericida del  $\text{TiO}_2$  así como para comprender los mecanismos de toxicidad que actúan durante la eliminación de las bacterias, pensando siempre en incrementar la eficiencia de la fotocatalisis heterogénea en la degradación bacteriana.



# CAPÍTULO 1

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL DIÓXIDO DE TITANIO (TiO<sub>2</sub>)

---

### 1.1. El TiO<sub>2</sub> como fotocatalizador: sus propiedades fisicoquímicas

El fenómeno de fotocatalisis se viene investigando desde hace relativamente poco tiempo, 1985 [9], y es el dióxido de titanio, TiO<sub>2</sub>, el material más estudiado para este fin. Específicamente, la capacidad fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> se ha venido estudiando de forma exhaustiva, durante estos últimos 25 años, buscando utilizarla en la eliminación de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua empleada para el consumo humano, desinfección del aire y para favorecer la oxidación parcial de compuestos orgánicos [10]. El dióxido de titanio presenta un efecto de citotoxicidad sobre las bacterias al exponerlo a la luz, principalmente a la radiación UV, y se investiga la posibilidad de aprovechar este comportamiento para desarrollar terapias que permitan degradar bacterias, superando las limitaciones existentes en los tratamientos convencionales [11].

Informes recientes muestran resultados muy interesantes sobre la fotodegradación de bacterias [12,13] y virus [14,15], como consecuencia de esta propiedad del TiO<sub>2</sub>. Para explicar estos resultados se han propuesto diferentes mecanismos que buscan justificar la acción bactericida del TiO<sub>2</sub> [16-20], algunas de las cuales fueron revisadas por Blake et al. [21].

El primer reporte importante sobre el efecto microbicida del TiO<sub>2</sub> se publicó en 1985, por Matsunaga y colegas [16], y desde entonces, el trabajo de investigación sobre la degradación fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> se ha ido incrementado considerablemente incluyendo, como ya se mencionó, un amplio espectro de

organismos: virus, bacterias, hongos y algas, entre otros. Aunque se ha avanzado en la estructuración y fundamentación de los mecanismos que conducen a la fotodegradación de las cepas, aún no han sido plenamente comprendidos y justificados. Otro aspecto, que actualmente se estudia, es el carácter no selectivo de la fotocatalisis ya que durante el proceso se pueden eliminar algunos compuestos orgánicos, no perjudiciales, que coexisten con las bacterias en la solución.

Para incrementar el conocimiento sobre esta temática es necesario obtener más información sobre detalles de la capacidad fotodegradante del  $\text{TiO}_2$  como por ejemplo, el efecto que tienen las fases presentes en el sólido, así como el del tamaño y la morfología de sus partículas, temas de interés para el presente proyecto.

### **1.1.1. Características fisicoquímicas y estructurales del $\text{TiO}_2$**

El titanio es un elemento químico de símbolo, Ti, número atómico 22 y peso atómico 47.90 g/mol. El elemento fue descubierto en 1791 por el sacerdote y mineralogista inglés William Gregor y en 1795, el químico alemán Martín Kalprotz, descubridor del uranio, le dio el nombre de titanio [22]. En la naturaleza se encuentran 5 isótopos estables; 46, 47, 48, 49 y 50 (ver tabla 1.1.)

El titanio es el noveno elemento más abundante en la corteza de la tierra, con un 0.8% en peso, si bien no es tan frecuente su existencia en concentraciones que hagan económicamente viable su extracción. Está presente en rocas ígneas y en los sedimentos derivados de ellas. En la mayor parte de las reacciones el titanio se enlaza con el oxígeno en presencia sobre otros elementos, encontrándose como óxido en los minerales rutilo ( $\text{TiO}_2$ ), ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ), y esfena ( $\text{CaO} \cdot \text{TiO}_2 \cdot \text{SiO}_2$ ) [22].

**Tabla 1.1.** Principales características fisicoquímicas del titanio [22].

Símbolo	Ti
Numero atómico	22
Peso atómico	47.88
Volumen atómico	10.6 W/D
Configuración electrónica	[Ar] 3d <sup>2</sup> 4s <sup>2</sup>
Radio covalente	1.32 Å
Primer potencial de ionización	6.83 eV
Valencia	3, 4
Punto de fusión	1670 ± 5 °C
Punto de ebullición	3260 °C
Capacidad calorífica	523 J/kg °C
Conductividad térmica	17 W/m °C
Coefficiente de expansión térmica a (20 °C)	8.41 x 10 <sup>-6</sup> °C <sup>-2</sup>
Conductividad eléctrica	0.031 la del Cu
Resistividad eléctrica	0.0026°C
Susceptibilidad magnética (K)	1.25 x 10 <sup>-5</sup>

Por otro lado, las propiedades mecánicas del titanio (tabla 1.2) dependen de su pureza, considerándose representativos los valores del titanio comercialmente puro.

**Tabla 1.2.** Propiedades mecánicas del titanio [22].

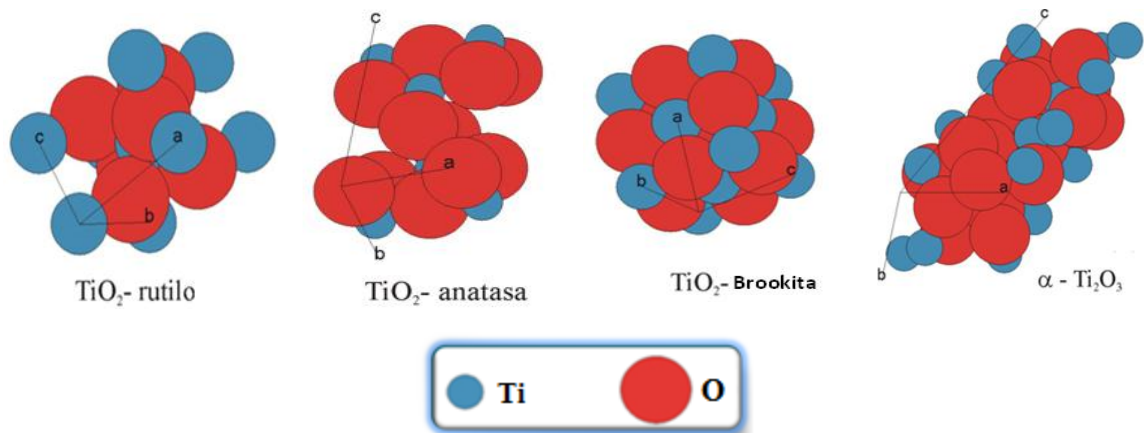
Propiedad	Valor
Resistencia	240 Mpa
Limite elástico	170 Mpa
Alargamiento	50%
Dureza	70 HR <sub>B</sub> ; 85 HV

El titanio presenta transformación alotrópica lo que permite que se puedan realizar tratamientos térmicos con transformación total. A temperatura ambiente, el titanio puro presenta una estructura cristalina hexagonal compacta, HCP, llamada fase  $\alpha$ . Por encima de los 882°C dicha estructura cristalina sufre una transformación alotrópica y se convierte en una estructura cúbica centrada en el cuerpo, BCC, llamada fase  $\beta$  (ver tabla 1.3).

**Tabla 1.3.** Características cristalográficas del titanio [22].

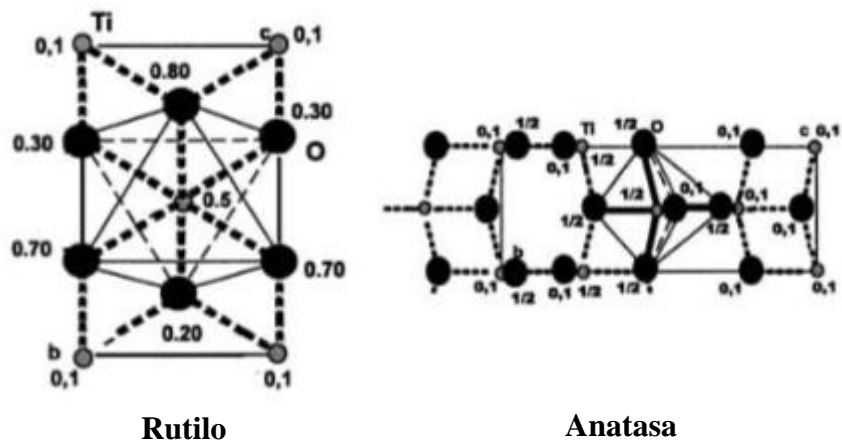
Propiedades	Valor
Estructura cristalina	$\alpha$ (HCP) $T < 882^\circ\text{C}$ $\beta$ (BCC) $T > 882^\circ\text{C}$
Parámetros de red cristalina	$\alpha$ : $c = 0.468 \text{ nm}$ ; $a = 0.295 \text{ nm}$ $\beta$ : $a = 0.332 \text{ nm}$ ( $900^\circ\text{C}$ )
Temperatura de transición $\alpha - \beta$	$882 \pm 2^\circ\text{C}$
Densidad	Fase $\alpha$ ( $20^\circ\text{C}$ ): $4.507 \text{ g/cm}^3$ Fase $\beta$ ( $885^\circ\text{C}$ ): $4.35 \text{ g/cm}^3$

A su vez, el dióxido de titanio presenta cuatro fases cristalinas: rutilo (estructura tetragonal), anatasa (estructura tetragonal), brookita (estructura ortorrómbica) y una de alta presión tipo  $\alpha\text{-PbO}_2$  [23] (figura 1.1). Para que se cumpla la regla electrostática de valencia, cada átomo de O es compartido por tres (3) octaedros. Para el rutilo y el  $\text{TiO}_2$  de alta presión, cada octaedro tiene dos (2) lados comunes con otros octaedros; en la brookita hay tres (3) y en la anatasa cuatro (4) lados compartidos por octaedros [23]. Por lo anterior, el rutilo y la fase de alta presión son las formas más estables del  $\text{TiO}_2$  y por ello muchos compuestos cristalizan en estructura tipo rutilo y algunos en la forma tipo  $\alpha\text{-PbO}_2$ , mientras que muy pocos ejemplos se conocen de materiales que presentan estructuras anatasa y brookita [23].



**Figura 1.1.** Fases cristalinas del dióxido de titanio [24].

El rutilo cristaliza en el sistema tetragonal con  $a = 4.85 \text{ \AA}$  y  $c = 2.953 \text{ \AA}$ , el Ti se ubica en las posiciones  $(0,0,0)$  y  $(1/2, 1/2, 1/2)$  y el oxígeno en las posiciones  $(x, x, 0)$ ,  $(-x, -x, 0)$ ,  $(x+1/2, 1/2-x, 1/2)$  y  $(1/2-x, 1/2+y, 1/2)$  donde  $x = 0.302$ . La anatasa, que es una fase polimorfa del anterior, cristaliza en el sistema tetragonal en una red  $I$  con  $a = 3.777 \text{ \AA}$  y  $c = 9.501 \text{ \AA}$ , donde el Ti ocupa las posiciones  $(0,0,0)$ ,  $(0, 1/2, 3/4)$  y las posiciones equivalentes por ser la red  $I$ , mientras que los oxígenos se sitúan en  $(0,0,0.204)$ ,  $(0,0,0.796)$ ,  $(1/2, 0, 0.454)$ ,  $(1/2, 0, 0.046)$  y las posiciones equivalentes por ser la red  $I$  [25]. En la figura 1.2 se ilustra la disposición de los átomos en las fases rutilo y anatasa del  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 1.2.** Disposiciones de los átomos de Ti y O en las fases anatasa y rutilo del  $\text{TiO}_2$  [25].

## **1.2. Obtención del TiO<sub>2</sub>**

### **1.2.1. Métodos convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, TiO<sub>2</sub>**

Las materias primas para la producción de TiO<sub>2</sub> son la ilmenita, el rutilo, el rutilo sintético y anatasa natural. La ilmenita posee un 43-61 % de TiO<sub>2</sub> y entre 34 y 49% de óxido de hierro, este material se encuentra en depósitos naturales primarios en Noruega, Rusia, Finlandia, Canadá y EE.UU. El rutilo se extrae de arenas de río, que poseen entre 90 y 98 % de rutilo, junto con Fe, Zr, V, Cr, Al, Si y Mg. El principal productor es Australia. El rutilo sintético se obtiene de la ilmenita, extrayendo el hierro y conservando la forma de la partícula. En Brasil se encontraron los depósitos más ricos del mundo de anatasa natural, con un contenido de TiO<sub>2</sub> entre el 30 y el 40% [26].

Existen dos métodos convencionales para obtener el dióxido de titanio, no necesariamente nanométrico, estos son el proceso sulfato y el proceso cloro [27].

#### **1.2.1.1. Proceso sulfato**

Fue el primer proceso comercial utilizado para la manufactura del dióxido de titanio. El mineral es inicialmente secado, separado y clasificado de modo que se asegure la sulfatación en un baño con ácido sulfúrico concentrado o en una reacción continua exotérmica; se debe tratar de maximizar la conversión del TiO<sub>2</sub> a sulfato de titanilo soluble en agua usando una cantidad mínima de ácido. Luego de precipitar el FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y filtrar, con el objetivo de retirar las últimas impurezas, el sulfato de titanilo es evaporado e hidrolizado para producir los “clusters” de óxido de titanio, el cual mediante un proceso de precipitación adecuado toma el tamaño de partícula deseado. Estas partículas, después de un adecuado tratamiento térmico, adquieren la forma cristalina requerida [27].

### **1.2.1.2. Proceso cloro**

Este proceso es conocido también como oxidación en llama. En este caso, se parte de un mineral o un precursor sintético con alta concentración de  $\text{TiO}_2$ . Se procede a mezclar con carbón y se hace reaccionar en un lecho fluidizado con cloro, a aproximadamente  $900^\circ\text{C}$ , hasta obtener  $\text{TiCl}_4$ . Luego se realiza un proceso de enfriamiento para retirar algunas impurezas. El resto del vapor es condensado, y se realiza una destilación fraccionada para producir  $\text{TiCl}_4$  puro; posteriormente se realiza la combustión del  $\text{TiCl}_4$  en una llama oxigenada.

El tamaño de las partículas del  $\text{TiO}_2$  depende del tiempo de residencia en la llama: tiempos largos favorece las partículas de mayor diámetro, presumiblemente formadas por la agregación de las pequeñas partículas; el tamaño de partícula oscila entre los 10 y 100 nm [27].

### **1.2.2. Métodos no convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, $\text{TiO}_2$**

Los polvos de  $\text{TiO}_2$  han sido obtenidos utilizando diversos métodos no convencionales, entre los que se destacan la síntesis química en fase vapor [28], hidrotérmal [29], precipitación controlada [30], sol-gel [31] y precursor polimérico (Pechini) [32]. Con el advenimiento de la nanotecnología, la obtención de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , con alta pureza química y estructura cristalina bien definida, se ha tornado en el objetivo central de muchos de las investigaciones que actualmente se realizan.

### **1.3. Síntesis del $\text{TiO}_2$ por el método sol-gel**

Dentro de los métodos no convencionales de síntesis, uno que se ha utilizado frecuentemente para obtener el  $\text{TiO}_2$  es el método sol gel.

### 1.3.1. Aspectos generales del método sol gel: ventajas y desventajas

Es un proceso utilizado principalmente para la producción de óxidos inorgánicos, también se utiliza para la obtención de nitruros, sulfuros, híbridos orgánicos e inorgánicos [33] entre otros compuestos. La química del proceso sol-gel está basada en las reacciones de hidrólisis y condensación de especies químicas provenientes de precursores moleculares [33], siendo los alcóxidos los más utilizados, los cuales son muy reactivos con los agentes nucleofílicos, tal como el agua [33], este método es apropiado para obtener también vidrios y cerámicos.

Se denomina sol a un líquido viscoso que realmente es una suspensión estable de partículas sólidas coloidales dentro de un líquido. Por otro lado, el gel es una red sólida interconectada tridimensionalmente, porosa, que se extiende de manera estable a través de un medio líquido y su tamaño es limitado por el tamaño del recipiente [34]. Se denomina proceso de gelación a la formación del gel y éste inicia cuando, después de dispersar homogéneamente el precursor y conformar el sol, el sistema comienza a rigidizarse experimentando un cambio brusco de líquido altamente viscoso a fase sólida. En esta etapa se presenta un estado intermedio, entre el precipitado y el gel, al que se denomina precipitado gelatinoso [35]. Los solventes que normalmente se emplean son el agua y líquidos orgánicos, principalmente alcoholes. El agua es el solvente más utilizado para transformar el precursor ya que sus propiedades eléctricas, alta constante dieléctrica y momento dipolar permanente, son muy importantes para que ocurra el proceso de transformación del precursor durante el desarrollo del proceso sol-gel.

Con frecuencia en este proceso se utilizan solventes orgánicos porque ellos permiten la disolución de los precursores y controlan la reacción de estos alcóxidos con agua. Dos parámetros importantes que se consideran durante el proceso, son la electronegatividad del catión y el pH del sistema; cualquier



cambio del pH de la solución desplaza el equilibrio de hidrólisis y por lo tanto ocasiona un cambio de la electronegatividad promedio del medio.

Las principales ventajas que presenta el método sol-gel, frente a los otros métodos de síntesis empleados son:

- Alta pureza de los productos obtenidos.
- Baja temperatura para realizar el proceso.
- Control adecuado de la nucleación y el crecimiento de las partículas coloidales primarias (morfología, tamaño y distribución de las partículas).
- Reducción de la temperatura de sinterización de los polvos sintetizados.
- Control de la microestructura del cerámico.
- Favorable obtención de nuevos tipos de vidrios.
- Alta homogeneidad química a nivel atómico.

Dentro de las desventajas del proceso Sol-gel se pueden destacar:

- El alto costo de los precursores (alcóxidos).
- No se puede utilizar en producción a gran escala (solo se emplea para obtener cerámicos avanzados).

### **1.3.2. Procedimiento experimental**

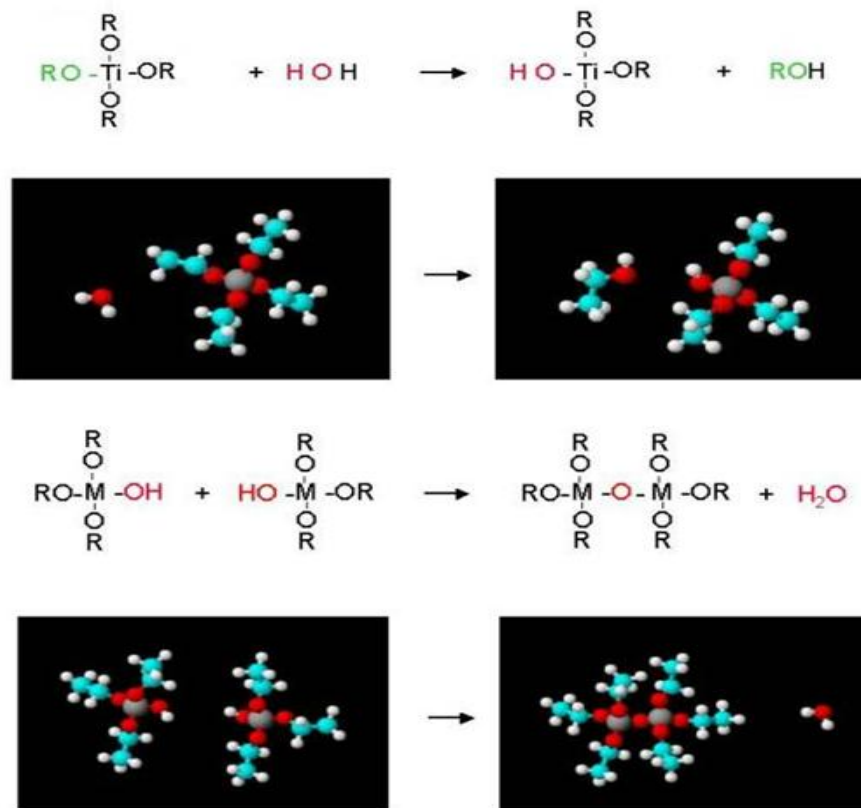
Para la obtención de polvos cerámicos de dióxido de titanio, empleados en este trabajo mediante el método sol gel, los reactivos usados, indicando su pureza y marca, son listados en la tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de  $\text{TiO}_2$  empleados en este trabajo, utilizando el método sol gel.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
Tetrabutóxido de titanio	Aldrich	99%.
Acetilacetona (AcacH).	J.T:Baker	98%
Etanol absoluto anhidrido	Mallinckrodt	99.5%
Hidróxido de Amonio $\text{HN}_4\text{OH}$	Merck	99%
Agua destilada		

Para dar cumplimiento a los objetivos de este trabajo es importante obtener un polvo cerámico de  $\text{TiO}_2$  con partículas nanométricas y baja aglomeración. Para cumplir con estos requisitos se debe tener un buen control sobre los parámetros más importantes que intervienen en el desarrollo del proceso de síntesis, tales como: naturaleza y concentración de los precursores, naturaleza del solvente y pH del sistema, además de la temperatura y el tiempo de duración de los tratamientos térmicos.

La obtención de los soles de  $\text{TiO}_2$ , se realizó a través de las reacciones de hidrólisis y policondensación del tetrabutóxido de titanio (TBT),  $\text{Ti}(\text{OBU})_4$  (figura 1.3), utilizando o no un acomplejante (acetilacetona- AcacH en el presente caso) para controlar las reacciones de hidrólisis del TBT [36]. Además, se adicionó hidróxido de amonio para obtener una condición básica en la solución, esto con el fin de favorecer la formación de un gel particulado y no de un gel polimérico [36].



**Figura 1.3.** Reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso sol-gel [37].

Se empleó como solvente alcohol etílico, para disolver el TBT, teniendo la precaución de que no se hidrolizara el precursor de titanio al entrar en contacto con el medio ambiente. La solución que contenía el TBT, alcohol etílico y acomplexante se agitó durante 20 minutos y finalmente se adicionó el agua destilada, manteniendo la agitación durante otros 20 minutos.

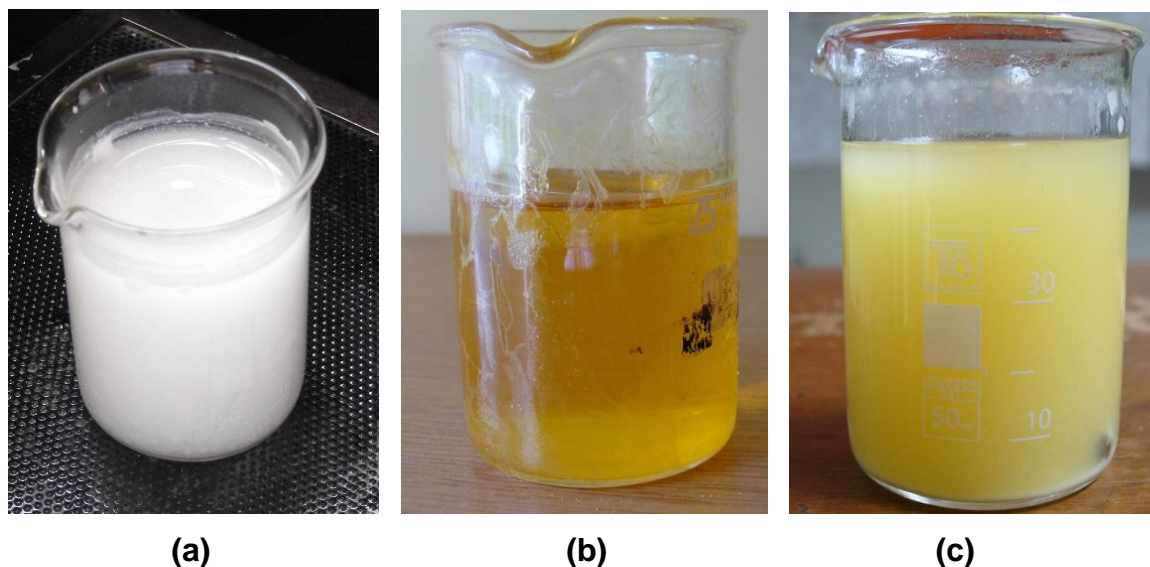
Un interés de este trabajo fue determinar el efecto acomplexante del AcacH y para ello se analizaron sistemas con diferentes relaciones TBT: AcacH, 2:1 y 3:1, que permitió determinar el efecto de la presencia de este reactivo sobre las características fisicoquímicas del polvo cerámico final. En la tabla 1.5 se indican las relaciones y cantidades de los reactivos utilizados en este trabajo para conformar los soles estables de titanio. La concentración de los precursores fue

un parámetro importante a analizar, así como la razón de concentración titanio/ acetilacetona [Ti/AcacH].

**Tabla 1.5.** Concentraciones molares, en una solución de 50 ml, de los diferentes reactivos utilizados en la formación de los soles de titanio.

Rc=Ti/AcacH	TBT	AcacH – Hidróxido de Amonio	Agua	Etanol
Sin AcacH	10.98 ml	0	0.85 mL	38.17 mL
2:1	10.98ml	1.62 mL	0.85 mL	36.55 mL
3:1	10.98ml	1.08 mL	0.85 mL	37.09 mL

En la figura 1.4 se muestran las suspensiones coloidales del sistema de titanio que se obtuvieron; sin AcacH (figura 1.4(a)), relación Ti:AcacH=2:1(figura 1.4(b)) y relación Ti:AcacH=3:1(figura 1.4(c)). Muestras de estos soles, (suspensión coloidal de partículas nanométricas) para los diferentes sistemas de interés, se caracterizaron utilizando espectroscopia IR con el fin de determinar como evolucionan los grupos funcionales presentes en ellos.

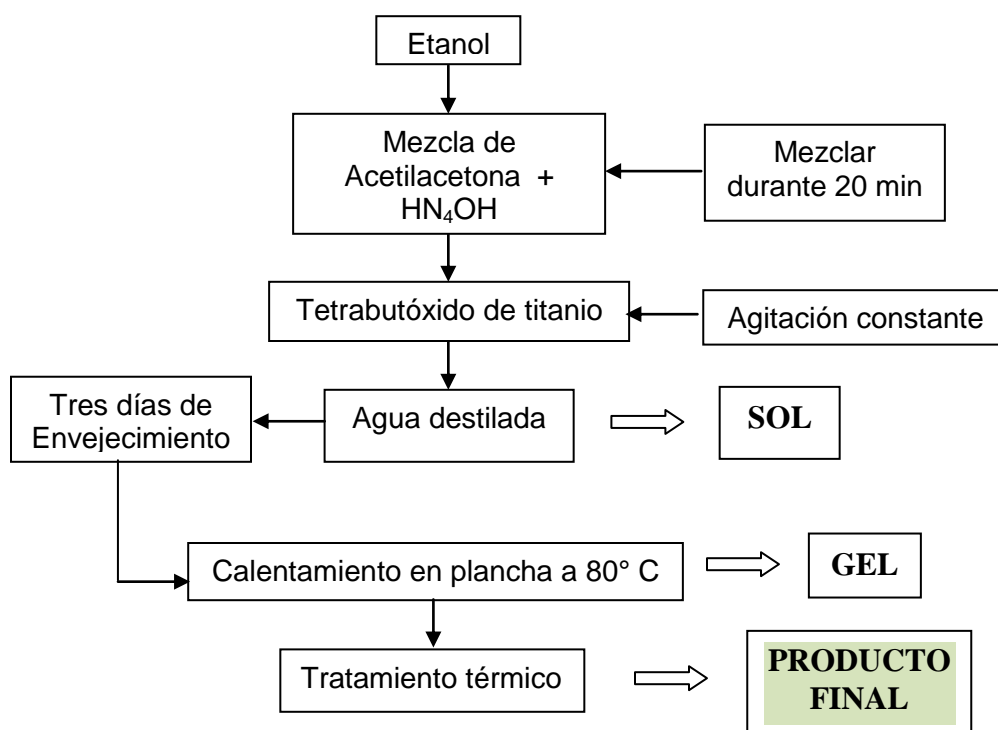


**Figura 1.4.** Textura de las suspensiones coloidales obtenidas durante el desarrollo del proceso sol-gel: (a) sin acomplejante, (b) relación Ti:AcacH=2:1 y (c) relación Ti:AcacH=3:1.

Para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y las propiedades del TiO<sub>2</sub> obtenido, los soles fueron sometidos a un programa de secado a 80°C, durante aproximadamente 3 días, en una estufa marca XXX hasta obtener los polvos cerámicos. A las muestras secas se les realizó un tratamiento térmico, cuyo programa de calentamiento se diseñó considerando una velocidad de incremento de la temperatura de 3 °C/min, desde temperatura ambiente hasta 200 °C. El sistema se mantuvo a esa temperatura por 2 horas con el fin de evaporar el agua adsorbida en el sólido y gran parte del solvente; posteriormente, se incrementó la temperatura, a la misma velocidad de 3 °C/min, hasta una temperatura final previamente determinada, desde 350°C hasta 800°C, donde el sólido permaneció por 2 horas. Luego se disminuyó la temperatura, hasta temperatura ambiente, a la misma velocidad (3 °C/min).

El material que resultó de la suspensión coloidal después de ser tratado a 80°C se caracterizó con análisis termogravimétrico (TG) y análisis térmico diferencial (ATD), (DSC Q100 de TA instruments) y las muestras sólidas obtenidas, al finalizar el tratamiento térmico, se caracterizaron utilizando espectroscopia infrarroja (Termo Electrón Nicolet IR200), difracción de rayos X (Philips PW1710 y la radiación K $\alpha$  del Cu ( $\lambda = 1.54\text{\AA}$ ), en el intervalo  $2\theta$  entre 10° y 70° y a una velocidad de barrido de 0.04°s<sup>-1</sup>) y microscopia electrónica de transmisión (JEOL- JEM 1200 EX) y de barrido (Philips XL-30 Scanning Electron Microscope), equipos para determinar superficie específica (Adsorción – desorción de gases Micromeritics ASAP 2010) , potencial zeta (Malvern Instruments Ltd) y para las medidas de absorbancia (Spectronic Genesys 5).

En la figura 1.5 se esquematizan las diferentes etapas que se cumplieron, durante el desarrollo del método sol-gel, para sintetizar los polvos de TiO<sub>2</sub> utilizados en este trabajo de investigación.

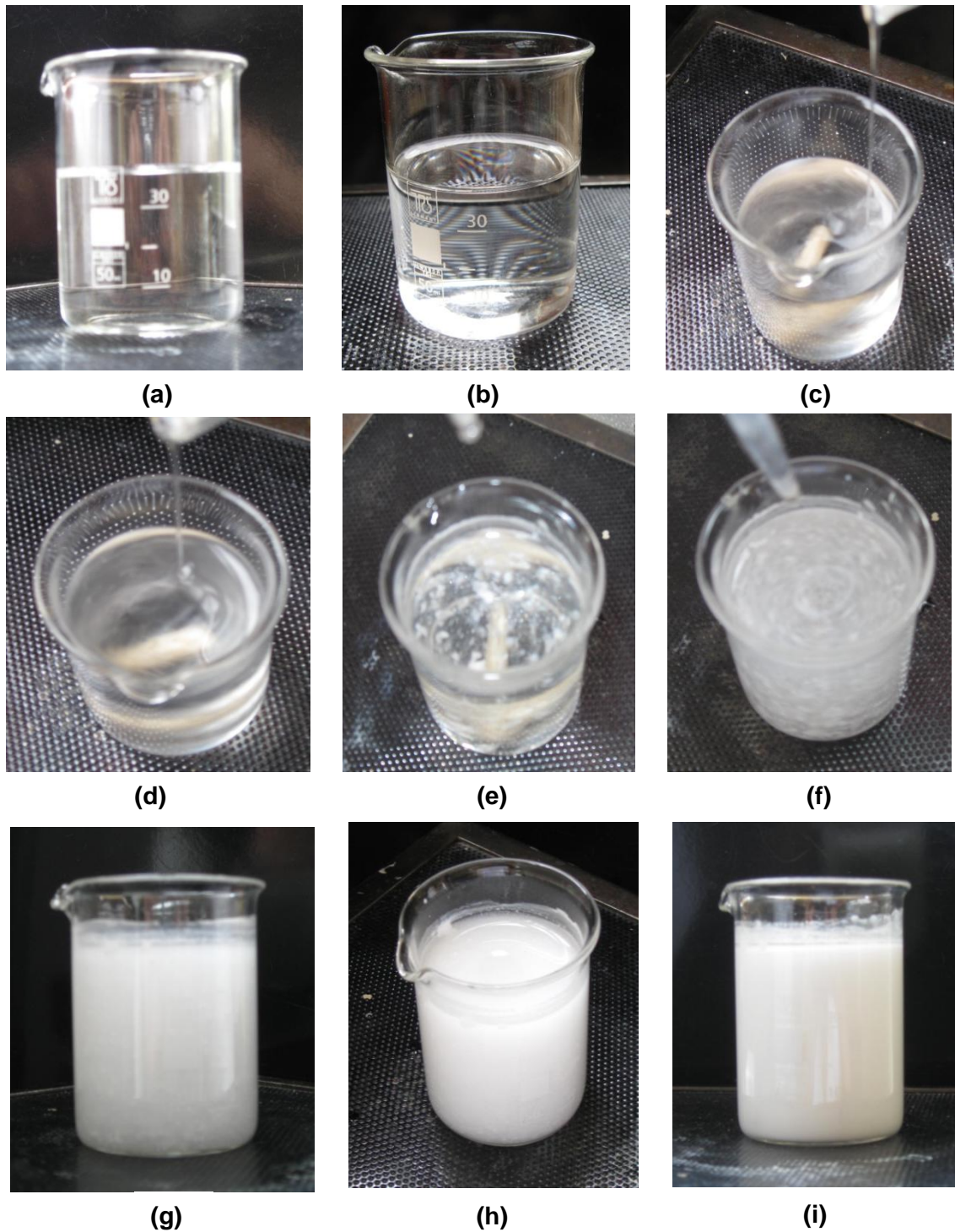


**Figura 1.5.** Esquema de las etapas del proceso sol-gel utilizado para sintetizar polvos de  $\text{TiO}_2$ .

Utilizando este método de síntesis, para obtener el  $\text{TiO}_2$  requerido, se puso especial atención a las reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso, tomando como variable importante el efecto del acomplejante, AcacH, incorporado al sistema.

En la figura 1.6 se muestra la evolución del sistema de titanio, sin AcacH, durante la formación del sol de titanio en cada instante del proceso. En estas fotografías se puede observar que el sistema de partida era totalmente transparente (figura 1.6.a) y que sufrió cambios apreciables a simple vista, principalmente en color, hasta que se formó el precipitado en el seno del solvente (figura 1.6.i).

Finalmente, la suspensión de titanio se calentó en una plancha, a una temperatura de  $80^\circ\text{C}$  por 48 horas, para remover el agua y obtener el sólido que luego se caracterizó y se trató térmicamente (figura 1.7).



**Figura 1.6.** Seguimiento de la evolución del sistema de titanio, sin AcacH y formación de un precipitado en el seno de la solución. Las fotografías se tomaron cada 20 minutos.



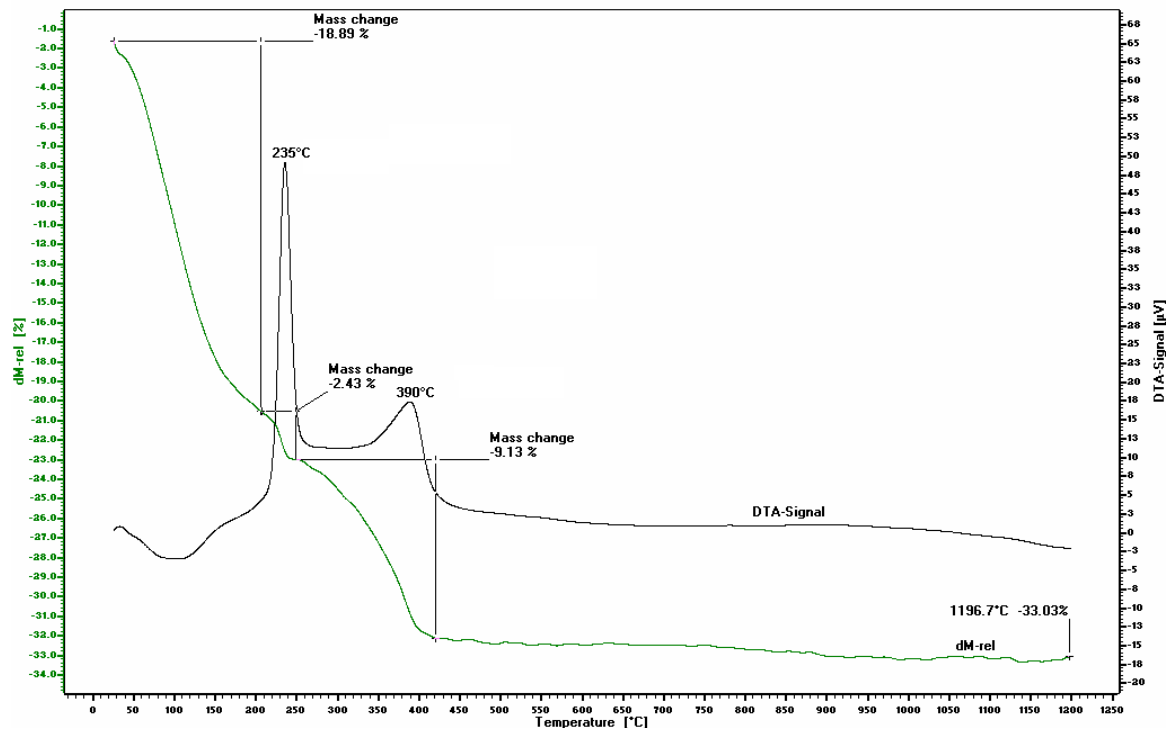
**Figura 1.7.** Material obtenido al secar a 80° C la suspensión de titanio conformada al finalizar el proceso sol – gel.

### **1.3.3. Control sobre la formación de la fase estructural en el sólido de $\text{TiO}_2$**

Después de obtener los polvos cerámicos, utilizando el método sol-gel, se procedió a su caracterización. El material que se utilizó para estos ensayos fue el que resultó de secar la suspensión obtenida, al final del proceso de síntesis (figura 1.7) a 80°C.

En la figura 1.8 se muestran las curvas de ATD/TG correspondientes al polvo obtenido al secar el sistema de titanio. Teniendo en cuenta el análisis térmico diferencial, ATD (figura 1.8), se observa un pico endotérmico, ancho, alrededor de 100°C que corresponde a la evaporación del agua adsorbida en el material. Además, la curva presenta dos picos exotérmicos: uno alrededor de 235°C que se puede asociar a la oxidación de la fase orgánica que existe en el sistema de titanio y otro a 390°C que correspondería a la formación del óxido y a su cristalización.



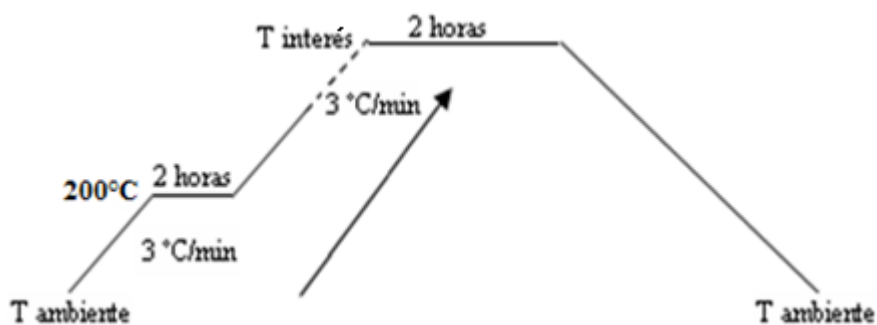


**Figura 1.8.** Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido obtenido del proceso de secado del sistema de titanio.

En el termograma TG, figura 1.8, se observa que la masa de la muestra a 205°C se ha reducido en un 18.89%, debido a la pérdida de agua, y entre 205 y 250 °C disminuyó en 2.43%. Finalmente, entre 250 y 420°C se presentó la última pérdida de masa que correspondió al 9.13 %; esta pérdida de masa se puede justificar considerando, principalmente, la eliminación de la fase orgánica que aun puede existir en la muestra. Para temperaturas mayores a 450°C la pérdida de peso es menos evidente y la masa del sólido tiende a mantenerse constante, alcanzándose a 1197°C una pérdida total de masa del material del ~33.03%, con respecto a la masa inicial de la muestra.

Con base en estos resultados del análisis térmico se concluyó que se puede obtener el TiO<sub>2</sub> a temperaturas iguales o mayores a 450°C, temperatura a partir de la cual la masa de la muestra tiende a permanecer constante. En la figura 1.9

se esquematiza el tratamiento térmico, a una velocidad de calentamiento lo suficientemente baja para garantizar la eliminación total de compuestos no deseados en el sólido, utilizado para obtener el  $\text{TiO}_2$  empleado en esta investigación.

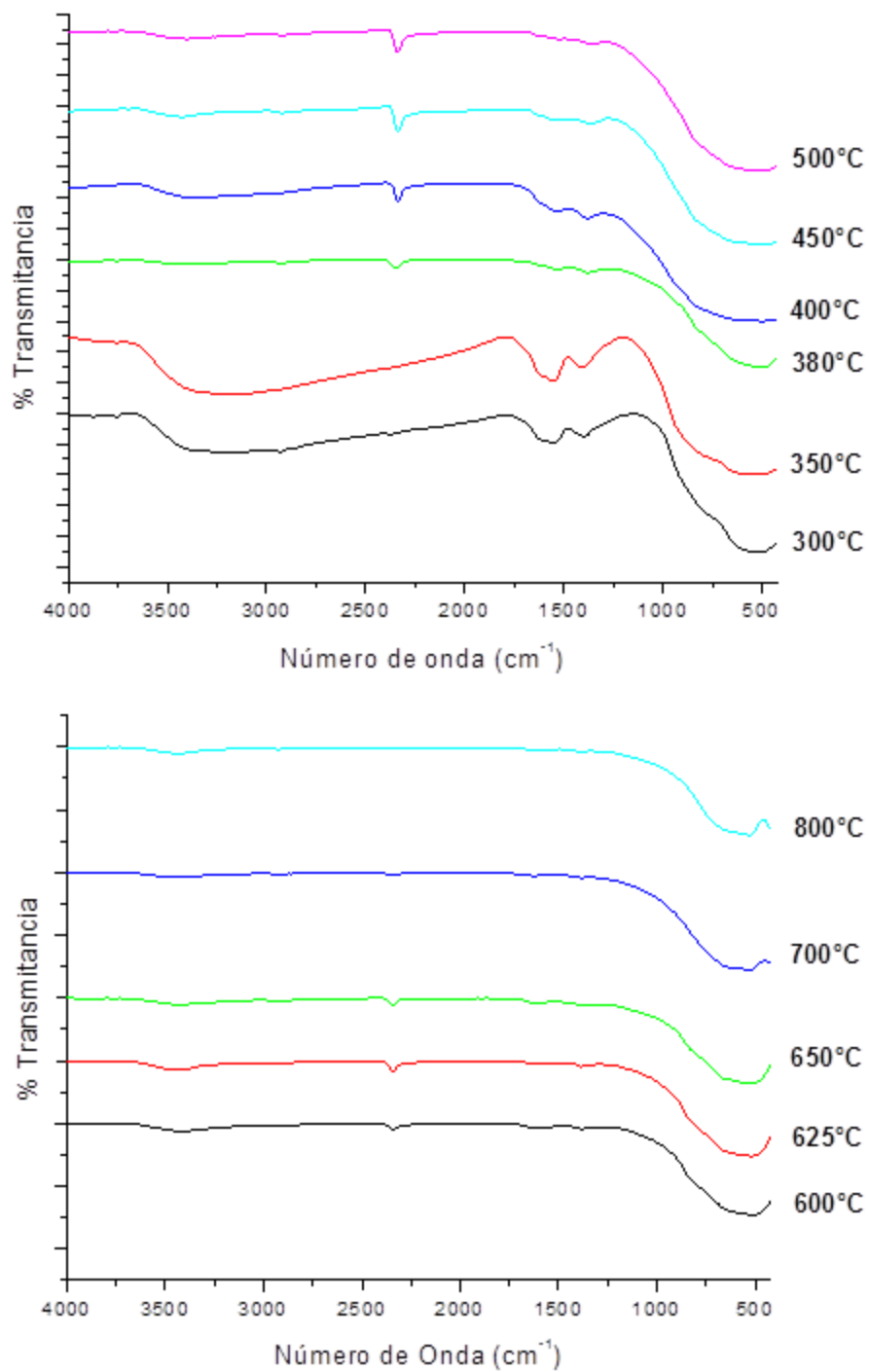


**Figura 1.9.** Rampa de tratamiento térmico utilizado para obtener los polvos cerámicos de  $\text{TiO}_2$  en sus diferentes fases.

Considerando los resultados del análisis térmico, figura 1.8, se determinó que el rango de temperatura de interés, para obtener las muestras a estudiar, va desde  $300^{\circ}\text{C}$  hasta  $800^{\circ}\text{C}$  con el fin de estudiar la evolución del sistema.

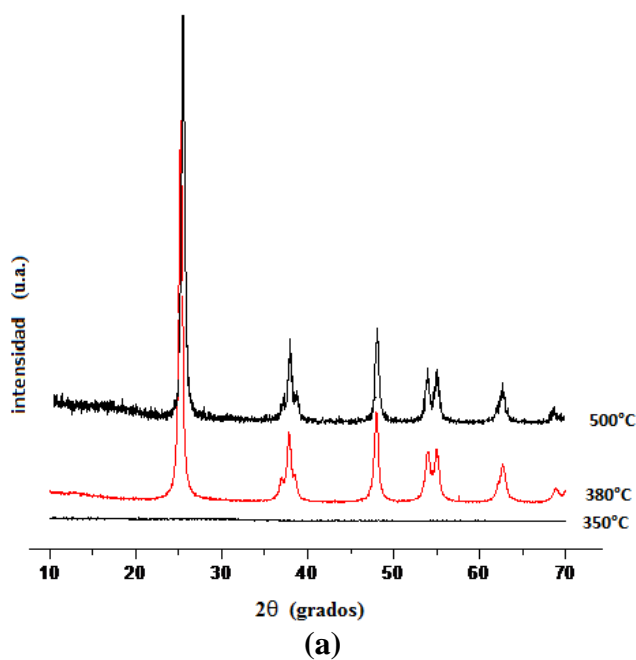
Los sólidos obtenidos, al secar las muestras a  $80^{\circ}\text{C}$ , fueron sometidos a tratamientos térmicos a las temperaturas de:  $300$ ,  $350$ ,  $380$ ,  $400$ ,  $450$ ,  $500$ ,  $600$ ,  $625$ ,  $650$ ,  $700$  y  $800^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Los polvos cerámicos obtenidos se analizaron utilizando espectroscopia IR y los espectros obtenidos se muestran en la figura 1.10. En ellos son evidentes las bandas típicas del agua a  $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$  y a  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ , las cuales aparecen en todos los espectros siendo bastante notoria para las muestras tratadas a  $300^{\circ}\text{C}$ ,  $350^{\circ}\text{C}$  y  $380^{\circ}\text{C}$ ; su intensidad se va reduciendo a medida que se aumenta la temperatura. La banda alrededor de  $1400\text{ cm}^{-1}$  se puede asociar a la vibración de grupos orgánicos C-H residuales [36]. Observando específicamente la región del espectro entre  $1000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ , donde se ubican principalmente las bandas asociadas a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C, ella presenta una banda de área grande que se va definiendo a medida que se aumenta la temperatura. En todos los espectros IR de la figura 1.10 se

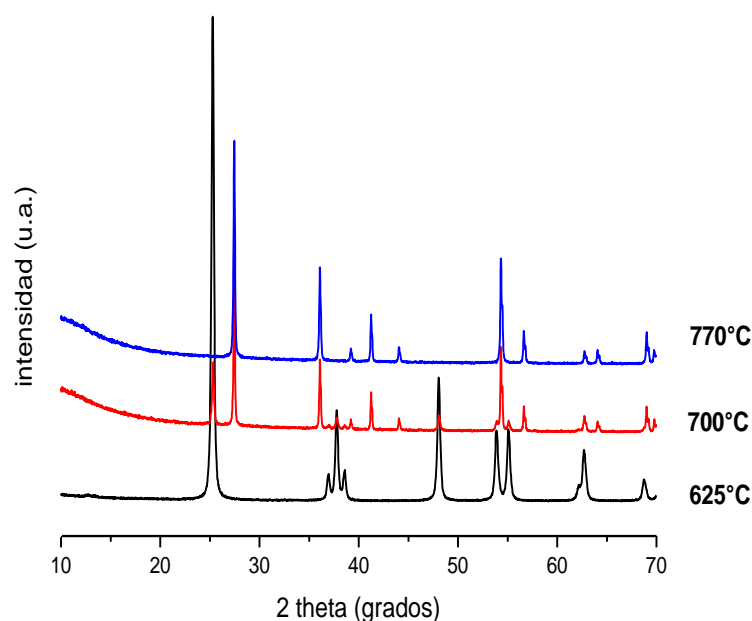
encuentran las bandas correspondientes a las vibraciones Ti-O-Ti, a  $500\text{ cm}^{-1}$ , y Ti-O, a  $600\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 1.10.** Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio tratados térmicamente, a diferentes temperaturas, por dos horas.

En la figura 1.11 se muestran los difractogramas de rayos X correspondientes a sólidos del sistema de titanio, los cuales indican que a una temperatura de 350°C el material sigue siendo amorfo y que entre 350 y 380°C ocurre la transición de fase amorfa a anatasa, tal como lo indica la curva de ATD (figura 1.8). Al tratar la muestra térmicamente a 500°C ésta alcanza una mayor cristalización, obteniéndose como única fase cristalina el  $\text{TiO}_2$  fase anatasa (PDF 21-1272) (figura 1.11(a)). Esta fase está presente en un amplio rango de temperaturas; observando la figura 1.11 es evidente que esta fase es estable entre 380°C y 625°C. En la figura 1.11 (b) el patrón de difracción obtenido muestra que al tratar la muestra térmicamente a una temperatura de 700°C coexisten las fases anatasa y rutilo del  $\text{TiO}_2$  ya que aparecen dos picos de intensidad máxima reflejada en los ángulos típicos de la anatasa ( $2\theta= 25.37$ ) y del rutilo ( $2\theta=27.46$ ) respectivamente, y en la muestra tratada a 770°C sólo son evidentes los picos asociados a la fase tipo rutilo. Como se observa en las curvas de ATD/TG, esta última transición no es muy evidente y en la curva de ATD solo se observan, entre 700 y 770°C, sutiles variaciones en la línea de base, lo que no da una evidencia clara que permita definir a que temperatura ocurre la transición anatasa-rutilo.





(b)

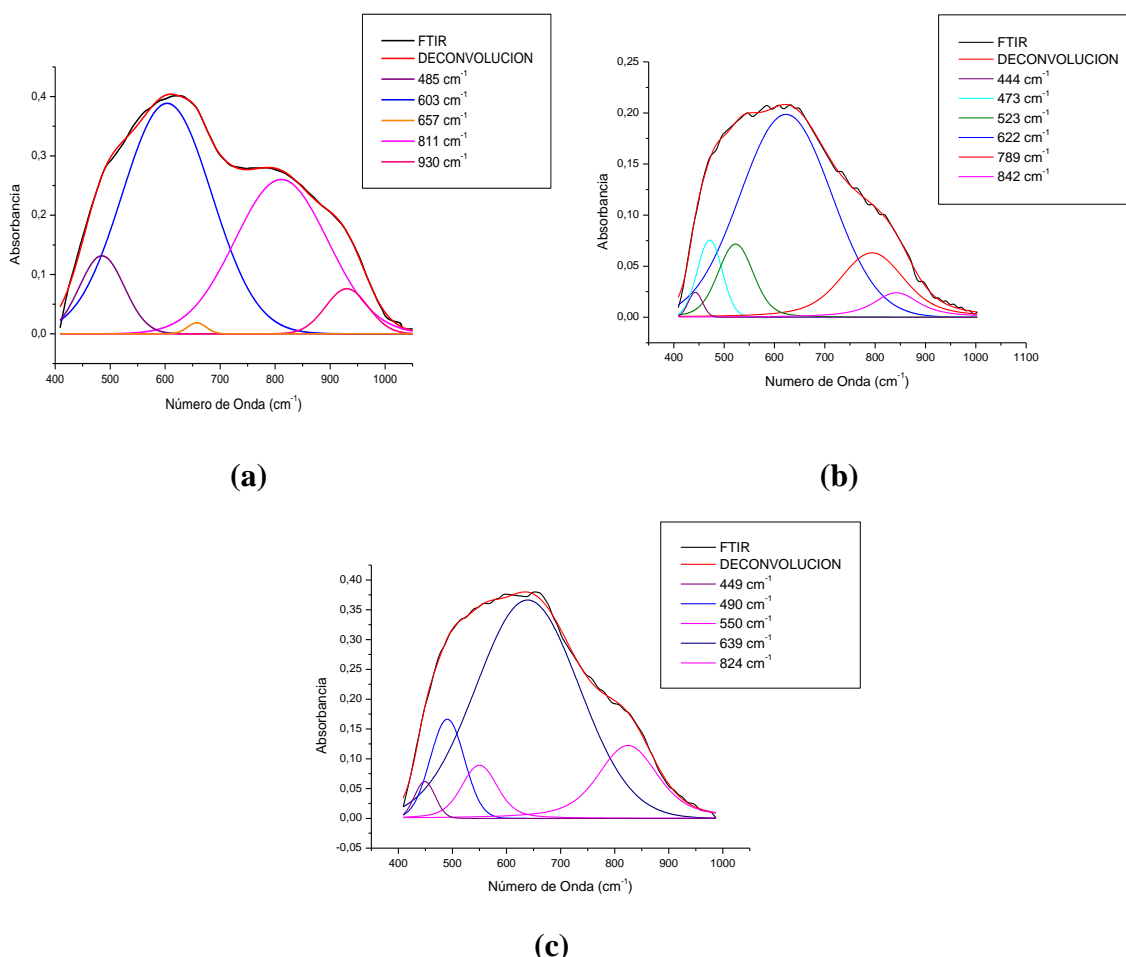
**Figura 1.11.** Difractogramas de rayos X de los sólidos del sistema de titanio tratados térmicamente a diferentes temperaturas, por 2 horas, donde se destacan: (a) la transición de fase amorfa a anatasa y (b) la transición de fase anatasa a rutilo.

Para tener información más detallada de lo que ocurre en los diferentes intervalos de temperatura donde, según los resultados de rayos X (figura 1.11), ocurren las transiciones de fase amorfa- anatasa y anatasa- rutilo, se realizó la deconvolución de los espectros IR correspondientes a muestras representativas en estos intervalos de temperatura. La región de interés, a la que se le realizó el proceso de deconvolución, es aquella donde se encuentran, principalmente, las bandas asociadas a los enlaces Ti-O, O-Ti-O y Ti-OH o sea entre  $1000$  y  $400$   $\text{cm}^{-1}$  (figuras 1.12 y 1.13).

Observando la forma del espectro IR en este rango, en las figuras 1.12 y 1.13, es evidente su diferencia. El espectro de la muestra de  $\text{TiO}_2$  amorfa, figura 1.12(a) tiene una forma totalmente diferente a las demás, más aún si se considera la presencia del enlace Ti-C, por ejemplo, debido a que no se ha eliminado totalmente la fase orgánica (ver figura 1.8); en este rango del espectro

IR están claramente diferenciadas las bandas a 603 y 657  $\text{cm}^{-1}$ , que se podrían asociar a las especies de simetría  $E_u^3$  y  $A_{2u}$  [38] relacionadas con los grupos funcionales que involucran enlaces Ti-O, además están presentes las bandas a 811  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $A_{2u}$  [39]) y la ubicada a 930  $\text{cm}^{-1}$ , que sólo aparece en este espectro. Los espectros de aquellas muestras donde se evidenció, por DRX, la presencia de la anatasa como única fase cristalina, figuras 1.12(b) hasta 1.13(b), presentaron una forma diferente, similar a la indicada en la figura 10.8(C), página 194, del libro de Farmer [39]. En este espectro están presentes las bandas ubicadas a  $\sim 630 \text{ cm}^{-1}$  (especie  $E_u^3$  [38]),  $\sim 830 \text{ cm}^{-1}$  ( $A_{2u} - \text{LO} + \text{acustic}$ ) [39] y a 460  $\text{cm}^{-1}$  ( $E_u^2 - \text{LO}$  [39]).

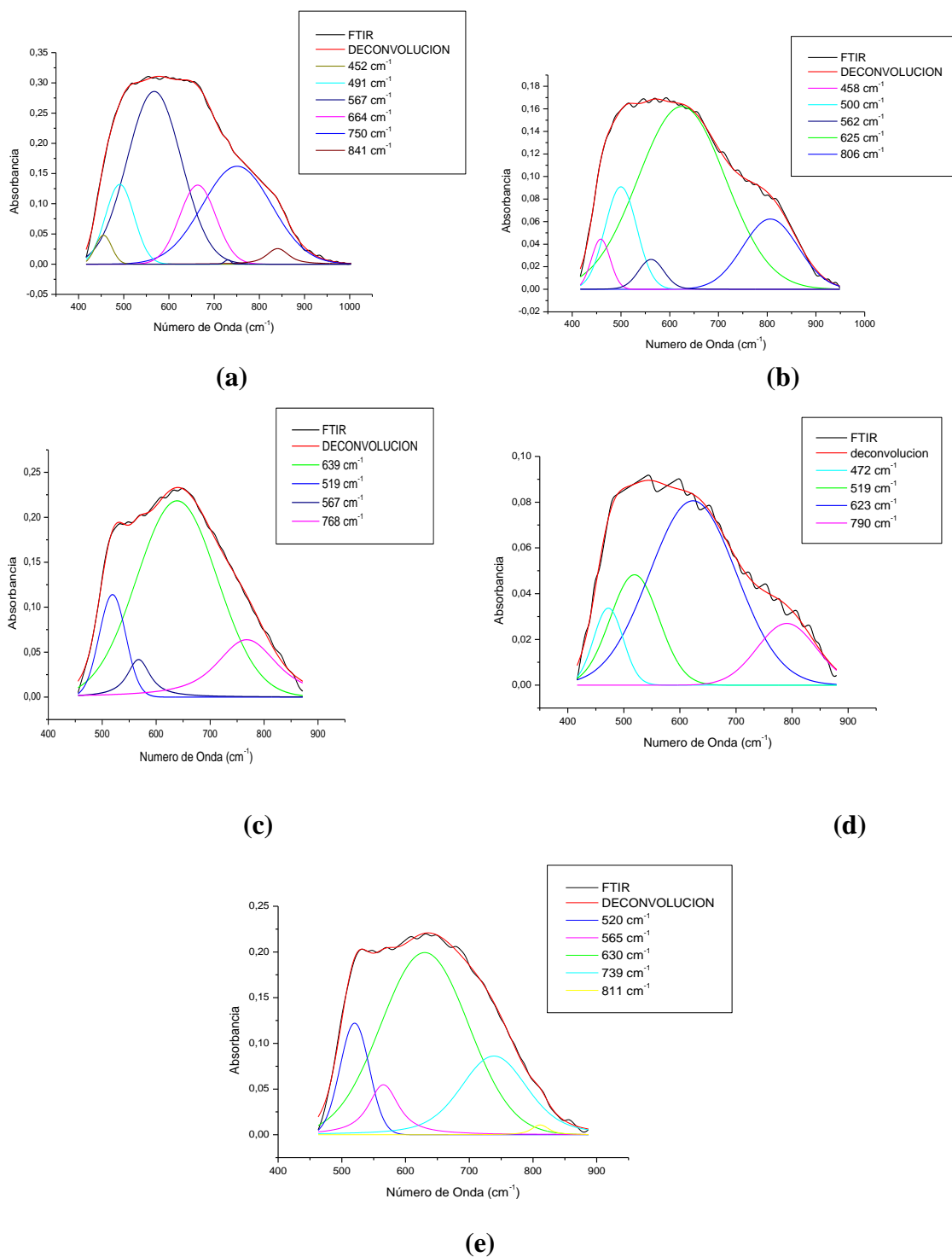
Los espectros que corresponden a muestras donde la fase rutilo comienza a ser importante, figuras 1.13(c) y 1.13(d), o es la única fase cristalina presente, figura 1.13(e), es más notoria la banda a 520  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $E_u^3 - \text{TO}$  y  $B_{1u}$  [39]), y se mantiene como banda importante la ubicada a  $\sim 630 \text{ cm}^{-1}$  (especie [38]), de allí la forma especial que presenta este espectro y que se asemeja al de la figura 10.8(A), página 194, del libro de Farmer [39]. A partir de las muestras tratadas a 625 °C, sus espectros presentan una banda ubicada a 565  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $A_{2g}$  [39]) cuya intensidad se va incrementando a medida que la fase rutilo comienza a ser importante. Específicamente, en el espectro correspondiente a la muestra que contiene como única fase cristalina rutilo, figura 1.13(e), están presentes las bandas características del  $\text{TiO}_2$  tipo rutilo: 630  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $E_u^3$  [38]), 520  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $E_u^3 - \text{TO}$  y  $B_{1u}$  [39]), 565  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $A_{2g}$  [39]) y 810  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $E_u^3 - \text{LO} + \text{acustic}$  [39]).



**Figura 1.12.** Deconvolución de los espectros IR, región entre 400 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , de muestras sólidas del sistema de titanio tratadas térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas a: (a) 350°C, (b) 380°C y (c) 500°C.

En los espectros que corresponden a muestras donde están presentes la fase anatasa y/o rutilo aparece una banda entre 740 y 780  $\text{cm}^{-1}$  que no se pudo asignar debido a que no está reportada en la literatura [38,39].

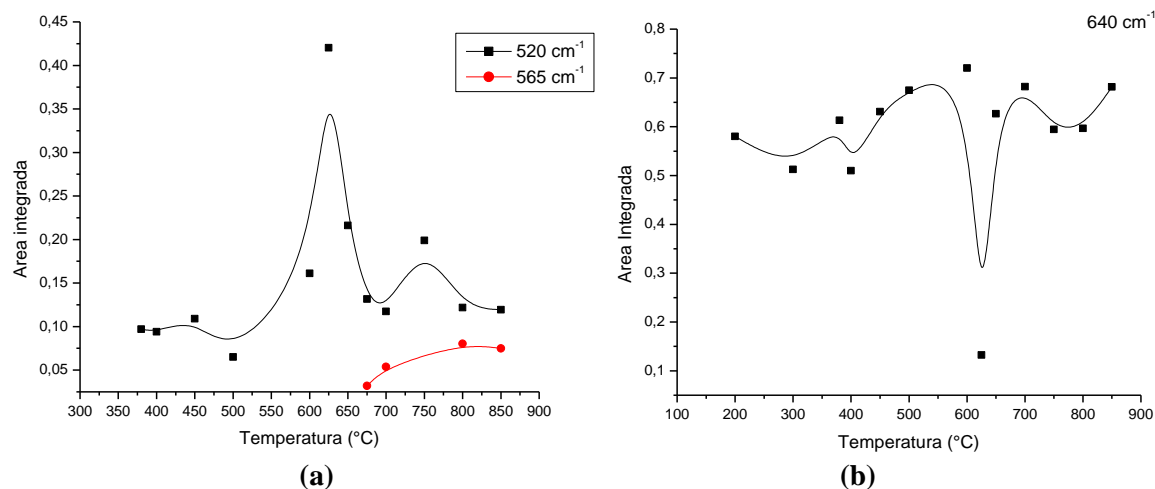
Como se indica en la literatura [39], los espectros IR del  $\text{TiO}_2$  se deben modificar de manera apreciable dependiendo tanto de la morfología como del tamaño de las partículas, siendo el rutilo un caso extremo por su alta polarizabilidad.



**Figura 1.13.** Deconvolución de los espectros IR, región entre 400 y 1000 cm<sup>-1</sup>, de muestras sólidas del sistema de titanio tratadas térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas a: (a) 625°C, (b) 670°C, (c) 700°C, (d) 750°C y (e) 800°C.



En la figura 1.14 se indican los valores de área integrada,  $A_b/A_T$ , correspondientes a las bandas más importantes ubicadas en la región de interés y que están asociadas a los grupos funcionales Ti-O y Ti-O-Ti.

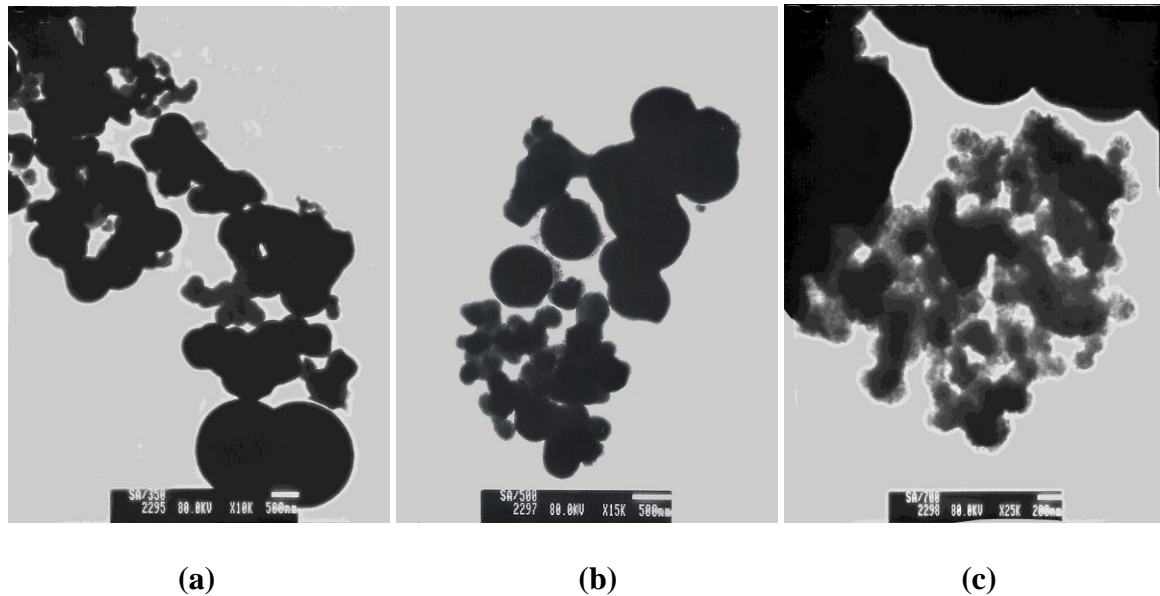


**Figura 1.14.** Evolución del área integrada,  $A_b/A_T$ , de los modos vibracionales correspondientes a las bandas: (a) 520 y 565  $\text{cm}^{-1}$  y (b) 640  $\text{cm}^{-1}$  del sistema de titanio.

La banda ubicada a 520  $\text{cm}^{-1}$ , asociada al grupo funcional Ti-O-Ti, se mantiene aproximadamente constante entre 350 y 500°C, a partir de esta temperatura presenta un crecimiento significativo, alcanzando un valor máximo a 625 °C, a partir de allí disminuye hasta adquirir un valor aproximadamente constante a los 700°C. La banda a 565  $\text{cm}^{-1}$  (especie  $A_{2g}$  [39]), característica de la fase rutilo, comienza a ser evidente a 670°C. Por otro lado, la banda a 640  $\text{cm}^{-1}$ , asociada al enlace Ti-O [40], presenta un mínimo a 625°C y se mantiene aproximadamente constante a las otras temperaturas. Considerando estos resultados, se puede proponer que la transición de fase anatasa – rutilo es posible que ocurra entre ~ 625 y ~ 670 °C donde son evidentes cambios apreciables de las bandas a 520 y 640  $\text{cm}^{-1}$  y el surgimiento de la banda a 565  $\text{cm}^{-1}$  típica del rutilo.

#### 1.3.4. Morfología y tamaño de partícula

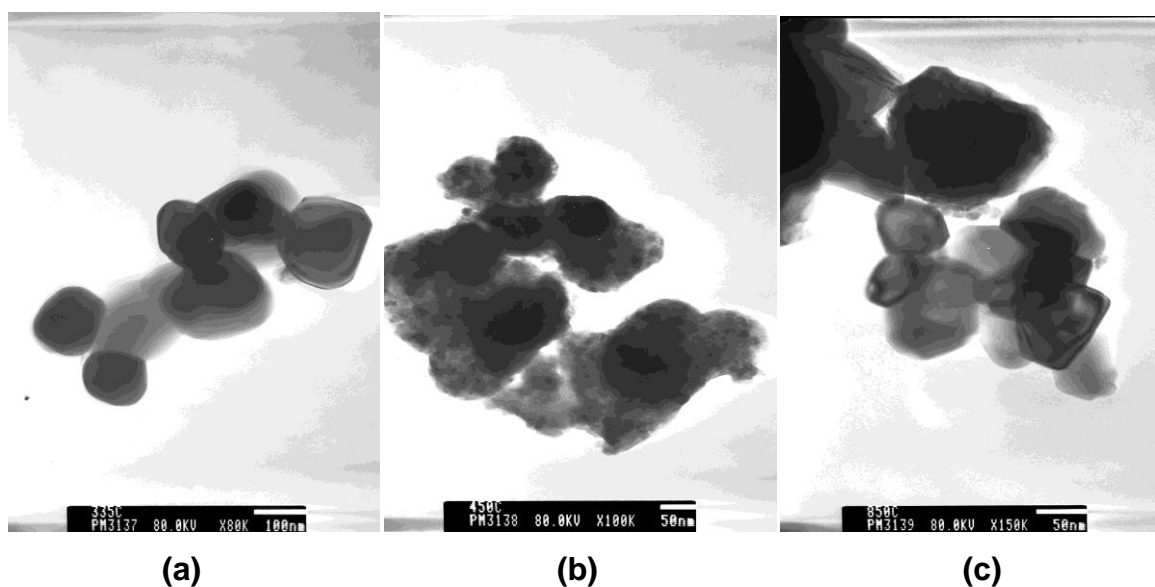
En la figura 1.15 se muestran las fotografías tomadas con MET de polvos cerámicos sintetizados por sol-gel, tratados a 350°C, 500°C y 700°C, durante 2 horas; las suspensiones preparadas se agitaron con un agitador mecánico convencional. En estas fotografías se observan partículas con formas esferoidales, con un tamaño promedio de 100 nm y otras que superan los 500 nm de diámetro. Se puede apreciar que, a medida que se aumenta la temperatura a la que es tratada la muestra, las partículas se van uniendo, formando cuellos entre ellas, generando partículas de mayor tamaño, figuras 1.15(a) y 1.15(b), favoreciendo la sinterización de las partículas primarias. En la figura 1.15(c) se observan partículas irregulares de ~100 nm que podrían estar relacionadas con la nueva fase cristalina presente en el sólido, la tipo rutilo.



**Figura 1.15.** Fotografías obtenidas con MET de material en polvo del sistema de titanio tratado térmicamente a: (a) 350°C/2h; (b) 500°C/2h y (c) 700°C /2h.

Con el fin de romper aglomerados que se presentan en las muestras analizadas (figura 1.15), se realizó un proceso de molienda en atricción. Para determinar el efecto de la molienda en la morfología y el tamaño de partícula de los polvos de

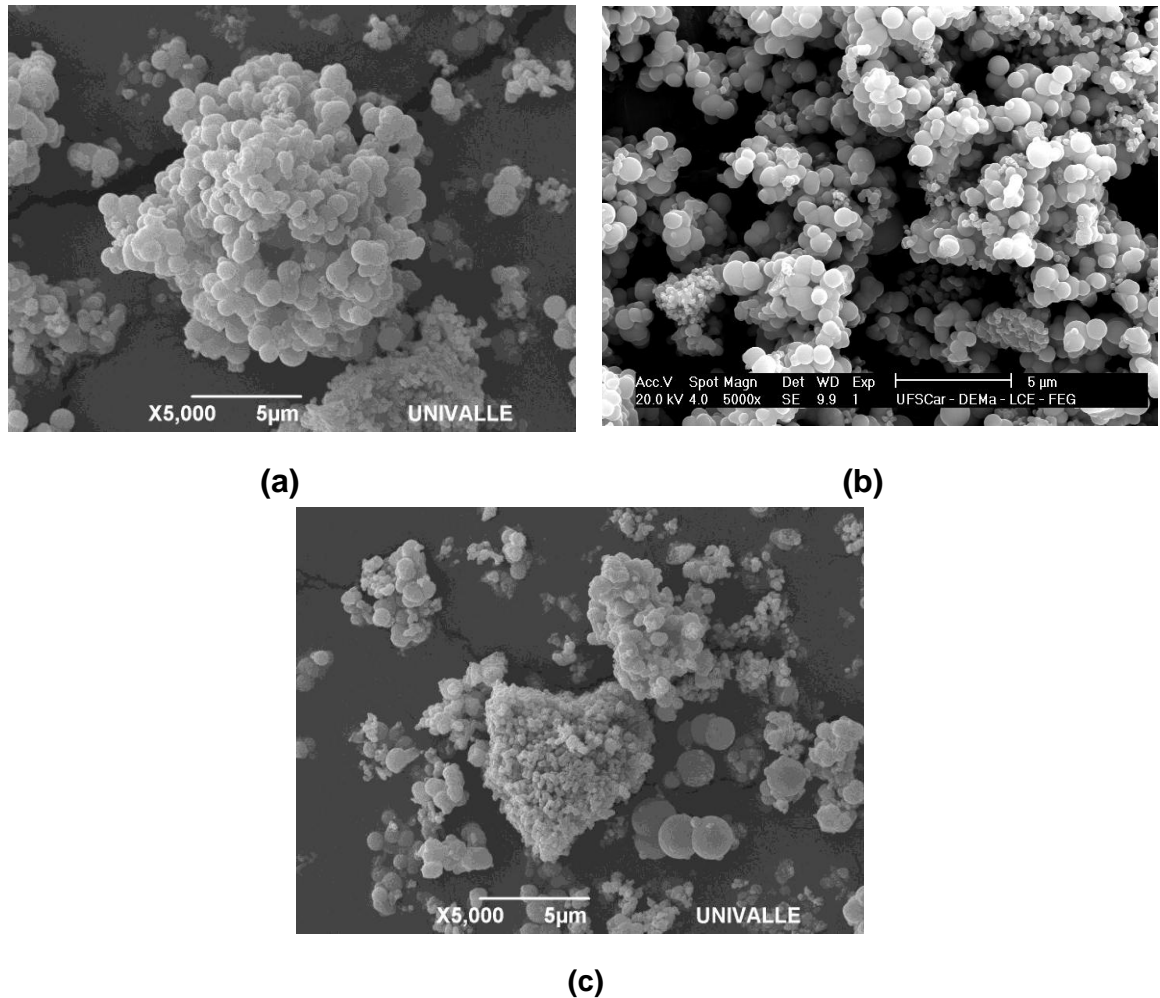
TiO<sub>2</sub> sintetizados, se realizó la molienda por atricción durante 4 horas. Para llevar a cabo la técnica MET las suspensiones preparadas se dispersaron mediante la aplicación de 8 minutos de ultrasonido, tal como lo sugieren autores para obtener suspensiones estables [41]; obteniéndose así suspensiones coloidales estables y de tamaños de partícula suficientemente pequeños, en comparación con los obtenidos por agitación mecánica, para evitar agregación y sedimentación. Este procedimiento permitió obtener resultados reproducibles, los resultados se muestran en la figura 1.16. La molienda por atricción permitió romper los aglomerados y obtener las partículas primarias con un tamaño de partícula de ~100 nm, para el material amorfo, para la fase anatasa < 50 nm y para la fase rutilo 50nm aproximadamente.



**Figura 1.16.** Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, de muestras de titanio molido por atricción, durante 4 horas y tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h (amorfo); (b) 450°C/2h (anatasa) y (c) 850°C /2h (rutilo).

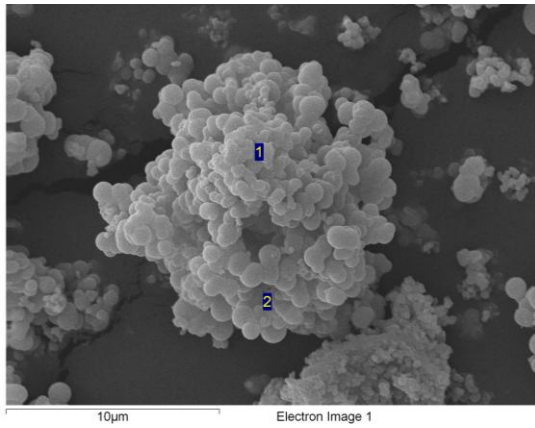
El tamaño de partícula obtenido en función de la dispersión, es de  $\leq 50\text{nm}$  cuando la muestra se ha molido con atricción y dispersado con ultrasonido y de  $\geq 100\text{nm}$  cuando la dispersión se ha realizado por simple agitación mecánica.

En la figura 1.17 se muestran las micrográficas obtenidas con MEB de sólidos del sistema de titanio tratado a 335 y 850°C por 2 horas, con molienda en atricción y una muestra tratada a 450°C por dos horas, sin molienda en atricción. En ellas se observó la presencia de aglomerados mayores a 10  $\mu\text{m}$ , compuesta de partículas menores a 1  $\mu\text{m}$ .



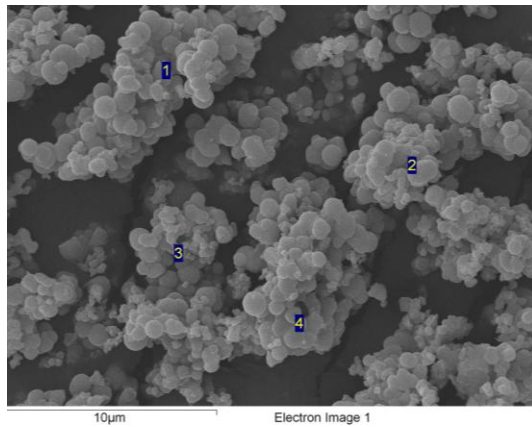
**Figura 1.17.** Micrográficas obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio obtenido tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h, (b) 450°C/2h y (c) 850°C /2h.

Además, los sólidos del sistema de titanio se caracterizaron por espectroscopia de energía dispersiva (EDS), para determinar los elementos presentes en el material cerámico.



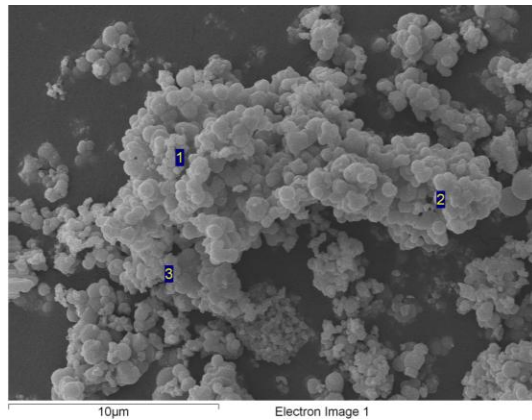
Spectrum	O	Ti	Total
1		100.00	100.00
2	47.56	52.44	100.00
Max.	47.56	100.00	
Min.	47.56	52.44	

(a)



Spectrum	O	Ti	Total
1	36.57	63.43	100.00
2	48.45	51.55	100.00
3		100.00	100.00
4	45.72	54.28	100.00
Max.	48.45	100.00	
Min.	36.57	51.55	

(b)



Spectrum	O	Ti	Total
1	49.64	50.36	100.00
2	53.32	46.68	100.00
3	59.65	40.35	100.00
Max.	59.65	50.36	
Min.	49.64	40.35	

(c)

**Figura 1.18.** Espectroscopia de energía dispersiva, obtenida del sólido del sistema de titanio obtenido tratado térmicamente a: (a) 335°C/2h, (b) 450°C/2h y (c) 850°C/2h.

El análisis de EDS (figura 1.18) se realizó para las sólidos del sistema de titanio tratado a 335°C (amorfa), 450°C (anatasa) y 850°C (rutilo), por 2 horas, en él se observa que la cantidad de titanio y oxígeno, se modifica si se tiene una estructura diferente del óxido. Así, para el TiO<sub>2</sub> amorfo existen zonas ricas en titanio y otras que contiene titanio-oxígeno. Luego, al tratar la muestra amorfa térmicamente se obtuvo la fase anatasa donde existen aún zonas ricas en titanio, en menor cantidad, y una gran cantidad de titanio-oxígeno; y al aumentar la temperatura de tratamiento, se obtuvo fase rutilo donde se observa que no hay zonas ricas en titanio y predomina en la mayoría de la muestra el titanio-oxígeno.

### **1.3.5. Características adicionales del TiO<sub>2</sub> sintetizado**

Para complementar la caracterización del TiO<sub>2</sub> sintetizado en este trabajo de investigación, se realizaron ensayos para determinar la superficie específica BET y el potencial Zeta de los mismos, características de interés si se consideran los usos potenciales de este óxido. Los espectros de UV- visible obtenidos para estas muestras, evidencian las bandas de absorción del TiO<sub>2</sub> y su respuesta ante la incidencia sobre él de la radiación en este intervalo de longitudes de onda.

#### **1.3.5.1. Superficie específica**

La determinación experimental del área específica de las muestras de TiO<sub>2</sub> ha sido realizada por el método BET de adsorción de gases. En la tabla 1.6 se presentan los valores de superficie específica de los sólidos del sistema de titanio sintetizados tratados a 330 °C, 450°C y 800°C por dos horas, parámetro que da información sobre la reactividad fisicoquímica de las mismas. Con base a los resultados obtenidos presentados en la tabla 1.6, se puede observar que a medida que el sistema de titanio es tratado a una mayor temperatura el valor de la superficie específica disminuye o sea que su reactividad disminuye.

**Tabla 1.6.** Valores de superficie específica (BET).

Muestra	Superficie específica (m <sup>2</sup> /g)
Amorfo	17.445±0.03
Anatasa	8.3543 ± 0.3292
Rutilo	3.9444±0.1918

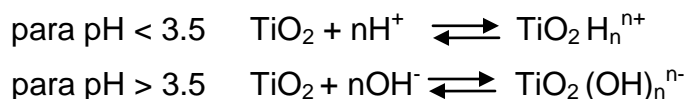
### 1.3.5.2. Potencial Zeta

Al considerar dispersiones de óxidos metálicos en agua, se encuentra que los iones determinantes del potencial del óxido son, principalmente, el OH<sup>-</sup> y el H<sup>+</sup> del agua y que el punto de carga nula (PZC, *Point of Zero Charge*) de las partículas se define como el pH del medio para el cual la carga total sobre su superficie es nula. Con el fin de determinar, de manera específica, el comportamiento de la carga superficial del TiO<sub>2</sub> fase anatasa, con el pH del sistema, se utilizó el equipo de Adsorción – desorción de gases Micromeritics ASAP 2010 (servicio brindado por la Universidad de Antioquia) para obtener los valores de potencial zeta y la conductividad en función del pH del medio. En la tabla 1.7 se indican los valores obtenidos para este ensayo. Ya que el pH natural de la muestra era de ~5.47, fue necesario añadir cantidades mínimas de NaOH para incrementar el pH del sistema hasta que se alcanzó un valor de pH básico de ~10,72. Por otro lado, para llevar el sistema a valores más bajos de pH se añadieron cantidades controladas de HCl. De acuerdo a los valores indicados en la tabla 1.7, al adicionar el HCl la carga superficial negativa, sobre las partículas de TiO<sub>2</sub>, disminuyó hasta que alcanzó un valor cero (ubicación del punto isoeléctrico que normalmente coincide con el PZC) y por la presencia de H<sup>+</sup> en el sistema, la superficie del TiO<sub>2</sub> debió adquirir una carga positiva que aumentó a medida que el pH disminuyó a un medio más ácido.

**Tabla 1.7.** Valores de potencial Z y conductividad del sistema de titanio obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h.

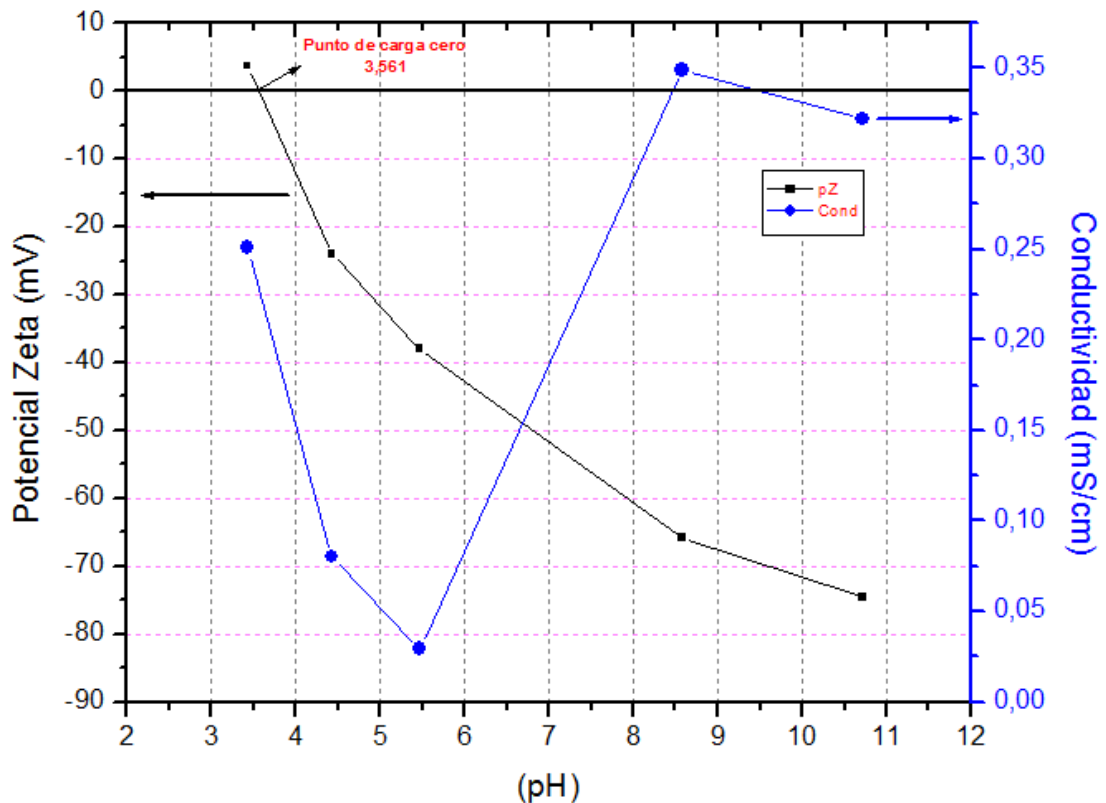
pH	Potencial Z (mV)	Conductividad (ms/cm)
3,43	3,67	0,251
4,43	-24	0,0805
5,47 (pH natural)	-38	0,0293
8,57	-65,8	0,349
10,72	-74,6	0,322

En la figura 1.19 se muestran las curvas de potencial Z y conductividad, en función del pH, caracterización que se realizó en un intervalo de pH entre ~3 y ~11, a 25.1 °C, evidenciándose la presencia de carga superficial positiva entre pH 3.43 y ~ 3.56 y carga superficial negativa para los demás valores de pH mayores a ~3.56, aumentando su negatividad conforme aumentaba el pH. El punto isoeléctrico se determinó de la curva, obteniéndose un valor de pH de 3.561, que discrepa de los valores reportados en la literatura: 6.25 [42], ~5.5 [43], pero según Furlong y Parfitt [44] los mejores valores estarían entre 4.8 - 5.6, aunque otros valores han sido obtenidos [45,46]. Estos datos corresponden principalmente, al TiO<sub>2</sub> fase rutilo pero según Lyklema [47] el valor del punto isoeléctrico para el TiO<sub>2</sub> fase anatasa estaría unas décimas por encima del valor para el rutilo, ya que los cristales de anatasa pueden estar cubiertos por una delgada capa de rutilo. No hay que olvidar que las propiedades superficiales de las partículas dependen del método de síntesis empleado. Por otro lado, las propiedades superficiales ácidas y básicas del TiO<sub>2</sub> se pueden expresar así [48]:



Condición que permitiría justificar el valor obtenido en este trabajo del punto isoeléctrico.





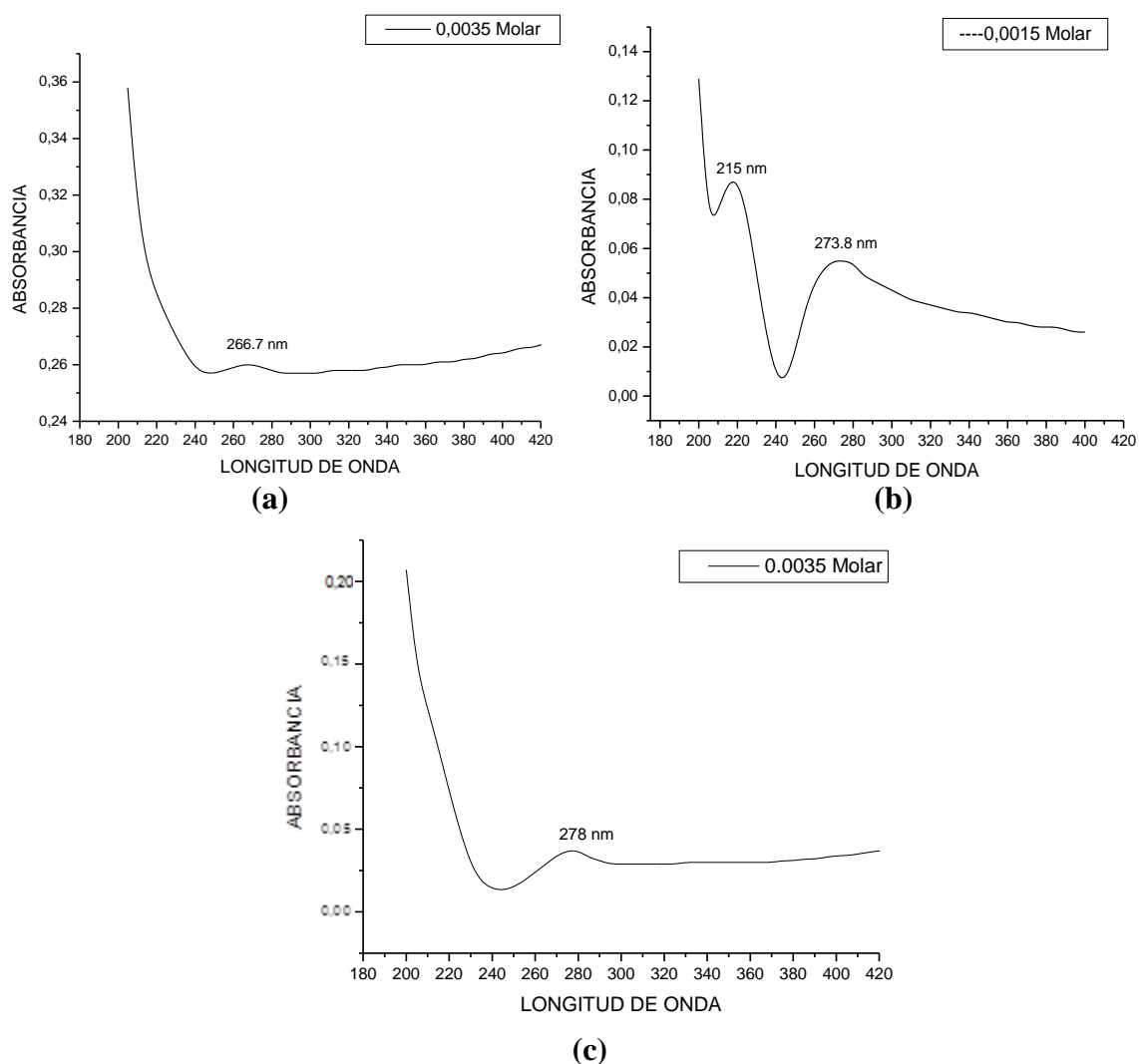
**Figura 1.19.** Gráfica de potencial Z y Conductividad en función del pH del sistema de titanio tratado térmicamente a 450 °C/2h.

### 1.3.5.3. Espectroscopia UV- Visible

Las medidas de absorbancia UV-visible se utilizó un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (UV/VIS) Spectronic Genesys 5, este es un equipo de doble haz que permite medir simultáneamente una referencia y la muestra de interés. Su rango de trabajo está entre los 200 nm y 1000 nm, con un paso de longitud de onda variable entre 1 y 5 nm. Las medidas se realizaron colocando un volumen de muestra de ~2 ml en una cubeta de cuarzo de 1cm de “paso de luz”. La muestra de suspensión dispersa de TiO<sub>2</sub> a analizar se obtuvo colocando en 250 ml de agua 69,9 mg de la fase de TiO<sub>2</sub> correspondiente. Luego se disperso utilizando ultrasonido y se filtró la suspensión para eliminar las “grandes” partículas, del orden de los cientos de nm, garantizando así que sólo quedarán

las < a 100 nm reduciendo de manera apreciable el efecto “dispersivo” de las “nanopartículas”.

De los espectros de UV obtenidos, figura 1.20, se determinaron los máximos de absorción de la radiación, valores de gran interés para optimizar las condiciones de irradiancia y absorción de las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$  (amorfa, anatasa y rutilo) con el fin de lograr un buen efecto “fotocatalizador”, generación de pares electrón – hueco, importante para la funcionalidad de interés de este proyecto.



**Figura 1.20.** Espectros de absorción UV- visible correspondientes a diferentes concentraciones del  $\text{TiO}_2$  sintetizado en este trabajo: (a) amorfo (335°C), (b) anatasa (450°C) y (c) rutilo (850°C).

Observando cuidadosamente los espectros UV-visible de la figura 1.20 se observan cambios en la ubicación de los máximos de absorción presentándose para el  $\text{TiO}_2$  amorfo dos máximos de absorbancia alrededor de  $\sim 200$  y  $266.7$  nm; en el caso del  $\text{TiO}_2$  fase anatasa los máximos se ubicaron a  $215$  y  $273,8$  nm y para el  $\text{TiO}_2$  fase rutilo a  $\sim 200$  y  $278$  nm. Según la literatura [49], las bandas entre los  $205$  y  $215$  nm se pueden atribuir a especies disueltas aisladas de óxido de titanio coordinadas tetraédricamente, mientras que aquellas ubicadas a  $\lambda > 250$  nm pueden asociarse a centros de  $\text{Ti(IV)}$  en coordinación penta y octaedral que daría información de la estructura de las nanopartículas ( $< 100$  nm) en suspensión. Dado el pequeño tamaño de las partículas, su solubilidad debe aumentar y las especies disueltas aisladas deben corresponder al producto de esta disolución.

#### 1.4. Conclusiones

- ✚ El método de síntesis utilizado en este trabajo, el proceso sol-gel, permitió obtener de manera controlada las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$ . Este es un método reproducible que permite garantizar unas características predeterminadas en el producto: tipo de fase, pequeño tamaño de partícula y buena pureza química, considerando sus potenciales aplicaciones tecnológicas.
- ✚ Utilizando espectroscopia IR se pudo estudiar la evolución del sistema de titanio considerando los grupos funcionales presentes en las muestras, cambios ocasionados por las diferentes reacciones fisicoquímicas que ocurrieron tanto en el seno de la suspensión coloidal como en la estructura de los sólidos. Se pudo determinar, empleando esta técnica, que la transición de fase anatasa-rutilo comienza a ocurrir por encima de los  $625^\circ\text{C}$ .

- ✚ A través del análisis con espectroscopia infrarroja y correlacionando estos datos con los resultados de DRX, se pudo determinar cualitativamente la presencia, en la muestra, de  $\text{TiO}_2$  amorfo, fase anatasa o rutilo a las diferentes temperaturas de estudio; lo anterior se pudo realizar con base en la presencia de las bandas características de estos compuestos en el intervalo espectral entre  $400$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$ . La forma de las bandas, en esta región, se va modificando dependiendo de la fase de  $\text{TiO}_2$  presente en el sólido. Se pudo determinar la ubicación de las bandas características de cada una de las diferentes fases cristalinas del  $\text{TiO}_2$  a través del proceso de deconvolución en este rango del espectro; estas bandas se pueden tomar como referentes para determinar, en una muestra desconocida, la presencia o no de una cierta fase del  $\text{TiO}_2$  en el sólido.
- ✚ El estudio de difracción de rayos X de los sólidos obtenidos, complementó la determinación de los rangos de estabilización de las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$  y mostró que el sólido tratado térmicamente a temperaturas menores a  $380^\circ\text{C}$  presentaba una estructura completamente amorfa y que para temperaturas de tratamiento mayores a  $450^\circ\text{C}$  el  $\text{TiO}_2$  cristalizaba como el  $\text{TiO}_2$  fase anatasa, siendo la principal fase cristalina hasta  $\sim 700^\circ\text{C}$  y a partir de esta temperatura se presentó la fase rutilo como fase mayoritaria.
- ✚ Los estudios de morfología y tamaño de partícula mostraron que las partículas primarias, independientemente de la fase cristalina predominante, presentaron una forma irregular, con bordes suaves y un tamaño de partícula de  $\sim 50\text{nm}$ .
- ✚ Utilizando la espectroscopia UV-visible fue posible determinar las principales bandas de absorción para las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$  sintetizado (amorfa, anatasa y rutilo). Los máximos se ubican en posiciones ligeramente diferentes lo que hace preveer diferentes respuestas a la radiación, entre  $200$  y  $300\text{ nm}$

que es el rango donde se presentan los máximos. Para todas las fases se registra la presencia de especies tetraédricas aisladas del óxido de titanio, producto de la disolución de las nanopartículas del TiO<sub>2</sub> (menores a 100nm), y de centros de Ti(IV) coordinados penta y octaédricamente que daría información de la estructura “sólida” de las nanopartículas.

## **Bibliografía**

- [1] W.J. Cooper, E. Cadavid, M.G. Nickelsen, K.J. Lin, C.N. Kurucz, T.D. Waite, *J. Am. Water Work Assoc.* 85 (1993) 106.
- [2] D.W. Hand, D.L. Perram, J.C. Crittenden, *J. Am. Water Work Assoc.* 87 (1995) 84.
- [3] E.R. Blatchley III, D. Margetas, R. Duggirala, *Water Res.* 37 (2003) 4385–4394.
- [4] K.L. Simpson, K.P. Hayes, *Water Res.* 32 (5) (1998) 1522–1528.
- [5] M.I. Cedregren, A.J. Selbing, O. L’ofman, B.A.J. K’allen, *Environ. Res. Sect. A* 89 (2002) 124–130.
- [6] C.G. Graves, G.M. Matanoski, R.G. Tardiff, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34 (2001) 103–124.
- [7] J. Kim, Y. Chung, D. Shin, M. Kim, Y. Lee, Y. Lim, D. Lee, *Desalination* 151 (2002) 1–9.
- [8] J. Milot, M.J. Rodriguez, J.B. Serodes, *J. Environ. Manage.* 60 (2000) 155–171.
- [9] Askeland, D. *Ciencia e Ingeniería de Materiales Cerámicos*. Editorial Thomson. 3ª ED. 1998.
- [10] Daniel M. Blake, Pin-Ching Maness, Zheng Huang, Edward J. Wolfrum, and Jie Huang. *Application of the Photocatalytic Chemistry of Titanium Dioxide to Disinfection and the Killing of Cancer Cells. Separation and Purification Methods. Volume 28(1) 1999, pp. 1-50.*
- [11] M. Song, R. Zhang, Y. Dai, F. Gao, H. Chi, B. Chen, X. Wang. *The in Vitro Inhibition of Multidrug Resistance by Combined Nanoparticulate Titanium dioxide and UV Irradition.*
- [12] K. Sunada, Y. Kikuchi, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) pag. 726.

- [13] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, N. Nakamura, T. Komine, Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988) 1330.
- [14] R.J. Watts, S.H. Kong, M.P. Orr, G.C. Miller, B.E. Henry, Water Res. 29 (1995) 95.
- [15] S. Lee, M. Nakamura, S. Ohgaki, J. Environ. Sci. Health A 33 (1998) 1643.
- [16] T. Matsunaga, T. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake, FEMS Microbiol. Lett. 29 (1985) 211.
- [17] T. Saito, T. Iwase, J.M.T. Horie, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 14 (1992) 369.
- [18] P.C. Maness, S. Smolinski, D.M. Blake, Z.H.E.J. Wolfrum, W.A. Jacoby, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4094.
- [19] Z. Huang, P.-C. Maness, D.M. Blake, E.J. Wolfrum, S.L. Smolinski, W.A. Jacoby, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 130 (2000) 163.
- [20] K. Sunada, T. Watanabe, K. Hashimoto, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 156 (2003) 227.
- [21] D.M. Blake, P.C. Maness, Z. Huang, E.J. Wolfrum, J. Huang, W.A. Jacoby, Separation Purification Methods 28 (1999) 1.
- [22] F. J. Gil Mur, C. A. Bádenas, J. M. Manero Planella, D. R. Riuz. Aleaciones Ligeras. Ediciones UPC. 2001.
- [23] U. Müller. Inorganic Structural Chemistry, second edition, John Wiley & Sons, Ltd, England 2007, pag. 57.
- [24] A. Gordon and Tristan. "SI Chemical Kenalf Data Book", fourth edition, (2002), pp 120-130.
- [25] M. A. Cuevas Diarte, T. Calvet. Problemas de Cristalografía. 1ª Edición. 2002.
- [26] Roberto J. Candal, Juan Rodríguez, Gerardo Colón, Silvia Gelover, Elena Vigil Santos, Antonio Jiménez González y Miguel A. Blesa. Materiales para Fotocatálisis y Electrofotocatálisis. Cap. 7.
- [27] Juan Rodríguez, Roberto J. Candal, José Solís, Walter Estrada, y Miguel A. Blesa. El fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones. Cap. 9.
- [28] K. Akurati, "Synthesis, characterization and sintering of nanocrystalline titania powders produced by chemical vapour synthesis". *Joint Research Laboratory Nanomaterials*, Institute for Materials Science. Darmstadt (Germany), pp 2248-2254, 2006.
- [29] H. P. Shivaraju, K. Byrappa, T. M. S. Vijay Kumar, C. Ranganathaiah, "Hydrothermal Synthesis and Characterization of TiO<sub>2</sub> Nanostructures on the Ceramic Support and their Photo-catalysis Performance", *Bulletin of the Catalysis Society of India*, vol. 9, pp. 37-50, 2010

- [30] H. R. Clauser, *The Encyclopedia of Engineering Materials and Processes*. Barcelona (España), Editorial Labor S. A., 1990, pp. 806-807.
- [31] H. Monreal, V. A. Martínez, "Obtención de (nanocilindros) de TiO<sub>2</sub> por ADN mediante Sol-Gel". *Rev. del Centro de Inv. México*, vol. 6, Núm. 23, ene – jun, 2005, pp. 21-26.
- [32] M.P. Pechini, "Method of preparing lead and alkaline earth titanates and niobates and coating method using the some to form a capacitor". *US Patent No.* 3,330,697, 11 July 1967.
- [33] J. Livage, et al, "Sol –Gel Chemistry of transition metal oxides", Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée, CNRS(UA 302), Université Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.
- [34] Sumio Sakka. HANDBOOK of SOL–GEL SCIENCE and TECHNOLOGY. Processing, Characterization and Applications.
- [35] Sumio Sakka. HANDBOOK of SOL–GEL SCIENCE and TECHNOLOGY. Processing, Characterization and Applications.
- [36] J. E. Rodríguez-Páez, A. Mafla, G. Andrade, G. Latorre. Obtención de soles estables de Sílice-Titania utilizando como acomplejante acetilacetato. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, Vol. 22, No. 1, 2002, 16-20.
- [37] G. Camargo, H. M. Galindo. "Estudio de la obtención de sustratos cerámicos para membranas inorgánicos". *Ing. Investig.* Vol. 25, No.2 Bogotá May/Aug. (2005).
- [38] J.T. Luxon, & R. Summitt, Interpretation of the infrared absorption spectra of stannic oxide and titanium dioxide (rutile) powders, *J. Chem. Phys.* 50, pp. 1366-1370.
- [39] V.C. Farmer. *The Infrared Spectra of Minerals*, Edited by Department of Spectrochemistry. The Macaulay Institute for Soil Research Aberdeen., 1974.
- [40] A. Guzmán, A. Fernández, J. E. Rodríguez, Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, Vol 31(121), pp. 529-536, 2007.
- [41] Sumio Sakka. HANDBOOK of SOL–GEL SCIENCE and TECHNOLOGY. Processing, Characterization and Applications.
- [42] W. Stumm, Chemistry of the solid-water interface. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 54, 1992.
- [43] S. Bueno, R. Bueno, C. Baudin, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 24 (9), pp. 2785-2791, 2004.
- [44] D. N. Furlong, G. D. J. Parfitt, *Colloid Interface Sci.* Vol 65. Pp. 548, 1978.
- [45] E.A. Barringer, H.K. Bowen, "High-Purity, Monodisperse TiO<sub>2</sub> powders by hydrolysis of titanium tetraethoxide.

- [46]** Aqueros interfacial Electrochemistry and dispersión stability, Langmuir, Vol. 1, pp. 420-428, 2008.
- [47]** J. Lyklema, Fundamentals of interface and colloid science. Vol. IV particulate colloids. Elsevier Academic Press. Amsterdam, 2005.
- [48]** YIN, H., WADA, Y., KITAMURA, T., KAMBE, S., MORASAWA, S., MORI, H., SAKATA, T., YANAGIDA, S. Hydrothermal synthesis of nanosized anatase and rutilo TiO<sub>2</sub> using amorphous TiO<sub>2</sub>. J. Mater. Chem., Vol. 11, pp. 1694-1703, 2001.
- [49]** J. L.G. Fierro (Ed). Metal oxides, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 612-613, 2006.



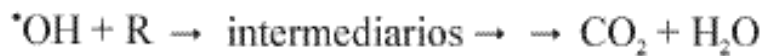
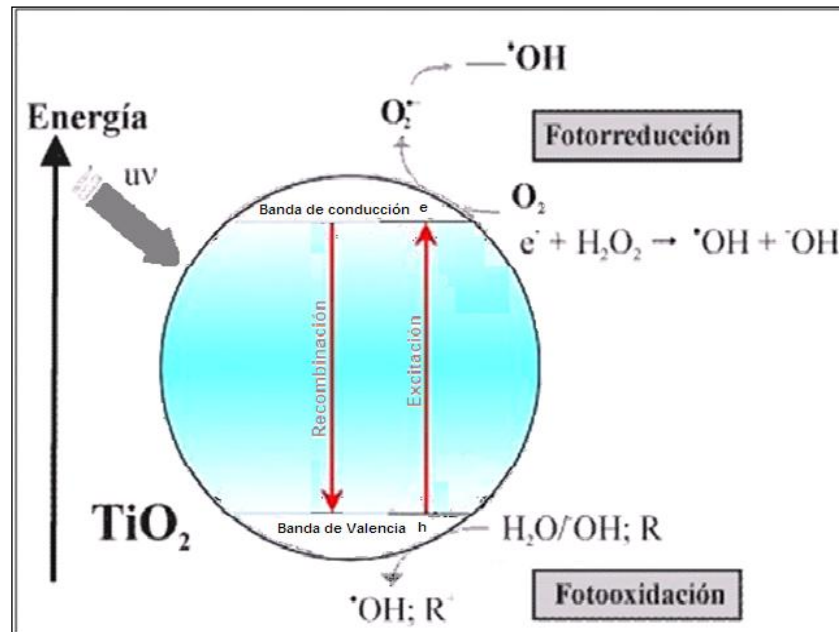
## CAPÍTULO 2

# ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL $\text{TiO}_2$ SINTETIZADO POR EL METODO SOL GEL

---

### 2.1. El Fenómeno de fotocatalisis en el $\text{TiO}_2$

El fenómeno de fotocatalisis que presenta el  $\text{TiO}_2$  se desarrolla utilizando radiación de longitud de onda inferior a 385 nm. Dos de las fases cristalinas que presenta el  $\text{TiO}_2$  muestran actividad fotocatalítica: la anatasa y el rutilo; la fase anatasa (con un “gap” de energía de 3.2 eV) presenta mayor actividad que el rutilo (“gap” de energía de 3.0 eV). Durante el desarrollo del proceso fotocatalítico ocurren varias etapas donde se pueden producir diversas especies químicas reactivas que ocasionan, bajo la incidencia de radiación UV, daños importantes a los microorganismos. El mecanismo de acción se muestra en la figura 2.1 donde, tras la absorción de luz suficientemente energética ( $E > h\nu$ ), se resalta la formación de especies como: radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), debido a los electrones que se ubican en la banda de conducción y a los huecos que se generan en la banda de valencia; estos pares electrón- hueco ( $e^-_{\text{BC}}/h^+_{\text{BV}}$ ) propician reacciones de oxidación y de reducción en la superficie de la partícula de  $\text{TiO}_2$ . El par electrón-hueco se puede recombinar, produciéndose calor, o difundir rápidamente hacia la superficie del catalizador. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por su sigla en inglés) que se producen en la superficie pueden interrumpir, o romper, la función, o la estructura, de las células o virus que rodean al fotocatalizador, de tal manera que la célula o virus, en contacto con la superficie del dióxido de titanio, puede experimentar una directa transferencia de electrones, o de huecos, a uno de sus constituyentes, propiciando la reducción o la oxidación de los mismos [1].



**Figura 2.1.** Esquema del proceso fotocatalítico sobre una partícula semiconductora de  $\text{TiO}_2$  [2].

Considerando más en detalle el mecanismo fotocatalítico que se representa en la figura 2.1, y las características espectrales de absorción del  $\text{TiO}_2$  que favorece su excitación en las regiones del UV-A (320-400nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C (200-280 nm) cuando incide radiación ultravioleta sobre una partícula de  $\text{TiO}_2$ , los fotones de energía superior a la de su ancho de banda (“gap” de energía y que corresponde a la diferencia entre los bordes inferior de la banda de conducción y superior de la de valencia,  $E_G$ ) son absorbidos por el sólido. Existe una probabilidad bastante alta de que estos fotones cedan su energía a electrones de la banda de valencia (BV) y que ellos pasen a ocupar estados energéticos de la banda de conducción (BC), creándose así pares electrón ( $e^-$ ) hueco ( $h^+$ ). Esos pares  $e^-/h^+$  generados se pueden recombinar dentro de los siguientes 10 ns pero si después de 250 ns de su formación algunos de ellos sobreviven, estos pares son atrapados en la superficie del  $\text{TiO}_2$ , tal que los electrones quedarían atrapados en sitios  $\text{Ti}^{4+}$  o muy cercanos a la superficie del  $\text{TiO}_2$  [3].

Cuando el  $\text{TiO}_2$  irradiado está en el agua, los electrones excitados en la banda de conducción pueden reducir el  $\text{O}_2$  dando origen a un ión “superóxido” ( $\text{O}_2^-$ ) que posteriormente se puede reducir produciendo peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a través de las siguientes reacciones [3]:

(2.1)

(2.2)

(2.3)

Pero el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con el ion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), incrementándose la velocidad de fotodegradación y formándose el radical  $\text{OH}$ , radical que también se puede producir cuando los electrones excitados, ubicados en la banda de conducción, reducen el peróxido de la siguiente manera [3]:

(2.4)

(2.5)

Por otro lado, los huecos ( $\text{h}^+$ ) pueden reaccionar con los iones hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y formar radicales  $\text{OH}$ , radical que se puede obtener, también, cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocasiona una descomposición oxidativa del agua; por otro lado la recombinación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede producir peróxido en condiciones aeróbicas [3]:

(2.6)

(2.7)

(2.8)

Tanto el  $\text{OH}$  como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  contribuyen a la degradación de especies o moléculas orgánicas, entre ellas las bacterias [2]. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se utilizaron partículas de  $\text{TiO}_2$ , excitadas con radiación UV, para inactivar bacterias mediante reacciones de oxidación y/o reducción.

La importancia de estudiar suspensiones de  $\text{TiO}_2$ , en medio acuoso, reside en el creciente desarrollo de la fotocatalisis heterogénea como método eficaz para resolver problemas de contaminación bacteriana. Su eficiencia y viabilidad han sido demostradas por numerosos grupos de investigadores, en todo el mundo, a través de una gran cantidad de trabajos que se han venido desarrollando y cuyos resultados se han registrado en publicaciones científicas desde 1985 [4], año en el que se utilizó por primera vez para estos fines, hasta la actualidad [5].

## **2.2. Los semiconductores como fotocatalizadores: interface semiconductor / líquido**

Con el fin de mejorar el mecanismo de inactivación de bacterias, catalizado por un semiconductor ( $\text{TiO}_2$  en el presente caso), es necesario conocer más sobre las propiedades del  $\text{TiO}_2$ . El dióxido de titanio está muy cerca de ser un semiconductor ideal debido a que es relativamente barato, muy estable químicamente y los huecos que son generados por la fotoexcitación, ecuación 2.1, son altamente oxidantes, ecuaciones 2.6 y 2.7, mientras que los electrones generados son lo suficientemente reductores para producir el superóxido, ecuación 2.2, y el peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ecuación 2.3. Por lo tanto, dependiendo de las condiciones exactas del sistema, los huecos, radicales  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  juegan un papel importante en los mecanismos fotocatalíticas de reacción [6].

Cuando el  $\text{TiO}_2$  es irradiado, y la energía de la radiación incidente es mayor que la energía del “gap” del  $\text{TiO}_2$  (3.2 eV para la anatasa y 3.0 eV para el rutilo), se crean pares electrón-hueco que se pueden recombinar rápidamente o si sobreviven son atrapados en la superficie de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , tal como se indicó anteriormente. Estas reacciones fotoquímicas se pueden escribir así:

Fotoexcitación:

(2.1)

Atrapamiento de los portadores de carga:

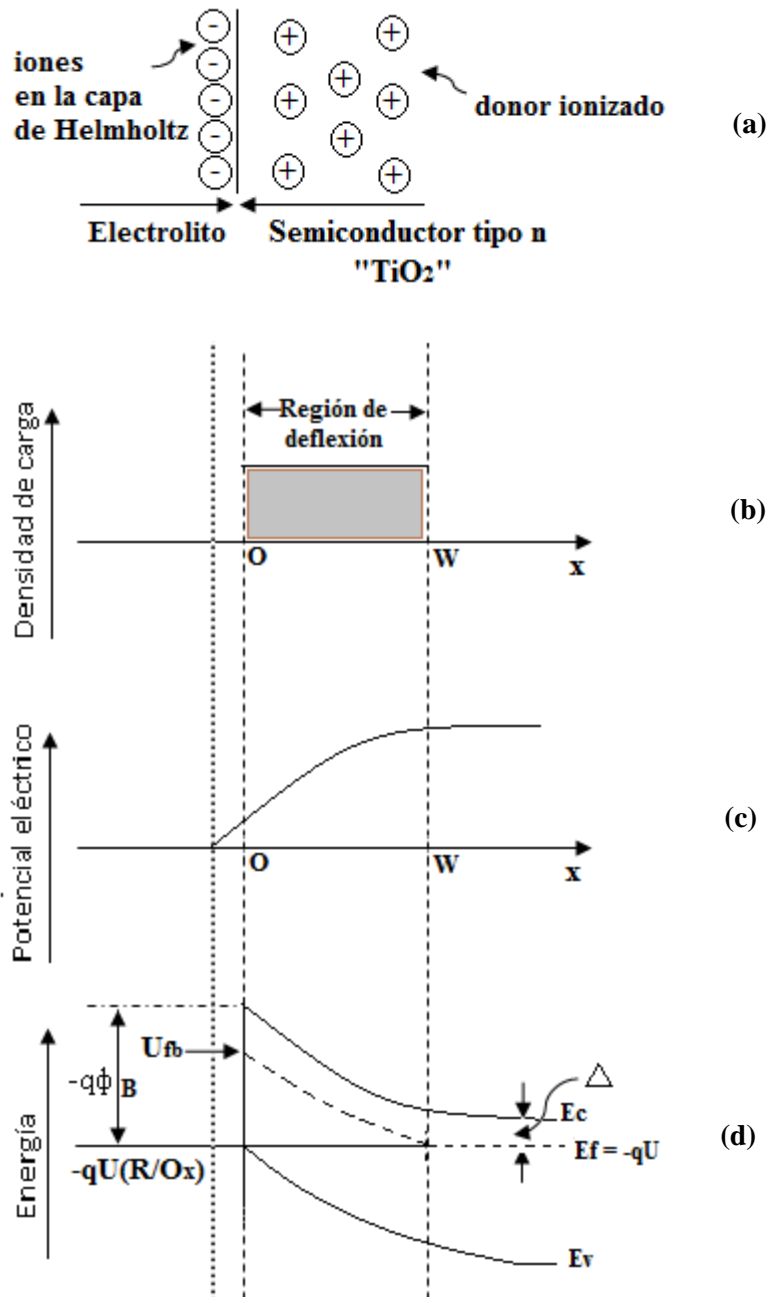
(2.9)

Recombinación electrón-hueco:

(2.10)

Si se desea utilizar las capacidades reductoras de los fotogenerados y la oxidante de los fotogenerados es necesario separarlos de manera efectiva, con poca pérdida de energía, antes que ellos pierdan toda su energía por recombinación generando “calor”. Una forma de lograr esta separación de la carga fotoinducida es a través de la “aplicación o generación de un campo eléctrico (gradiente de potencial)” en aquel lugar donde ocurre la foto-excitación de los electrones [6].

Si un semiconductor está en contacto con una solución electrolítica, cuando se alcanza un equilibrio termodinámico en la interface se debe formar una capa de carga negativa dentro de una delgada región de la superficie del semiconductor, lo que ocasiona que las bandas de energía se “curven” hacia arriba para el caso de los semiconductores tipo “n”. El espesor de esta capa de carga es del orden de 1 a  $10^3$  nm, valor que depende de la densidad de portadores y de la constante dieléctrica del semiconductor. Al generarse en el  $\text{TiO}_2$  un par de  $e^-/h^+$ , este es separado por el “campo eléctrico” generado por la capa de carga tal que los  $e^-$  se mueven a la región interfacial y los  $h^+$  hacia el “interior” del semiconductor. En la figura 2.2 se ilustra esquemáticamente la distribución de carga, figura 2.2(a), la distribución de densidad de carga, figura 2.2(b), la disposición de potencial eléctrico, figura 2.2(c), y la curvatura de las bandas, figura 2.2(d), en la interfase semiconductor/electrolito, asumiendo que no hay carga superficial o dipolos superficiales presentes [6].



**Figura 2.2.** Esquema que ilustra: (a) distribución de carga, (b) distribución de densidad de carga, (c) el potencial eléctrico y (d) la curvatura de las bandas de energía en la interfase semiconductor (TiO<sub>2</sub>)/electrolito considerando que no hay carga superficial ni dipolos superficiales presentes [6].

El potencial eléctrico producido por la capa de carga se puede obtener resolviendo la ecuación de Poisson para una distribución de carga dada, de tal manera que para la interfase semiconductor/electrolito, figura 2.2, el potencial  $\phi(x)$  a una distancia “x” desde la superficie del semiconductor estaría dada por la siguiente expresión [6,7]:

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{qN_D}{\epsilon_0\epsilon_s} \quad (2.9)$$

Tal que  $N_D$ , concentración de donores, es constante a través del semiconductor,  $\epsilon_0$  es la permitividad en el vacío,  $\epsilon_s$  es la constante dieléctrica del semiconductor,  $\phi(0)$  el potencial eléctrico en la superficie ( $x=0$ ) y  $W$  el ancho de la capa de carga. Las expresiones para  $\phi(0)$  y  $W$  están dados por [6,7]:

$$\phi(0) = \frac{qN_D W^2}{2\epsilon_0\epsilon_s} \quad (2.10)$$

$$W = \sqrt{\frac{2\epsilon_0\epsilon_s \phi(0)}{qN_D}} \quad (2.11)$$

Donde “ $d$ ” es el espesor de la capa externa de Helmholtz,  $\phi_{redox}$  es el potencial redox en equilibrio o potencial del electrodo y  $\phi_{banda}$  es el potencial de “banda plana” (cuando las bandas del semiconductor están planas).

Considerando la actividad fotocatalítica del  $TiO_2$ , diversos factores la pueden afectar: su estructura cristalina, el tipo de impurezas que presente, el área superficial o el tamaño de partícula y densidad de grupos hidroxilos superficiales, entre otros posibles parámetros. Adicionalmente, esta actividad puede ser afectada por parámetros ambientales o del entorno: intensidad y longitud de onda de la fuente de luz, tiempo de iluminación, pH del sistema y temperatura [8]. En este proyecto se centró la atención en los factores del primer tipo y se fijaron los parámetros ambientales. Por lo mencionado anteriormente, la actividad fotocatalítica del semiconductor ( $TiO_2$  en este caso) debe ser controlada por tres parámetros básicos: (1) su propiedad para absorber la luz (espectro de absorción de la radiación (figura 1.19) y coeficiente de absorción); (2) la velocidad de

oxidación y reducción del “sustrato” orgánico por los respectivos y y (3) la velocidad de recombinación . Mientras el primer parámetro es determinado por la estructura del seno del sólido semiconductor (“bulk”), y solo las propiedades de difusión y reflexión son controladas por el tamaño de partícula y la textura de la superficie, el segundo parámetro depende más directamente de la naturaleza de la superficie [6].

Concretamente, con relación a la probabilidad de recombinación , se asume que esta recombinación ocurre en los defectos cristalinos [6] y siendo la superficie de las nanopartículas un “gran defecto”, porque se rompe la continuidad de la estructura del “bulk”, mayor área superficial más rápida la recombinación. Pero el área superficial también afecta, positivamente, la velocidad de reacción de los y los con el “sustrato” orgánico, por lo que se debe tener cuidado con la evaluación de esta cantidad porque cuando se puede hacer predominar la “reacción superficial” frente a la recombinación, la fotocatalisis de una área superficial grande sería mejor [6]. Ya que la relación entre las propiedades físicas del semiconductor ( $\text{TiO}_2$  en este caso) y su actividad fotocatalítica no es simple, para optimizar la eficiencia del fotocatalizador semiconductor se deben considerar y analizar parámetros relacionados con las reacciones superficiales y la recombinación .

### **2.3. Uso del $\text{TiO}_2$ fotocatalítico como bactericida**

El tema de la esterilización de células microbiales es de gran importancia en los campos médicos y bio-industriales. Para lograr esta esterilización comúnmente, se utilizan antibióticos y bactericidas, pero no es extraño utilizar métodos físicos como la irradiación con UV. Estos métodos, que son muy efectivos, pueden inducir muchos problemas, por ejemplo toxicidad o mutagénesis por los reactivos. Adicionalmente, se han utilizados métodos electro-químicos destacándose entre ellos el de oxidación electroquímica sobre un electrodo de grafito [9].



Recientes estudios sobre las aplicaciones de la fotocatalisis en la desinfección muestran el efecto de la fotoactividad del dióxido de titanio sobre algunos microorganismos [10]. Estos trabajos indican la capacidad que tiene el  $\text{TiO}_2$  para eliminar un amplio rango de bacterias, Gram negativas y Gram positivas, hongos filamentosos y unicelulares, algas, protozoos, virus de mamíferos y bacteriófagos. De sus resultados se puede concluir que el mecanismo de muerte involucra, principalmente, la degradación de la pared celular y la membrana citoplasmática, de las bacterias, debido a la producción, por parte del  $\text{TiO}_2$  activado por irradiación, de especies reactivas de oxígeno así como de radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno a través de reacciones como las que se indican en las ecuaciones 2.1 a 2.7. Esto conduce, en principio, a la pérdida de contenido celular y a la posterior lisis celular que puede llevar a la completa mineralización del organismo. Este proceso de inactivación es más eficiente cuando hay un contacto cercano entre los organismos y el catalizador  $\text{TiO}_2$  [10].

Concretamente para la inactivación de bacterias, haciendo uso de la fotocatalisis heterogénea, se ha venido utilizando el  $\text{TiO}_2$  ya que este óxido ha demostrado ser un buen candidato para cumplir esta función frente a diferentes tipos de bacterias. Matsunaga y colaboradores [4,11] fueron los primeros en reportar resultados de un nuevo sistema fotoquímico de esterilización en el cual una cepa de *E. coli* fue inactivada con polvos de dióxido de titanio. Ellos inmovilizaron los polvos del semiconductor sobre membranas de acetilcelulosa para tener un mayor control sobre ellos y poderlos recuperar, aunque también trabajaron con el material en polvo, y luego los colocaron en un reactor donde fueron expuestos a la irradiación de una lámpara de mercurio; junto con una cepa de *E. coli*. Los resultados de este trabajo indican que la esterilización del *E. coli* utilizando el  $\text{TiO}_2$  es efectiva para bajas concentraciones de la bacteria ( $<10^3$  cells/ml), que su sobrevivencia decrece con el incremento de la intensidad de la luz así como con la concentración de polvos de  $\text{TiO}_2$  inmovilizado y tiempos medios de residencia (exposición al  $\text{TiO}_2$  irradiado) de 16 minutos, este sistema de esterilización fue

muy estable, permitiendo su uso durante una semana con tasas de sobrevivencia de las bacterias <1%.

Por otro lado, Saito e investigadores [12] mostraron que el  $\text{TiO}_2$  presentaba actividad fotocatalítica bacteriana sobre otras clases de bacterias. Ellos utilizaron el  $\text{TiO}_2$  para inactivar al streptococo sobrinus AHT (bacteria oral) y encontraron que con una concentración de 1 mg /ml de óxido eliminaban completamente  $10^5$  unidades formadoras de colonia, por el mililitro, de bacterias, dentro de 1 minuto. Cuando usaron una densidad bacteriana más alta,  $10^8$  unidades formadoras de colonia por ml, los resultados mostraron que la acción fotocatalítica era bastante efectiva después de los 60 min, alcanzándose la destrucción completa de las cepas bacterianas a los 120 minutos. En este caso la co-agregación del  $\text{TiO}_2$  y las bacterias jugaron un papel importante; ellos se fueron descomponiendo a medida que se irradiaban con la luz. Los resultados de Saito et al. [12] indican que para obtener una mayor información sobre la muerte bacteriana, que parece deberse principalmente a un desorden significativo en las membranas de la célula, se debe poner atención a los cambios que ocurren en el pH de la mezcla durante la reacción y a la fuga o pérdida de  $\text{K}^+$  ya que, siendo la acumulación de  $\text{K}^+$  una característica universal de los sistemas vivos, estas “fugas” serían indicadores del cambio en la permeabilidad de las membranas. Ellos asumen que el daño de la membrana se debe principalmente a la oxidación de la membrana ocasionada por las especies reactivas de oxígeno, el superóxido, o los radicales hidroxil, generados por el  $\text{TiO}_2$  irradiado.

La investigación sobre la acción fotodegradante del  $\text{TiO}_2$  sobre cepas bacterianas continuó después de estos trabajos pioneros, más específicamente sobre la *Escherichia coli*, con el interés de conocer el posible mecanismo que hace que el  $\text{TiO}_2$  las degrade y elimine [5,13-16]. Como ya se indicó anteriormente, el estudio que se realizó en este trabajo sobre el efecto fotodegradante del  $\text{TiO}_2$  sobre el *E. coli* y el *S. aureus* se centro más en características del material que

en los parámetros ambientales y para ello se consideraron como referentes algunos trabajos realizados previamente, principalmente sobre el efecto del tamaño de partícula [17,18] y la cristalinidad del TiO<sub>2</sub> [19, 20] sobre su acción fotocatalítica.

## **2.4. Bacterias**

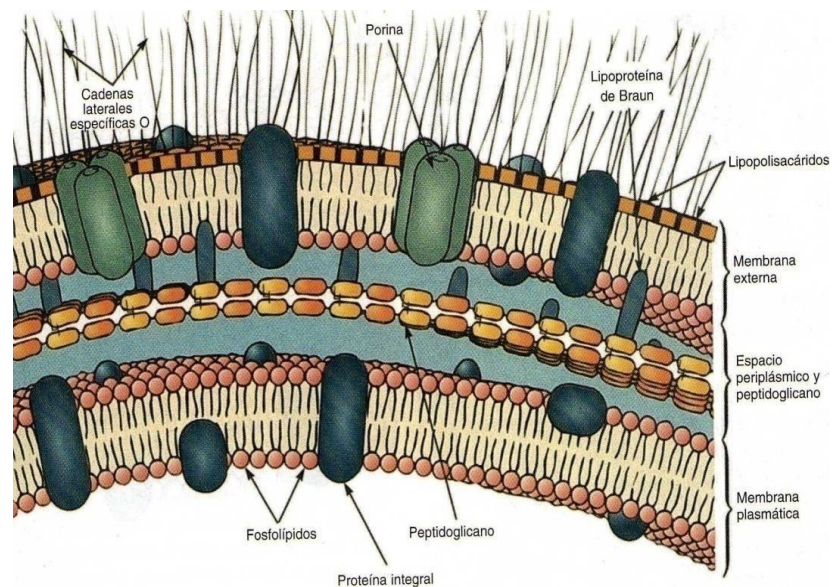
Ya que las bacterias son importantes para este trabajo es necesario conocer un poco más sobre ellas. Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta. Se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos, y crecen hasta en las condiciones más extremas como, por ejemplo, en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos y en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre [21].

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros, entre 0,5 y 5 µm, y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (que poseen los animales, las plantas, los hongos, etc.), no tienen un núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos; ellas poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano.

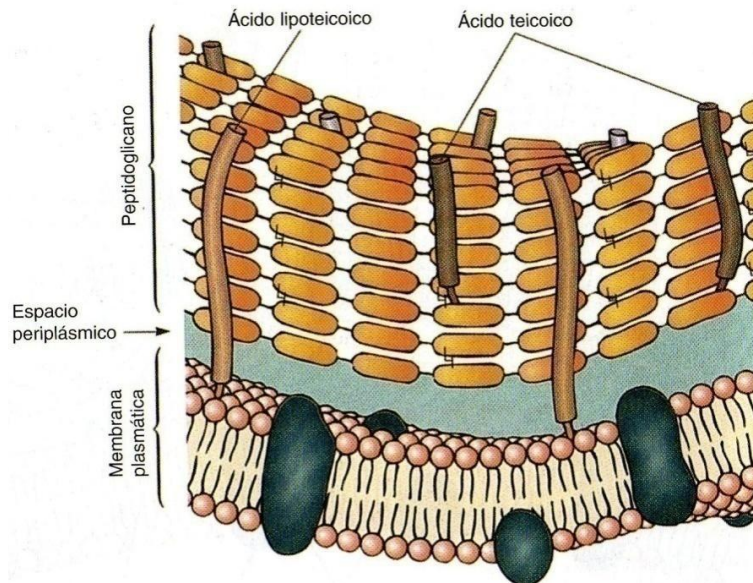
### **2.4.1 Pared celular bacteriana**

La pared celular bacteriana está formada por un polímero de dos derivados del azúcar: el NAG (ácido N-acetilglutámico) y el NAM (ácido N-acetilmurámico), que le confiere rigidez y da forma a las células bacterianas y actúa como una barrera selectiva frente a diferentes moléculas. La cantidad de peptidoglicano presente en una bacteria es una de las características que permite su clasificación como Gram positiva (Gram<sup>+</sup>) o Gram negativa (Gram<sup>-</sup>). En las bacterias Gram

negativas, figura 2.3, la capa de peptidoglicano es relativamente fina (1-2 capas y entre 2 y 6 nm) y se encuentra rodeada por una segunda membrana lipídica exterior (con un espesor entre 6 y 18 nm) que contiene 50% de lipopolisacáridos, 35% de fosfolípidos y 15% de lipoproteínas. En el caso de las Gram positivas, figura 2.4, la pared celular está constituida por una capa gruesa (hasta 40 capas y entre 20 y 80 nm) de peptidoglicano (80%), y además contiene ácidos teicoicos (10-20%) que son polímeros de glicerol o ribitol fosfato; los ácidos teicoicos están unidos al peptidoglicano o a la membrana citoplasmática [8, 22].



**Figura 2.3.** Pared celular de la bacteria Gram-negativa [23].



**Figura 2.4.** Pared celular de la bacteria Gram-positiva [23].

Las bacterias Gram<sup>+</sup>, figura 2.4, son células que están constituidas, como ya se indicó, por una pared celular conformada por ácidos teicoicos, los cuales son polialcoholes unidos por ésteres de fosfato (polímeros que contienen glicerolfosfato o residuos de fosfato de ribitol). Estos polialcoholes aportan carga negativa a la superficie celular lo que se puede utilizar para el trasiego de iones a través de la pared. También, algunos ácidos teicoicos, que contienen glicerol, se pueden unir a los lípidos de la membrana conformando los ácidos lipoteicoicos. Debido a la existencia de estos ácidos lipoteicoicos, estas células son muy sensibles a la acción de la lisozima y a la penicilina, antibióticos utilizados para infecciones causadas por las bacterias Gram<sup>+</sup>, que impiden la formación de la pared celular [22].

En las células Gram<sup>-</sup>, el peptidoglicano constituye sólo el ~10% de la pared. Hacia fuera de la membrana citoplasmática hay un área abierta denominada periplasma, por fuera de ésta hay una fina capa de peptidoglicano y

externamente a éste se encuentra otra membrana adicional, la membrana externa (figura 2.3).

#### 2.4.2. Bacterias de estudio en este trabajo

En este trabajo de investigación se consideraron dos cepas bacterianas para estudiar: una cepa Gram<sup>+</sup>, *Staphylococcus aureus*, y una cepa Gram<sup>-</sup> la *Escherichia coli*. Estas cepas fueron suministradas por el laboratorio para docencia y son las que normalmente se utilizan en los laboratorios de Biología de la Universidad del Cauca para realizar las prácticas del currículo del programa de Biología.

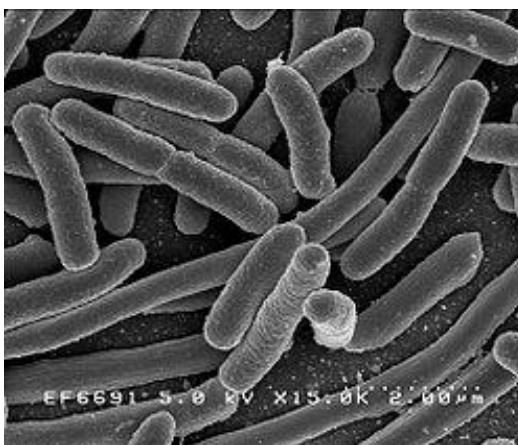
El *Staphylococcus aureus* es un anaerobio facultativo de la familia *Staphylococcaceae*, coco, Gram positivo, y sus células se disponen en racimos como lo indica la figura 2.5. Suele constituir parte de la microflora normal humana, es un tipo común de bacteria que normalmente vive en la piel y algunas veces en las fosas nasales de personas sanas, y puede ocasionar infecciones “oportunistas” debido a la producción de enzimas que contribuyen a su virulencia y propagación; es considerado el principal patógeno en el hombre, causante de infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía y septicemia [24].



**Figura 2.5.** Colonia de *Staphylococcus aureus*, bacteria Gram-positivas [25].

Han surgido cepas de *Staphylococcus aureus* que se han vuelto resistentes a varios antibióticos, primero a la penicilina y luego a la metilina, llegando a ser una preocupación para el ambiente hospitalario debido a las infecciones sistemáticas que ocasiona [26]. En el agar nutriente generalmente forma colonias de color gris o amarillo dorado [23].

Por otro lado, la *Escherichia coli*, bacilo Gram negativo (figura 2.6), es un tipo de bacteria que vive en el intestino. La mayoría de las *E. coli* son inofensivas, sin embargo, algunos tipos pueden producir enfermedades y causar molestias estomacales. El peor tipo de *E. coli* puede causar insuficiencia renal y hasta la muerte. Estos problemas tienen más probabilidades de ocurrir en niños y en adultos con sistemas inmunológicos debilitados. Se pueden adquirir infecciones por *E. coli* al consumir alimentos que contienen la bacteria o al tragar agua en una piscina contaminada con materia fecal humana.



**Figura 2.6.** *Escherichia coli*, bacteria Gram-negativa [25].

## **2.5. Factores que afectan la actividad fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> cuando se considera su funcionalidad bacteriana**

Como se ha indicado, son muchos los factores que pueden afectar la actividad fotocatalítica del TiO<sub>2</sub>, entre ellos se puede considerar la morfología de las

partículas y su estructura cristalina, las impurezas, el área superficial y/o el tamaño de partícula, y la densidad superficial de grupos hidroxilo; si se considera solo el material. Pero por otro lado, están los parámetros medioambientales: intensidad y longitud de onda de la fuente de luz, el tiempo de iluminación, ya sea continua o intermitente, el pH del medio, el oxígeno disuelto, la concentración del catalizador y la temperatura que también pueden afectar la inactivación bacteriana [8]. El conocimiento de la influencia de este conjunto de variables han permitido controlar los mecanismos del proceso de degradación y optimizar la funcionalidad del  $\text{TiO}_2$  frente a la inactivación bacteriana.

Aunque los contaminantes orgánicos suelen absorber radiación en un amplio rango de longitudes de onda, su absorción es más fuerte a longitudes de onda cortas, por lo tanto es importante tener en cuenta este fenómeno en el momento de definir y determinar la acción específica del catalizador. Otro parámetro que se debe controlar durante el proceso de fotodegradación es el aumento de la temperatura en el fotoreactor, variación que puede ocasionar pérdidas del producto a degradar por evaporación o termólisis.

A continuación se enuncian algunos aspectos que hay que considerar y tener en cuenta, al analizar el efecto fotodegradante del  $\text{TiO}_2$ , aspectos relacionados, principalmente, con los parámetros ambientales que no se consideraron en este trabajo si no que se “fijaron”, con base a lo que se enuncia en los siguientes numerales.

### **2.5.1. Intensidad de luz**

Tanto la fuente de luz como la intensidad de la misma son factores importantes que afectan la inactivación de las bacterias. Wei et al. [27] estudiaron el efecto de la intensidad de luz en la degradación bacteriana usando el  $\text{TiO}_2$ , irradiado con luz UV de longitud de onda larga (>380 nm), e incrementando la intensidad



de la luz de 1800 a 16600 W/m<sup>2</sup>. Sus resultados indican que el tiempo para alcanzar una mortalidad del 90% fue de 30 minutos cuando la intensidad de luz se incrementó al valor anteriormente mencionado. También encontraron que la presencia de buenos aceptores de electrones como el O<sub>2</sub> o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mejoró la eficiencia aniquiladora del TiO<sub>2</sub> fotocatalítico porque minimizó la recombinación de h<sup>+</sup> y e<sup>-</sup>. Bekbolet [28] estudió el efecto de la intensidad de luz en la inactivación de la *Escherichia coli*, en un rango de 249 a 679 W/m<sup>2</sup> en presencia de 1 mg/ml (1000 ppm) de TiO<sub>2</sub>, encontrando un incremento lineal en la inactivación bacteriana con aumento de la intensidad de luz. El trabajo realizado por Huang et al. [29], también sobre *E. coli*, mostró que la viabilidad celular decrecía del 45% a un 3% al incrementar la intensidad de la luz de 7.8 a 20.3 W/m<sup>2</sup>. Rincon y Pulgarin [30], usando como fuente la luz solar, también estudiaron la inactivación de la *E. coli*, en ausencia o presencia de TiO<sub>2</sub>, encontrando que al aumentar la intensidad de luz de 400 a 1000 W/m<sup>2</sup>, la inactivación bacteriana se incrementó.

### **2.5.2. Fuente de luz y longitud de onda**

Los estudios realizados utilizaron sólo fuentes de luz UV porque el objetivo principal es el de desinfectar el sistema de todas las bacterias. Durante la última década, los investigadores han centrado su atención en la luz solar y en determinar cuál sería la luz más adecuada para inactivar bacterias. Los resultados muestran que la luz violeta visible y la luz azul poseen poca capacidad de desinfección, mientras que las otras componentes de la luz solar, por ejemplo UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) y UVC (200 – 280 nm) son capaces de inactivar organismos; la radiación UVC de 260 nm tiene la máxima potencia porque corresponde al máximo de absorción del ADN de los organismos a inactivar, su incidencia sobre los organismos puede iniciar cambios en los ácidos nucleicos y en otras estructuras como las enzimas y los antígenos inmunizadores (el uso de UVC-254 nm es común para desinfectar el agua para beber) [8] . Wegelin et al. [31] estudiaron la inactivación de bacterias y virus bajo diferentes

fuentes de luz y encontraron que fuentes de luz entre 300 y 370 nm tienen acción degradante sobre bacterias y virus y que la luz UVC es menos efectiva que la UVA en desactivar microorganismos.

Davies and Evison [32] encontraron que la luz solar con longitud de onda por debajo de 370 nm era la más efectiva para la inactivación del *E. coli* en el agua y Acra et al. [33] concluyeron que la tasa de supervivencia era más significativa cuando la bacteria, coliformes, era expuesta a longitudes de onda entre 260 y 350 nm.

### **2.5.3. pH del medio**

El pH del medio acuoso afecta de forma significativa al  $\text{TiO}_2$  debido a que, como se mencionó antes, los iones determinantes de potencial del semiconductor son los  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$ , por lo que una modificación del pH induce cambios en la carga eléctrica superficial y en el estado de agregación de las partículas de  $\text{TiO}_2$ . El punto de carga cero del  $\text{TiO}_2$ , fase anatasa, sintetizado en esta investigación por el método sol gel fue de pH 3.561 (numeral 1.3.5.2) por lo que para valores de pH inferiores las partículas presentan cargas positivas y para valores superiores negativas.

Por otro lado, el pH limita la actividad de las enzimas que le permiten a un organismo sintetizar un nuevo protoplasma, por lo tanto, en el caso específico del *E. coli*, el pH óptimo para su crecimiento en un cultivo está entre 6.0 y 7.0 a 37°C; en general, los valores de pH requeridos para el crecimiento bacteriano están entre un pH mínimo de 4.4 y un pH máximo de 9.0. El *E. coli* presenta su punto de carga cero a un pH ~2-3, donde ocurriría un cambio en la carga superficial de la célula, y como el  $\text{TiO}_2$  utilizado en esta investigación tiene un punto de carga cero a un pH de 3.56, es de esperar que a valores de pH por debajo de ~2 se presente repulsión electrostática entre el *E. coli* y el  $\text{TiO}_2$ , ya que ambas

superficies estarían cargadas negativamente, y en el intervalo entre pH ~2 y 3.56 la atracción electrostática entre el *E. coli* y el TiO<sub>2</sub> debería ser considerable debido a que sus superficies poseen cargas eléctricas de signo opuesto. Aunque se considera que la interacción electrostática entre las células cargadas y la superficie del TiO<sub>2</sub> no deberían jugar un papel determinante en la actividad fotocatalítica global [8], el efecto de la interacción superficial células-TiO<sub>2</sub> en la inactivación de los microorganismos es un tema de discusión actual.

#### **2.5.4. La temperatura**

La literatura científica ha reportado que la temperatura puede afectar la degradación fotocatalítica de las bacterias [8]. Además, se sabe que cuando la temperatura decrece, el metabolismo microbiano se desacelera, disminuyendo la inactivación de las bacterias en estudio [34]. Rincon y Pulgarin [30] estudiaron el efecto de la temperatura sobre la supervivencia de cultivos de organismos Gram negativas (*E. coli*) y Gram positivas (Enterococci) y encontraron que los grupos responden diferente a la temperatura; las bacterias Gram<sup>+</sup> fueron menos resistentes al incremento de la temperatura que las bacterias Gram<sup>-</sup> debido, principalmente, a sus diferencias morfológicas. Para ellos la velocidad de degradación de las bacterias Gram<sup>+</sup> es más rápida que las Gram<sup>-</sup> cuando el incremento de la temperatura ocurrió entre 23 y 45°C. Cho et al. [35] investigaron la inactivación de cepas de *E. coli* a varias temperaturas, entre 6 y 33°C, y encontraron que la tasa de supervivencia de la bacteria disminuyó de 62% a <2% al incrementar la temperatura, en presencia de 1000 mg/L de TiO<sub>2</sub>.

#### **2.6. Procedimiento experimental**

En este trabajo de investigación se utilizó un proceso de oxidación avanzada con el fin de inactivar bacterias. La prueba de sensibilidad, para detectar bacterias

resistentes a los antimicrobianos, se realizó por el método de microdilución en medio líquido.

### 2.6.1. Preparación del inóculo.

24 horas previas a la prueba de microdilución se realizó la resiembra de las cepas *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* en caldo Mueller Hinton, figura 2.7, tomándose de tres a cinco colonias bien aisladas, de tamaño y morfología similar, con un asa de punta redonda para luego ser transferidas a un erlenmeyer que contenía 20 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusión). Este sistema se incubó por espacio de 12 horas a una temperatura de 37°C, en agitación constante, hasta alcanzar una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland que correspondería a una suspensión con un contenido entre  $1$  y  $2 \times 10^8$  UFC/ml.



Figura 2.7. Preparación del inóculo de las cepas; *E. coli* y *E. aureus*.

### 2.6.2. Métodos para estudiar la evolución de las cepas de *E. coli* y *S. aureus*

Para determinar la actividad fotodegradante del dióxido de titanio sobre cepas de *Escherichia coli* y el *Staphylococcus aureus* se utilizaron dos procedimientos:

(1) lectura de proliferación de bacterias mediante el método de microdilución, realizando lecturas en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 y (2) actividad bactericida mediante curvas de muerte o letalidad.

### 2.6.2.1. Protocolo para determinar la actividad degradante del TiO<sub>2</sub>

A continuación se indica cómo se preparó el medio con las bacterias, preferiblemente **10<sup>6</sup> bacterias/ml**.

Se partió del inóculo preparado tal como se describió en el numeral 2.6.1, a éste se le realizó una dilución seriada 1/10, 1/100 o 1/1000 con el medio (caldo Mueller Hinton) libre de bacterias, hasta encontrar la cantidad adecuada (10<sup>6</sup> bacterias/ml). Para realizar el cálculo se tomó una medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda fija (600 nm) y el valor de la lectura de absorbancia se reemplazó en la ecuación de la recta - Mc. Farland:

Para ilustrar el uso de esta curva de calibración se realizó el siguiente cálculo:

$$Y = 1.922 (0.223) + 417.1 \text{ (en rojo absorbancia de las diluciones)}$$

Cantidad que indica el número de bacterias por ml de medio.

Una vez preparada la muestra de bacterias con el medio, 10 ml, se realizaron los montajes correspondientes a los ensayos que se indican en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Ensayos para determinar la actividad fotodegradante del TiO<sub>2</sub>.

No. tubos	Ensayo	Descripción
1	Crecimiento de bacterias en medio de	8 micro pozos cada uno con 250 µl.

	cultivo (curva de crecimiento normal)	
2	Medio + bacterias + antibiótico	Agregar 30 µl de antibiótico por cada 2 ml de medio-bacterias y sembrar en 4 micropozos de 250 µl.
3	Medio + bacterias irradiadas con UV.	Igual que (1) pero bajo la acción de la radiación UV.
4	Medio + bacterias +TiO <sub>2</sub> [1000 ppm]	Agregar 0.5 ml de TiO <sub>2</sub> a 2 ml de medio-bacterias, agitar y repartir en 4 pozos de 250 µl. (En este ensayo el sistema se mantuvo cubierto con papel aluminio)
5	Medio + bacterias + TiO <sub>2</sub> [1000ppm] + UV	Igual que (4) pero bajo la acción de la radiación UV.

Se realizaron lecturas de los ensayos indicados en la tabla 2.1 a los 30, 60 y 150 minutos, para determinar la proliferación bacteriana a través de las lecturas de absorbancia empleando para ello un espectrofotómetro UV/VIS Spectronic Genesys 5, para ello se reunieron cuatro muestras de 250 µl de cada ensayo, en una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 600 nm. Para obtener los valores finales, la absorbancia se reemplazó en la ecuación de la curva de calibración y los resultados se expresaron en número de bacterias /ml.

Los 10 ml de medio-bacterias preparados solo alcanzaron para un ensayo completo (lectura a 30 minutos), con (1) replica (ensayo duplicado), ya que se usaron 2 ml por cada ensayo, o sea que para realizar las lecturas a los 30', 60' y 150' se debieron preparar 30 ml de medio con bacterias.

El procedimiento descrito anteriormente se realizó tanto para las cepas de *Staphylococcus aureus* como de *Escherichia coli* evaluando las diferentes fases presentes en el dióxido de titanio sintetizado en este trabajo (amorfo, anatasa o rutilo), en una concentración de 1000 ppm.

### 2.6.2.2. Método I: Microdilución.

En una placa de ELISA se realizaron las diluciones anteriormente descritas, 2.6.2.1, y el experimento se efectuó por duplicado utilizando medio de cultivo e inóculo como control positivo, y medio de cultivo, inóculo y antibiótico (Trimetoprima), como control negativo. Se inoculó cuidadosamente las muestras la placa para evitar el paso de material de una celdilla a otra, tal como se muestra en la figura 2.8. Los resultados obtenidos se indican en el anexo I.



**Figura 2.8.** Adición del medio de cultivo a las celdillas de las microplacas.

### 2.6.2.3. Curvas de letalidad

El otro método utilizado para estudiar la evolución de las cepas bacterianas de interés fue el de las curvas de letalidad, y por lo tanto estudiar la actividad bactericida del  $\text{TiO}_2$  en suspensión sobre estas cepas. Para ello se analizaron las siguientes variables: naturaleza de las cepas bacterianas, fase presente en el sólido y tiempo de contacto de las bacterias con el  $\text{TiO}_2$  previamente activado utilizando radiación UV, por exposición del material durante 1 hora a esta radiación.

### ***(i) Preparación del medio de Cultivo***

El medio de cultivo utilizado en este proyecto fue el caldo Mueller Hinton. Este medio se preparó en un erlenmeyer, en cantidades controladas, de tal modo que el medio se podía utilizar como base para efectuar el agregado de suplementos necesarios para realizar pruebas con microorganismos más exigentes.

En un erlenmeyer se depositaron 250 ml de agua destilada a la que se le agregó 5,25 gr de Caldo Mueller Hinton (material en polvo) y se agitó manualmente, hasta disolverlo completamente (figura 2.9). Posteriormente, este caldo se colocó en una autoclave a 140°C, durante 40 minutos.



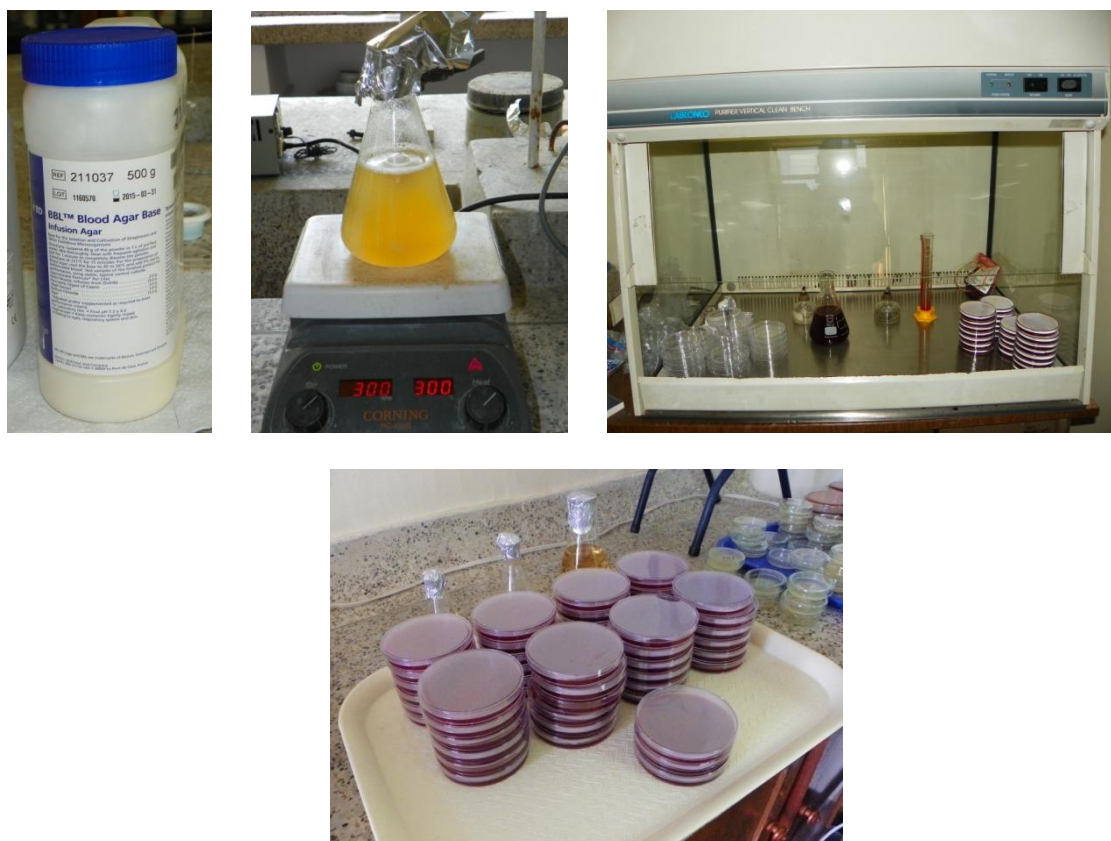
**Figura 2.9.** Preparación del Caldo Mueller Hinton.

El inóculo bacteriano que se utilizó en este proceso se obtuvo a través de la metodología indicada en el numeral 2.6.1. El inóculo bacteriano que se colocó en los tubos fue muy inferior, en recuento de colonias, al inóculo preparado inicialmente (0,5 de Mc Farland); la concentración fue de  $1 \times 10^6$  ufc/ml y para ello se realizó una dilución seriada del inóculo original.

### ***(ii) Preparación del Agar nutritivo***



El agar nutritivo utilizado en este proyecto fue agar base sangre (figura 2.10). Se tomó un erlenmeyer y se le agregó 400 ml de agua destilada, a ésta se le adicionó 16 gr del agar base sangre (BBL – Blood Agar Base Infusión Agar), manteniendo la mezcla en constante agitación a una temperatura de 300°C. Cuando el agar se disolvió completamente, se colocó en una autoclave a una temperatura de 140°C, durante 40 minutos. Una vez realizado este proceso, se le adicionó a la mezcla 28 ml de sangre humana, se agitó manualmente y se sirvió en cajas de petri; este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar.



**Figura 2.10.** Preparación de las cajas de petri con agar base sangre.

**(iii) Preparación de las suspensiones de  $TiO_2$ .**

El  $TiO_2$  sintetizado, al ser un material en polvo, se dispersó en dimetil-sulfóxido. La suspensión de  $TiO_2$  se preparó en una concentración de 1000 ppm que según,

la literatura reportada [28,35], es una concentración adecuada para la inactivación bacteriana.

Así, para realizar una prueba, se debía disponer al menos 5 tubos de reacción, considerando las variables que se estudiaron:

- 1) Un tubo que contenía el inóculo a utilizar como control positivo (crecimiento normal).
- 2) Un tubo que contenía el inóculo y antibiótico a utilizar como control negativo.
- 3) Otro tubo que contenía el inóculo y la suspensión de  $\text{TiO}_2$ , tomando en cuenta la fase presente en el óxido (amorfo, anatasa y rutilo).
- 4) Un tubo que contenía el inóculo y que había sido sometido a la acción de la radiación UV.
- 5) Finalmente, otro tubo que contenía el inóculo y la suspensión de  $\text{TiO}_2$ , donde el óxido había sido previamente activado sometiéndolo a radiación UV durante 1 hora.

Para preparar cada uno de estos tubos se utilizó la metodología descrita en el numeral 2.6.2.1. Las muestras preparadas para considerar cada una de las variables mencionadas anteriormente, se depositaron en las cajas de petri, previamente condicionadas para este fin (figura 2.10) a los 30, 60 y 150 minutos del inicio de los ensayos (con las cepas cultivadas); la lectura de las unidades formadoras de colonias se realizaron 24 horas posteriores al inicio del ensayo, después de incubar las mismas a 37 °C. Este procedimiento se llevó a cabo para una de las dos cepas mencionadas anteriormente, objeto de investigación.

#### ***(iv) Recuento de colonias después de la incubación***

La lectura se efectuó a “ojo desnudo” a los 30, 60 y 150 minutos reconociendo la turbiedad de los tubos y realizando las diluciones necesarias para poder realizar

el conteo, diluciones que se detallan a continuación según se observe turbidez o no.

- Para el tiempo igual a cero ( $t=0$ ) de la curva de letalidad:

Para medir la concentración del tubo control a  $t = 0$  se efectuaron 2 diluciones, una 1/100 (0,05 ml del tubo control positivo en 4.95 ml de caldo Mueller Hinton (MH)) y 1/10 de la solución anterior (1/1000) (0,5 ml en 4,5 ml de caldo MH). Se tomaron de ambos tubos alícuotas de 0,05 ml y se depositaron en la superficie de placas de Petri que contenían el medio apropiado para el desarrollo del microorganismo que se estaba estudiando; luego se diseminaron con la ayuda de una espátula de Drigalski. A las 24 horas de incubación, a 37°C en una atmósfera apropiada (atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>), se efectuó el recuento de colonias que existían en las placas y este número se multiplicó por la dilución efectuada, así: en la primera por  $2 \times 10^3$  y en la segunda por  $2 \times 10^4$ . Los recuentos obtenidos fueron valorados según los siguientes criterios: de los recuentos obtenidos en ambas placas se eligió aquél que dé valores intermedios entre 50 y 200 ufc por placa porque:

Si fuera menor de 50 el error estadístico sería considerable ya que  $E(\text{error}) = 2/(n \times 100)^{1/2}$  donde  $n$  es el número de colonias contadas.

Si el recuento fuera mayor de 200 el error sistemático (error en el recuento y superposición de colonias) sería considerable.

- Para el tiempo igual 30 minutos, 60 y 150 minutos de la curva de muerte:

Luego de los 30, 60 y 150 minutos de inicio del ensayo, para aquellos tubos que permanecen *límpidos* (tubos en los que el TiO<sub>2</sub> tiene alguna acción bacteriostática sobre el microorganismo), se realizaron las siguientes diluciones para realizar el respectivo recuento de microorganismos:

- 1) 1/10 (0,1 ml del tubo “turbio” (tubo de crecimiento) en 0,9 ml de caldo MH)

- 2) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH)
- 3) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH)
- 4) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH)

Del tubo original y de todas las diluciones anteriores se sembraron 0,01 ml en una placa de petri, con el medio apropiado para el desarrollo del microorganismo en estudio, y se dispersó con una espátula de Drigalsky. A las 24 horas de incubación, a 37°C en la atmósfera adecuada según el caso, se efectuó el recuento de colonias y se multiplicó por la inversa de la dilución efectuada así: en la primera por  $1 \times 10^2$ , la segunda por  $1 \times 10^3$ , en la tercera por  $1 \times 10^4$ , la cuarta por  $1 \times 10^5$  y en la última dilución por  $1 \times 10^6$ .

Ahora bien, para los tubos que luego de los tiempos mencionados se encuentren **turbios** (tubo control y aquellos en los que la concentración de  $\text{TiO}_2$  no tuvo efecto bactericida) se espera que la concentración de su contenido sea mayor que  $5 \times 10^7$  ufc/ml. Para poder realizar el recuento de colonias se realizan las siguientes diluciones:

- 1) 1/100 (0,5 ml en 0,05 ml de caldo MH).
- 2) 1/100 (0,5 ml de la suspensión anterior en 0,05 ml de caldo MH).
- 3) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH).
- 4) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH).
- 5) 1/10 (0,1 ml de la suspensión anterior en 0,9 ml de caldo MH).

A partir de la segunda dilución se siembra 0,05 ml de cada uno de los tubos en una placa de Petri, en el medio apropiado para el desarrollo del microorganismo en estudio.

A las 24 horas de incubación, a 37°C en la atmósfera adecuada según el caso, se efectúa el recuento de colonias y se multiplica por la inversa de la dilución

efectuado, así: la primera por  $2 \times 10^5$ , la segunda por  $2 \times 10^6$ , la tercera por  $2 \times 10^7$  y la cuarta por  $2 \times 10^8$ .

### 2.6.3. Variables que se consideraron en el estudio

Las variables que se consideraron en este estudio fueron: la naturaleza de las cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), las diferentes fases que presenta el dióxido de titanio sintetizado (amorfo, anatasa y rutilo) en una concentración de 1000 ppm, tiempos de contacto de las bacterias con el  $\text{TiO}_2$  previamente activado al exponerlo a radiación UV y por último la temperatura del experimento.

### 2.6.4. Características de las lámparas UV utilizadas en esta investigación

Con el fin de optimizar la eficiencia del sistema de irradiación utilizado en este experimento, se colocaron en la parte superior de una cabina de flujo laminar 4 lámparas ultravioleta con las características indicadas en las tablas 2.2 y 2.3. Con este montaje, cuyas especificaciones se indican en la tabla 2.4, se pudo elevar la potencia de irradiación y acumular más energía con relación a la fuente de radiación que se utilizó para realizar la prueba preliminar que se llevó a cabo en el servicio de microbiología del hospital de pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” - Buenos Aires, Argentina. Como se observó en los espectros de absorción de luz UV para las diferentes fases del  $\text{TiO}_2$  (amorfo, anatasa y rutilo) numeral 1.3.5.3, figura 1.19, uno de los picos de absorción que estas muestras presentaron se encontraba entre 266,7 y 278 nm, y por esto se decidió trabajar con lámparas UV de baja longitud de onda.

**Tabla 2.2.** Referencias de las lámparas UV.

Marca	Referencia	Potencia (W)	Cantidad
-------	------------	--------------	----------

Philips	G30T8	30	2
Fuji electric Co	GLT8	30	2

**Tabla 2.3** Otras características de las lámparas.

30 Watt G30 T8 Germicidal Ultraviolet Light Bulb			
Manufacturer	Philips Lighting	Watts	30W
Man. Part #	360164	Case Quantity	25
Base Type	G13	Case Discount	10%
Maximum Overall Length	36"	Volts	102

Product Specifications	
Product Number	360164
Full product name	TUV 30W T8
Case Quantity	25
Base	G13 Med Bi-Pin
Bulb	T8
Voltage	102V
Watts	30W
Max Overall Length	36 Inches
Width	1 Inch
Useful Life	9000 Hours
Main Application	Disinfection
Common Code	TUV 30W G30 T8 25PK
Product Number	36016-4

**Features/Benefits**

- Emit short-wave UV radiation with a peak at 253.7 nm (UV-C) for germicidal action
- Lamp glass filters out the 185 nm ozone-forming line

**Tabla 2.4** Especificaciones del montaje en la cabina de flujo laminar.

<b>Cabina de flujo laminar</b>	Labconco Purifier Class II Biosafety Cabinet 64132
<b>Material</b>	Aluminio reflectivo (pulido)

<b>Lámparas</b>	4
<b>Balastos</b>	1
<b>Distancia lámpara-placa (cm)</b>	15 y 30

En la figura 2.11 se puede observar cómo se ubicaron las 4 lámparas de luz UV en la cabina de flujo laminar, además en su interior se adaptó un agitador orbital para que las placas de petri estuvieran en constante agitación.



**Figura 2.11.** Disposición de las lámparas de UV en la cabina de flujo laminar.

### **2.6.5. Resultados y discusión de la actividad bactericida del $\text{TiO}_2$ sobre cepas de *Escherichia coli***

En este trabajo de investigación se propusieron dos métodos para evaluar el efecto degradante del  $\text{TiO}_2$ , sometido o no a irradiación, sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*: proliferación mediante el método de microdilución, realizando lecturas en un espectrofotómetro, y el de actividad bactericida mediante curvas de letalidad. Debido a que el fotocatalizador utilizado,  $\text{TiO}_2$ , fue un material en polvo que contenía aglomerados de  $\sim 500$  nm y a que las lecturas con el espectrofotómetro se realizaron a una longitud de onda fija (600 nm), las lecturas realizadas durante el desarrollo del ensayo de

proliferación bacteriana, con el espectrofotómetro no fueron correctas ya que el fenómeno que más predominó fue el de dispersión de la luz y no el de absorción debido a la cercanía entre la longitud de onda fija (600 nm) y el tamaño de los aglomerados (~500 nm). Algunos resultados obtenidos del ensayo de proliferación se muestran en la sección de anexos y a continuación se indican los resultados más relevantes al seguir la inactivación bacteriana mediante el método de curvas de letalidad, para las dos cepas de interés.

#### **2.6.5.1. El cultivo bacteriano**

En esta investigación se utilizaron cepas de *E. coli* suministradas por el Laboratorio de biología de la Universidad del Cauca, cultivadas en una placa con agar nutritivo de la que se tomaron de tres a cinco colonias bien aisladas, de tamaño y morfología similar utilizando un asa de punta redonda y se transfirieron a un erlenmeyer con 20 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusión). La incubación posterior de este sistema se realizó por espacio de 12 horas, a una temperatura de 37°C en agitación constante, hasta alcanzar una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0,5 de la escala de McFarland, equivalente a una suspensión con 1 a 2 x 10<sup>7</sup> UFC/ml. La concentración de células se determinó mediante un procedimiento de recuento viable en placas de agar base sangre (BBL – Blood Agar Base Infusión Agar) después de diluciones seriadas de las cepas, en caldo MH.

#### **2.6.5.2. La reacción fotocatalítica**

El fotocatalizador utilizado en este estudio fue el TiO<sub>2</sub>, sintetizado durante el desarrollo de este proyecto de investigación utilizando el método sol gel, después de realizarle un proceso de molienda en atricción durante 4 horas (numeral 1.3.4)



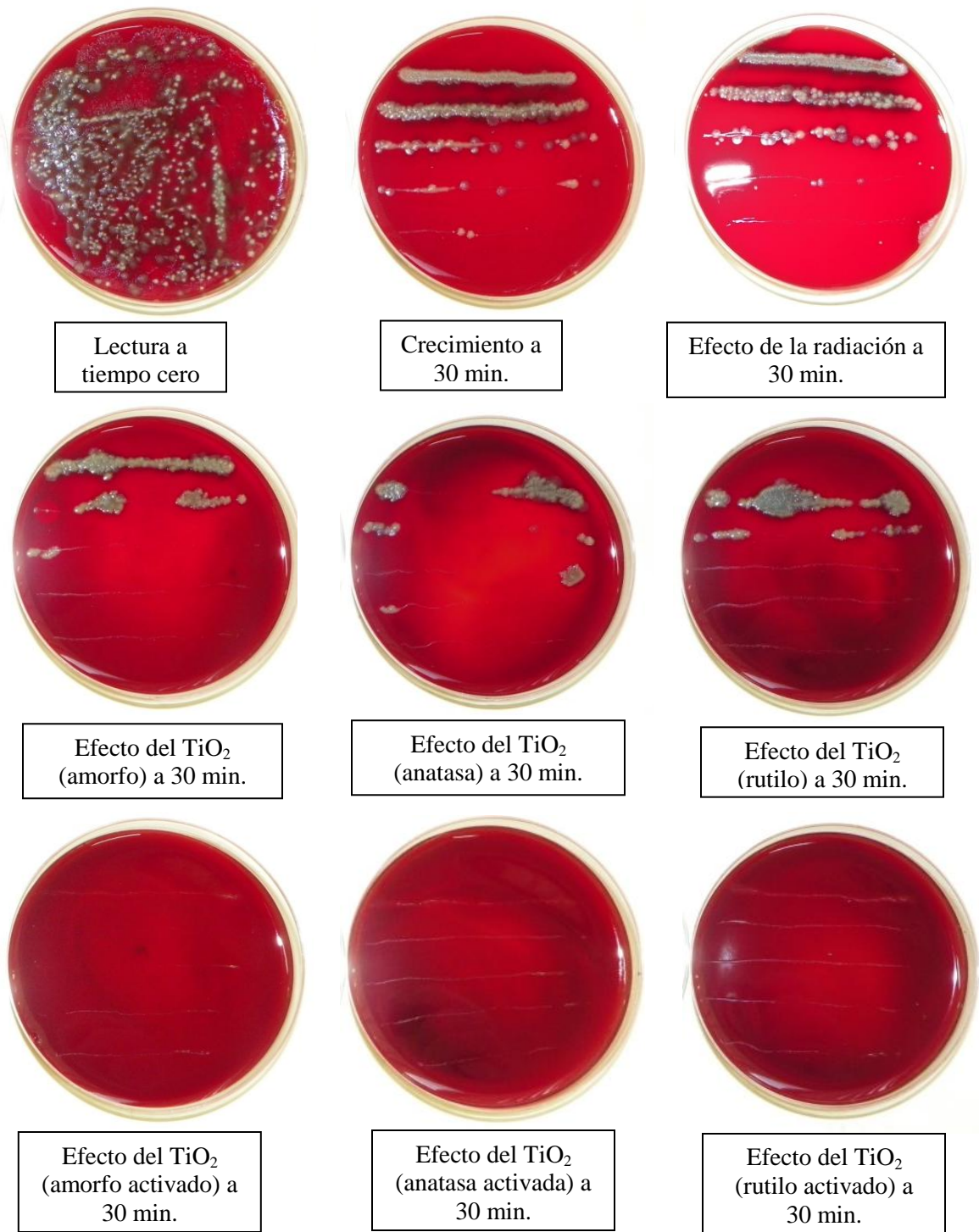
considerando cada una de sus diferentes fases: amorfo, anatasa y rutilo. Estas muestras presentaron una superficie específica de  $17.445 \pm 0.03 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $8.3543 \pm 0.3292 \text{ m}^2/\text{g}$  y  $3.9444 \pm 0.1918 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente, y un tamaño de partícula primario de  $\sim 100 \text{ nm}$ , en la fase amorfa, y  $\sim 50 \text{ nm}$  para las fases cristalinas anatasa y rutilo. Para los ensayos de fotodegradación se usó una suspensión de  $\text{TiO}_2$  en Dimetil sulfóxido ( $10 \text{ mg}/10 \text{ ml}$ ), suspensión que se preparó siempre inmediatamente antes del desarrollo de la reacción fotocatalítica y se mantuvo en la oscuridad. El protocolo utilizado para analizar cada una de las siguientes variables: el efecto del antibiótico (Trimetroprima), el efecto de la radiación, el efecto del  $\text{TiO}_2$  en cada una de sus fases y el efecto del  $\text{TiO}_2$  (amorfo, anatasa y rutilo) previamente activado sobre el crecimiento bacteriano, se muestran en el numeral 2.6.2.1. (específicamente en la tabla 2.1). Para el ensayo que permitió determinar el efecto de la actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  sobre el crecimiento bacteriano, el óxido, en sus diferentes fases, fue sometido a la radiación durante 1 hora colocándolo sobre el agitador orbital que se encontraba dentro de la cabina de flujo laminar (numeral 2.6.4) y la cual tenía en su parte superior las lámparas de UV ( $\lambda \sim 254 \text{ nm}$ ). La intensidad de la luz que alcanzaba la superficie de la suspensión de  $\text{TiO}_2$  era de aproximadamente  $30 \text{ Wm}^{-2}$ .

### **2.6.5.3. Ensayo de viabilidad celular de la cepa de *Escherichia coli***

La pérdida de viabilidad bacteriana fue examinada por el procedimiento de recuento viable de colonias. En esta investigación, en uno de los ensayos, las bacterias se suspendieron con el  $\text{TiO}_2$  previamente activado para determinar el efecto de su activación y no de la superposición simultánea de los dos efectos: presencia del  $\text{TiO}_2$  y de la radiación, sobre las cepas bacterianas. En la gran mayoría de investigaciones [4, 13, 15], la suspensión de las bacterias con el  $\text{TiO}_2$  (P25, Degussa AG, Alemania) se expone continuamente a la irradiación con luz UV, dificultando la determinación del efecto, independiente, de la radiación y del fenómeno de la fotocatalisis.

En este trabajo, una suspensión de *E. coli*, sin TiO<sub>2</sub>, se iluminó con luz UV para determinar el efecto de la radiación y se conformó otra suspensión también sin TiO<sub>2</sub>, para estudiar la proliferación de las bacterias en la oscuridad, esta última se tomó como referente de crecimiento de la población de células. Además, se realizó una suspensión de bacterias con TiO<sub>2</sub>, sin radiación, para determinar el efecto del TiO<sub>2</sub> en la oscuridad. De ellas se tomaron muestras a los 30, 60 y 150 minutos. El conteo viable de colonias se realizó en placas de agar, base sangre, después de diluciones seriadas de la muestra en caldo MH. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La suspensión de bacterias de partida se conformó a una concentración de  $2.7 \times 10^6$  UFC/ml. En la figura 2.12 se muestran las fotografías obtenidas de los cultivos al utilizar el método de curvas de letalidad de cepas de *Escherichia coli*. En ellas se observa el efecto de las diferentes variables que se consideraron en este ensayo, a los 30 minutos, sobre el crecimiento de las bacterias.

En estas fotografías se puede observar la cantidad de unidades formadoras de colonias UFC/ml en el cultivo de partida, a tiempo cero, y como fue el desarrollo poblacional de las mismas, a los 30 minutos, al encontrarse en un medio adecuado para su crecimiento. Además, se ilustra el desarrollo de las mismas al ser sometidas a la acción de la radiación y a la presencia de las diferentes fases que presentaba el TiO<sub>2</sub> (amorfo, anatasa y rutilo). El interés central del ensayo fue el de analizar el comportamiento de las cepas de *E. coli* en presencia del TiO<sub>2</sub>, en sus diferentes fases (amorfo, anatasa y rutilo), sin y con activación durante una (1) hora con luz UV.



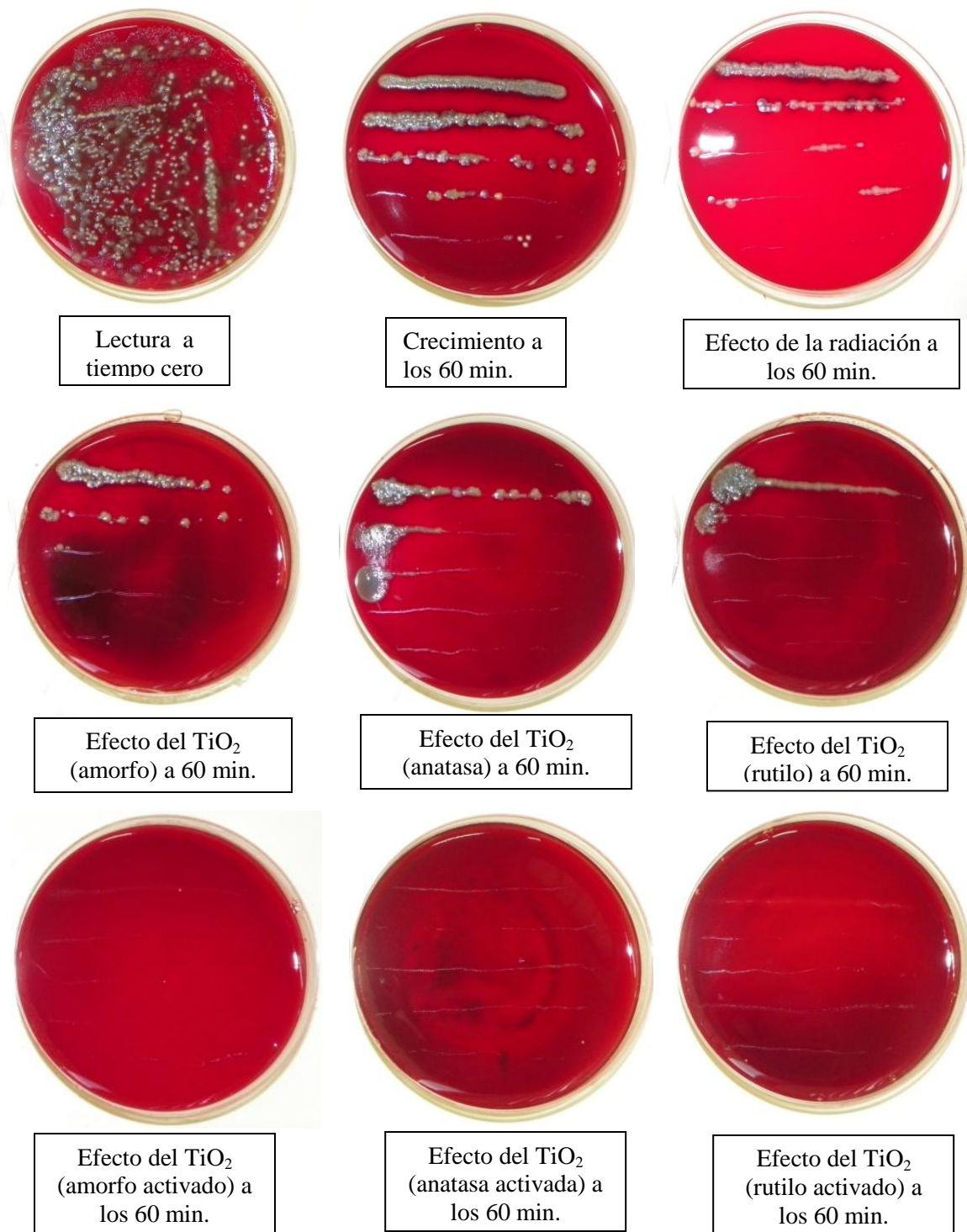
**Figura 2.12.** Resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del  $\text{TiO}_2$  fases (amorfa, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 30 minutos de iniciados los ensayos.

En la figura 2.12 se observa que en el cultivo inicial se presentaba una gran cantidad de UFC/ml de *E. coli* y que este fue sufriendo cambios apreciables, a simple vista, al considerar las diferentes variables de análisis. La presencia del  $\text{TiO}_2$  en sus diferentes fases, sin exposición a la radiación UV, ocasionó una disminución apreciable en el número de colonias de *E. coli* aún si se compara con el cultivo que fue sometido solamente a la acción de la radiación. Por otro lado, cuando el óxido fue expuesto previamente a la acción de la radiación UV, durante una hora antes de adicionarlo a la suspensión de bacterias, éste produjo una inactivación bacteriana total después de los 30 minutos de contacto con las bacterias, independientemente de la fase presente en el  $\text{TiO}_2$ . Estos resultados reiteran la gran importancia de las reacciones, superficiales, superficie del  $\text{TiO}_2$ -membrana de la bacteria, y la gran acción bactericida que tiene el efecto fotodegradante del  $\text{TiO}_2$ , activado previamente, sobre la proliferación del *E. coli*.

El avance poblacional del *E. coli* se siguió en el tiempo, considerando la acción de las diferentes variables en estudio.

En la figura 2.13 se observan las fotografías de los cultivos después de los 60 minutos de iniciados los diferentes ensayos. Se observa un comportamiento de los cultivos similar al observado a los 30 minutos (figura 2.12): reducción poblacional del *E. coli* por la presencia del  $\text{TiO}_2$ , en sus diferentes fases, sin activar y la eliminación total de las bacterias cuando estaban en contacto directo con el  $\text{TiO}_2$  activado.

A los 150 minutos de iniciados los ensayos, figura 2.14, el efecto de la presencia del  $\text{TiO}_2$  sin activación, sobre el crecimiento poblacional del *E. coli*, es mucho más evidente, más aun que el de la radiación. Como era de esperar, en los cultivos que contenían el  $\text{TiO}_2$  activado, independiente de la fase que presentara el óxido, no se observó ninguna colonia de *E. coli*.



**Figura 2.13.** Resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del TiO<sub>2</sub> fases (amorfa, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 60 minutos de iniciados los ensayos.



Lectura a tiempo cero



Crecimiento a los 150 min.



Efecto de la radiación a los 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (amorfo) a 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (anatasa) a 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (rutilo) a 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (amorfo activado) a los 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (anatasa activada) a los 150 min.



Efecto del  $\text{TiO}_2$  (rutilo activado) a los 150 min.

**Figura 2.14.** Resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la radiación y de la presencia del  $\text{TiO}_2$  fases (amorfa, anatasa y rutilo), sin y con activación previa, sobre cepas de *Escherichia coli*, después de 150 minutos de iniciados los ensayos.

La pérdida de viabilidad de las células de *Escherichia coli* por la acción de la radiación UV y por la presencia del TiO<sub>2</sub>, sin y con exposición previa a la radiación UV, en sus diferentes fases (amorfa, anatasa y rutilo) se determinó haciendo el recuento del número de colonias presentes en los cultivos después de 24 horas de incubación. Las curvas de UFC/ml en función del tiempo, para las diferentes condiciones de cultivo, se muestran en la figura 2.15. En la figura 2.15(a) se muestra el crecimiento normal bacteriano, partiendo de aproximadamente de  $2.7 \times 10^6$  ufcml<sup>-1</sup>, así como el efecto sobre su proliferación con el tiempo de un antibiótico, trimetoprima y de la radiación. Cuando las bacterias se sometieron a la acción del antibiótico, durante 30 minutos, se presentó una disminución en su viabilidad pero que con el paso del tiempo se volvió a incrementar levemente su proliferación. Por otro lado, cuando las células de *E. coli* ( $2.7 \times 10^6$  ufcml<sup>-1</sup>) se sometieron a la acción de la radiación UV, durante 30 minutos, se disminuyó considerablemente su población y ésta siguió disminuyendo de forma lenta hasta los 150 minutos de exposición, pero sin alcanzar la completa eliminación de las bacterias.

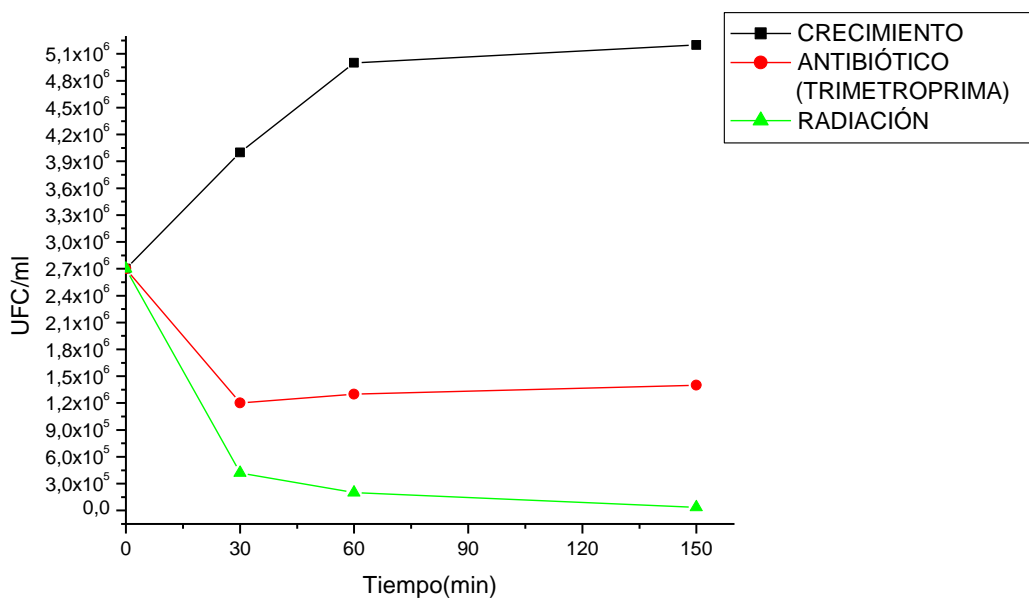
En la figura 2.15(b) se muestra el efecto de la presencia de TiO<sub>2</sub> no activado, en sus diferentes fases (amorfa, anatasa y rutilo) sobre la población de bacterias de *E. coli*. Las curvas indican que el TiO<sub>2</sub> no activado, afecta el crecimiento bacteriano considerablemente, de manera contundente durante los primeros 30 minutos del ensayo; sólo para el TiO<sub>2</sub> fase rutilo se observó que después de 150 minutos de contacto con las bacterias éstas perdieron su viabilidad, mostrando inactivación completa tal como se observa en la correspondiente fotografía de la figura 2.14.

En la figura 2.15(c) se muestra que las bacterias de *E. coli* en presencia de 1 mgml<sup>-1</sup> [1000 ppm] de TiO<sub>2</sub> (amorfo, anatasa o rutilo), previamente irradiado con luz UV durante 1 hora, todas las bacterias perdieron su viabilidad después de 30 minutos y este resultado se mantuvo todo el tiempo que duró el ensayo. La

inactivación completa de *E. coli* fue evidente a los 30 minutos de exposición al TiO<sub>2</sub> activado. Los datos numéricos obtenidos en este ensayo se presentan en la tabla 2.5.

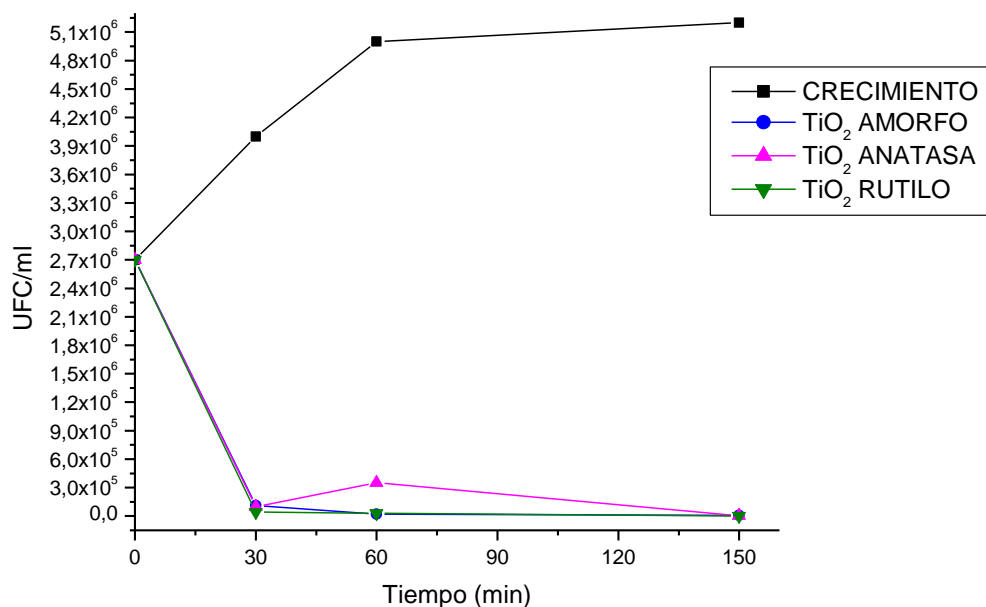
**Tabla 2.5.** Datos numéricos obtenidos del método de curvas de letalidad de cepas de *Escherichia coli* al estar expuestas a las diferentes variables de interés por 30,60 y 150 minutos.

Tiempo (min)	Crecimiento (ufcml <sup>-1</sup> )	Antibiótico (trimetoprima) (ufcml <sup>-1</sup> )	Radiación (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> amorfo (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> anatasa (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> rutilo (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> amorfo activado (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> anatasa activado (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> rutilo activado (ufcml <sup>-1</sup> )
0	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6	2,7E6
30	4E6	1,2E6	4,2E5	1,1E5	1E5	4,2E4	0	0	0
60	5E6	1,3E6	2E5	2E4	3,5E5	3E4	0	0	0
150	5,2E6	1,4E6	3,6E4	7E3	3,3E3	0	0	0	0

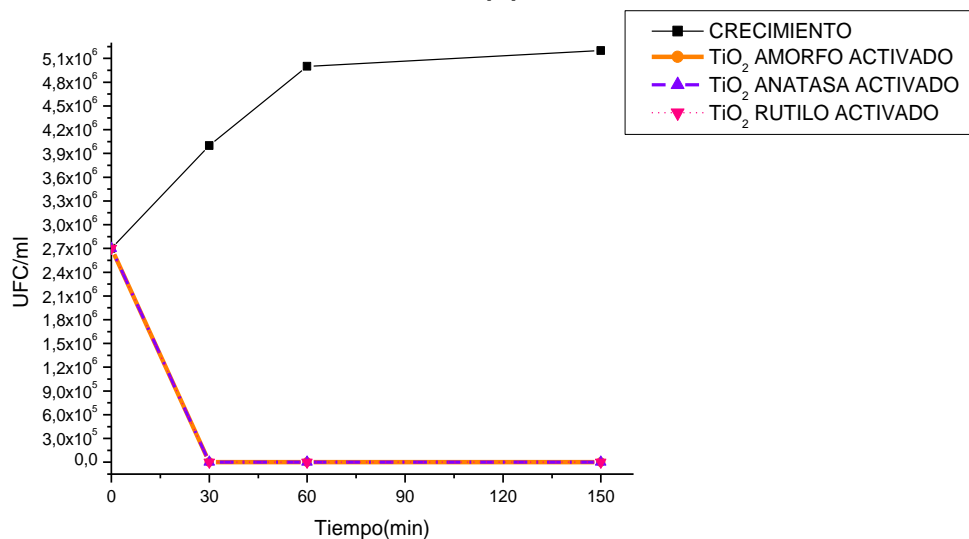


(a)





(b)



(c)

**Figura 2.15.** Curvas de número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo que indican como varía la población del *E. coli* al someter los cultivos a la acción de un antibiótico (Trimetoprima) y radiación UV (a), a la exposición de TiO<sub>2</sub> sin activar (b) y activado previamente, utilizando radiación UV durante 1 hora (c), considerando diferentes fases presentes en el óxido. La concentración inicial de células en la suspensión fue de  $2.7 \times 10^6$  ufcml<sup>-1</sup>.

Los resultados indicados en las figuras 2.12 a 2.15 sobre la inactivación de las bacterias confirman que al iluminar inicialmente el TiO<sub>2</sub> para activarlo,

independiente de su fase, este ejerce una fuerte acción biocida sobre el *E. coli* [36-38]. Aunque no está bien estructurado el mecanismo que justifique la acción bactericida del TiO<sub>2</sub> activado, se considera que la reacción fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> ocasiona un aumento de la permeabilidad celular [15], lo que puede propiciar la generación de deterioro en varios sitios de la célula, contribuyendo a la muerte celular. Los daños en la pared celular ocurren cuando se ponen en contacto las bacterias de *E. coli* con el TiO<sub>2</sub> y esto puede suceder debido a que la barrera impuesta por la membrana externa de lípidos (entre 6 y 18 nm de espesor) y la capa de peptidoglicano se averíe severamente por las reacciones, fotocatalíticas (ver ecuaciones 2.1 a 2.8) o no (reacciones superficiales), propiciadas por la presencia del TiO<sub>2</sub> durante los primeros 30 minutos de los ensayos, generando, a continuación, un daño progresivo de la membrana citoplasmática [15], lo que ocasiona que la bacteria se torne permeable incluso a las moléculas grandes. Al ocurrir lo anterior, la membrana citoplasmática se vería severamente afectada, lo que permitiría explicar la pérdida irreversible de la viabilidad tal como lo muestra las figuras 2.15(b) y 2.15(c). Lo enunciado confirma que la envoltura celular de los microorganismos es, de hecho, el objetivo central de la reacción, fotocatalítica o no, del TiO<sub>2</sub> y una causa importante de la muerte celular.

El ataque de las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), que provienen de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, afectan la permeabilidad de la membrana de las bacterias, la cual es responsable de su actividad respiratoria, ocasionando la pérdida de esta última función que llevaría a la muerte de las mismas, comportamiento que ha sido ya estudiado por diferentes investigadores [14].

No hay que descartar la posibilidad de que las partículas de TiO<sub>2</sub> inicialmente se adsorban sobre la superficie de las bacterias, acción propiciada por interacciones de atracción electrostática ya que el punto de carga cero para el *E. coli* está en pH 2-3 y para el TiO<sub>2</sub> en pH 3.56, para luego ingresar al interior de la bacteria.

Trabajos recientes sobre este tema, utilizando células eucariotas [39,40], indican que la absorción de las partículas de  $\text{TiO}_2$  puede ser resultado de la fagocitosis [40]. Una vez que las partículas de  $\text{TiO}_2$  hayan entrado en las células, y la membrana citoplasmática se haya dañado, los componentes intracelulares estarían más expuestos a un ataque directo. Trabajos previos indican que el  $\text{TiO}_2$  no presenta una selectividad para atacar los componentes celulares [41, 42], por lo tanto, al ingresar, atacaría indistintamente a todos los componentes intracelulares presentes.

En resumen, las bacterias en su medio de crecimiento normal ( $2.7 \times 10^6$  ufc/ml) tienen su contenido intracelular intacto, protegido por la pared celular y la membrana citoplasmática, pero a los 30 minutos de exposición al  $\text{TiO}_2$  activado con luz UV (1mg/ml), o no, la integridad de la pared celular y la membrana citoplasmática se ven comprometidos por la acción del óxido, ya sea por la salida de flujo del contenido celular o por el ingreso de las partículas de  $\text{TiO}_2$  tal como se muestra en la figura 2.12. En el mecanismo de inactivación propuesto es importante la modificación de la permeabilidad de la pared celular y de la membrana citoplasmática, principales blancos del ataque de las partículas de  $\text{TiO}_2$ . Cuando la pared celular se avería, los radicales, así como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , comienzan a jugar un papel importante en la inactivación bacteriana ya que ellos ingresan a la célula dañada y pueden atacar, directamente, las enzimas [1, 4, 11] y el ADN [15].

Con el desarrollo de la presente investigación se ha demostrado que las bacterias de *E. coli* expuestas a la acción de  $\text{TiO}_2$  previamente activado, con luz UV, pierden su viabilidad degradándose completamente. Un resultado similar ha sido obtenido por otros investigadores [4, 13, 15] trabajando con el  $\text{TiO}_2$  irradiado continuamente con UV. Esta última metodología genera la duda de cuál de los dos efectos, el de la radiación y el de la exposición al  $\text{TiO}_2$  activado, es el más importante en la inactivación bacteriana. Con la metodología desarrollada en el

presente trabajo se puede determinar el efecto real de la radiación, figura 2.15(a), y de las partículas de  $\text{TiO}_2$  sin activación, figura 2.15(b), y activado previamente utilizando radiación UV durante 1 hora, figura 2.15(c), considerando las diferentes fases de  $\text{TiO}_2$ . Ya que el  $\text{TiO}_2$  no fue irradiado continuamente, y que el fenómeno de recombinación electrón-hueco se debe presentar, es necesario que las reacciones de oxidación propiciadas por las especies altamente oxidantes, generadas por las reacciones fotocatalíticas del  $\text{TiO}_2$ , continúen su agresión a las bacterias aún en la “oscuridad”, acción que se podría justificar si se considera el desarrollo de reacciones en cadena ocasionadas por los radicales libres en un proceso de peroxidación lipídica [14].

#### **2.6.6. Resultados y discusión de la actividad bactericida del $\text{TiO}_2$ sobre cepas de *Staphylococcus aureus***

A continuación se indican los resultados obtenidos del estudio de inactivación bacteriana, utilizando el método de curvas de letalidad, para las cepas de *Staphylococcus aureus*.

##### **2.6.6.1. El cultivo bacteriano**

En esta investigación se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* suministradas por el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca. Para preparar el cultivo bacteriano se utilizó una metodología similar a la empleada para la obtención del cultivo bacteriano de las cepas de *E. coli* (ítem 2.6.5.1).

##### **2.6.6.2. La reacción fotocatalítica**

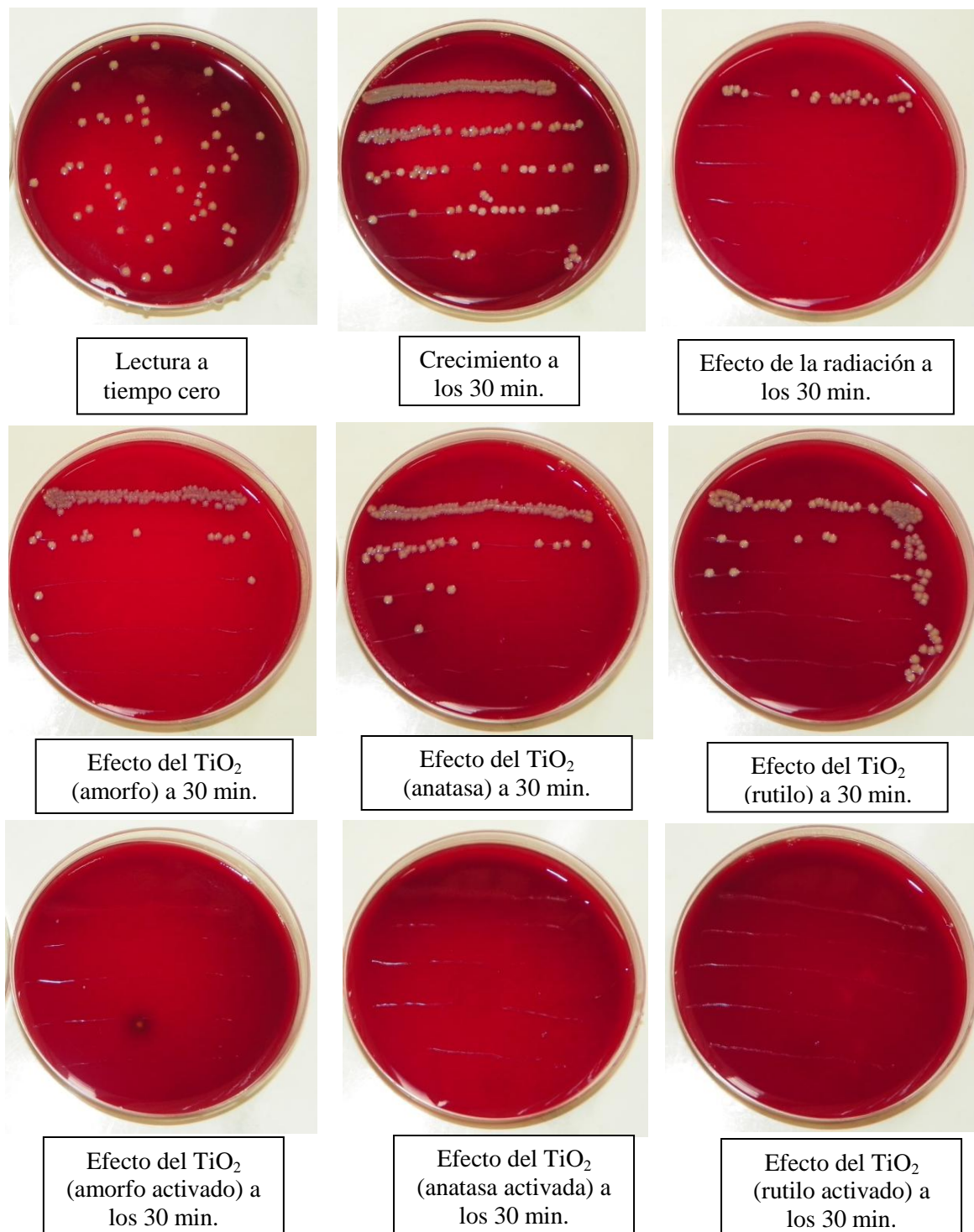
Para determinar el efecto de un semiconductor sólido sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* se utilizó el  $\text{TiO}_2$ , en sus diferentes fases (amorfo

( $17.445 \pm 0.03 \text{ m}^2/\text{g}$ ), anatasa ( $8.3543 \pm 0.3292 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y rutilo ( $3.9444 \pm 0.1918 \text{ m}^2/\text{g}$ ), sintetizado durante el desarrollo de esta investigación mediante el método sol gel y sometido posteriormente a un proceso de molienda en atricción durante 4 horas; las partículas primarias presentaron un tamaño de  $\sim 100 \text{ nm}$ , para la fase amorfa, y de  $\sim 50 \text{ nm}$  para las fases anatasa y rutilo (ver ítem 1.3.4). La preparación de la suspensión se realizó de igual manera que para el *E. coli*, descrita en el numeral 2.6.5.2.

### **2.6.6.3. Ensayo de viabilidad celular de la cepa de *Staphylococcus aureus***

La metodología utilizada para realizar este ensayo, con esta cepa, es similar a la descrita en el ítem. 2.6.5.3 para el *Escherichia coli*. En la figura 2.16 se muestran las fotografías de los cultivos conformados para estudiar la viabilidad celular mediante el método de curvas de letalidad, de las cepas de *Staphylococcus aureus* y en ellas se observa el efecto de los diferentes parámetros considerados sobre el crecimiento de las bacterias, después de 30 minutos de iniciados los ensayos.

En las fotografías de la figura 2.16 se puede observar la cantidad de unidades formadoras de colonias, UFC/ml, al inicio del ensayo (tiempo cero), y como esta cantidad se modificó a los 30 minutos de colocar la cepa en un medio adecuado para su crecimiento. Para este mismo tiempo de duración del ensayo, se muestra el efecto de su exposición a radiación UV y a las diferentes fases que presenta el  $\text{TiO}_2$  (amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometido previamente a radiación con luz UV, durante 1 hora, para activarlo (generación de los pares electrón-hueco).

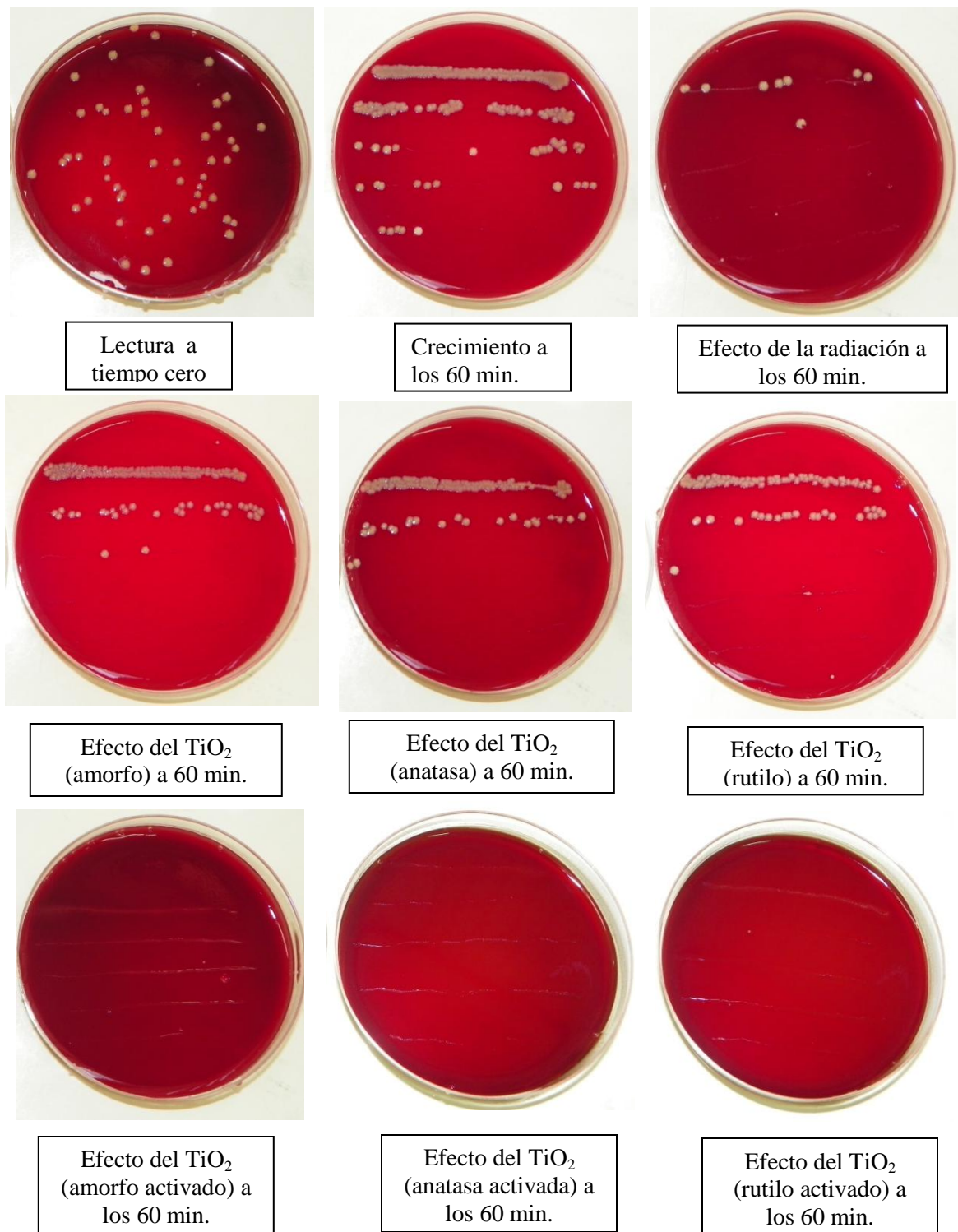


**Figura 2.16.** Fotografías tomadas a los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la exposición al TiO<sub>2</sub> (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometidas a radiación previa, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 30 minutos de iniciado el ensayo.

En la figura 2.16 se observa que al inicio del ensayo, punto de partida, se tenía una gran cantidad de UFC/ml de *S. aureus*, cantidad que fue sufriendo cambios apreciables, a simple vista, al considerar el efecto de las diferentes variables de interés. La presencia del dióxido de titanio en sus diferentes fases, sin activación previa, ocasionó en el cultivo una disminución en el número de colonias de *S. aureus*, aunque no tan grande como la que propicio la exposición de la cepa a la radiación. Cuando el óxido se sometió a radiación previa, y después se adicionó a la suspensión de bacterias, éste ocasionó una inactivación bacteriana total a los 30 minutos de iniciado el ensayo, tal como se observa en las correspondientes fotografías de la figura 2.16, independientemente de la fase que presentaba el  $\text{TiO}_2$ .

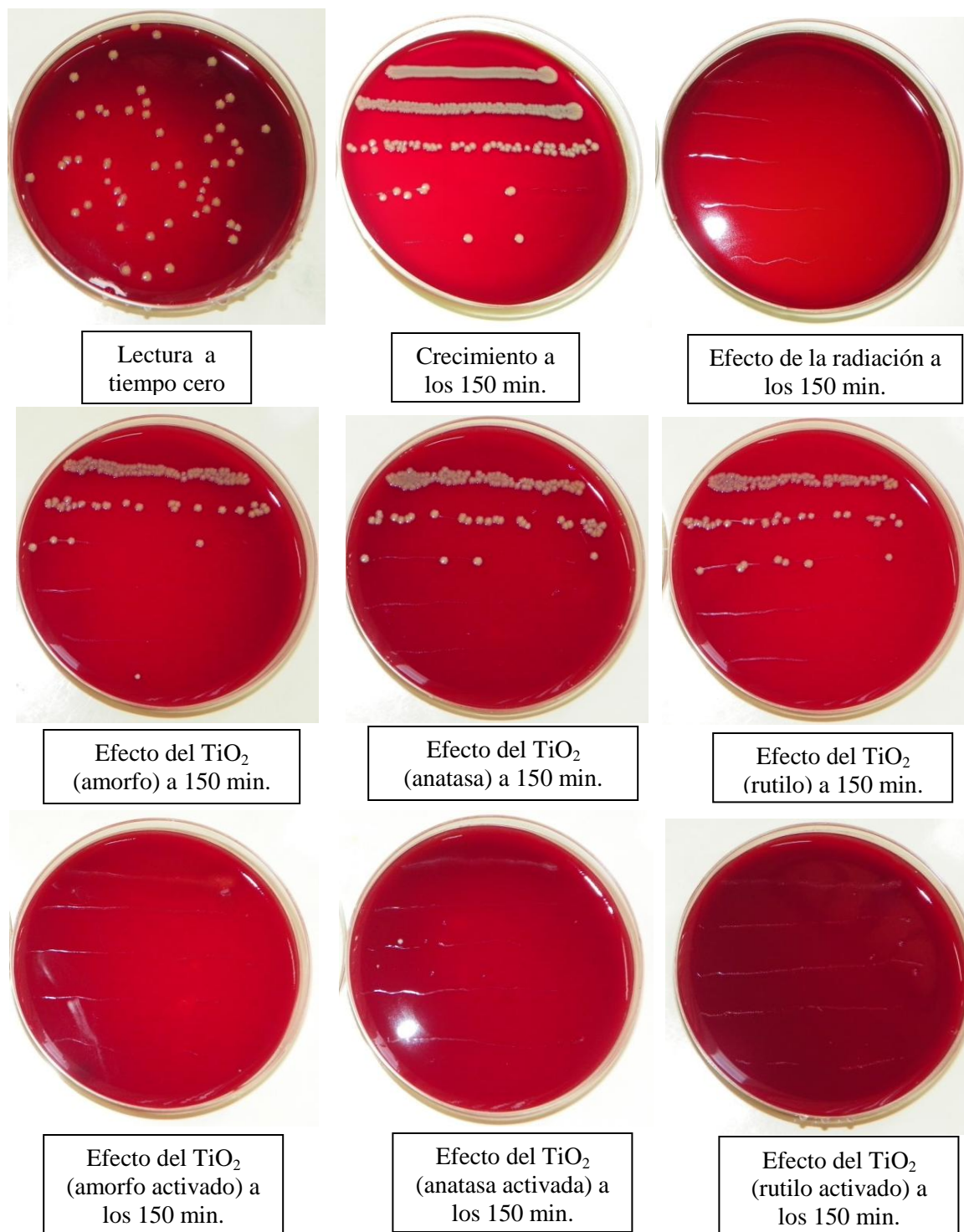
En la figura 2.17 se muestran las fotografías que evidencian el desarrollo de las colonias en los diferentes cultivos después de 60 minutos de iniciado el ensayo. Se observa que la radiación y el  $\text{TiO}_2$  en sus diferentes fases, sin activación previa, siguen ocasionando disminución en el número de colonias, UFC/ml, bacterianas; los cultivos que contenían el  $\text{TiO}_2$ , diferentes fases y activado previamente, no presentan ninguna colonia de la cepa.

En la figura 2.18 se muestran las fotografías de los cultivos conformados para evaluar el crecimiento poblacional de cepas de *S. aureus* a los 150 minutos de iniciado el ensayo, considerando las diferentes variables en estudio. Se observa en el presente caso que el efecto de exposición al  $\text{TiO}_2$  en sus diferentes fases, sin exposición previa a la radiación, se mantuvo aproximadamente igual a lo que existía a los 60 minutos (figura 2.17). El  $\text{TiO}_2$  activado previamente con radiación UV mantuvo su efecto de eliminación completa de las bacterias y la radiación UV, aplicada al cultivo, a los 150 minutos las eliminó completamente.



**Figura 2.17.** Fotografías tomadas a los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la exposición al  $\text{TiO}_2$  (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometido a radiación previa, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 60 minutos de iniciado el ensayo.





**Figura 2.18.** Fotografías tomadas de los cultivos conformados para evaluar el efecto de la radiación y la presencia del TiO<sub>2</sub> (fases amorfo, anatasa y rutilo), sin y sometido previamente a la acción de la radiación UV, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* después de 150 minutos de iniciado el ensayo.

La determinación de la pérdida de viabilidad de las células de *Staphylococcus aureus*, considerando las diferentes variables, se determinó realizando el recuento de colonias después de 24 horas de incubación de los cultivos correspondientes. Las curvas de ufc/ml en función del tiempo, para las diferentes variables, se muestran en la figura 2.19 y en la tabla 2.6 se indican los valores correspondientes poniendo en evidencia el gran efecto bactericida del TiO<sub>2</sub> activado previamente, siendo las fases cristalinas, anatasa y rutilo las más eficientes.

En la figura 2.19(a) se observa el crecimiento normal bacteriano partiendo de aproximadamente  $9.6 \times 10^5$  ufcml<sup>-1</sup>, que muestra su proliferación en función del tiempo cuando las bacterias se sometieron a la acción del antibiótico empleado, Trimetroprima durante 30 minutos, presentándose una disminución en su viabilidad que luego se mantuvo aproximadamente constante con el paso del tiempo hasta los 150 minutos. Además, la figura 2.19(a) muestra que cuando las bacterias *S. aureus* ( $9.6 \times 10^5$  ufcml<sup>-1</sup>) se sometieron a irradiación con luz UV, durante 30 minutos, se disminuyó considerablemente su población, tendencia que se mantuvo hasta alcanzar la inactivación total de las bacterias, a los 150 minutos de exposición.

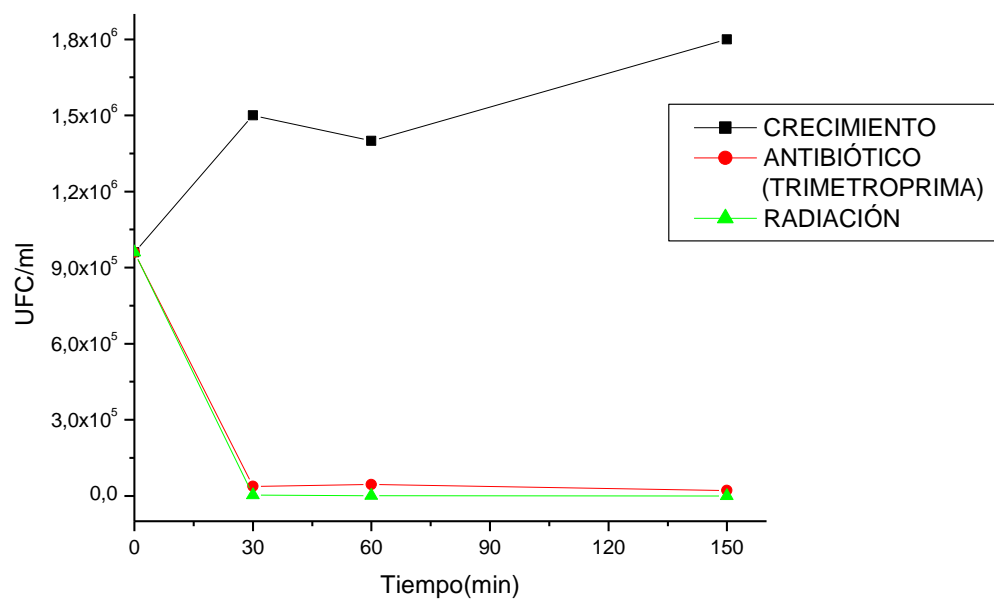
En la figura 2.19(b) se observa como la presencia de TiO<sub>2</sub> sin activación, en sus diferentes fases (amorfo, anatasa o rutilo), afectó el crecimiento bacteriano disminuyendo en un orden de magnitud las ufcml<sup>-1</sup> del conteo inicial, durante los primeros 30 minutos. Para tiempos mayores, hasta los 150 minutos, la viabilidad bacteriana se mantuvo constante tal como se indica en la tabla 2.6.

En la figura 2.19(c) se observa que las bacterias de *S. aureus* en presencia de 1mg/ml [1000 ppm] de TiO<sub>2</sub> activado (amorfo, anatasa y rutilo), previamente irradiado con luz UV durante 1 hora, todas las bacterias de *Staphylococcus aureus* perdieron su viabilidad después de 30 minutos de iniciado el ensayo,

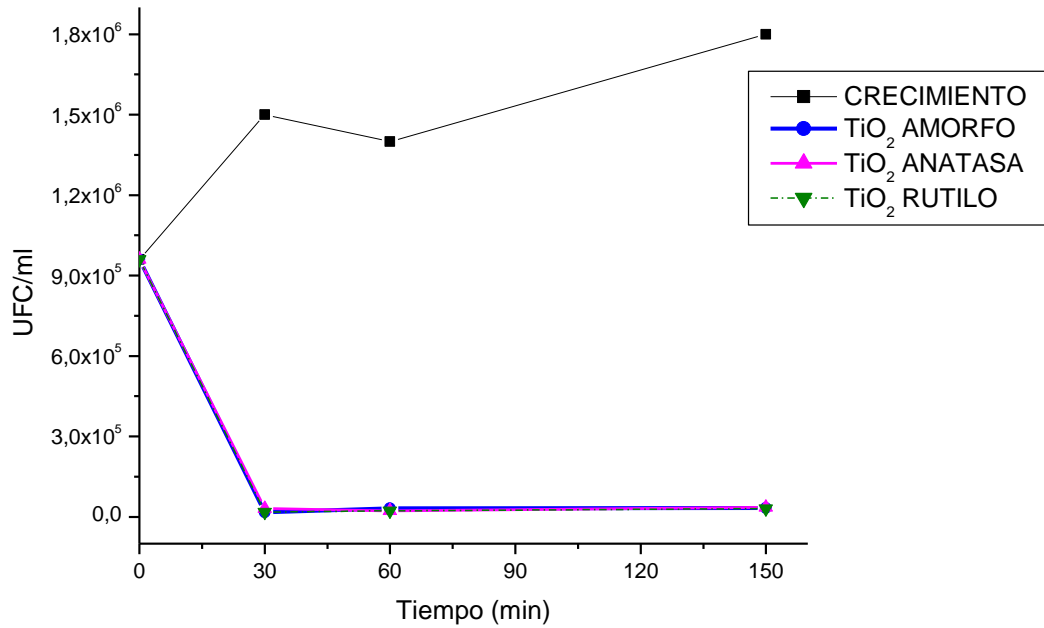
resultado que se mantuvo durante todo el tiempo. La inactivación completa del *S. aureus* se observó a los 30 minutos de iniciado el ensayo. Los datos numéricos obtenidos se presentan en la tabla 2.6.

**Tabla 2.6.** Datos numéricos obtenidos en el ensayo de curvas de letalidad de cepas de *Staphylococcus aureus* al considerar las diferentes variables de interés por 30,60 y 150 minutos.

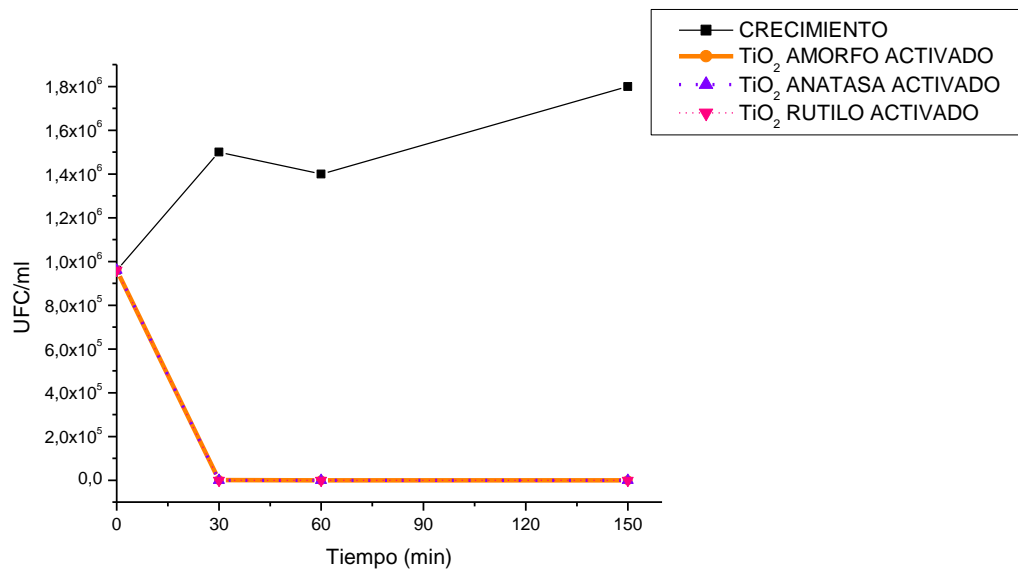
Tiempo (min)	Crecimiento (ufcml <sup>-1</sup> )	Antibiótico (trimetoprima) (ufcml <sup>-1</sup> )	Radiación (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> amorfo (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> anatasa (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> rutilo (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> amorfo activado (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> anatasa activado (ufcml <sup>-1</sup> )	TiO <sub>2</sub> rutilo activado (ufcml <sup>-1</sup> )
0	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5	9,6E5
30	1,6E6	3,8E4	2,9E3	1,7E4	3,1E4	1,8E4	1 E2	0	0
60	1,4E6	4,5E4	1E3	3,2E4	2,3 E4	2,2E4	0	0	0
150	2E6	2,1E4	0	3,3E4	3,5 E4	3,1E4	0	0	0



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.19.** Curvas de número de unidades formadoras de colonias (ufcml<sup>-1</sup>) en función del tiempo, considerando las diferentes variables de interés que afectan la viabilidad de las células de *S. aureus*: (a) efecto de la radiación y el antibiótico, (b) efecto de la exposición al TiO<sub>2</sub> sin activar y (c) efecto de la exposición al TiO<sub>2</sub> activado previamente, considerando diferentes fases presentes en el óxido.

De acuerdo a los resultados obtenidos no hay gran diferencia entre el efecto de fotodegradación ocasionada por el TiO<sub>2</sub> fase anatasa y el TiO<sub>2</sub> fase rutilo, lo que lleva a concluir que la eliminación del *S. aureus* es prácticamente independiente de la fase cristalina que presenta el TiO<sub>2</sub> activado bajo las condiciones a las que se realizaron los ensayos.

Al evaluar los ensayos realizados por separado, para determinar el efecto de la radiación UV, figura 2.19(a), y la exposición al TiO<sub>2</sub> no activado, figura 2.19(b), y activado, figura 2.19(c), se observa que el TiO<sub>2</sub> sin activar ocasionó una pequeña disminución en el número de ufcml<sup>-1</sup> bacteriana (ver figura 2.19(b) y tabla 2.6), mientras que al exponer las bacterias a la radiación UV se obtuvo la eliminación de las mismas a los 150 minutos de inicio del ensayo (figura 2.19 y tabla 2.6). Pero, si se activa previamente el TiO<sub>2</sub>, sometándolo a la radiación UV durante 1 hora, la inactivación bacteriana total se alcanzó a los 30 minutos de inicio del ensayo para las fases cristalinas anatasa y rutilo.

Un análisis similar al realizado a los resultados obtenidos de los ensayos para *E. coli* es válido para el caso del *S. aureus*, lógicamente considerando la diferencia que existe entre la estructura de las bacterias Gram negativa, *E. coli*, y Gram positiva, *S. aureus* (ver figuras 2.3 y 2.4).

### ***Consideraciones generales teniendo en cuenta el tamaño nanométrico del TiO<sub>2</sub>***

Un aspecto importante que es necesario considerar para explicar los resultados que se obtuvieron en este trabajo, es el tamaño nanométrico que presentaron las partículas de TiO<sub>2</sub> sintetizadas por el método sol gel. Para ello se utilizó una metodología similar a la indicada en los numerales anteriores.

### **1) Ensayos sin iluminación**

Trabajos previos muestran que las nanopartículas de varios óxidos, entre ellos el ZnO, SiO<sub>2</sub>, y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, son tóxicas para las bacterias debido a su tamaño [18]. En el caso concreto de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> no hay acuerdo en los resultados con relación a este efecto: algunos dicen que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> no presentan este efecto de toxicidad sobre las bacterias [18] y otros dicen que sí [43, 44]; los resultados del presente proyecto fortalece y da soporte a esta última apreciación (figuras 2.15 y 2.19). El efecto de toxicidad que presentan las nanopartículas, sobre las bacterias podría ser ocasionado por los iones metálicos disueltos en el sistema que se desprenden de la superficie de los mismos, antes o después de que las nanopartículas entren en las células [45]. Pero este no debe ser el único mecanismo que se debería considerar al estudiar la actividad antibacteriana de las nanopartículas, se deberían considerar otras propiedades que estén relacionadas con su nanotamaño y que hacen posible la producción de radicales libres, por ejemplo [46], u otros mecanismos de toxicidad no determinados adicionales a los que consideran las especies de oxígeno altamente reactivas (ROS por sus siglas en inglés). En conclusión, los mecanismos antibacteriales de las nanopartículas no están completamente determinados, aunque el contacto íntimo bacterias-nanopartículas, recubriendo las segundas a las primeras, parece ser muy importante para que este efecto se haga evidente [18].

### **2) Ensayos con iluminación**

Para justificar la favorable acción bactericida del TiO<sub>2</sub> al ser sometido a la acción de la radiación UV, considerando su tamaño nanométrico, se debe partir de los procesos primarios que ocurren durante la fotocatalisis. El primer evento es la incidencia de la radiación,  $h\nu$ , que permite la generación de portadores de carga a través de la siguiente reacción:

(2.9)

portadores de carga que se desplazan hacia la superficie de la partícula quedando atrapados cerca o en ella, tal que [17]:

(2.10a)

(2.10b)

donde  $\Gamma_{OH}$  representa los grupos funcionales hidratados superficiales,  $e_{tr}^*$  el electrón atrapado en la superficie y  $h\nu_{tr}$  al hueco atrapado también en la superficie. Los portadores de carga generados pueden experimentar recombinación en el “bulk” del material [17]:

(2.11)

o en la superficie [17]:

(2.12a)

(2.12b)

Si los portadores de carga “sobreviven” y no se recombinan, es posible que ocurran en la superficie las siguientes reacciones de oxidación y reducción, respectivamente [17]:

(2.13a)

(2.13b)

siendo  $OH^{\cdot}$  una especie reducida y  $OH^+$  una especie oxidada.

Aunque los tiempos característicos de estas reacciones en el proceso de fotocatalisis dependerían, principalmente, de las características del material, es de esperar que el más lento sea el transporte de carga hacia la superficie, mas para el  $TiO_2$  [17].

Por otro lado, un óptimo proceso de fotocatalisis, por parte del  $TiO_2$ , está muy relacionado con la denominada “eficiencia cuántica”, la cual indica la relación

entre la velocidad de transferencia de portadores de carga, hacia la superficie, y la velocidad de recombinación del par electrón-hueco; por lo tanto, una mayor eficiencia cuántica se podría lograr reduciendo la velocidad de recombinación o aumentando la velocidad de transferencia de portadores de carga a la superficie. En nuestro caso, el haber obtenido por el método sol gel nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  con un tamaño de  $\sim 10$  nm para la fase anatasa y  $\sim 50$  nm para la fase amorfa y rutilo, aumentaría la velocidad de transferencia de carga a la superficie pero esta reducción de tamaño también aumentaría su superficie específica por lo que los procesos de recombinación superficial se incrementarían, esto ocasionaría que los dos procesos entraran en competencia para determinar la eficiencia reactiva fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  sintetizado. Según la literatura [17] hay un valor óptimo de tamaño de partícula donde se presentaría un equilibrio de estos dos procesos, entre 10 y 13.3 nm, obteniéndose la máxima eficiencia fotocatalítica para el  $\text{TiO}_2$  “puro”. El tamaño de partícula obtenido en este trabajo,  $\sim 10$  nm para la fase anatasa y  $\sim 50$  nm para la fase amorfa y rutilo (figura 1.16), no está muy alejado de este valor óptimo y, además, el método sol gel garantiza una alta pureza del  $\text{TiO}_2$  (bajo contenido de impurezas y por lo tanto de sitios “trampa”, tanto para los electrones como para los huecos, que podrían constituirse en centros de recombinación), características que permiten justificar la eficiencia bactericida observada para el  $\text{TiO}_2$  sintetizado (ver figuras 2.12 a 2.18 y las tablas 2.5 y 2.6).

Otro aspecto que hay que considerar cuando se trata la actividad fotocatalítica, y lo que la pueda afectar, es la estructura cristalina del  $\text{TiO}_2$ , concretamente su estructura superficial. Esto se puede justificar si se consideran los sitios donde los portadores de carga fotogenerados, electrones y huecos, pueden ser atrapados. Los electrones fotoproducidos pueden ser atrapados en diferentes sitios: por átomos de titanio ubicados en la superficie o en el interior de la partícula, o por moléculas de oxígeno adsorbidas sobre la superficie [6,47]. Para



el caso de los huecos fotogenerados, ellos son atrapados por átomos de oxígeno reticulares, cercanos a la superficie, o por grupos hidroxilos superficiales.

Observando los resultados de EDS obtenidos para las muestras de  $\text{TiO}_2$  sintetizadas, figura 1.18, es evidente que la presencia y cantidad de ciertos elementos en las muestras, específicamente de titanio y oxígeno, se modifica si se tiene una diferente estructura del óxido. Así, para el  $\text{TiO}_2$  amorfo (figura 1.18(a)) existen zonas ricas en titanio y otras que contienen titanio-oxígeno. Después de tratar térmicamente el  $\text{TiO}_2$  amorfo se obtuvo la fase anatasa (figura 1.18(b)) donde existen aún zonas ricas en titanio, en menor cantidad que para el caso anterior, y una gran cantidad de titanio-oxígeno; al aumentar la temperatura de tratamiento ( $T > 750^\circ\text{C}$ ), obteniéndose la fase rutilo (figura 1.18(c)), se observa que no hay zonas ricas en titanio y predomina en la mayoría de la muestra el titanio-oxígeno. Si se considera lo anteriormente enunciado, y los resultados obtenidos, es de esperar que para el  $\text{TiO}_2$  amorfo y el  $\text{TiO}_2$  fase anatasa predomine el “atrapamiento” de electrones fotoproducidos, más para el amorfo que para la anatasa debido a la presencia de una mayor cantidad de zonas ricas en titanio. Por otro lado, para las fases anatasa y rutilo es importante el “atrapamiento” de huecos por la presencia de oxígenos reticulares cerca a la superficie de la partícula. De acuerdo a esto, la fase del  $\text{TiO}_2$  más favorecida con este proceso de “atrapamiento” de portadores de carga fotogenerados es la tipo anatasa. Este proceso de “atrapamiento” de los portadores de carga es importante porque propicia la “separación” de los electrones y los huecos, “retrasando” así el proceso de recombinación. Por un lado, las especies “no atrapadas” y que no se recombinen pueden ser transferidas al adsorbato (de naturaleza oxidante para el  $e^-$  y reductor para el  $h^+$ ), proceso que no es muy eficiente por que la recombinación ocurre muy rápidamente, pero, posteriormente, los “atrapados” pueden ser excitados térmicamente para que continúen moviéndose sobre la superficie y reaccionen, contribuyendo a las

oxidación o reducción de los adsorbatos y haciendo más eficiente el efecto fotodegradante del  $\text{TiO}_2$ .

En la literatura científica [19,20] se indica que la fase anatasa, del  $\text{TiO}_2$ , tiene una mayor actividad fotocatalítica que la fase tipo rutilo esto debido a que el nivel de energía de la banda de conducción del rutilo es más positiva, lo que retardaría la reducción del oxígeno ( ) [19]. El hecho de que el  $\text{TiO}_2$  Degussa P25, que contiene un 80% de anatasa y un 20% de rutilo con un tamaño de partícula de 30 nm, sea el fotocatalizador más utilizado actualmente, por su alta actividad fotocatalítica, se podría justificar considerando su alta cristalinidad y el bajo dopado con  $\text{Fe}^{3+}$  [17]. Muy poco trabajo se ha realizado para determinar la actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  amorfo [20]. Este material debe tener muchas imperfecciones, entre ellas: impurezas, enlaces tipo “dangling”, o microvacíos, que deberían contribuir a la recombinación , debido a los estados electrónicos que estas imperfecciones generan en la banda prohibida. Pero, por otro lado, los estados localizados tipo Anderson, que están presentes en el  $\text{TiO}_2$  amorfo [48], podrían incrementar los “tiempos de vida” de los y aumentando la actividad fotocatalítica [20]. Los resultados de la literatura [20] muestran una despreciable actividad fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$  amorfo, que la justificaron considerando la fácil recombinación del y el favorecido tanto por las “trampas” superficiales, propiciadas por las imperfecciones ya mencionadas, como las que existen en el “bulk” de las nanopartículas. Recientemente, un trabajo realizado utilizando  $\text{TiO}_2$  amorfo hidratado ( $\text{TiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) [49], mostró que el material presentaba una actividad fotocatalítica no despreciable que se incrementaba con la temperatura. Los investigadores concluyeron que el  $\text{TiO}_2$  amorfo presentaba esta adecuada fotoactividad debido a la gran cantidad de agua superficial ubicada en los sitios activos, los “ $\text{Ti}^{3+}$ ”. Por otro lado, comparando el valor del ancho de la banda prohibida de las fases cristalinas del  $\text{TiO}_2$  con el amorfo de este óxido, se encuentra que este último tiene un “gap”

más ancho,  $\sim 3.5$  eV [49], lo que propicia una reducción fotocatalítica eficiente del  $H_2O$ .

Para el caso concreto de la acción bactericida, tanto de las fases cristalinas del  $TiO_2$  como la amorfa estudiadas en este trabajo, se encontró que todas presentaban gran actividad fotodegradante, tal que a los 30 minutos de ser activados los óxidos de titanio, tiempo que corresponde a la primera lectura del ensayo, no se observaron colonias en los cultivos (figuras 2.12 y 2.16). Específicamente con relación al  $TiO_2$  amorfo, que presentó zonas ricas en titanio (figura 1.18(a)), los trabajos previos [20,49] indican que después de iluminar la muestra se deberían formar una gran cantidad de sitios activos " $Ti^{3+}$ " debido al atrapamiento de los electrones fotogenerados por los " $Ti^{4+}$ " superficiales, tal como lo muestran las reacciones de las ecuaciones 2.12a y 2.12b. Además, dada la similitud en la obtención de las muestras utilizadas en este proyecto con las del trabajo de Zhang y Maggard [49], se puede considerar que la actividad que presenta el  $TiO_2$  amorfo se justifica por el "agua" superficial que se ubica en los sitios " $Ti^{3+}$ ", lo que reduciría la recombinación de los huecos con los electrones en estos sitios. Por otro lado, no hay que descartar el efecto de los estados localizados de Anderson, presentes en el  $TiO_2$  amorfo, con relación al incremento del tiempo de vida de los  $h^+$  y los  $e^-$ , lo que permitiría aumentar la actividad fotocatalítica de este material.

## 2.4. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos al estudiar el cambio en la viabilidad de bacterias *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva), utilizando las curvas de letalidad y considerando las diferentes variables analizadas, se puede concluir lo siguiente:

- ✚ El estudio del efecto de la radiación UV sobre las cepas de interés, muestra una reducción del número de colonias presentes en los cultivos. Para la cepa de *Escherichia coli* se observó que al someterla a la acción de la radiación UV, durante 30 minutos, una disminución considerable de su población. Esta condición de reducción se mantuvo, no tan pronunciada, hasta los 150 minutos de exposición, sin alcanzarse la completa eliminación de las bacterias. Por otro lado, las cepas de *Staphylococcus aureus*, sometidas a la irradiación UV durante 30 minutos, presentaron una gran disminución de su población y mantuvieron esta tendencia hasta alcanzar la eliminación total de las bacterias, a los 150 minutos de exposición.
- ✚ Independientemente de la fase presente en el TiO<sub>2</sub> sin activar (amorfa, anatasa o rutilo), el número de unidades formadoras de colonias presentes en los cultivos se redujo apreciablemente. Esto pone en evidencia el desarrollo de ciertas reacciones superficiales entre la superficie de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y la pared de la membrana de las bacterias, reacciones que afectarían la permeabilidad de esta última y el proceso de “respiración” de los microorganismos, ocasionando su muerte. Aunque no se determinaron específicamente estas reacciones, es de esperar que la radiación UV presente en el espectro de radiación solar, entre el 5 y 10%, permitiría la formación de especies reactivas altamente oxidantes, como el superóxido y radicales , que oxidarían la membrana (proceso denominado peroxidación lipídica), ocasionándole grandes daños y posterior muerte de la bacteria. No hay que descartar la posibilidad de que el TiO<sub>2</sub>, de tamaño nanométrico, pueda ingresar al interior de la bacteria y ocasionar daños más contundentes en ella.
- ✚ El TiO<sub>2</sub> activado previamente, sometiendo el polvo sintetizado a la acción de radiación UV durante una hora, independiente de la fase presente eliminó totalmente las colonias de bacterias durante los primeros momentos de

interacción del óxido con las cepas cultivadas, tal como se evidenció a los 30 minutos de iniciado el ensayo. Este resultado indica que el efecto fotodegradante del  $\text{TiO}_2$  sobre las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, en concentraciones de  $2.7 \times 10^6$  y  $9.6 \times 10^5$  respectivamente, es contundente y elimina completamente las cepas cultivadas debido, principalmente, a la acción de las especies altamente oxidantes producidas por los pares electrón - hueco. Además, para las condiciones empleadas en el ensayo, no se requirió de la acción continua de la radiación UV sobre el  $\text{TiO}_2$  incorporado a los cultivos.

Aunque no era un objetivo del proyecto proponer un mecanismo que explicara la acción bactericida de la reacción fotocatalítica del  $\text{TiO}_2$ , ampliamente referenciada en la literatura científica, se obtuvieron algunos elementos importantes que se deberían considerar en el momento que se estructure dicho mecanismo. Indudablemente, el daño principal ocasionado a la pared celular, donde la superficie del fotocatalizador hace contacto con la bacteria, es producido por las especies altamente oxidantes generadas a través del efecto de fotoexcitación del  $\text{TiO}_2$ . Después de romper la protección de la pared celular, el daño por oxidación podría extenderse a la membrana citoplasmática presente en las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Una vez deteriorada la membrana citoplasmática se propiciaría la salida del contenido celular y, posteriormente, la lisis bacteriana.

## **Bibliografía**

- [1] D. M. Blake, P. Maness, Z. Huang, E. J. Wolfrum, J. Huang and W. A. Jacoby. "Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells". Separation and Purification Methods, Volume 28(1) (1999), pp. 6-9.
- [2] V. M. Sarria, S. Parra, A. G. Rincón, C. Pulgarín, R. A. Torres. Nuevos sistemas electroquímicos y fotoquímicos para el tratamiento de aguas residuales y de bebida.

- [3] M. K. Ram, S. Andreescu, H. Ding (Eds), "Nanotechnology for environmental decontamination", Mc Graw Hill Companies Inc., New York, 2011.
- [4] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake. "Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders". FEMS Microbiol.Lett. 29 (1985,) 211-214.
- [5] C. Pulgarin, J. Kiwi, V. Nadtochenko. "Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO<sub>2</sub> films involving cell-wall damage and lysis". Applied Catalysis B: Environmental. 2012.
- [6] M. Kaneko, J. Okura (Eds), "Photocatalysis: Science and Technology", Biological and Medical Physics series, Kodansha- Springer, New York, 2002.
- [7] S. M. Sze, Kwok K. Ng, "Physics of semiconductor devices", third edition, John Wiley & Sons, Inc. Publication, New Jersey, 2007.
- [8] V. H. Grassian (Ed). "Nanoscience and Nanotechnology: environmental and Health Impacts". Capítulo 13, John Wiley & Sons. Inc Publication, New Jersey, pp. 332-333, 2008.
- [9] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake. "Electrochemical sterilization of microbial cells". Bioelectrochem, Bioenergetics, 13(1984), pp. 393-400.
- [10] Diario la Prensa, sábado 18 de junio de 2011, Buenos Aires – Argentina.
- [11] T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, N. Nakamura, T. Komine. "Continuous - Sterilization System That Uses Photosemiconductor Powders". Appl. Environ Microbiol.54(6)(1988):1330-1333.
- [12] T. Saito, T. Iwase, J. Horie and T. Mrioka. "Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on mutans streptococci". J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 14 (1992), 369-379.
- [13] K. Sunada, T. Watanabe, K. Hashimoto. "Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub> thin film". Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 156 (2003), 227–233.
- [14] P.C. Maness, S. Smolinski, D.M. Blake, Z. Huang, E.J. Wolfrum, W.A. Jacoby, "Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward and understanding of its killing mechanism". Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4094.
- [15] Z. Huang, P.C. Maness , D. M. Blake , E. J. Wolfrum, S. Smolinski , W. Jacoby. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 130 (2000) 163–170.
- [16] P. Liu, W. Duan, Q. Wang, X. Li, "The damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of TiO<sub>2</sub> ", colloids and surface B: Biointerfaces, 78 (2010), pp. 171-176.

- [17] Z. Zhang, Ch. Wang, R. Zakaria, J.Y. Ying, "Role of particle size in nanocrystalline TiO<sub>2</sub>- based photocatalysts", J. Phys. Chem. B, 102 (1998), pp. 10871-10878.
- [18] W. Jiang, H. Mashayeki, B. Xing, "Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles", Environmental Pollution, 157 (2009), pp. 1619-1625.
- [19] K. Tanaka, M.F.V. Capule, T. Hisanaga, "Effect of crystallinity of TiO<sub>2</sub> on its photocatalytic action", Chem. Phys. Lett. , 187 (1-2)(1991), pp. 73-76.
- [20] B. Ohtani, Y. Ogawa, S. Nishimoto, "Photocatalytic activity of amorphous-anatase mixture of titanium (IV) oxide particles suspended in aqueous solutions". J. Phys. Chem. B, 101 (1997), pp. 3746-3752.
- [21] Diario la Prensa, sábado 18 de junio de 2011, Buenos Aires – Argentina.
- [22] T. D. Brock, 1978. Capitulo 2, la célula procariota, 15-60 p., En: Biología de los Microorganismos, 2 edición, Ediciones omega, S.A., Barcelona, p. 774.
- [23] L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein.. Microbiology, 5 ed., Editorial the McGraw-Hill Companies. 2002. p. 1147.
- [24] N. R. Brock, S. J. Harper, J. R. Waller, M. L Nicholson. A concecutive series of 70 laparoscopic donor nephrectomies demonstrates the safety of this new operation. Transplantation Proceedings, vol.37 No. (2) (2005), pp.627-628.
- [26] E. Mamani, D. Luján, G. Pajuelo. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito U nanue. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos, vol.67 No.(2) (2002), pp.120-124.
- [27] C. Wei, W. Lin, Z. Zainal, N.E. Williams, K. Zhu, A.P. Kruzic, R.L. Smith, K. Rajeshwar. Bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assited water disinfection system. Environ. Sci. Technol. 28 (5) (1994), pp. 934-938.
- [28] M. Bekbolet. Photocatalytic bactericidal activity of TiO<sub>2</sub> in aqueous suspensions of *E. coli*. Water Sci Technol (1997); 35 (11-12):95-100.
- [29] N. Huang, Z. Xiao, D. Huang, C. Yuan, "Photochemical disinfection of *Escherichia coli* with a TiO<sub>2</sub> colloid solution and a self assembled TiO<sub>2</sub> thin film". Supramol. Sci., 5 (1998), pp. 559-564.
- [30] A. G. Rincon, C. Pulgarin. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous–intermittent) light intensity and of (suspended–fixed) TiO<sub>2</sub> concentration. Applied Catalysis B: Environmental 44 (2003) 263–284.
- [31] M. Wegelin, S. Canonica, K. Mechsner, T. Fleischmann, F. Pesaro, A. Metzler. Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. J Water Supply Res Technol. (1994); 43(3): 154-169.

- [32] C. Davies, L. Evison, "Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters", *J. Appl. Bacteriol* 70 (1991), pp. 265-274.
- [33] A. acra, Z. Raffoul, Y. Karahagopian, "Solar disinfection of drinking water and oral rehydration solutions: guidelines for house hold application in developing countries". Department of Environmental Health, Beirut, 1984.
- [34] S. Kim, W. Choi. Kinetics and mechanisms of photocatalytic degradation of  $(\text{CH}_3)_n\text{NH}_4\cdot n^+(0 \leq n \leq 4)$  in  $\text{TiO}_2$  suspension: the role of OH radicals. *Environ Sci Technol* (2006)36: 2019-2025.
- [35] M. Cho, H. Chung, W. Choi, J. Yoon. Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in  $\text{TiO}_2$  photocatalytic disinfection. *Appl Environ Microbiol* (2005),71(1): 270-275.
- [36] M. Bekbölet, C. Araz, *Chemosphere*. 32 (1996) 959.
- [37] L. Belháčová, J. Krysa, J. Geryk, J. Jirkovský, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 149.
- [38] J. Ireland, P. Klostermann, E. Rice, R. Clark, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) pp.1668.
- [39] H. Sakai, E. Ito, R. Cai, T. Yoshioka, Y. Kubota, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Biochim. Biophys. Acta* 1201 (1994) 259.
- [40] R. Cai, R.K. Hashimoto, K. Itoh, Y. Kubota, A. Fujishima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64 (1991) 1268.
- [41] H. Hidaka, S. Horikoshi, K. Ajisaka, J. Zhao, N. Serpone, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 108 (1997) 197.
- [42] H. Hidaka, S. Horikoshi, N. Serpone, J. Knowland, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 111 (1997) 205.
- [43] G. Fu, P.S. Vary, C.T.Lin, "Anatase  $\text{TiO}_2$  nanocomposites for antimicrobial coatings", *journal of physical chemistry B*, 109, pp.8889-8898.
- [44] L. K. Adams, D. Y. Lyon, P. J. J. Alvarez, "Comparatives eco-toxicity of nanoscale  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$  and  $\text{ZnO}$  water suspensions", *Water Research*,40 (2006) pp. 3529-3532.
- [45] T. J. Bruner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink, W. J. Stark, "In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and the effect of particle solubility ". *Environmental Science X Technology*, 40 (14), pp. 4374-4381.
- [46] M. Green, E. Hewman, "Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking", *Chemical communications*, (2005) pp. 121-123.
- [47] Y. Nakaoka, Y. Nasaka, "ERS", *J. Photochem. Photobiol. A*, 110, (1997), pp. 299-305.



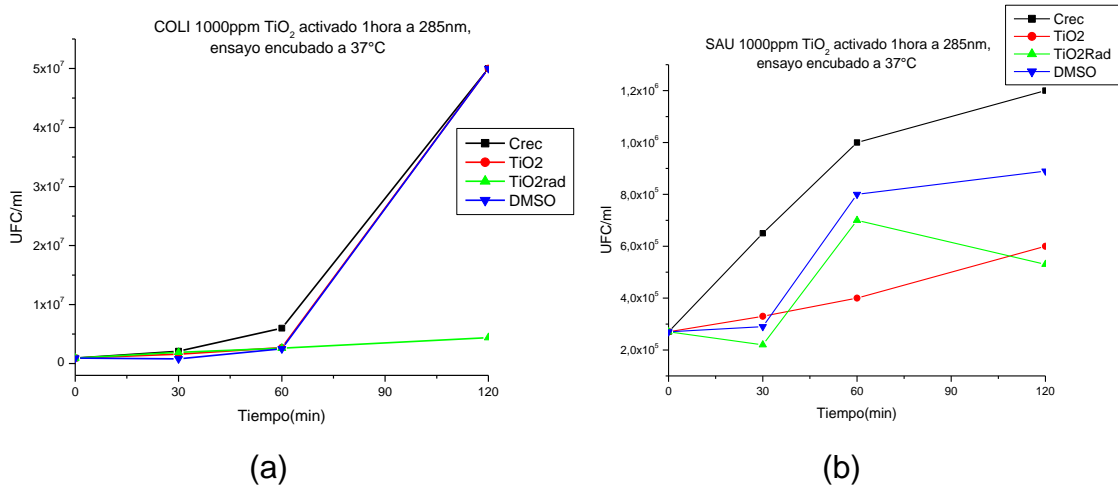
**[48]** N. F. Mott, E. A. Davis, "Electronic Processes in Non-crystalline materials", second edition. Oxford University Press. Oxford U.K., 1979.

**[49]** Z. Zhang, P. A. Muggard, "Investigation of photocatalytically-active hydrated forms of amorphous titania,  $\text{TiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ", J. Photochem. Photobiol A: chemistry, 186, (2007) pp.8-13.

## ANEXOS

### I. Estudio preliminar del efecto bactericida del TiO<sub>2</sub> utilizando curvas de letalidad.

**Primer ensayo:** Se llevo a cabo en una concentración de 1000 ppm de TiO<sub>2</sub> fase anatasa, este se activo por una hora en UV a 285 nm, luego se enfrento a las dos cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus* y posteriormente se encubo en estufa a 37°C.



**Figura 1.** Resultado de los ensayos para determinar el efecto bactericida del TiO<sub>2</sub>, fase anatasa obtenida en este trabajo, sobre cepas de *E.coli* (a) y *S. aureus* (b), tomando 1000 ppm del óxido.

En la figura 1 se observa que el dimetil sulfoxido no degrada las bacterias y siguen su crecimiento normal tanto SAU como COLI. La presencia de TiO<sub>2</sub> sin radiación no degrada las bacterias, ni SAU ni COLI, por esta razón estos ensayos no se repitieron. Se realizaron conteos a 30' 60' 2h y 24h.

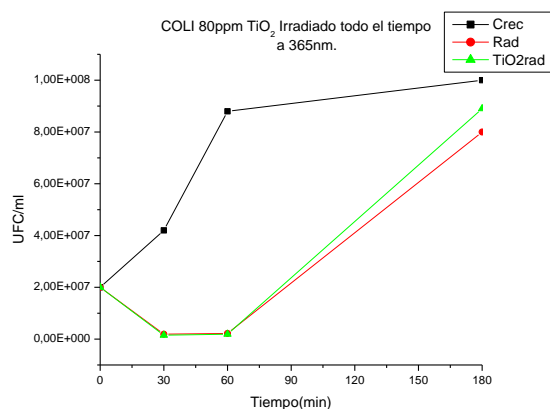
**Tabla 1.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *E. coli*, tomando 1000 ppm de TiO<sub>2</sub>.

tiempo	crecimiento	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> - radiacion	DMSO
0	9,2E5	9,2E5	9,2E5	9,2E5
30	2,1E6	1,6E6	1,9E6	8E5
60	6E6	2,7E6	2,6E6	2,5E6
120	5E7	5E7	4,4E6	5E7

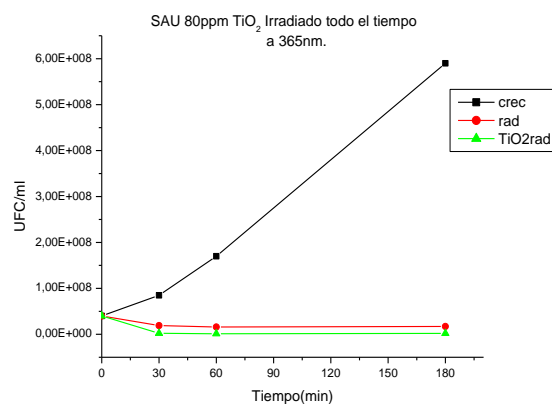
**Tabla 2.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *S. aureus*, tomando 1000 ppm de TiO<sub>2</sub>.

tiempo	crecimiento	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> - radiacion	DMSO
0	2,7E5	2,7E5	2,7E5	2,7E5
30	6,5E5	3,3E5	2,2E5	2,9E5
60	1E6	4E5	7E5	8E5
120	1,2E6	6E5	5,3E5	8,9E5

**Segundo ensayo:** Se llevo a cabo a una concentración de 80 ppm de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, irradiado todo el tiempo en UV a 365 nm, en las dos cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus* a temperatura ambiente (22 °C). Se realizaron conteos a 30' 60' y 3h.



(a)



(b)

**Figura 2.** Resultado de los ensayos para determinar el efecto bactericida del  $\text{TiO}_2$ , fase anatasa obtenida en este trabajo, sobre cepas de *E. coli* (a) y *S. aureus* (b), tomando 80 ppm del óxido.

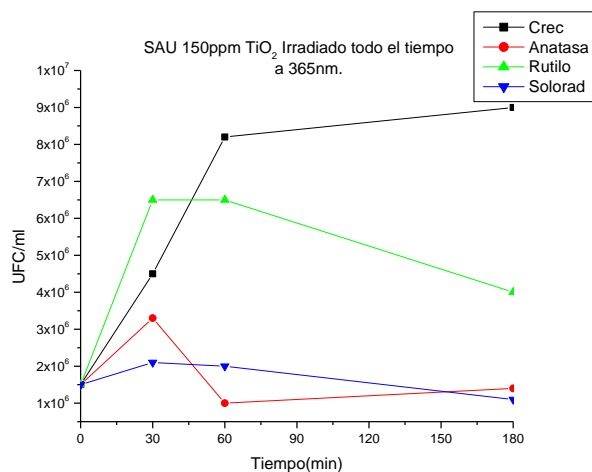
**Tabla 3.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *E. coli*, tomando 80 ppm de  $\text{TiO}_2$ .

tiempo	crecimiento	radiac	$\text{TiO}_2$ - radiacion
0	2E7	2E7	2E7
30	4,2E7	1,9E6	1,5E6
60	8,8E7	2,2E6	1,9E6
180	1E8	8E7	8,9E7

**Tabla 4.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *S. aureus*, tomando 80 ppm de  $\text{TiO}_2$ .

tiempo	crecimiento	radiac	$\text{TiO}_2$ - radiacion
0	4E7	4E7	4E7
30	8,5E7	1,9E7	2,2E6
60	1,7E8	1,6E7	1,3E6
180	5,9E8	1,7E7	2,06E6

**Tercer ensayo:** Se llevo a cabo a una concentración de 150 ppm de  $\text{TiO}_2$  en las dos fases anatasa y rutilo, irradiada todo el tiempo en UV a 365 nm, en una cepa bacteriana de *S. aureus* a temperatura ambiente (22 °C). También se llevo a cabo un ensayo de la bacteria irradiada para comprobar la efectividad de la radiación. Se realizaron conteos a 30', 60' y 3h.



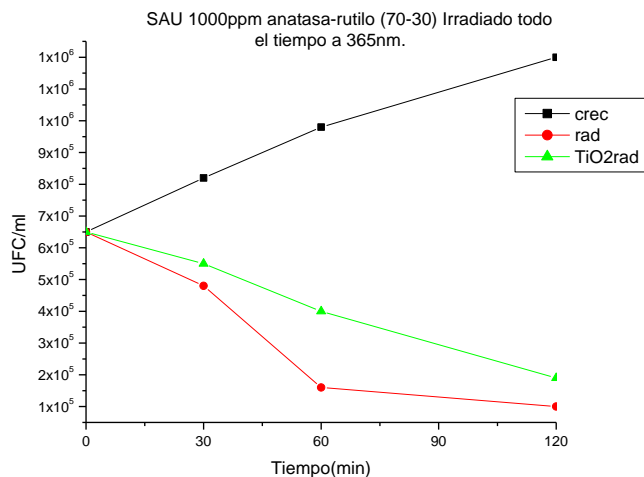
**Figura 3.** Resultado del ensayo para determinar el efecto bactericida del  $\text{TiO}_2$ , tanto de la fase anatasa como de la fase rutilo obtenidas en este trabajo, sobre cepas *S. aureus*, tomando 150 ppm del óxido.

**Tabla 5.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *S. aureus*, tomando 150 ppm de  $\text{TiO}_2$  de las fases anatasa y rutilo.

tiempo	crecimiento	anatasa	rutilo	Solo radiación
0	1,5E6	1,5E6	1,5E6	1,5E6
30	4,5E6	3,3E6	6,5E6	2,1E6
60	8,2E6	1E6	6,5E6	2E6
180	9E6	1,4E6	4E6	1,1E6

**Cuarto ensayo:** Se realizo a una concentración de 1000 ppm de  $\text{TiO}_2$  en una mezcla de dos fases (anatasa- rutilo) en una proporción 70-30 respectivamente, irradiada todo el tiempo en UV a 365 nm, en una cepa bacteriana de *S. aureus* a temperatura ambiente (22 °C). También se llevo a cabo un ensayo de la bacteria

irradiada para comprobar la efectividad de la radiación. Se realizaron conteos a 30' 60' y 3h.



**Figura 4.** Resultado del ensayo para determinar el efecto bactericida del  $\text{TiO}_2$ , utilizando una mezcla de 70-30 fase anatasa y fase rutilo obtenidas en este trabajo, sobre cepas *S. aureus*, tomando 1000 ppm del óxido.

**Tabla 6.** Datos de unidades formadoras de colonia obtenidos 24 horas después de haber realizado el cultivo de las bacterias *S. aureus*, tomando 1000 ppm de una mezcla de fases anatasa-rutilo, 70-30, del  $\text{TiO}_2$ .

tiempo	crecimiento	radiación	TiO2+rad
0	6,5E5	6,5E5	6,5E5
30	8,2E5	4,8E5	5,5E5
60	9,8E5	1,6E5	4E5
120	1,2E6	1E5	1,9E5