

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**INMOVILIZACIÓN DE LA PRODIGIOSINA PARA APLICACIONES  
BIOTECNOLÓGICAS**

**Por:**

**Patricia Hernández Velasco**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación  
en Microbiología Aplicada**

**Noviembre, 2018.**

**INMOVILIZACIÓN DE LA PRODIGIOSINA PARA APLICACIONES  
BIOTÉCNOLÓGICAS**

Revisión de la tesis

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

**ASESOR**

---

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

**CO- ASESORA DE TESIS**

---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

**COMITÉ TUTORIAL**

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken

**COMITÉ TUTORIAL**

**INMOVILIZACIÓN DE LA PRODIGIOSINA PARA APLICACIONES  
BIOTÉCNOLÓGICAS**

Aprobación de la tesis

---

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

**PRESIDENTE**

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken

**SECRETARIO**

---

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

**VOCAL**

---

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## RESUMEN

Patricia Hernández Velasco

Fecha de grado: Noviembre, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: INMOVILIZACIÓN DE LA PRODIGIOSINA PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

Número de páginas: 64

Candidato para el Grado de Maestría en  
Ciencias con Orientación en  
Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

La prodigiosina es un pigmento producido por *Serratia marcescens*. Posee una estructura tripirrólica de naturaleza hidrofóbica. Tiene la característica de presentar actividades biológicas importantes, como agente antimicrobiano, antioxidante, y actividad anticancerígena.

Gran parte de las aplicaciones que se han desarrollado empleando este metabolito son en su forma libre, lo que impide la recuperación y reutilización del mismo, por lo que el presente proyecto se enfocó al desarrolló una metodología que permitió realizar la inmovilización de la prodigiosina mediante adsorción física en 3 materiales: celulosa, dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), siendo estos 2 últimos, modificados superficialmente con dodecil sulfato de sodio (SDS) para obtener una superficie hidrofóbica y así obtener la inmovilización de la prodigiosina en dichos soportes.

Las cinéticas de inmovilización mostraron que los materiales que inmovilizan una mayor cantidad de prodigiosina son la celulosa que es un material de naturaleza hidrofóbica, inmovilizando 0.62mg de prodigiosina/g de material, y el  $\text{SiO}_2$ , que inmovilizó 1.14mg de prodigiosina/g de material. Análisis por FT-IR demostraron la presencia de las bandas características del material prístino: celulosa,  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ , del surfactante (en el caso del  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  modificados) y de la Prodigiosina. Además, análisis por espectrofotometría de UV-vis, demostraron la presencia de las bandas de absorción características de la prodigiosina a 543nm.

Finalmente se llevó a cabo el desarrollo de 2 pruebas concepto para la aplicación del sistema inmovilizado; 1) mediante macro dilución se evaluó la actividad antibacteriana del sistema contra cepas Gram negativas (*E. coli*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), obteniendo un resultado negativo al mostrar aumento en la densidad óptica de los cultivos, y 2) se realizó la sensibilización de una celda

solar la cual presentó una actividad positiva en la transmisión de energía, registrando un porcentaje de eficiencia de 0.01%.

Firma del asesor: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Químicas por las instalaciones brindadas en donde se llevó a cabo el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, realizar el presente proyecto de Tesis bajo su dirección, así como por su asesoría y apoyo.

A la Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado por su apoyo, paciencia asesoría.

Al comité tutorial: las doctoras Pilar del Carmen Morales San Claudio, Alcione García González y al Doctor Ulrico Javier López Chuken, por los aportes y la retroalimentación recibida durante la realización del presente proyecto.

A la Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas, por todo el apoyo brindado desde el inicio de esta etapa.

A los profesores del posgrado, por el tiempo y los conocimientos compartidos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio quienes con su apoyo y amistad permitieron que esta experiencia fuera más agradable.

## DEDICATORIA

A mi madre por el amor y apoyo incondicional.

A mis abuelos Bertoldo Velasco Orea<sup>†</sup> y Francisca Cruz por creer en mí.



## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Serratia marcescens .....	2
1.2 Prodigiosina .....	2
1.3 Inmovilización .....	4
CAPITULO 2	
ANTECEDENTES .....	10
2.1 Aplicaciones de la prodigiosina.....	10
2.2 Usos de la prodigiosina inmovilizada .....	11
2.3 Celdas solares sensibilizadas con pigmentos microbianos.....	11
CAPITULO 3	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	13
3.1 Aportación científica.....	13
3.2 Hipótesis .....	13
3.3 Objetivo general .....	13
a) Objetivos específicos.....	14
CAPITULO 4	
METODOLOGÍA.....	16
4.1 Obtención, purificación y caracterización de la prodigiosina producida a partir de cultivos de Serratia marcescens .....	16
4.2 Modificación de los materiales (TiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> ) con SDS y caracterización mediante FT-IR.....	20
4.3 Inmovilización de la prodigiosina y caracterización mediante FT-IR y UV-vis .....	21
4.4 Evaluación de la fotoestabilidad de la Prodigiosina .....	26
4.5 Comprobación de la estabilidad de los sistemas inmovilizados (SiO <sub>2</sub> modificado con prodigiosina inmovilizada y celulosa con prodigiosina inmovilizada).....	26
4.6 Realización de pruebas de concepto .....	27
CAPITULO 5	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Obtención, purificación y caracterización de la prodigiosina producida a partir de cultivos de Serratia marcescens .....	32



5.2 Modificación de los materiales (TiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> ) con SDS y caracterización mediante FT-IR.....	33
5.3 Inmovilización de la prodigiosina y caracterización mediante FT-IR y UV- vis .....	35
5.4 Prueba de fotoestabilidad de la prodigiosina .....	48
5.5 Comprobación de estabilidad de los sistemas inmovilizados.....	49
5.6 Realizar pruebas de concepto de los sistemas inmovilizados. ....	51
CAPITULO 6	
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	58
ANEXOS .....	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Materiales empleados como soportes para inmovilización .....	6
Tabla 2. Concentraciones de prodigiosina pura.....	28
Tabla 3. Cantidades de material mg/ml y concentración de prodigiosina inmovilizada en mg/L.....	28
Tabla 4. Constantes de adsorción de la prodigiosina en TiO <sub>2</sub> modificado.....	45
Tabla 5. Constantes de adsorción de la prodigiosina en SiO <sub>2</sub> modificado.....	47
Tabla 6. Constantes de adsorción de la prodigiosina en celulosa.....	48
Tabla 7. Parámetros Electroquímicos de la Celda solar sensibilizada con prodigiosina.....	54
Tabla 8. Tabla comparativa de eficiencias de pigmentos naturales en celdas orgánicas.....	54
Tabla 9. Tabla de reactivos utilizados.....	63
Tabla 10. Tabla de equipos utilizados.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Mecanismo de acción del grupo metoxilo de la Prodigiosina sobre la membrana celular bacteriana. ....	3
Fig. 2. Espectro de absorción de la prodigiosina purificada. ....	33
Fig. 3. Espectro de FTIR TiO <sub>2</sub> prístino y TiO <sub>2</sub> modificado.....	34
Fig. 4. Espectro de FT-IR SiO <sub>2</sub> prístino y SiO <sub>2</sub> modificado.....	35
Fig. 5. Curva de calibración de la prodigiosina.....	36
Fig. 6. Interacción del material-SDS-prodigiosina. ....	37
Fig. 7. Comparación de inmovilización de la PG en materiales de estudio. ....	38
Fig. 8. Espectro de FTIR de TiO <sub>2</sub> prístino y TiO <sub>2</sub> +SDS +PG. ....	40
Fig. 9. Espectro de FTIR de SiO <sub>2</sub> prístino y SiO <sub>2</sub> +SDS+PG.....	41
Fig. 10. Espectro de FTIR de celulosa y celulosa +PG.....	42
Fig. 11. Espectro de UV-vis del TiO <sub>2</sub> +SDS y TiO <sub>2</sub> +SDS+PG.....	42
Fig. 12. Espectro de UV-vis del SiO <sub>2</sub> +SDS y SiO <sub>2</sub> +SDS+PG.....	43
Fig. 13. Espectro de UV-vis de la celulosa y celulosa + PG.....	43
Fig. 14. Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en TiO <sub>2</sub> modificado con ajuste al modelo de Freundlich.....	45
Fig. 14. Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en SiO <sub>2</sub> modificado con ajuste al modelo de Temkin.....	46
Fig. 15. Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en celulosa ajustado al modelo de Langmuir.....	47
Fig. 17. Prueba de fotoestabilidad de la prodigiosina.....	49
Fig. 18. Liberación de la prodigiosina inmovilizada en celulosa.....	50
Fig. 19. Liberación de la prodigiosina inmovilizada en SiO <sub>2</sub> modificado con SDS.....	50
Fig. 20. Curva corriente -voltaje de celda solar sensibilizada con PG.....	53

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
Abs	Absorbancia
ml	Mililitros
mg	Miligramos
L	Litro
nm	Nanómetros
FTIR	Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
PG	Prodigiosina
T°	Temperatura
h	Horas
Psi	Libra por pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
g	Gramos
μl	Microlitros
PEG	Polietilenglicol
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
mV	Milivolts
μA	Microamperio
ITO	Oxido de Indio y Estaño (Indium Tin Oxide)
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

En el campo de la microbiología moderna se han generado estudios sobre una gran diversidad de productos metabólicos que pueden ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas, tales como enzimas, pigmentos, antibióticos, entre otros (Giri,*et al.*, 2004). Cabe destacar que los pigmentos obtenidos a partir de microorganismos poseen características de gran importancia para la industria, ya que pueden ser empleados como colorantes en alimentos, textiles, plásticos, etc. (Darshan y Manonmani, 2015), así mismo, existen pigmentos que presentan actividad antioxidante, así como algunas actividades biológicas tales como: antimicrobiana e inclusive algunos que pueden presentar actividad anticancerígena.

De igual manera existen otras tecnologías emergentes en las que pueden ser empleados microorganismos, así como sus metabolitos. Como, por ejemplo, el desarrollo de las celdas de combustible microbianas que consisten en la transformación de la energía química en energía eléctrica a partir de un sustrato presente. Así mismo, en los últimos años, se ha incrementado el interés en el desarrollo de celdas solares orgánicas, que emplean pigmentos naturales que son extraídos de diversas fuentes como: plantas, flores, vegetales (Hosseinnezhad *et al.*, 2018) y recientemente de algunas especies bacterianas (Órdenes *et al.*, 2016), dichos pigmentos se emplean para la sensibilización de las celdas solares,

permitiendo convertir la luz solar en electricidad (Wongcharee *et al.*, 2007). Cabe mencionar que la mayoría de los pigmentos extraídos de microorganismos no presentan toxicidad y son biodegradables, lo que les confiere ciertas ventajas tecnológicas comparadas con su contra parte de origen sintético (Usman *et al.*, 2017).

### **1.1 *Serratia marcescens***

Dentro del grupo de microorganismos capaces de producir pigmentos sobresale la bacteria *Serratia marcescens*, que es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, suele estar ampliamente distribuida en el ambiente, encontrándose comúnmente en suelo, agua y plantas (De Araújo *et al.*, 2010). Esta bacteria es reconocida por su capacidad de producir enzimas tales como DNAsa, lipasas y quitinasas (Giri,*et al.*, 2004), así como su resistencia a los antibióticos colistina, cefalotina y ampicilina (Grimont y Grimont, 2006). Bajo ciertas condiciones de cultivo, *S. marcescens* posee la capacidad de producir prodigiosina (Giri,*et al.*, 2004). Este metabolito secundario ha sido estudiado ampliamente, encontrándose que factores como la temperatura, pH, fuente de carbón, fuente de nitrógeno y la presencia de algunas sales orgánicas beneficiaban su producción (De Araújo *et al.*, 2010).

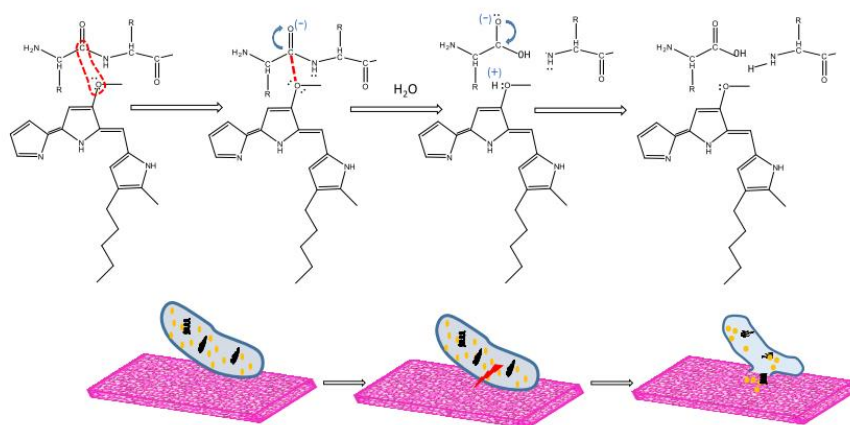
### **1.2 Prodigiosina**

La prodigiosina es un pigmento hidrofóbico (Haddix *et al.*, 2008) con estructura tripirrólica, insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como cloroformo, metanol, acetonitrilo y Dimetilsulfóxido (DMSO) (De Araújo *et al.*,2010).Este

pigmento puede ser producido además por otras bacterias, tales como: *Pseudoalteromonas* sp., *Haella chejuensis*, *Vibrio* sp., *Streptomyces coelicor* (Lapenda *et al.*, 2014).

Este compuesto posee un amplio rango de actividades biológicas entre las que se encuentran propiedades antibacterianas, antifúngicas e inmunosupresoras, (Aruldas *et al.*, 2014). Por esta razón, se han investigado metodologías que permitan aumentar su producción, y por ende poder buscar nuevos campos de aplicación para este metabolito.

A pesar de la gran diversidad de aplicaciones que puede tener la prodigiosina, una de las más estudiadas es su actividad antibacteriana, la cual fue estudiada por Arivzhivendhan *et al.*, (2015) encontrando que el grupo metoxilo de la prodigiosina es el encargado de romper los enlaces peptídicos presentes en la membrana celular de las bacterias, provocando así su efecto antibacterial, tal como se observa en la Fig. 1 (Arivzhivendhan *et al.*, 2015).



**Fig. 1.** Mecanismo de acción del grupo metoxilo de la Prodigiosina sobre la membrana celular bacteriana (Arivzhivendhan *et al.*, 2015).

Debido a la funcionalidad de este grupo funcional, es necesario buscar métodos que permitan mantener la estructura de la prodigiosina estable y bioaccesible para aprovechar esta característica en el diseño de futuras aplicaciones biotecnológicas. De tal manera que, aunque las aplicaciones de la prodigiosina como agente antibacteriano han sido probadas de manera directa, han sido pocos los esfuerzos por diseñar metodologías que permitan emplear el reúso de esta molécula durante varios ciclos a fin de disminuir los insumos y maximizar su efecto.

Con la finalidad de resolver dicha limitación, en el presente proyecto se ha propuesto realizar la inmovilización de la prodigiosina en materiales inertes, lo cuales se sabe que confieren ciertas ventajas a los metabolitos inmovilizados, siendo algunas de las más importantes: el incrementar la estabilidad química, el reúso del compuesto por varios ciclos, la fácil recuperación, entre otros (Sheldon, 2007).

### **1.3 Inmovilización**

La inmovilización corresponde al confinamiento de un metabolito en una determinada región definida en el espacio manteniendo sus propiedades y actividades. Asimismo, de acuerdo con el tipo de inmovilización estos metabolitos pueden ser inmovilizados de manera permanente o temporal (Fajardo *et al.*,2011).

Existen diferentes tipos de inmovilización, entre los cuales destacan:

**Adsorción:** el cual representa el método más fácil de inmovilización, donde el metabolito es disuelto en una solución y el soporte sólido es puesto en contacto con la solución durante cierto periodo de tiempo. El mecanismo de adsorción



está basado en enlaces débiles como las fuerzas de Van der Waals, enlaces electrostáticos y/o interacciones hidrofóbicas, que no afectan la actividad del metabolito (Sassolas, *et al.*, 2012).

**Entrecruzamiento:** es un método ampliamente utilizado debido a su simplicidad, consiste en el uso de reactivos bifuncionales que permiten formar uniones intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Este método presenta inconvenientes debido a que puede haber pérdida de actividad debido a las alteraciones químicas que se llevan a cabo durante la inmovilización (Arroyo, 1998).

**Unión covalente:** este tipo de inmovilización se lleva a cabo mediante la unión de grupos funcionales, por lo que el metabolito no puede ser lixiviado del soporte. Este método de inmovilización tiene como desventaja la posible inactivación de la molécula, volviéndola inutilizable (Sheldon, 2007).

**Encapsulación:** Consiste en la localización del metabolito dentro de una matriz ya sea una fibra hueca o una microcápsula, el compuesto no está enlazado a la matriz de ninguna forma, por lo que no hay una modificación de la actividad biológica durante el proceso de inmovilización. Dentro de las limitaciones se puede mencionar la lixiviación de los biocomponentes que son inmovilizados (Sassolas, *et al.*, 2012).

Debido a que el grupo metoxilo de la estructura de la prodigiosina es el encargado de la actividad antimicrobiana, es importante emplear un tipo de inmovilización que permita mantener la estructura original, para poder aplicar el

sistema inmovilizado como agente antibacteriano, por lo que la inmoviliación mediante adsorción es la opción que responde a las necesidades de la inmovilización de la prodigiosina.

Existen diversos estudios que demuestran que los procesos de adsorción pueden ser evaluados mediante isotermas de adsorción (Dada *et al.*, 2012) , las cuales son curvas que permiten evaluar la retención de una sustancia en un sólido a varias concentraciones, siendo esta una herramienta importante para describir y predecir la movilidad del adsorbato en el adsorbente (Limousin *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Soportes

Las características de los soportes son de gran importancia para determinar la eficiencia del sistema inmovilizado, los materiales empleado deben incluir propiedades como: resistencia física, biocompatibilidad, ser inertes entre los metabolitos y bajo costo por mencionar lagunas (Fajardo *et al.*,2011).

En este contexto, la Tabla 1 muestra ejemplos de materiales comúnmente empleados como soportes en distintas aplicaciones biotecnológicas (Tabla 1; Arroyo, 1998):

**Tabla 1.** Materiales empleados como soportes para inmovilización

<b>Soportes inorgánicos</b>	<b>Soportes orgánicos</b>	
	<b>Naturales</b>	<b>Sintéticos</b>
Piedra pómez	Celulosa	Poliestireno
Sílice	Almidón	Poliacrilamidas
Óxidos de metales	Colágeno	Poli metacrilatos
Alúmina	Queratina	Poli amidas
Cerámicas		

De acuerdo con la clasificación anterior, los materiales propuestos para la inmovilización fueron seleccionados conforme a las posibles aplicaciones del sistema inmovilizado, así como por algunas características propias de estos materiales, los cuales son 2 óxidos de metales (dióxido de Titanio,  $\text{TiO}_2$  y dióxido de silicio,  $\text{SiO}_2$ ) y la celulosa.

### **1.3.2.1 Dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ )**

El  $\text{TiO}_2$  es un material que ha sido ampliamente utilizado en diferentes tipos de industrias, debido a su alta estabilidad química, su baja toxicidad y bajo costo, debido a su coloración blanca es empleado en algunos casos como pigmento (Rajh *et al.*, 2014), de igual manera existen otras aplicaciones de este material como la autolimpieza, purificación de aire y agua, así como también posee propiedades antibacterianas debido a su alta hidrofiliidad y su fuerte actividad oxidativa en presencia de luz (Abbas *et al.*, 2016), cabe destacar que este material es capaz de fotodegradar algunos contaminantes orgánicos como alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos mediante radiación de luz UV-visible (Zeng *et al.*, 2010).

De igual manera este material ha sido seleccionado como un elemento indispensable para la elaboración de celdas solares, el cual, al ser combinado con pigmentos naturales, es capaz de transformar la luz solar en energía eléctrica, esto, debido a la coloración blanca del  $\text{TiO}_2$  que limita su capacidad de absorber la luz. Algunos estudios han demostrado que al combinarse con colorantes naturales, se aumenta la absorbancia luminosa por el material, logrando así una mayor transferencia de electrones (Kazmi *et al.*, 2016).

### **1.3.2.2 Dióxido de Silicio (SiO<sub>2</sub>)**

El SiO<sub>2</sub> es un material poroso, hidrofílico, con capacidad de conductividad térmica (Nurten y Paksoy, 2017), presenta gran área superficial, buena biocompatibilidad, abundantes cargas superficiales y tiene buena dispersión en agua, dichas características permiten que este material sea empleado en diferentes aplicaciones como desecante, como lecho filtrante para depuración de agua e incluso para micro encapsulación.

Debido a su naturaleza hidrofílica, la interacción con la prodigiosina (hidrofóbica) no sería posible, por lo que es importante encontrar metodologías que permitan la interacción de los 2 compuestos.

Qiao *et al.*, (2015) estudiaron la obtención de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> hidrofóbicas a partir de una modificación superficial empleando dodecil sulfato de sodio (SDS) como modificador, realizando de igual manera una comparación en la modificación nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, para evaluar el efecto de la naturaleza de la superficie, ya que estos compuestos son en cierto modo similares.

### **1.3.2.3 Celulosa**

La celulosa, que es un polímero hidrofóbico, insoluble en agua y en diferentes solventes orgánicos, ha sido empleada por su porosidad y su estabilidad mecánica como medio filtrante. Al inmovilizar nanopartículas inorgánicas, se ha demostrado que éstas mantienen sus propiedades eléctricas, magnéticas y óptica (Zeng *et al.*, 2010).

Existen diversos estudios que evalúan la capacidad de inmovilización de la celulosa al ser empleada en la inmovilización de algunas enzimas. Sathishkumar, *et al.* (2014), evaluó la inmovilización de lacasas en nanofibras de celulosa, observando que este material es apropiado para estas aplicaciones debido a su área superficial, porosidad de la fibra interna y poca transferencia de masa, finalmente el sistema inmovilizado presentó estabilidad térmica, reutilización durante varios ciclos y buena estabilidad a los cambios de pH.

## CAPITULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Aplicaciones de la prodigiosina

La prodigiosina ha sido ampliamente estudiada en su forma libre, siendo utilizada en aplicaciones tales como colorante en industrias de alimentos donde ha sido empleada en leche, yogurt y bebidas carbonatadas (Darshan & Manonmani, 2015), así mismo ha sido aplicada como pigmento en la industria de poliolefinas (Ryazantseva & Andreyeva, 2014) y algunos textiles como lana, seda, nylon y telas acrílicas donde algunos materiales teñidos llegaron a mostrar propiedades antibacterianas (Alihosseini *et al.*, 2008).

Por otra parte, se han llevado a cabo estudios sobre la actividad anticancerígena de la prodigiosina, como en el estudio desarrollado por Kavitha *et al.*, (2010) que realizó un estudio sobre la actividad contra el cáncer y la apoptosis contra el cáncer de carcinoma de cuello uterino humano.

En cuanto a la actividad antimicrobiana del pigmento hay diversos estudios como el realizado por Karbaschi *et al.*, (2017) que evaluó la actividad antibacteriana de la prodigiosina en bacterias aisladas (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) de muestras de alimentos procesados, encontrando que la prodigiosina puede ser empleada en la industria de alimentos.

## **2.2 Usos de la prodigiosina inmovilizada**

En los últimos años se ha desarrollado interés en la aplicación de la prodigiosina inmovilizada, ya sea en el área farmacéutica, donde ha sido empleada para tratar el cáncer junto con algunos medicamentos neoplásicos como es explicado en algunos estudios como los realizados por Danyuo *et al.*, (2014) que diseñó un dispositivo biomédico implantable que tenía como objetivo la liberación programada de concentraciones controladas de prodigiosina y medicamentos contra el cáncer a través de microcanales. Así mismo Obayemi *et al.*, (2016) donde estudió la inmovilización de la Prodigiosina mediante la técnica de encapsulación, empleando poli- ácido- láctico- co- glicólico (PLGA) y poli- vinil alcohol (PVA) junto con medicamentos anticancerígenos para tratamiento de cáncer para la liberación programada de los principios activos.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de inmovilización de la Prodigiosina en una matriz de celulosa, con el objetivo de eliminar bacterias patógenas de soluciones acuosas, a través de un reactor en columna obteniendo una eliminación del 97.3% tanto para bacterias Gram negativas (*E. coli*), como para Gram positivas (*B. cereus*) (Arivizhivendhan *et al.*, 2015).

## **2.3 Celdas solares sensibilizadas con pigmentos microbianos**

Gran parte de las celdas solares sensibilizadas con colorantes, emplean pigmentos naturales tales como: antocianinas, flavonoides y carotenoides, siendo estos últimos sintetizados tanto por plantas como por algunos microorganismos, pero su uso se ha limitado a los extraídos de plantas, por lo que en este contexto los

pigmentos de origen microbiano son una fuente que no ha sido muy explorada para la sensibilización de este tipo de celdas solares.

Órdenes *et al.*, (2016) estudió el uso de pigmentos producidos por bacterias antárticas, para la sensibilización de celdas solares, obteniendo pigmentos de color amarillo y rojo, que corresponden a una mezcla de luteína y zeaxantina y cantaxantina respectivamente. Con el uso de estos 2 pigmentos obtuvo un % de eficiencia de 0.03%, siendo este uno de los primeros acercamientos para el desarrollo de celdas solares sensibilizadas con pigmentos microbianos.

Con base a lo anterior, se puede observar que los estudios realizados tanto en la inmovilización de la prodigiosina, como en la sensibilización de celdas solares con pigmentos de origen microbiano son escasos, por lo que en el presente proyecto se propone realizar la inmovilización de la prodigiosina en 3 materiales, de los cuales los óxidos de metales son modificados superficialmente para lograr la interacción con la prodigiosina, y de esta manera aprovechar las características inherentes de cada uno de ellos y así poder realizar 2 pruebas concepto para la aplicación del sistema inmovilizado.



## CAPITULO 3

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Aportación científica

La escasa información acerca del uso de la prodigiosina inmovilizada limita la expansión de sus aplicaciones en la biotecnología, la cual hasta hace unos años había sido solamente empleada de forma libre. Es por ello que, en e proyecto se desarrolló por primera vez un protocolo de inmovilización de la prodigiosina basado en la modificación superficial de 2 soportes sólidos ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ), la cual se comparó con la inmovilización en un material ya estudiado como la celulosa. Así mismo se estableció su uso en dos pruebas concepto (1) como agente antibacteriano y (2) como sensibilizador de una celda solar, siendo esta última la primera vez que se propone el uso de la prodigiosina en la generación de energía.

#### 3.2 Hipótesis

La modificación superficial de los soportes sólidos para ser anfifílicos permitirá la inmovilización de la prodigiosina, permitiendo su uso en diversas aplicaciones biotecnológicas tales como: (1) Antibacteriano y (2) Sensibilizador de una celda solar.

#### 3.3 Objetivo general

Inmovilizar la prodigiosina en celulosa,  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  modificados superficialmente para la evaluación de su estabilidad y usos potenciales en

aplicaciones biotecnológicas mediante pruebas de concepto tales como: (1) Antibacteriano y (2) Sensibilizador de una celda solar.

**a) Objetivos específicos**

3.4.1 Obtener, purificar y caracterizar la prodigiosina producida a partir de cultivos de *Serratia marcescens*.

- a) Reactivación de la cepa de *S. marcescens*
- b) Producción y purificación de la prodigiosina
- c) Caracterización de la prodigiosina

3.4.2 Realizar la modificación de los materiales ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ) con SDS y realizar su caracterización mediante FT-IR.

- a) Modificación superficial del  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  con SDS
- b) Caracterización de los materiales modificados

3.4.3 Realizar la inmovilización de la prodigiosina en los soportes modificados y la celulosa, así como su caracterización mediante FT-IR y UV-vis.

- a) Cinéticas de inmovilización
- b) Caracterización mediante FT-IR y UV-vis
- c) Isotermas de adsorción

3.4.4 Evaluar la fotoestabilidad de la prodigiosina.

3.4.5 Comprobar la estabilidad de los sistemas inmovilizados.

3.4.6 Realizar pruebas de concepto de los sistemas inmovilizados para las aplicaciones biotecnológicas propuestas.

a) Antibacteriano.

b) Sensibilizador de una celda solar.

## CAPITULO 4

### METODOLOGÍA

#### **4.1 Obtención, purificación y caracterización de la prodigiosina producida a partir de cultivos de *Serratia marcescens***

##### **4.1.1 Reactivación de la cepa de *Serratia marcescens***

Debido a que la cepa a utilizar se encontraba preservada en glicerol, se procedió con la reactivación; para lo cual se preparó caldo LB de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se vertieron 5-6 ml de medio en tubos Hosch y se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi de presión en una autoclave automática (Tuttnauer 2540M). Posteriormente el medio se dejó atemperar para su subsecuente inoculación empleando una alícuota de 50 µl tomada del tubo ependorf que contenía la cepa en glicerol. El tubo con caldo nutritivo inoculado se incubó a 28 °C durante 24 horas en una incubadora con agitación SHEL-LAB 1575.

A continuación de prepararon tubos con agar inclinado, el agar LB se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, y se sembró por estría una asada del tubo de caldo LB que se inoculó anteriormente. Los cultivos obtenidos de los tubos inclinados se utilizaron en la producción de la prodigiosina.

Una vez que se realizó la reactivación y la resiembra de la cepa de *S. marcescens* se llevó a cabo una tinción de Gram para comprobar que es una bacteria Gram negativa.

La tinción de Gram se llevó a cabo tomando una asada del tubo inclinado y se colocó en un portaobjetos, después se agregó una gota de agua y se dejó secar, una vez que la muestra se secó, se agregó cristal violeta y se dejó durante 1 minuto, transcurrido el tiempo el portaobjetos se enjuagó con agua destilada, posteriormente se agregó lugol durante 3 minutos, seguido de la adición de alcohol-acetona por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y se agregó safranina durante 1 minuto. Finalmente, la muestra se enjuagó y se dejó secar para su posterior observación al microscopio empleando el objetivo 100X, mediante la adición de una gota de aceite de inmersión.

#### **4.1.2 Producción y purificación de la prodigiosina**

La producción de la prodigiosina se lleva mediante la siembra de *S. marcescens* en medio cacahuate, el cual se compone de aceite de cacahuate en agua destilada, obteniendo una concentración final al 1 %.

La extracción del aceite consiste en retirar la cascara del cacahuate (incluyendo el tegumento), posteriormente el cacahuate es triturado con ayuda de un mortero con pistilo, para reducir el tamaño de partícula y poder extraer la mayor cantidad de aceite posible. Enseguida el cacahuate triturado se colocó en un vaso de precipitados y se agregó éter de petróleo hasta cubrir la totalidad del cacahuate, se dejó reposar durante 2 horas y transcurrido el tiempo se filtró utilizando una gasa. La solución filtrada es colocada en un rotavapor para facilitar la evaporación del solvente y obtener el aceite de cacahuate puro (sin residuos de solvente). El aceite

obtenido se vertió en un tubo Falcon de 50 ml y se almacenó en refrigeración hasta su uso.

Una vez que se extrajo el aceite se prepararon 10 ml de medio cacahuate al 1 % colocando en un vial de vidrio (0.1 g de aceite de cacahuate y 10 ml de agua destilada) el cual se esterilizó en una autoclave. Una vez esterilizado el medio se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con una asada de la cepa tomada de un tubo inclinado con agar LB sembrado por estría, el medio se incubó durante 24 horas a 28 °C a 150 rpm.

Transcurridas las 24 horas se realizó una resiembra en 10 ml de medio cacahuate, y se inoculó tomando 4 ml del cultivo del escalamiento anterior, se incubó durante 48 horas a 28 °C a 150 rpm. Pasadas las 48 horas de incubación se prepararon 100 ml de medio cacahuate al 1 % en un matraz de 250 ml, se esterilizó, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 4 ml del medio cultivo del ultimo escalamiento, se incubó 48 horas a 28 °C a 150 rpm.

Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la extracción del pigmento. Para cada cultivo de 100 ml se utilizaron 2 tubos Falcon de 50 ml, se colocaron 25 ml de cultivo en cada uno y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a una temperatura de 8 °C. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y se agregaron nuevamente 25 ml de medio en cada tubo, se centrifugaron a las mismas condiciones y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 3 ml de cloroformo a cada tubo Falcon y se sometieron a un tratamiento de ultrasonificación durante 1 minuto, dejando 2 minutos de reposo para enfriar la muestra, este proceso se repitió 3 veces con cada tubo Falcon. Una vez que todos

los tubos fueron ultrasonificados se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a 8 °C, después se recuperó la fase líquida que contenía el pigmento y se transfirió a otro tubo Falcon, el cual se tapó con una gasa y se almacenó a resguardo de la luz hasta la completa evaporación del solvente.

Una vez que el solvente se evaporó por completo, se procedió con la purificación de la prodigiosina mediante cromatografía en columna, utilizando sílica gel en cloroformo como fase estacionaria, y una mezcla de cloroformo: metanol (9:1) como fase móvil. La columna se preparó colocando un disco delgado de algodón en el fondo de una bureta, posteriormente se le adicionó la fase estacionaria, preparada con ~13 g de sílica gel en 50 ml de cloroformo, la cual se dejó empacar por gravedad. Por otra parte, previa a su purificación, la prodigiosina fue diluida en ~1 ml de cloroformo.

Una vez compactada la fase estacionaria, se agregó la solución de prodigiosina y se adicionó la fase móvil, hasta recuperar la fracción de la prodigiosina purificada, la cual se recogió en un vial previamente seco y pesado.

Al terminar la recuperación del pigmento, se tapó el vial con una gasa y se mantuvo en oscuridad hasta la completa evaporación del solvente, posteriormente se conservó en refrigeración hasta su uso.

#### **4.1.3 Caracterización de la prodigiosina**

Una vez que se evaporó el solvente de la purificación se realizó un barrido mediante espectrofotometría de UV- Vis para identificar la prodigiosina, la cual se

ha reportado que presenta absorbancia a una longitud de onda de 535~540 nm (Guryanov *et al.*, 2013).

## **4.2 Modificación de los materiales (TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) con SDS y caracterización mediante FT-IR**

### **4.2.1 Modificación superficial del TiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub> con SDS**

Para la modificación superficial de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (21 nm) y SiO<sub>2</sub> (10-20 nm) (adquiridas de Sigma Aldrich) se siguió la metodología propuesta por Sharma *et al.*, (2015) pesaron 0.5 g de nanopartículas y se suspendieron en 50 ml de etanol al 70 %, la suspensión se acidificó con 3 gotas de HCl 0.2 N para obtener un pH de 4~5 y se dejó agitando en un vaso de precipitados de 100 ml con ayuda de un agitador magnético. Posteriormente se adicionó por goteo 10 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 % y se dejó agitar durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo, la solución fue vertida en 2 tubos Falcon, se centrifugaron a 4400 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados utilizando etanol al 70 % para eliminar el surfactante que no interaccionó con el material. Los lavados se realizaron agregando 10 ml de etanol a cada tubo Falcon, se agitaron vigorosamente durante ~1 min y se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se repitió el mismo procedimiento 2 veces más, después se llevó a cabo un último lavado con 10 ml de etanol al 96 %, se agitaron los tubos y la mezcla se transfirió a un vaso de precipitados de 100 ml. A continuación se calentó en una estufa a 120 °C durante 2 horas para eliminar el etanol y secar el material modificado (Sharma *et al.*, 2015).



Una vez que el material modificado está completamente seco, se deja enfriar en un desecador y se almacena hasta su uso, en un vial de vidrio previamente seco, y pesado.

#### **4.2.2 Caracterización de los materiales modificados**

Una vez que los materiales fueron modificados, se realizó su caracterización mediante espectrometría de FT-IR, para corroborar la presencia del surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS) en el material modificado.

#### **4.3 Inmovilización de la prodigiosina en los soportes modificados y la celulosa, así como su caracterización mediante FT-IR y UV-vis**

##### **4.3.1 Cinéticas de inmovilización**

Antes de realizar las pruebas de inmovilización se llevó a la cabo la preparación de una curva de calibración preparando soluciones de prodigiosina a diferentes concentraciones a partir de una solución de 0.1 mg de prodigiosina por ml de solvente (cloroformo). A partir de esta solución se realizaron diluciones para obtener un rango de concentraciones de 0.09, a 0.01 mg/ml. Una vez que se obtuvieron la soluciones se midió la absorbancia de cada una y se elaboró una gráfica de absorbancia de las soluciones contra concentración de prodigiosina. La curva se ajustó al modelo de regresión lineal, con la finalidad de ser usada en la medición de cantidad de prodigiosina inmovilizada en los diferentes materiales.

Una vez lista la curva de calibración se realizaron las cinéticas de inmovilización en los materiales prístinos y modificados ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ ) con el objetivo de evaluar la capacidad de inmovilización del material no modificado con respecto al modificado con surfactante.

Debido a que el cloroformo es un solvente altamente volátil y el  $\text{TiO}_2$  presenta alta actividad fotocatalítica se contemplaron estos factores durante el proceso de inmovilización, por lo que se empleó un recipiente color ámbar herméticamente cerrado y en oscuridad para evitar la fotocatálisis del pigmento.

Las inmovilizaciones se realizaron por triplicado para cada material, se prepararon 25 ml de solución de prodigiosina en cloroformo con una concentración de 1.0 mg/ml, dicha concentración se evaluó con la curva de calibración utilizando una dilución de 1:100 (20  $\mu\text{l}$  de solución de prodigiosina:1980  $\mu\text{l}$  de cloroformo).

Posteriormente se vertieron 7 ml de la solución de prodigiosina (1mg/ml) en un vial de color ámbar, se pesaron 500 mg del material (celulosa,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$  prístino o modificado con SDS, según sea el caso) y se agregaron a los viales, los cuales se mantuvieron en agitación constante. Se realizaron muestreos cada 45 minutos, durante 8 horas continuas, posteriormente se dejaron agitar toda la noche y los monitoreos se continuaron de 10 a 12 horas hasta completar las 24 horas desde la primera lectura, para realizar las lecturas de la absorbancia se centrifugaron los tubos a 4000 rpm, a 8 °C durante 5 min, y se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra y se agregaron 1980  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se leyó a 539 nm, esto para llevar a cabo la cinética de inmovilización, conocer el tiempo en que se alcanza la estabilidad en la

adsorción del pigmento, así como para conocer la cantidad de prodigiosina inmovilizada.

#### 4.3.2 Caracterización mediante FT-IR y UV-vis

Una vez que la prodigiosina fue inmovilizada en los 5 materiales (celulosa, TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> modificado, SiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub> modificado), se realizó la caracterización mediante espectrometría de FT-IT y UV-vis, para evaluar la presencia de la prodigiosina inmovilizada en el material.

#### 4.3.3 Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción se llevaron a cabo por triplicado, manteniendo constante la concentración de las soluciones de prodigiosina y variando la cantidad de material a utilizar (TiO<sub>2</sub> modificado, SiO<sub>2</sub> modificado y celulosa). Para realizar las isotermas se realizaron inmovilizaciones empleando 100, 300, 500, 750 y 1000 mg de material, los cuales se colocaron en viales, donde se adicionaron 7 ml de solución de PG a una concentración de 1 mg/ml, posteriormente se mantuvo en agitación constante durante 20 h. Al concluir 20 horas se realizó una centrifugación de la solución, a 4000 rpm, 8 °C por 5 min. Finalmente se realizó la medición de la absorbancia para conocer la concentración final y así calcular la cantidad de prodigiosina inmovilizada.

El valor de Q<sub>e</sub> (cantidad de soluto adsorbido en los materiales mg/g) fue calculada mediante la ec.1 (Dada *et al.*, 2012):

$$Q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{W} \dots\dots\dots (ec.1)$$

Donde:

$Q_e$ = Cantidad de soluto adsorbido de la solución (mg/g).

$V$ = Volumen del adsorbato (L).

$C_0$ = Concentración inicial (antes de la adsorción) (mg/L).

$C_e$ = concentración final (después de la adsorción) (mg/L).

$W$ = Peso en gramos del adsorbente (g).

Una vez obtenido al valor de  $Q_e$ , se realizó el ajuste para los 3 modelos a utilizar: Langmuir, Freundlich y Temkin, los cuales cuentan con una ecuación linealizada que permite realizar el análisis de los datos obtenidos.

#### 4.3.3.1. Modelo de Langmuir

El modelo de Langmuir se representa en su forma lineal por la ec. 2 Xu *et al.*, (2013):

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{max}b} \times \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_{max}} \dots\dots\dots (ec. 2)$$

Donde:

$q_e$  = es la capacidad de adsorción al equilibrio (mg/g).

$C_e$  = concentración final (después de la adsorción) (mg/L).

$q_{max}$  = cantidad máxima de prodigiosina adsorbida en el adsorbente (mg/g).

$b$  = es la constante de Langmuir relacionada con la afinidad de adsorción (L/mg).

Nota: la  $q_{\max}$  y  $b$  se calculan a partir de la pendiente y la intersección de los diagramas lineales de  $1/q_e$  vs  $1/C_e$ .

#### 4.3.3.2 Modelo de Freundlich

Este modelo se representa en su forma lineal por la ec. 3 Xu *et al.*, (2013):

$$\log(q_e) = \log K_f + \frac{1}{n} \log(C_e) \dots \dots \dots \text{(ec. 3)}$$

Donde:

$K_f$  = es la constante de capacidad de adsorción.

$1/n$  = es la constante de intensidad de adsorción (factor de heterogeneidad).

Nota: estos valores se obtienen a partir de la pendiente y la intersección de la gráfica lineal de  $\log(q_e)$  vs  $\log(C_e)$ .

#### 4.3.3.3 Modelo de Temkin

Este modelo se representa en su forma lineal por la ec. 4 linealizada Zheng *et al.*, (2009).

$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \dots \dots \dots \text{(ec. 4)}$$

Donde:

$$B = RT/b$$

$b$  = es la constante de Temkin relacionada con la temperatura (J/mol).

$A$  = es la constante de enlace de equilibrio térmico (L/g).

R= es la constante de gas (8.314J/mol K).

T= es la temperatura absoluta (K).

Nota: las constantes se obtienen a partir de la pendiente y la intersección de la gráfica lineal  $q_e$  vs  $\ln C_e$ .

#### **4.4 Evaluación de la fotoestabilidad de la Prodigiosina**

Para evaluar la fotoestabilidad de la prodigiosina se preparó una solución de prodigiosina con concentración de 1mg/ml, la cual fue expuesta a la luz solar durante 4 días, evaluando la concentración cada 24 horas hasta completar los 4 días (96 h).

#### **4.5 Comprobación de la estabilidad de los sistemas inmovilizados (SiO<sub>2</sub> modificado con prodigiosina inmovilizada y celulosa con prodigiosina inmovilizada)**

La prueba de estabilidad de los sistemas inmovilizados se realizó ajustando la metodología propuesta por Arivizhivendhan *et al.*, (2015), que consiste en poner en contacto al sistema con agua destilada, bajo agitación, para garantizar el contacto continuo del material con el agua. La prueba fue durante 4 días, realizando muestreos de la concentración de prodigiosina en la solución acuosa cada 24 horas.

El muestreo se realizó mediante centrifugación a 4000 rpm, durante 5 minutos, seguido de la toma de muestra (2 ml), la cual fue medida por espectrofotometría de UV-vis para conocer la concentración de prodigiosina presente.

## 4.6 Realización de pruebas de concepto

### 4.6.1 Antibacteriano

Para llevar a cabo las pruebas antimicrobianas se implementó la metodología de macrodilución empleando la técnica de espectrometría para la determinación de la densidad óptica (DO), el medio de cultivo empleando fue caldo MH. Las cepas empleadas fueron las cepas ATCC 11229 de *E. coli* y *Staphylococcus aureus*.

Las cepas se reactivaron en 50 ml de caldo Mueller Hilton (MH), el cual se preparó de acuerdo con las indicaciones del fabricante, se esterilizó a 121 °C, 15 psi, durante 15 min, se dejó enfriar y se inoculó con 50 µl de la cepa conservada en glicerol, enseguida el matraz se incubó a 28 °C, 150 rpm durante 20 h.

Posteriormente se realizó la lectura de la densidad óptica (D.O.) a  $\lambda = 650$  nm, utilizando diluciones 1:10 con solución salina, por lo que la lectura obtenida se multiplicó por el factor de dilución (F. D. =10).

La actividad antibacteriana se evaluó tanto en la prodigiosina libre como en la prodigiosina inmovilizada. En la tabla 2 se observan las concentraciones empleadas para la prodigiosina libre, mientras que en la tabla 3 se observan las cantidades de material empleadas para la prodigiosina inmovilizada.

Se prepararon los tubos con 4ml caldo MH, los cuales fueron inoculados con 0.01ml de cada bacteria (D.O.=1) se agregaron las cantidades de prodigiosina libre y prodigiosina inmovilizada de acuerdo con la prueba a realizar y se incubaron a 28°C, 150 rpm durante 24 h. después de las 24 h se realizó la medición de la D.O.

a 650 nm, empleando como blanco el medio de cultivo con prodigiosina libre y el medio de cultivo con prodigiosina inmovilizada sin bacterias (Danevčič *et al.*, 2016).

**Tabla 2.** Concentraciones de prodigiosina pura

Prodigiosina (mg/ml)
100
200
300
1000
2000
3000

**Tabla 3.** Cantidades de material mg/ml y concentración de prodigiosina inmovilizada en mg/L.

Material	TiO <sub>2</sub> modificado	TiO <sub>2</sub> modificado + PG	SiO <sub>2</sub> modificado	SiO <sub>2</sub> modificado + PG	Celulosa	Celulosa +PG
Cantidad material (mg/ml)	172	172	64.1	64.1	219.7	219.7
Cantidad PG inmovilizada (mg/L)	NA	30	NA	50	NA	100

#### 4.6.2 Sensibilización de una celda solar

Una celda solar consta de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia y una solución electrolítica. Para la elaboración del electrodo de trabajo se preparó una pasta de TiO<sub>2</sub> sin modificar y otra con TiO<sub>2</sub> modificado para las que se utilizaron: 0.2 g de TiO<sub>2</sub> (modificado o sin modificar según sea el caso), 0.4 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 0.1 M, 0.08 g de PEG y se agregó triton 100X gota a gota hasta obtener una pasta ligeramente viscosa.



La pasta obtenida fue extendida sobre un vidrio recubierto con ITO, el cual es un material conductor. Previamente el vidrio con ITO fue sometido a un tratamiento de limpieza que consistió en: un lavado con jabón, enjuague con agua destilada, posteriormente se sumergió en una mezcla de acetona y alcohol isopropílico 50: 50 y se sometió a un baño de ultrasonido por 5 minutos para eliminar los restos de materia orgánica que pudieran quedar en la superficie. Una vez limpio, el vidrio con ITO se cuadrículo en 9 partes iguales con ayuda de cinta plástica, cada uno de ellos será un electrodo de trabajo, al cual se le aplicará la pasta de  $\text{TiO}_2$ . La pasta se extendió uniformemente con ayuda de un portaobjetos hasta formar una capa delgada de aproximadamente 2 mm de espesor.

Una vez que se secó la pasta, se retiró la cinta y se cortaron los electrodos con ayuda de un cortador de vidrio. Cada electrodo se sometió a un proceso de calcinación en una mufla a  $500\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y posteriormente se dejaron enfriar. Por otro lado, se preparó una solución de prodigiosina a una concentración de 10 mg/ ml, la cual se utilizó para sensibilizar los electrodos. La sensibilización de los electrodos consiste en la adsorción del pigmento en la capa de  $\text{TiO}_2$ , la cual se realiza por goteo (aprox. 5 gotas) de la solución de prodigiosina (10 mg/ml) sobre cada electrodo.

Los electrodos de referencia se prepararon empleando una pasta de carbón comercial, la cual se extendió en un vidrio cubierto con ITO, previamente lavado y cuadrículado con ayuda de cinta plástica. La pasta se extendió con un portaobjetos para obtener una capa uniforme de aproximadamente 2 mm de espesor.

El electrolito se preparó disolviendo 0.41 g de Yoduro de potasio (KI) y 0.038 g de Iodo ( $I_2$ ) en 50 ml de etilenglicol, para obtener una solución de KI/ $I_2$  0.5 M/0.03 M.

Ya listos los electrodos de trabajo y de referencia, se armaron las celdas solares bajo un esquema tipo sándwich que consiste en colocar entre el electrodo de trabajo ( $TiO_2$  con prodigiosina), el de referencia y la solución de electrolito.

El armado de la celda se realizó colocando entre el electrodo de referencia y de trabajo, 10  $\mu$ l de electrolito; los electrodos se fijaron con ayuda de unas pinzas, posteriormente se realizaron las pruebas de la celda, en un simulador solar Sciencetech® 55150 acoplado a un potencióstato Gamry® PCI4-740A, para registrar las curvas de corriente -voltaje y conocer la fotorespuesta. Las mediciones se realizaron a condiciones constantes de temperatura e irradiación de un sol de intensidad como fuente de energía ( $\sim 100 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  y AM 1.5).

Existen distintos parámetros electroquímicos que ayudan a determinar la eficiencia de una celda solar. La densidad de la corriente ( $J_{max}$ ) y el voltaje ( $V_{max}$ ) para la potencia máxima ( $P_{max}$ ) se obtuvieron de las gráficas Corriente-Voltaje medidas a través del simulador solar. De esta curva se obtuvieron los valores de la densidad de corriente en circuito cerrado ( $J_{sc}$ , en unidades de  $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y voltaje en circuito abierto ( $V_{oc}$ , en unidades de V). Estos últimos parámetros son empleados para calcular el factor de llenado,  $FF$  (ec. 5) (Wongcharee et al., 2007).

$$FF = \frac{(J_{max} \times V_{max})}{(J_{sc} \times V_{oc})} \dots\dots\dots \text{(ec. 5)}$$

La eficiencia de conversión fotoeléctrica de la celda solar es obtenida mediante la ec.6 (Wongcharee et al., 2007):

$$\eta = \frac{J_{sc} \times V_{oc}}{P_{inc}} \dots\dots\dots (ec. 6)$$

## CAPITULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Obtención, purificación y caracterización de la prodigiosina producida a partir de cultivos de *Serratia marcescens*

##### 5.1.1 Reactivación de la cepa de *Serratia marcescens*

La reactivación de la cepa de *S. marcescens*, se realizó exitosamente. Por otro lado, la tinción de Gram permitió observar una bacteria Gram negativa y en forma de bacilos.

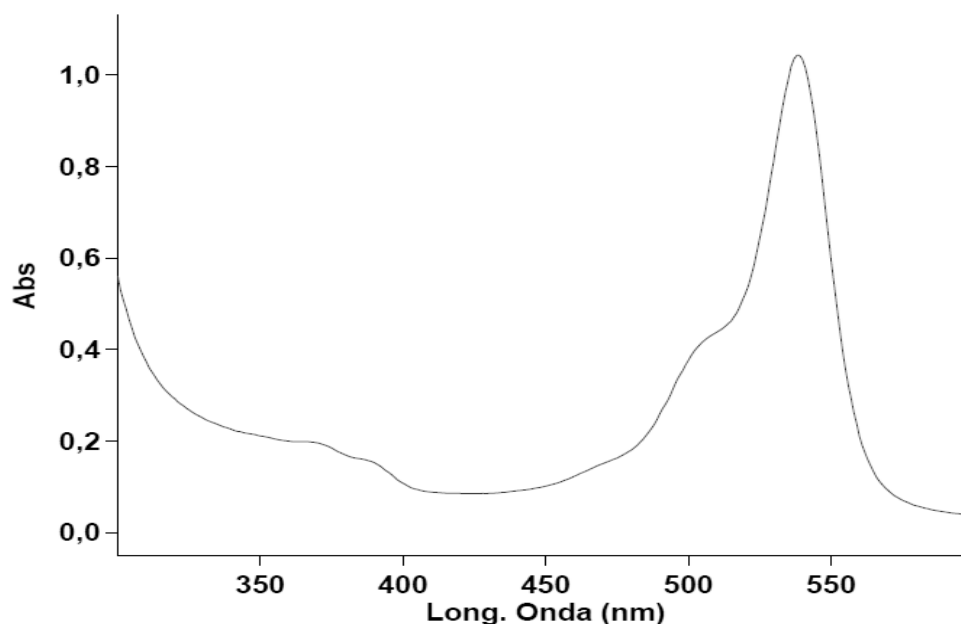
##### 5.1.2 Producción y purificación de la prodigiosina

La producción de la prodigiosina se realizó siguiendo una metodología optimizada (Ávila, 2016), obteniendo un rendimiento de ~0.05-0.06 mg de prodigiosina/ml de medio de cultivo, obteniendo una producción total de ~2 g de prodigiosina. Una vez que se extrajo la prodigiosina, fue purificada por cromatografía de columna.

##### 5.1.3 caracterización de la prodigiosina

La caracterización se llevó a cabo mediante un barrido de la muestra por espectrofotometría de UV-vis en un rango de 300 a 800 nm para la identificación del pigmento. En la Fig. 1 se muestra el espectro obtenido del barrido realizado, donde se observa una señal a 539 nm, la cual corresponde a la prodigiosina, ya

que existen reportes en los que la prodigiosina en medio ácido es de color rojo y presenta absorbancia de 535 a 540 nm (Guryanov *et al.*, 2013).



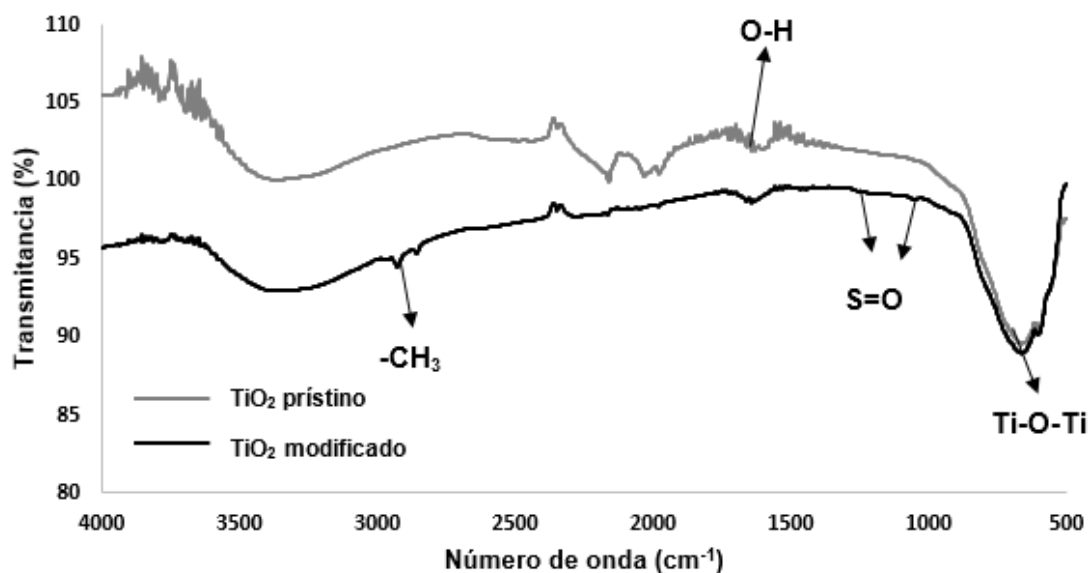
**Fig. 2.** Espectro de absorción de la prodigiosina purificada.

## **5.2 Modificación de los materiales (TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) con SDS y caracterización mediante FT-IR**

### **5.2.1 Modificación superficial y caracterización del TiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub> con SDS**

Una vez que se llevó a cabo la modificación de los materiales (TiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub>) se realizó un análisis de FTIR, para corroborar la presencia del SDS en la estructura del material, en la Fig. 3, se observa el espectro Infrarrojo del TiO<sub>2</sub> modificado, donde se encuentran las siguientes bandas: de 500-600 cm<sup>-1</sup> corresponde a enlaces de flexión de Ti-O-Ti y a 1,650 cm<sup>-1</sup> se encuentra la flexión del grupo -OH atribuidos al TiO<sub>2</sub> (Al-Taweel y Saud, 2016) , en cuanto al SDS se observan las

siguientes señales: a  $1,214\text{ cm}^{-1}$  y  $1,108\text{ cm}^{-1}$  el estiramiento asimétrico del S=O y a  $2,950\text{ cm}^{-1}$  estiramiento asimétrico del  $-\text{CH}_3$  (Chatterjee *et al.*, 2014).



**Fig. 3.** Espectro de FTIR  $\text{TiO}_2$  prístino y  $\text{TiO}_2$  modificado.

En el caso del  $\text{SiO}_2$  en la Fig.4 se aprecia el espectro obtenido, donde se observan las siguientes bandas: a  $1,100\text{ cm}^{-1}$  y  $800\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento simétrico del Si-O-Si , las bandas a  $3,400\text{ cm}^{-1}$  y  $958\text{ cm}^{-1}$  son característica del Si-OH (Chen *et al.*, 2013). En el caso del SDS se puede observar una ligera banda a  $2,950\text{ cm}^{-1}$  que indica estiramiento asimétrico de  $-\text{CH}_3$ , hay otras bandas características de estiramiento asimétrico y simétrico de S=O del SDS a  $1,220$  y  $1,108\text{ cm}^{-1}$   $\text{CH}_3$  (Chatterjee *et al.*, 2014), los cuales pueden estar empalmados con la banda a  $1,100\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento simétrico del Si-O-Si.

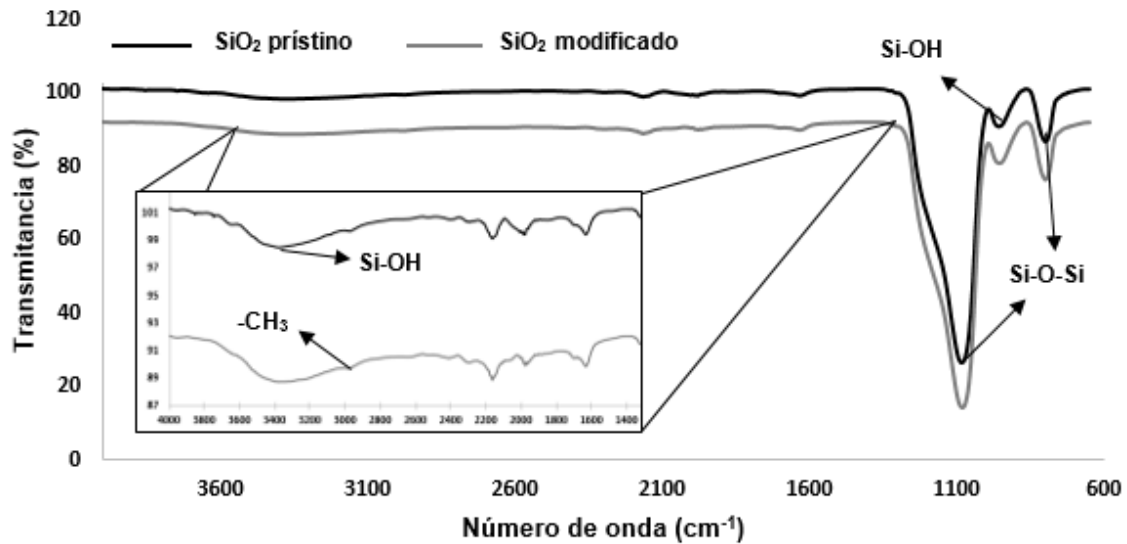
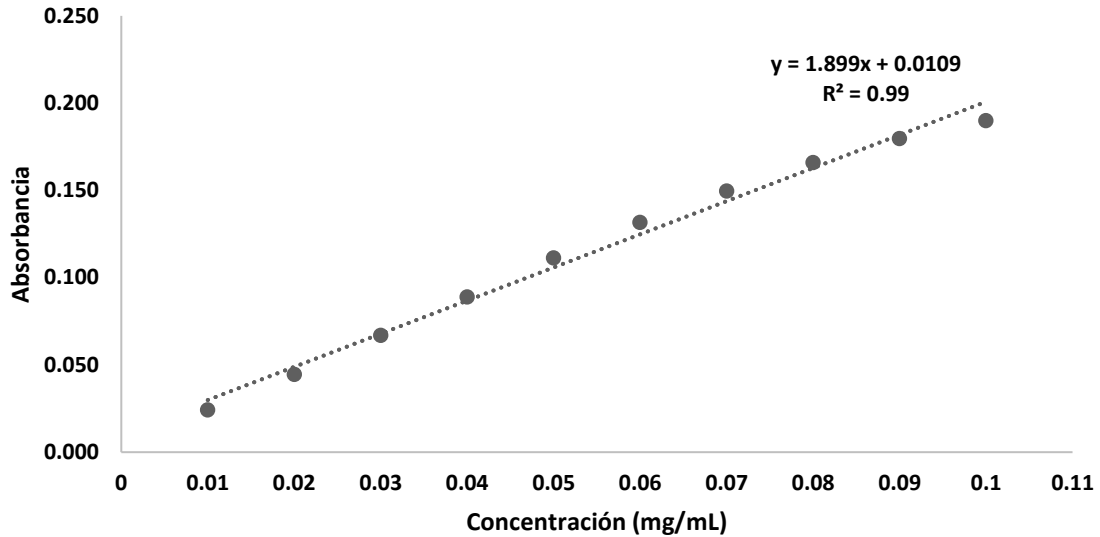


Fig. 4. Espectro de FT-IR SiO<sub>2</sub> prístino y SiO<sub>2</sub> modificado.

### 5.3 Inmovilización de la prodigiosina y caracterización mediante FT-IR y UV-vis.

Antes de realizar las cinéticas se realizó la curva de calibración de la prodigiosina, para conocer la cantidad de pigmento inmovilizada en los soportes. La curva de obtenida presentó un coeficiente de determinación  $R^2= 0.99$  (Ver Fig. 5), lo que significa que el cambio de la variante absorbancia es explicada por el modelo de regresión (Dozie-Nwachukwu *et al.*, 2016).



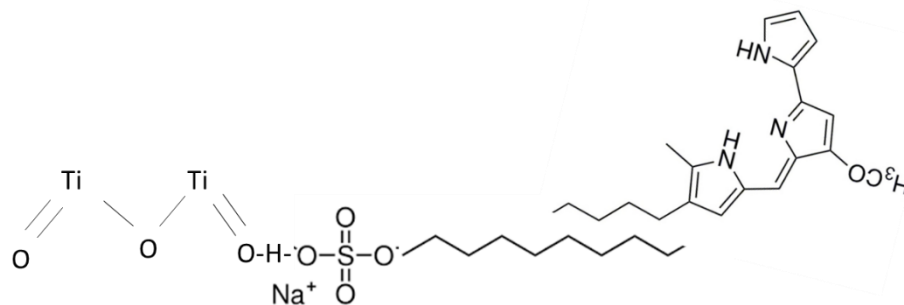
**Fig. 5.** Curva de calibración de la prodigiosina.

### 5.3.1 Cinéticas de inmovilización

La inmovilización de la PG se realizó en tres diferentes materiales:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$  y celulosa, de los cuales solo el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{SiO}_2$  fueron modificados con SDS con la finalidad de poder obtener materiales anfífilicos (Qiao *et al.*, 2016), y así, permitir la inmovilización de la PG, cuya naturaleza es hidrofóbica.

La interacción de la prodigiosina con el material modificado con SDS se observa en la Fig. 6, donde el SDS funciona como intermediario entre el material (al ser un agente surfactante que consta de un grupo hidrofóbico y un grupo hidrófilo) y la prodigiosina, ya que estos son de naturalezas opuestas, por lo que el SDS se va a alinear de acuerdo con la naturaleza de cada material.

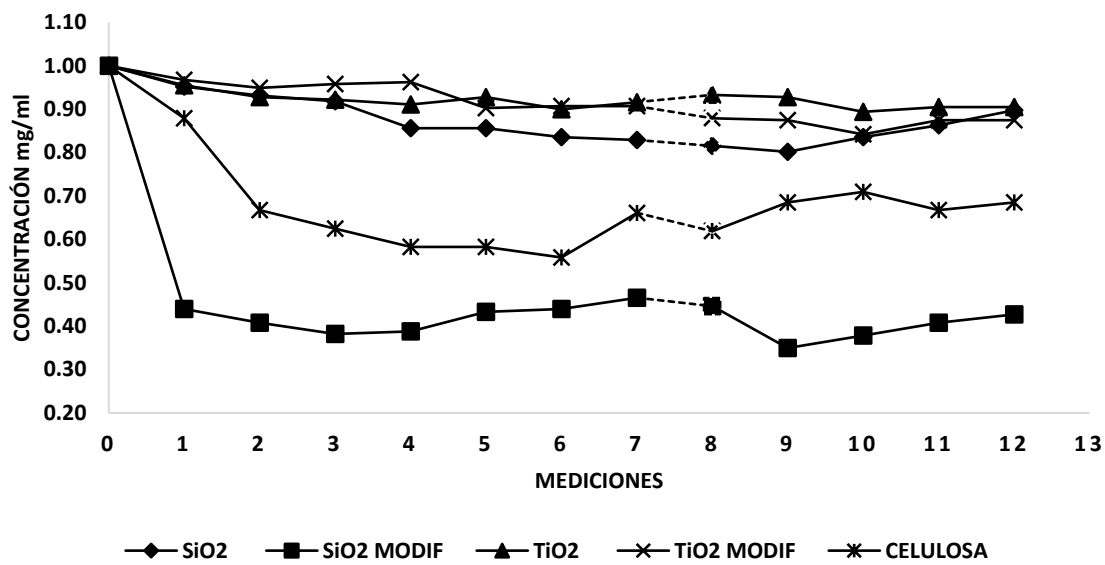




**Fig. 6.** Interacción del material-SDS-prodigiosina (Caligur, 2008), (Rossom *et al.*, 2016).

Se realizaron cinéticas de adsorción en los diferentes materiales y así conocer el comportamiento de la inmovilización y el tiempo en que esta alcanza la estabilidad.

En la Fig. 7 se muestra la cinética de inmovilización de la PG en los materiales empleados. La cantidad de pigmento inmovilizado en el  $\text{TiO}_2$  prístino es la más baja (0.09 mg), en comparación con los demás materiales. En cuanto al  $\text{TiO}_2$  modificado la cantidad de PG inmovilizado aumento ligeramente a 0.13 mg, casi similar a la cantidad inmovilizada de pigmento en el  $\text{SiO}_2$  prístino (0.10 mg). Por otro lado, el  $\text{SiO}_2$  modificado presenta un aumento sustancial en la cantidad de pigmento adsorbido, el cual fue de 0.57 mg. En el caso de la celulosa, cuya naturaleza es hidrofóbica (por ello no fue modificada) se logró inmovilizar 0.31 mg. Por otro lado, en esta Figura se logra observar que los 5 materiales empleados para la inmovilización llegan al equilibrio a partir de las 20-21h después de haber iniciado la cinética (correspondiente a las mediciones número 10-11).



**Fig. 7.** Comparación de inmovilización de la PG en materiales de estudio.

Como se puede apreciar, los materiales modificados presentan mayor inmovilización de pigmento en comparación con los materiales prístinos, siendo el mejor el SiO<sub>2</sub> modificado.

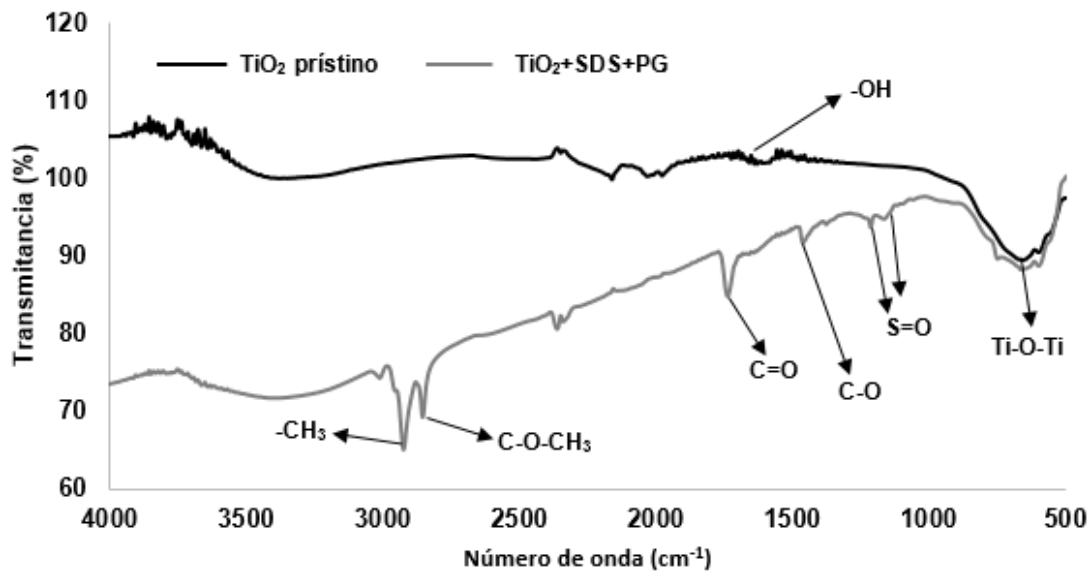
Lo anterior puede ser atribuido a que la modificación superficial del SiO<sub>2</sub> permitió obtener una superficie hidrofóbica, debido a que la superficie del SiO<sub>2</sub> presenta sitios de ácido de Bronsted, los cuales pueden proporcionar protones para la unión con el modificador, esta unión se lleva a cabo debido a que el SDS se hidroliza para producir dodecanol en el proceso térmico y este compuesto es atacado por los protones de los sitios de ácido de Bronsted en la superficie de las partículas de SiO<sub>2</sub> para generar un carbocatión, que a su vez reacciona con el resto del SiO para generar una estructura de Si-O-C y dar la modificación hidrofóbica (Qiao *et al.*, 2016).

En el caso del TiO<sub>2</sub> modificado este mantuvo su superficie hidrofílica, esto debido a que la superficie del TiO<sub>2</sub> solo tiene sitios ácidos de Lewis y los sitios ácidos de Bronsted pueden proporcionar protones para la reacción entre los grupos de la superficie del material y el modificador (SDS).

### 5.3.2 Caracterización mediante FT-IR y UV-vis

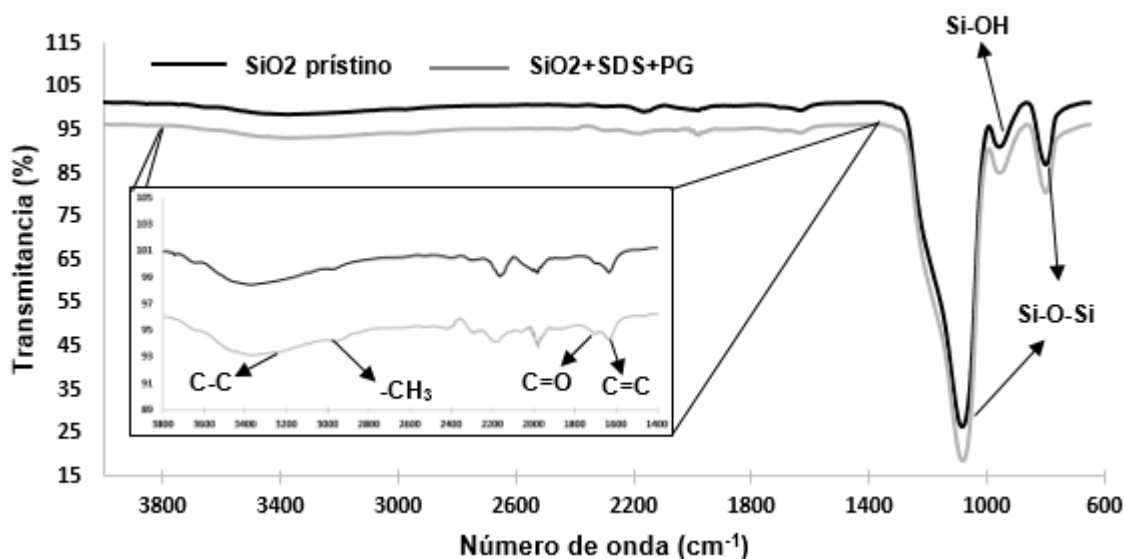
Una vez que se realizaron las inmobilizaciones en los diferentes materiales, se realizó una caracterización mediante espectrometría de FTIR, para comprobar la adsorción de la PG.

En el caso del TiO<sub>2</sub>, se observa en la Fig. 8 el espectro de infrarrojo de la PG inmobilizada en el material modificado. En la Figura observamos las siguientes bandas: para el TiO<sub>2</sub> de 500-600 cm<sup>-1</sup> indica un enlace de flexión de Ti-O-Ti, a 1,650 cm<sup>-1</sup> la flexión del grupo -OH (Al-Taweel y Saud, 2016), para el SDS las bandas asignadas son las siguientes: 1,214 cm<sup>-1</sup> y 1,108 cm<sup>-1</sup> se encuentra el estiramiento asimétrico del S=O, a 2,920 cm<sup>-1</sup> estiramiento asimétrico del -CH<sub>3</sub> (Chatterjee *et al.*, 2014). La PG presenta las siguientes bandas: la región de la huella dactilar a 1,734 cm<sup>-1</sup> presenta un enlace C=O, a 1,452 cm<sup>-1</sup> un enlace C-O, en 1,852 cm<sup>-1</sup> presenta una banda correspondiente al grupo metilo (C-O-CH<sub>3</sub>) (Arivizhivendhan *et al.*, 2015), lo que permite observar que el material fue modificado y hay presencia de PG inmobilizada.



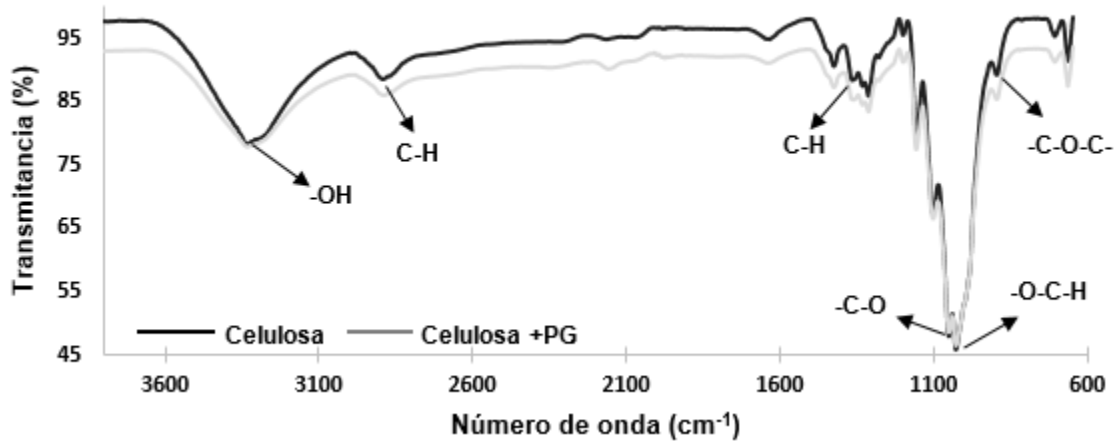
**Fig. 8.** Espectro de FTIR de  $\text{TiO}_2$  prístino y  $\text{TiO}_2$  +SDS +PG.

Para la PG inmovilizada en  $\text{SiO}_2$  la Fig. 9 muestra las bandas características para el  $\text{SiO}_2$  prístino, SDS y PG, que son las siguientes: a  $1,100 \text{ cm}^{-1}$  y  $800 \text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento simétrico del Si-O-Si, a  $3,400 \text{ cm}^{-1}$  y  $958 \text{ cm}^{-1}$  son bandas correspondientes al Si-OH (Chen *et al.*, 2013), se observa una ligera banda a  $2,950 \text{ cm}^{-1}$  que indica estiramiento asimétrico de  $-\text{CH}_3$ , así como 2 bandas más a  $1,220$  y  $1,108 \text{ cm}^{-1}$  que indican un estiramiento asimétrico y simétrico de S=O del SDS  $\text{CH}_3$  (Chatterjee *et al.*, 2014), los cuales pueden estar empalmados con la banda a  $1,100 \text{ cm}^{-1}$  del estiramiento simétrico del Si-O-Si del  $\text{SiO}_2$ . La PG presenta las siguientes bandas: la región de la huella dactilar a  $1,734 \text{ cm}^{-1}$  presenta un enlace C=O, una banda a  $1,630 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un enlace C=C (Aruldass *et al.*, 2014) y una banda a  $3,295 \text{ cm}^{-1}$  para un enlace C-C (Arivizhivendhan *et al.*, 2015) al observar esta bandas, se puede observar que el material fue modificado así como que la PG fue inmovilizada.



**Fig. 9.** Espectro de FTIR de SiO<sub>2</sub> prístino y SiO<sub>2</sub> +SDS+PG.

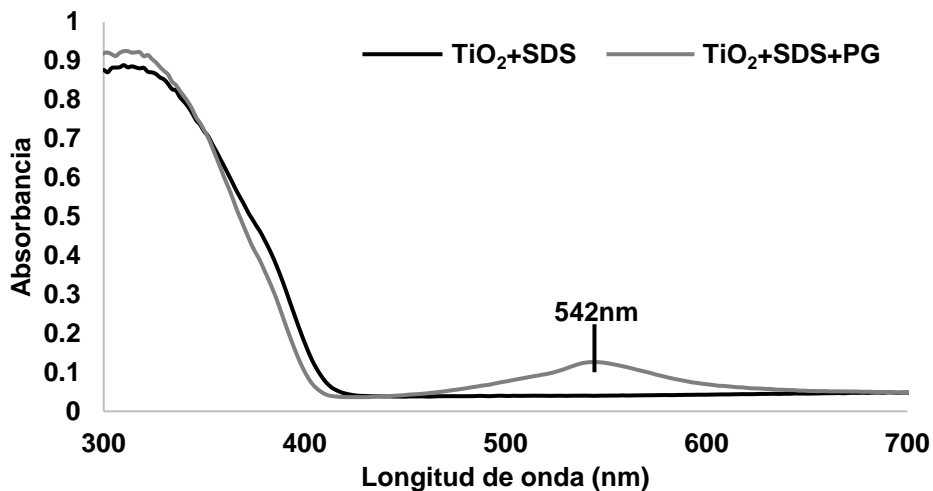
La Fig. 10 presenta las bandas características de la celulosa que son las siguientes: a 3,391 cm<sup>-1</sup> se asigna al estiramiento del -OH, a 2,906 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del C-H, la banda a 898 cm<sup>-1</sup> es característica del enlace β-glucosídico entre las unidades de glucosa que conforman la celulosa, a 1,061cm<sup>-1</sup> se asigna al grupo -C-O de alcoholes secundarios y funciones de esteres de la cadena principal de celulosa (Abderrahim *et al.*, 2015), la vibración de flexión C-H para el grupo -O-C-H se identificó por bandas de 1,389 cm<sup>-1</sup> y 1,035 cm<sup>-1</sup>, la vibración de estiramiento del grupo -C-O-C- se muestra a 844 cm<sup>-1</sup> (Arivizhivendhan *et al.*, 2015). En cuanto a la PG existen bandas características que se encuentra a los siguientes números de onda: 2,927 cm<sup>-1</sup> asignado al CH aromático y a 1,135 cm<sup>-1</sup> se encuentra el C-N (Aruldass *et al.*, 2014), los cuales pueden estar empalmados en las bandas correspondientes al -OH y al -C-O del espectro de la celulosa, ya que estas son muy pronunciadas.



**Fig. 10.** Espectro de FTIR de celulosa y celulosa +PG.

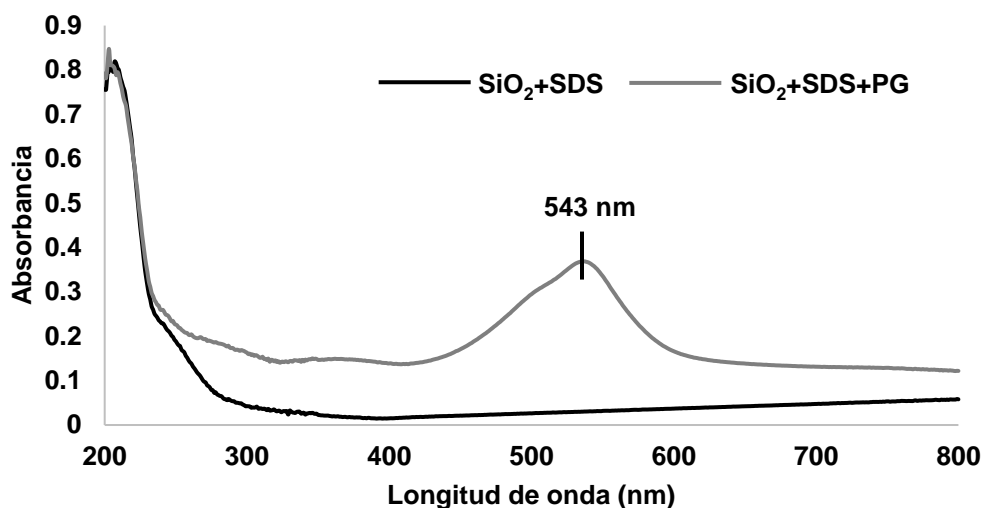
En cuanto a la caracterización de los sistemas inmovilizados mediante espectrofotometría de UV-vis se obtuvieron los siguientes espectros.

La Fig. 11 muestra una señal de absorción a 542 nm atribuido a la prodigiosina, en comparación con el TiO<sub>2</sub> modificado sin pigmento. La PG presenta una señal característica de 535-540 nm (Guryanov *et al.*, 2013), sin embargo el ligero desplazamiento observado se debe a la interacción natural del pigmento con el TiO<sub>2</sub> modificado.



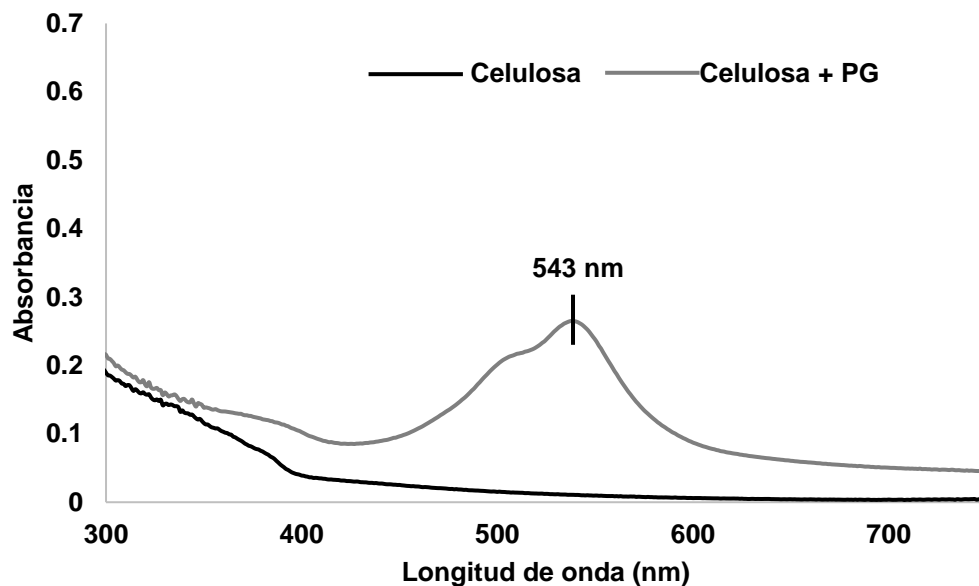
**Fig. 11.** Espectro de UV-vis del TiO<sub>2</sub>+SDS y TiO<sub>2</sub>+SDS+PG.

Para el SiO<sub>2</sub> modificado con SDS se obtuvo el espectro de la Fig. 12 donde se observa una banda a 543 nm correspondiente a la prodigiosina, mostrando el mismo desplazamiento que en el TiO<sub>2</sub>.



**Fig. 12.** Espectro de UV-vis del SiO<sub>2</sub>+SDS y SiO<sub>2</sub>+SDS+PG.

Para la celulosa con prodigiosina inmovilizada se observa una señal a 543 nm atribuida a la prodigiosina (Fig. 13).



**Fig. 13.** Espectro de UV-vis de la celulosa y celulosa + PG.

Con los espectros de FT-IR se comprueba la inmovilización de la prodigiosina en los materiales propuestos, que a pesar de no presentar de manera clara las bandas características de la prodigiosina en estos los espectros, los resultados de UV- vis así como las cinéticas realizadas permiten corroborar la inmovilización ya que muestran mayor cantidad de prodigiosina inmovilizada en los materiales modificados en comparación con los materiales prístinos en el caso de los óxidos de metales.

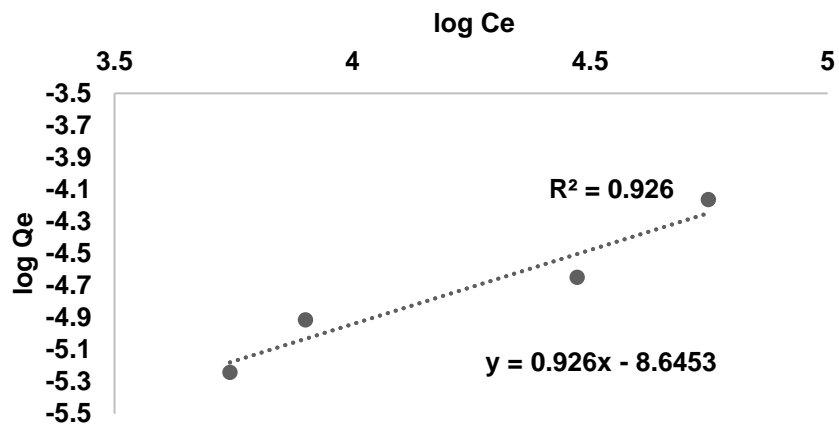
### **5.3.3 Isotermas de adsorción**

Para conocer el mecanismo de adsorción del pigmento en los diferentes materiales se llevaron a cabo isotermas de adsorción para cada material, cabe mencionar que sólo se llevaron a cabo las isotermas para los materiales modificados ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ ) y la celulosa, ya que son los materiales que mostraron mayor capacidad de adsorción. Las isotermas de adsorción de los 3 materiales fueron ajustados a los 3 modelos mencionados en 4.3.3, pero solo se muestra el grafico del modelo al que mejor se ajustó cada isoterma, así como sus respectivas constantes de adsorción de acuerdo con el modelo correspondiente.

En la Fig. 14 se observa el grafico lineal del  $\text{TiO}_2$  modificado ajustado al modelo de Freundlich, en la Figura se observa que este es el modelo que mejor se ajusta al obtener un coeficiente de determinación  $R^2= 0.92$ . El modelo de Freundlich describe una adsorción no ideal e irreversible, que puede aplicarse a la adsorción multicapa, donde la capacidad adsorbida es la suma de adsorción en todos los sitios, donde los sitios de unión más fuerte son ocupados primero, hasta que la



energía de adsorción disminuye exponencialmente al completar el proceso de adsorción (Foo y Hameed, 2010).



**Fig. 14.** Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en TiO<sub>2</sub> modificado con ajuste al modelo de Freundlich.

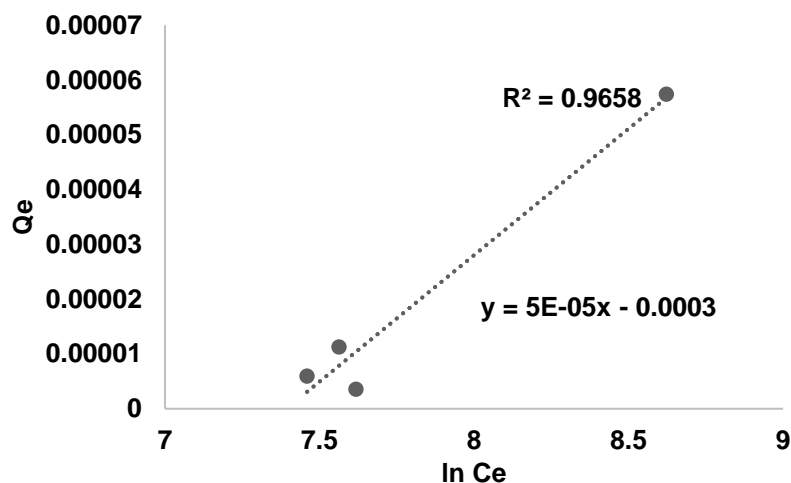
En la tabla 4, se muestran las constantes de adsorción de la prodigiosina en el TiO<sub>2</sub> modificado, ajustada al modelo de Freundlich donde:  $K_f$  es un indicador aproximado de la capacidad de adsorción, obteniendo que 1 g de TiO<sub>2</sub> modificado inmoviliza aproximadamente  $2.29 \times 10^{-9}$  mg de prodigiosina/g de material, en cuanto a valor de  $n = 1$  indica que la partición entre las 2 fases es independiente de la concentración y el valor de  $1/n = 0.926$  indica que la inmovilización es de tipo normal (Dada *et al.*, 2012).

**Tabla 4.** Constantes de adsorción de la prodigiosina en TiO<sub>2</sub> modificado.

Isoterma de Freundlich			
$\frac{1}{n}$	$n$	$K_f$ (mg/g)	$R^2$
0.926	1.08	$2.29 \times 10^{-9}$	0.926

Para la inmovilización de la prodigiosina en SiO<sub>2</sub> modificado se realizó el ajuste lineal para los 3 modelos propuestos, resultando el modelo de Temkin el que mejor se ajusta, en la Fig. 15 se muestra el ajuste del modelo lineal de Temkin para el SiO<sub>2</sub> modificado con prodigiosina inmovilizada.

El modelo de Temkin asume un comportamiento de adsorción caracterizado por una distribución uniforme de energías de unión hasta alcanzar un valor máximo de energía de unión (Johnson y Arnold, 1995).



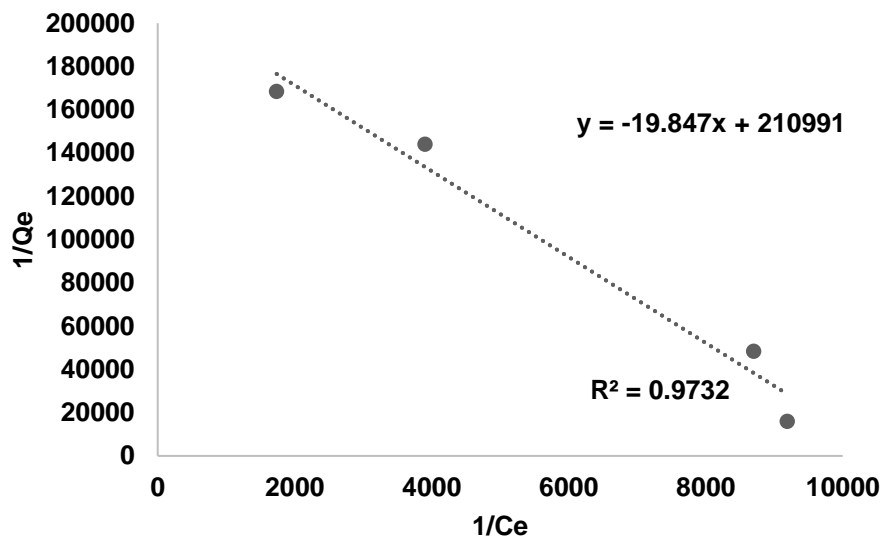
**Fig. 15.** Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en SiO<sub>2</sub> modificado con ajuste al modelo de Temkin.

Con respecto a las constantes de este modelo, se muestran en la tabla 5, donde A es la constante de equilibrio isotérmico, b es la constante de a isoterma, B es la constante relacionada con el calor de adsorción y R2 es el coeficiente de determinación.

**Tabla 5.** Constantes de adsorción de la prodigiosina en SiO<sub>2</sub> modificado.

Isoterma de Temkin			
A (L/mg)	b	B	R <sup>2</sup>
2.47X10 <sup>-3</sup>	4.96E+07	5X10 <sup>-5</sup>	0.965

Para la celulosa el modelo que mejor se ajusta es el modelo de Langmuir, como se muestra en la Fig. 16, este modelo describe que el comportamiento de adsorción se basa en la adsorción de una monocapa (cuyo espesor es del tamaño de una molécula), la cual solo ocurre en un numero finito de sitios localizados que poseen la misma afinidad por el adsorbato, sin presentar interacciones laterales e impedimento estérico entre las moléculas adsorbidas en los sitios adyacentes (Foo & Hameed, 2010).



**Fig. 16.** Grafico lineal de la adsorción de la prodigiosina en celulosa ajustado al modelo de Langmuir.

La tabla 6 muestra las constantes de adsorción del modelo de Langmuir, la  $q_{\max}$  es la cantidad máxima de prodigiosina adsorbida en el adsorbente,  $K_L$  es la constante de Langmuir,  $R_L$  es el factor de separación, que en este caso al ser igual a 1 quiere decir que la adsorción es de naturaleza lineal.

**Tabla 6.** Constantes de adsorción de la prodigiosina en celulosa.

<b>Isoterma de Langmuir</b>			
<b><math>q_{\max}</math> (mg/g)</b>	<b><math>K_L</math> (L/mg)</b>	<b><math>R_L</math></b>	<b><math>R^2</math></b>
$4.73 \times 10^{-6}$	$-9.40 \times 10^{-5}$	1	0.973

#### **5.4 Prueba de fotoestabilidad de la prodigiosina**

La prueba de fotoestabilidad permitió evaluar la estabilidad del pigmento en respuesta a las radiaciones UV emitidas por la luz solar, como se observa en la Fig.17 la concentración de la PG se mantiene constante durante las 120 h monitoreadas, comprobando la fotoestabilidad de la prodigiosina y por ende su potencial uso como sensibilizador en celdas solares orgánicas (Posadas Chincilla, 2009), cabe mencionar que existen estudios que emplean pigmento microbianos para la sensibilización de celdas solares y realizan pruebas de estabilidad empleando la misma metodología pero en tiempos menores como el realizado por Órdenes *et al.*, (2016), que hizo la evaluación durante 1 hora haciendo mediciones en intervalos de 10 minutos.

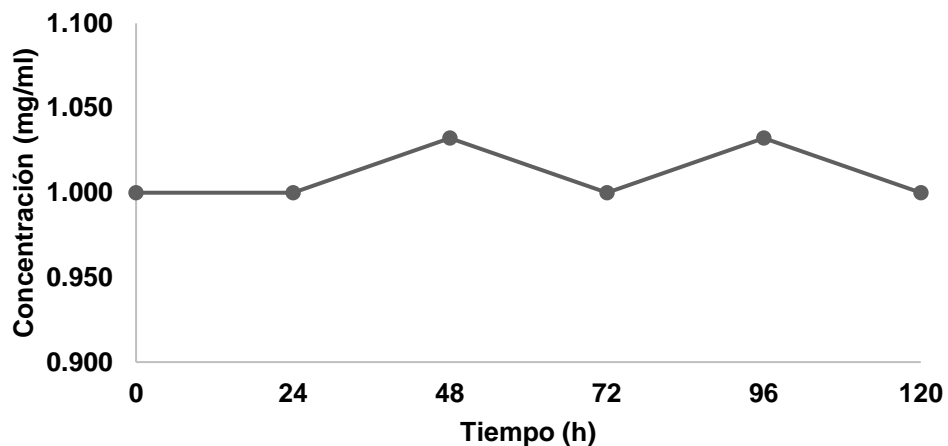
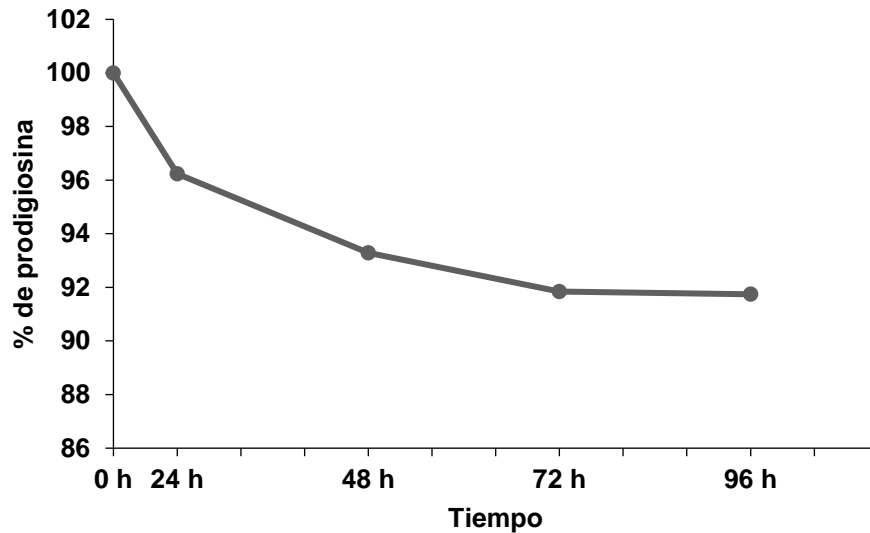


Fig. 17. Prueba de fotoestabilidad de la prodigiosina.

### 5.5 Comprobación de estabilidad de los sistemas inmovilizados.

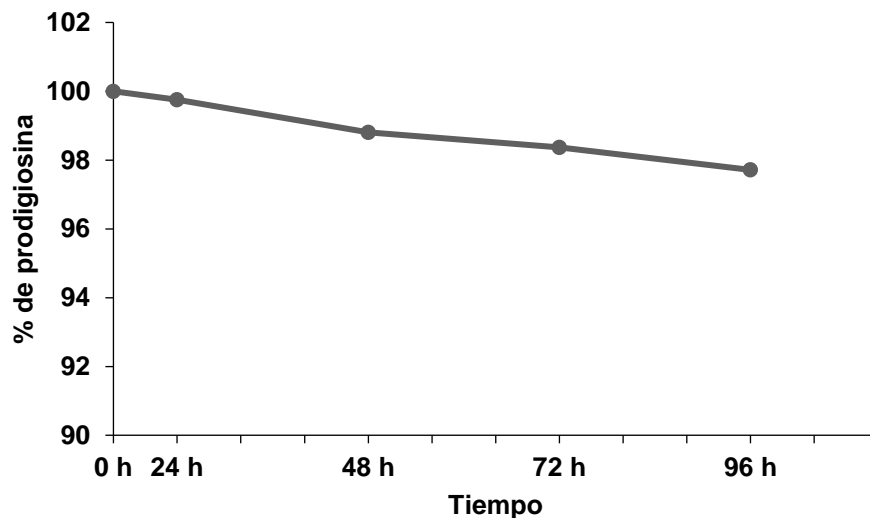
La prueba de estabilidad se realizó en la celulosa con prodigiosina inmovilizada (Fig. 18) y el SiO<sub>2</sub> modificado con SDS y con prodigiosina inmovilizada.

En el caso de la celulosa la el porcentaje de prodigiosina que fue liberada fue 8.3 % con respecto a la concentración inicial de prodigiosina que había inmovilizada en la celulosa, al realizar una comparación con el porcentaje reportado por Arivizhivendhan *et al.*, (2015) que realizó la imovilización de la prodigiosina en una matriz de celulosa reporto una liberación de prodigiosina del 1.2 %, lo cual puede ser atribuido a la dimensión de la matriz empleada que fue de 5 cm de diametro por 1 cm de espesor, lo que disminuye el area superficial de contacto del sistema inmovilizado con respecto a las nanoparticulas empleadas en el presente proyecto que eran de 20 nm, por lo que al disminuir el tamaño de partícula el area superficial se ve aumentada, facilitando el contacto del agua destilada con el sistema inmovilizado.



**Fig. 18.** Liberación de la prodigiosina inmovilizada en celulosa.

Para la prodigiosina inmovilizada en SiO<sub>2</sub> modificado con SDS, el porcentaje de liberación de prodigiosina después de 96 horas fue de 2.3 % con respecto a la concentración inicial de prodigiosina que había inmovilizada, lo cual puede deberse a que la cantidad de prodigiosina que había inmovilizada en este material es mayor en comparación a la inmovilizada por la celulosa.



**Fig. 19.** Liberación de la prodigiosina inmovilizada en SiO<sub>2</sub> modificado con SDS.

## 5.6 Realizar pruebas de concepto de los sistemas inmovilizados

### 5.6.1 Antibacteriano

Las pruebas antibacterianas se llevaron a cabo tanto en prodigiosina libre como en prodigiosina inmovilizada mediante metodología de macrodilución empleando la espectrofotometría de UV- vis para realizar las mediciones de D.O.

Para la prodigiosina libre se emplearon 6 concentraciones diferentes (100, 200, 300, 1000, 2000 y 3000 mg/L), de las cuales todas mostraron un resultado negativo, debido a que hubo crecimiento bacteriano en todas las pruebas realizadas, sin embargo hay estudios que reportan concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de la prodigiosina pura contra *E. coli*: 103.4±6.3 mg/L (Danevčič *et al.*, 2016), y Karbaschi *et al.*, (2017) reporta una MIC para *E. coli* de 3,126 mg/L; al homologar la concentración de prodigiosina pura no se observó el mismo efecto, lo cual puede ser atribuido al efecto del pH, ya que se ha reportado que la prodigiosina presenta mejor actividad antimicrobiana a pH ácido (pH 6) en comparación con un pH alcalino (Gulani *et al.*, 2012), lo que cual puede ser atribuido a que el solvente utilizado en la presente investigación no permite realizar el ajuste del pH de la solución de prodigiosina, lo cual puede ser un factor a considerar en estudios futuros.

En cuanto a la prodigiosina inmovilizada en los materiales (celulosa, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) se probaron 3 concentraciones, las cuales no mostraron disminución de crecimiento bacteriano en cuanto a la D.O, por lo que, como se comentó anteriormente la concentración de prodigiosina inmovilizada que se empleó en las pruebas realizadas fue baja en comparación con lo reportado en la literatura, así como cabe

mencionar que las concentraciones mínimas inhibitorias, reportadas en la literatura, están basadas en prodigiosina de alta pureza. Sin embargo, en esta investigación se realiza solo un proceso de purificación y no se evalúa el porcentaje de pureza del pigmento, por lo cual la concentración empleada en esta prueba (la cual se trató de homologar con lo reportado en la literatura) probablemente se encuentre diluida por otros componentes presentes en la muestra, los cuales no pudieron ser separados durante la purificación en la columna de cromatografía. Ya que incluso en cromatografías por capa fina realizadas previamente (resultados no mostrados), se pueden observar bandas que dan indicios a la posibilidad de tener distintos tipos de prodigiosina. Por lo cual más estudios deben ser realizados para obtener una mejor caracterización de la muestra.

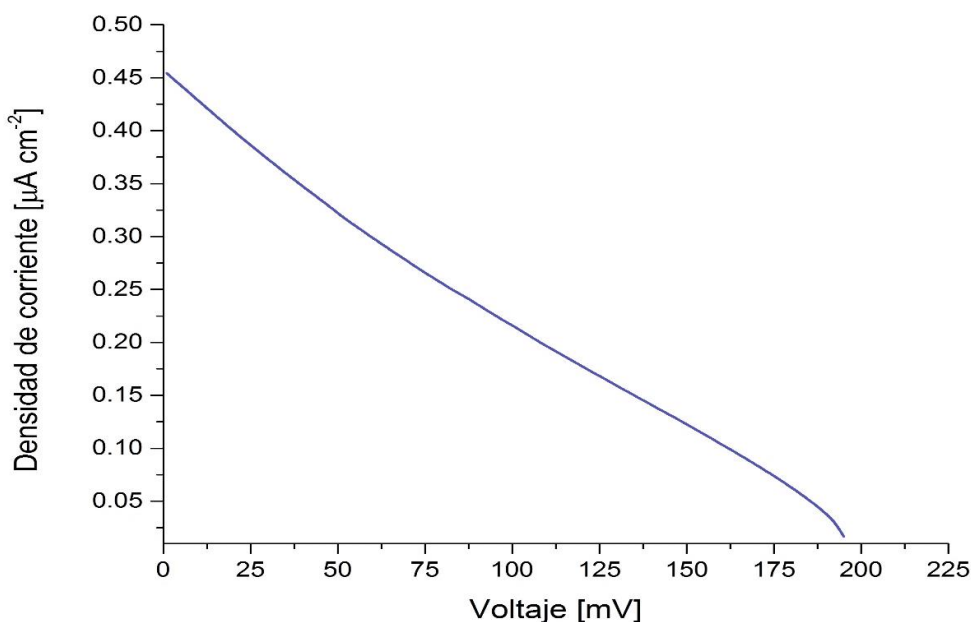
#### **5.6.2 Sensibilizador de una celda solar.**

La Fig. 20 muestra la curva voltaje contra corriente obtenida de las mediciones correspondientes a la celda orgánica sensibilizada con prodigiosina, bajo condiciones del simulador solar. A partir la curva se obtuvieron los parámetros electroquímicos: corriente en corto circuito  $I_{sc}$  (mA-cm<sup>2</sup>) y Voltaje en circuito abierto  $V_{oc}$  (mV), que son empleados para calcular el factor de llenado  $ff$  (%) (Wongcharee et al., 2007).

Los parámetros electroquímicos de la celda solar sensibilizada con prodigiosina se muestran en la tabla 7. Con estos resultados observamos que hay un buen almacenamiento de energía (195 mV), pero con una baja generación de corriente eléctrica (2.27 mA-cm<sup>2</sup>), por lo cual, la eficiencia en la conversión de la energía solar



debe ser mejorada (0.01 %). Este representa un primer acercamiento al desarrollo de celdas solares empleando la prodigiosina, lo cual no es común, puesto que normalmente se emplean pigmentos extraídos de vegetales o frutas. El rendimiento de la celda solar podría ser optimizado ajustando factores como el tipo de electrolito, el electrodo de referencia y el solvente de extracción de la prodigiosina. En la Tabla 8 se muestra el rendimiento obtenido de celdas solares sensibilizadas con pigmentos microbianos (*Hymenobacter sp* y *Chryseobacterium*) Órdenes *et al.*, (2016) y un pigmento de origen vegetal (*Blue pea*) (Wongcharee *et al.*, 2007) donde se observa que el rendimiento obtenido con la prodigiosina se encuentra dentro del rango reportado para estos pigmentos.



**Fig. 20.** Curva corriente -voltaje de celda solar sensibilizada con PG.

**Tabla 7.** Parámetros Electroquímicos de la Celda solar sensibilizada con prodigiosna.

<b>Pigmento</b>	<b>Corriente en corto circuito Isc (mA-cm2)</b>	<b>Voltaje en circuito abierto Voc (mV)</b>	<b>Factor de llenado ff (%)</b>	<b>Eficiencia (%)</b>
Prodigiosina	2.27	195	1	0.01

**Tabla 8.** Tabla comparativa de eficiencias de pigmentos naturales en celdas orgánicas.

<b>Pigmento</b>	<b>Eficiencia <math>\eta</math> (%)</b>
<i>Hymenobacter sp.</i> (rojo)	0.03
<i>Chryseobacterium</i> (amarillo)	0.03
<i>Blue pea</i>	0.05

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

Se logró producir prodigiosina a partir de la cepa de *S. marcescens*, utilizando medio cacahuete al 1 %, obteniendo un total de ~2 g del pigmento, así mismo se logró hacer la caracterización del pigmento mediante espectrofotometría de UV-vis, obteniendo una banda a 539 nm, la cual se encuentra dentro de lo reportado por otros autores.

Mediante FT-IR se analizaron los materiales modificados con SDS, comprobando la presencia de este último compuesto en su estructura, obteniendo así materiales anfifílicos.

Se logró la inmovilización de la prodigiosina en soportes sólidos de TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> y celulosa, siendo el SiO<sub>2</sub> modificado y la celulosa los que presentaron mejor resultado inmovilizando 1.14 mg/g y 0.62 mg/g respectivamente, de igual manera se realizó la caracterización mediante FT-IR, observando bandas características del surfactante en los materiales modificados, y bandas de la prodigiosina. Así mismo se evaluó el mecanismo de adsorción mediante las isotermas encontrando que cada material se ajusta a un modelo diferente.

Se evaluó la fotoestabilidad de la prodigiosina durante 120 horas, obteniendo como resultado que la concentración de la solución se mantuvo constante, resultando un pigmento apto para su aplicación como posible sensibilizador de celdas orgánicas.

La estabilidad de los sistemas inmovilizados se evaluó mediante inmersión de los mismos en agua destilada durante 4 días, obteniendo una liberación del 8.2 % para la prodigiosina inmovilizada en celulosa y 2.3 % para la prodigiosina inmovilizada en SiO<sub>2</sub> modificado.

Se implementó la metodología de macrodilución empleando espectrofotometría de UV- vis para evaluar la D.O para evaluar la actividad antimicrobiana de la prodigiosina pura y el sistema inmovilizado, obteniendo un resultado negativo a las concentraciones empleadas durante las pruebas debido a que no se observó disminución en la D.O.

Finalmente se desarrolló una prueba concepto de celda solar orgánica sensibilizada con PG, la cual resultó con una eficiencia de conversión de 0.01 %, valor comparable con el rango de eficiencia reportado para pigmentos naturales (Órdenes *et al.*, 2016). Mostrando así el potencial uso de este pigmento como sensibilizador y abonando al escaso conocimiento que existe acerca del desarrollo de celdas solares empleando pigmentos bacterianos, puesto que normalmente se emplean pigmentos extraídos de vegetales o frutas.

## PERSPECTIVAS

Realizar un proceso de caracterización de los compuestos que pudieran estar presentes en la muestra, realizar un proceso de purificación más exhaustivo y determinar la pureza del pigmento para posteriormente realizar las pruebas antibacterianas.

Implementar una metodología que permita realizar una evaluación de viabilidad de las bacterias después del tratamiento con prodigiosina, ya sea libre e inmovilizada.

Llevar a cabo una optimización del rendimiento de la celda solar sensibilizada con prodigiosina mediante la variación del electrolito, del tipo de electrodo de referencia y el solvente utilizado, para obtener una mayor % de rendimiento, ya que estos factores son de gran importancia para el buen desempeño de una celda solar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abderrahim, B., Abderrahman, E., Mohamed, A., Fatima, T., & Abdesselam, T. (2015). Kinetic Thermal Degradation of Cellulose , Polybutylene Succinate and a Green Composite : Comparative Study, 3(4), 95–110. <https://doi.org/10.12691/wjee-3-4-1>.
- Ahmad, R., & Sardar, M. (2014). Immobilization of cellulase on TiO<sub>2</sub> nanoparticles by physical and covalent methods: a comparative study.
- Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1
- Al-Taweel, S. S., & Saud, H. R. (2016). New route for synthesis of pure anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles via ultrasound- assisted sol-gel method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(January 2017), 620–626.
- Alihosseini, F., Ju, K. S., Lango, J., Hammock, B. D., & Sun, G. (2008). Antibacterial colorants: Characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*, 24(3), 742–747. <https://doi.org/10.1021/bp070481r>.
- Andreyeva, I. N., & Ogorodnikova, T. I. (2015). Pigmentation of *Serratia marcescens* and Spectral Properties of Prodigiosin, 84(1), 28–33. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010026>.
- Arivzhivendhan, K. V, Boopathy, R., Maharaja, P., Regina, R., & Sekaran, G. (2015). RSC Advances Bioactive prodigiosin-impregnated cellulose matrix for the removal of pathogenic bacteria from aqueous solution. *RSC Advances*, 5, 68621–68631. <https://doi.org/10.1039/C5RA09172A>.
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, (JANUARY 1998), 1–17.
- Aruldass, C. A., Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2014). Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.006>.
- Caligur, V. (2008). Detergent properties and applications. *BioFiles*, 3(3), 14.
- Casullo de Araújo, H. W., Fukushima, K., & Takaki, G. M. C. (2010). Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules*, 15(10), 6931–6940. <https://doi.org/10.3390/molecules15106931>.
- Chatterjee, S., Sala??n, F., & Campagne, C. (2014). The influence of 1-butanol and trisodium citrate ion on morphology and chemical properties of chitosan-based microcapsules during rigidification by alkali treatment. *Marine Drugs*, 12(12), 5801–5816. <https://doi.org/10.3390/md12125801>.

- Chen, J., Xiao, P., Gu, J., Han, D., Zhang, J., Sun, A., & Chen, T. (2013). Smart Hybrid System of Au Nanoparticles Immobilized PDMAEMA Brushes for Thermally Adjustable Catalysis, (300 mL), 1–8.
- Dada, A. O., Olalekan, A. P., Olatunya, A. M., & Dada, O. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn<sup>2+</sup> onto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 3(1), 38-45.
- Danevčič, T., Vezjak, M. B., Zorec, M., & Stopar, D. (2016). Prodigiosin - A multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. *PLoS ONE*, 11(9), 9–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162412>.
- Danyuo, Y., Obayemi, J. D., Dozie-Nwachukwu, S., Ani, C. J., Odusanya, O. S., Oni, Y., ... & Soboyejo, W. O. (2014). Prodigiosin release from an implantable biomedical device: kinetics of localized cancer drug release. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 734-745.
- Darshan, N., & Manonmani, H. K. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>.
- Dozie-Nwachukwu, S. O., Danyuo, Y., Obayemi, J. D., Odusanya, O. S., Malatesta, K., & Soboyejo, W. O. (2016). *Extraction and encapsulation of prodigiosin in chitosan microspheres for targeted drug delivery*. *Materials Science and Engineering: C*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.078>.
- Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J. A., VillaVelázquez-Mendoza, C., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V., & Manzanillo, T. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica*, 3(6).
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, 156, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.
- Giri, A. V, Anandkumar, N., Muthukumar, G., & Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>.
- Grimont, F., & Grimont, P. a D. (2006). The Genus *Serratia*. *Prokaryotes*, 6, 219–244. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_11).
- Gulani, C., Bhattacharya, S., & Das, A. (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial , antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 116–122.
- Guryanov, I. D., Karamova, N. S., Yusupova, D. V., Gnezdilov, O. I., & Koshkarova, L. A. (2013). Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(1), 106–111. <https://doi.org/10.1134/S1068162012060040>.

- Haddix, P. L., Jones, S., Patel, P., Burnham, S., Knights, K., Powell, J. N., & LaForm, A. (2008). Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7453-7463.
- Hosseinnezhad, M., Rouhani, S., & Gharanjig, K. (2018). Extraction and application of natural pigments for fabrication of green dye-sensitized solar cells. *Opto-Electronics Review*, 26(2), 165-171.
- Johnson, R. D., & Arnold, F. H. (1995). The temkin isotherm describes heterogeneous protein adsorption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1247(2), 293–297. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00006-G](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00006-G).
- Kavitha, R., Aiswariya, S., & Ratnavali, C. M. (2010). Anticancer activity of red pigment from *Serratia marcescens* in Human cervix carcinoma. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2(1), 784-787.
- Kazmi, S. A., Hameed, S., Ahmed, A. S., Arshad, M., & Azam, A. (2016). Electrical and optical properties of graphene –TiO<sub>2</sub> nanocomposite and its applications in dye sensitized solar cells (DSSC). *Journal of Alloys and Compounds*, 691, 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.08.319>.
- Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R., & Nascimento, S. C. (2014). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 399–406. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1793>.
- Limousin, G., Gaudet, J. P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthes, V., & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), 249-275.
- Muhamad, M. S., Salim, M. R., & Lau, W. J. (2015). Surface modification of SiO<sub>2</sub> nanoparticles and its impact on the properties of PES-based hollow fiber membrane. *RSC Advances*, 5(72), 58644-58654.
- Nurten, Ş., & Paksoy, H. (2017). Solar Energy Materials & Solar Cells Determining influences of SiO<sub>2</sub> encapsulation on thermal energy storage properties of different phase change materials, 159, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2016.08.030>.
- Obayemi, J. D., Danyuo, Y., Dozie-Nwachukwu, S., Odusanya, O. S., Anuku, N., Malatesta, K., ... Soboyejo, W. O. (2016). PLGA-based microparticles loaded with bacterial-synthesized prodigiosin for anticancer drug release: Effects of particle size on drug release kinetics and cell viability. *Materials Science and Engineering C*, 66, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.071>.



- Órdenes-Aenishanslins, N., Anziani-Ostuni, G., Vargas-Reyes, M., Alarcón, J., Tello, A., & Pérez-Donoso, J. M. (2016). Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in dye sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 707-714.
- Posadas Chincilla, A. M. (2009). Determinación de errores y tratamiento de datos 1. *Revista Científica*, 9(125), 1–15.
- Qiao, B., Liang, Y., Wang, T., & Jiang, Y. (2016). Applied Surface Science Surface modification to produce hydrophobic nano-silica particles using sodium dodecyl sulfate as a modifier. *Applied Surface Science*, 364, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.12.116>.
- Ryazantseva, I., & Andreyeva, I. (2014). Application of prodigiosin as a colorant for polyolefines. *Advances in Biological Chemistry*, 4(1), 20–25. <https://doi.org/10.4236/abc.2014.41004>.
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.
- Sathishkumar, P., Kamala-Kannan, S., Cho, M., Kim, J. S., Hadibarata, T., Salim, M. R., & Oh, B. T. (2014). Laccase immobilization on cellulose nanofiber: the catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 100, 111-120.
- Sharma, R., Shaw, R., Tiwari, S., & Tiwari, S. (2015). Nano-Titania Decorated Fly Ash as Self-Cleaning Antibacterial Cool Pigment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3(11), 2796–2803. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00692>.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>.
- Usman Hizbullah , Abdulkadir Nafi'u , Gani Mustapha, M. H. M. (2017). Bacterial Pigments and its Significance, 4(3), 1–6. <https://doi.org/10.15406/mojbb.2017.04.00073>.
- Van Rossom, W., Asby, D. J., Tavassoli, A., & Gale, P. A. (2016). Perenosins: a new class of anion transporter with anti-cancer activity. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(9), 2645-2650.
- Wongcharee, K., Meeyoo, V., & Chavadej, S. (2007). Dye-sensitized solar cell using natural dyes extracted from rosella and blue pea flowers. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 91(7), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2006.11.005>.
- Karbaschi, P., Zarif, B. R., & Houshmandi, Z. (2017). Evaluation of antibacterial effect of prodigiosin pigment produced by serratia marcescens against staphylococcus aureus and escherichia coli isolated from processed food. *Indo american journal of pharmaceutical sciences*, 4(5), 1348-1353.

- Xu, W. H., Wang, L., Wang, J., Sheng, G. P., Liu, J. H., Yu, H. Q., & Huang, X. J. (2013). Superparamagnetic mesoporous ferrite nanocrystal clusters for efficient removal of arsenite from water. *CrystEngComm*, 15(39), 7895-7903.
- Zheng, H., Liu, D., Zheng, Y., Liang, S., & Liu, Z. (2009). Sorption isotherm and kinetic modeling of aniline on Cr-bentonite. *Journal of hazardous materials*, 167(1-3), 141-147.
- Zeng, J., Liu, S., Cai, J., & Zhang, L. (2010). TiO<sub>2</sub> immobilized in cellulose matrix for photocatalytic degradation of phenol under weak UV light irradiation. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(17), 7806–7811. <https://doi.org/10.1021/jp1005617>.

## ANEXOS

### Materiales y reactivos

Se trabajó con material básico de laboratorio como: tubos Falcon, tubos de ensayo, micropipetas, cajas Petri, soportes universales, matraces, vasos de precipitados, embudo de vidrio, etc.

Los reactivos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla A-1.** Tabla de reactivos utilizados.

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
Cloroformo	J. T. Baker
Metanol	J. T. Baker
Caldo LB	DIFCO
Agar LB	DIFCO
Etanol	Desarrollo de Especialidades Químicas
Éter de petróleo	Desarrollo de Especialidades Químicas
Silica gel	MERK
Ácido clorhídrico	Desarrollo de Especialidades Químicas
Dodecil sulfato de sodio	IBI Scientific
Triton 100X	Amresco
Yoduro de potasio	PQM
Yodo	MERK
Caldo nutritivo	BIOXON
celulosa	Sigma Aldrich
Nanoparticulas de TiO <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Nanoparticulas de SiO <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Polietilenglicol	MERK
Etilenglicol	MERK
Alcohol isopropílico	J. T. Baker
acetona	J. T. Baker
Ácido nítrico	Desarrollo de Especialidades Químicas
Caldo Müeller Hinton	DIFCO

## Equipos

Los equipos que se utilizaron en la realización del proyecto se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla A-2.** Tabla de equipos utilizados.

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Centrifuga refrigerada	Thermo Electron®	CENTRA CL 3 R
Ultrasonificador	Fisher Scientific®	FB120
Constant Speed Mixer	Lab-line®	1195
Espectrofotómetro UV-vis	Spectronic®	4001
Incubadora con agitación	SHEL-LAB®	1575
Autoclave automática	Tuttnauer®	2540M
Horno de Secado	LAB LINE®	3513
Plancha de calentamiento c/agitación	Thermo Scientific®	SP13132
Balanza Analítica	AND®	HR-200
Agitador para tubos grandes	Thermolyne®	M107625
Campana de bioseguridad	Labconco®	36204-04w
Incubadora con agitación	Barnstead international®	SHK4000
Baño de ultrasonido	Branson®	1510R- DTH
Simulador solar	Sciencetech®	55150
Potenciostato	Gamry®	PCI4-740A