

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE LA
MEZCLA $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ SOBRE *E. coli* EN PRESENCIA DE LUZ VISIBLE
MEDIANTE UN MÉTODO DE VALIDACIÓN**

**DAYANNA PATRICIA AYALA BOTIA
MARÍA ALEJANDRA VARGAS BUITRAGO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE LA
MEZCLA TiO₂/CuOx SOBRE *E. coli* EN PRESENCIA DE LUZ VISIBLE
MEDIANTE UN MÉTODO DE VALIDACIÓN**

**DAYANNA PATRICIA AYALA BOTIA
MARÍA ALEJANDRA VARGAS BUITRAGO**

**Trabajo de investigación para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

**DIRECTOR
César Augusto Quiñones Segura
Doctor en ciencias**

**CODIRECTOR
Adriana Inés Páez Morales
Microbióloga**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado
César Augusto Quiñones Segura

Firma del jurado

Firma del jurado

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Decano General de la Facultad de Ingenierías

Ing. Julio César Fuentes Arismendi

Director de Investigaciones

Ing. Armando Fernández Cárdenas

Director del Departamento de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestro director de tesis Dr. Sc César Augusto Quiñones Segura por su acompañamiento, alegría, locura y asesoría en este arduo trabajo; sobre todo por permitirnos pertenecer al grupo de investigación de Materiales Fotoactivos, a la profesora MS. Sc Adriana Inés Páez Morales por su ayuda, paciencia, colaboración y explicación con el trabajo desarrollado en microbiología.

A nuestros padres que nos motivaron, nos dieron palabras de aliento cuando las cosas no parecían salir bien, gracias por su entrega desmesurada y constante colaboración. A cada uno de nuestros familiares que con su cooperación financiera y espiritual hicieron posible este proyecto.

Al grupo de Materiales Fotoactivos, por brindarnos su apoyo en el proceso de elaboración de este trabajo, en especial a María Camila Gamboa por su compromiso y colaboración permanente, a Lina, Jaime, Ophyr, Leonia, Paula, Diana y Tatiana, por ayudarnos en alguna etapa para el desarrollo de este proyecto. A nuestros compañeros tesistas Marcela Benavides, Paola Suárez, Jeison Beleño, Karen, Andrés Cortés, Felipe Aponte y Catalina, por el trabajo en equipo.

A Jeison Andrés Beleño y Cristian Rivera por sus importantes aportes en la automatización del fotorreactor, con la programación en LabVIEW, y toda la instrumentación requerida, a Felipe Pinto por realizar los planos del fotorreactor.

A Jenny Buitrago por dejar de lado sus compromisos y dedicarnos tiempo para sacar adelante la suspensión y las películas. A Yolanda Quiñones por su colaboración y paciencia. Al profesor Andrés Loaiza por ayudarnos con las pruebas de caracterización de las películas.

Agradecemos a la coordinadora de laboratorios Yenny Hernández y a los monitores, por su generosidad y amabilidad.

Finalmente, a la Universidad de América, Politécnico Gran Colombiano, Universidad Nacional de Colombia y Pontificia Universidad Javeriana, por abrir sus puertas para realizar este proyecto de investigación.

Quiero agradecer a Dios, por todo lo valioso que tengo en mi vida, por guiarme en esta etapa tan importante, permitirme finalizarla con éxito y darme la fortaleza para seguir adelante ante las adversidades.

Dedico este proyecto de grado a mis padres Heber Ayala y Patricia Botía, quienes construyeron este camino para mí, con su amor, esfuerzo y ejemplo, a mi querido hermano Nico, por ser una gran compañía y sacarme una sonrisa con sus ocurrencias, este logro es para ustedes, los quiero mucho.

Finalmente, no puedo irme sin darle gracias a María Alejandra Vargas, por los momentos que afrontamos para lograr esta meta profesional, algunos difíciles y otros tantos llenos de alegría, que privilegio es tener esa amiga y compañera de tesis.

-Dayanna Patricia Ayala Botía.

Dedico este proyecto a mi madre Nidia Buitrago por su apoyo, amor y entrega completa, a mi padre Carlos Vargas por su ayuda y preocupación, a mi abuela Pureza Rodríguez por enseñarme a ser fuerte en momentos difíciles, a José Manuel Osorio por sus consejos, a mi hermano Manuel Osorio por sacarme sonrisas, a mi novio Daniel Velandia por estar a mi lado, ser mi confidente y mi alegría, a mis tíos por su valiosa colaboración, a mi amiga Laura Álvarez por sus palabras de aliento, a Heidy Moreno por escucharme y brindarme su amistad.

A mi compañera y amiga de tesis Dayanna Ayala porque sin ella este proyecto no hubiera sido posible, gracias por compartir tantas traspasadas, preocupaciones, tristezas, alegrías y sueños.

Y al ser más importante: Dios, porque es mi consejero, mi ayuda, mi soporte, mi protector, mi padre, mi consentidor, el que levanta mi cabeza, mi escudo y mi fortaleza, mi guardián y mi escondite más seguro. Todo se lo debo.

-María Alejandra Vargas Buitrago

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	20
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
1.1 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA	21
1.2 FOTOCATÁLISIS AMBIENTAL	23
1.3 DIÓXIDO DE TITANIO EN FOTOCATÁLISIS	23
1.3.1 Modificación de TiO ₂ con CuO	24
1.4 MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MEZCLA TiO ₂ /CuO	26
1.4.1 Impregnación húmeda	26
1.5 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS	26
1.5.1 Spin Coating	26
1.6 FOTOCATÁLISIS PARA LA DESINFECCIÓN	27
1.6.1 Mecanismo de desinfección.	28
1.7 MÉTODO DE SEGUIMIENTO	30
1.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	31
1.8.1 Estándar de Mc Farland.	31
1.8.2 Escherichia coli	31
1.8.3 Recuento en placa	32
1.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS	33
1.9.1 Parámetros de validación	34
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
2.1 PROTOCOLO LAVADO DE VIDRIOS	35
2.1.1 Reactivos empleados	35
2.1.2 Descripción	35
2.2 PROTOCOLO DE ELABORACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA MEZCLA	36
2.2.1 Reactivos empleados	36

2.2.2 Descripción	36
2.3 PROTOCOLO DEPOSICIÓN DE LA MEZCLA EN EL SUSTRATO	38
2.3.1 Reactivos empleados	38
2.3.2 Descripción	38
2.4 PRUEBA FUNCIONAMIENTO DE PELÍCULAS AZUL DE METILENO	39
2.4.1 Materiales Empleados	39
2.4.2 Descripción	40
2.5 PROTOCOLO MICROBIOLÓGICO	41
2.5.1 Fotorreactor	41
2.5.1.1 Componentes fotorreactor	42
2.5.2 Descripción metodología microbiológica	44
2.5.2.1 Activación de la cepa	44
2.5.2.2 Igualación a patrón Mc Farland	44
2.5.2.3 Fotorreacción	44
2.5.2.4 Cuantificación del microorganismo	44
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
3.1 LAVADO DE VIDRIOS	46
3.2 ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS CON LA MEZCLA TiO_2/CuOx	46
3.2.1 Elaboración y activación de la mezcla	46
3.2.2 Suspensión de la mezcla	46
3.2.3 Deposición de la mezcla	47
3.2.4 Calcinación de las películas	47
3.2.5 Películas depositadas	47
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS	48
3.3.1 Caracterización morfológica (SEM).	48
3.3.2 Caracterización estructural (DRX).	50
3.4 FOTODEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO	51
3.5 EVALUACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE UNA VALIDACIÓN	55
3.5.1 Población de estudio	55
3.5.2 Condiciones microbiológicas	55
3.5.3 Parámetros de validación	56
3.5.4 Prueba preliminar de calibración de equipos	56

3.5.5 Prueba preliminar de esterilidad del medio de cultivo	57
3.5.6 Prueba preliminar de promoción de crecimiento	58
3.5.7 Resultados solución de prueba	58
3.5.8 Análisis estadístico	59
3.5.8.1 Análisis de repetibilidad analista 1	60
3.5.8.2 Análisis de repetibilidad analista 2	62
3.5.9 Sensibilidad de la técnica	63
3.5.10 Inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i>	63
3.5.11 Comparación resultados entre analistas	67
3.5.12 Eficiencia del método	68
3.5.13 Tasa de supervivencia de <i>E. coli</i>	69
4. CONCLUSIONES	76
5. RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFIA	78
ANEXOS	84

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Esquema del proceso fotocatalítico con TiO ₂	22
Figura 2. Espectro Electromagnético.	24
Figura 3. Sistema fotocatalítico TiO ₂ /CuO.	25
Figura 4. Esquema del proceso de deposición de películas por Spin Coating.	27
Figura 5. <i>E. coli</i> en contacto con película de TiO ₂ .	29
Figura 6. Degradación <i>E. coli</i> usando luz visible.	30
Figura 7. Comparación Patrón Mc Farland con la solución preparada.	31
Figura 8. Bacteria Gram Negativa <i>E. coli</i> .	32
Figura 9. Proceso dilución de las muestras.	33
Figura 10. Protocolo elaboración y activación de la mezcla.	37
Figura 11. Elaboración de la mezcla TiO ₂ /CuOx.	37
Figura 12. Protocolo deposición de la mezcla TiO ₂ /CuOx.	39
Figura 13. Protocolo degradación de Azul de Metileno.	41
Figura 14. Fotorreactor usado para la inactivación de <i>E. coli</i> .	43
Figura 15. Fotorreactor en funcionamiento.	43
Figura 16. Protocolo microbiológico.	45
Figura 17. Resultados protocolo de lavado de vidrios.	46
Figura 18. Películas depositadas.	47
Figura 19. Caracterización morfológica película TiO ₂ sin modificar.	48
Figura 20. Imágenes del análisis SEM para las películas elaboradas con TiO ₂ /CuOx.	49
Figura 21. Difractograma mezcla preparada a 550°C.	50
Figura 22. SEM <i>E. coli</i> sin y con presencia de nanopartículas de Cu.	71
Figura 23. Resultados siembra por analista 1	73
Figura 24. Resultados siembra por analista 2	74

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Curva de calibración azul de metileno.	40
Gráfica 2. Degradación de A.M con películas elaboradas a temperatura de calcinación (550°C).	52
Gráfica 3. Degradación de A.M con películas elaboradas a temperaturas de calcinación (580°C y 600°C).	53
Gráfica 4. Degradación de A.M bajo espectro de luz visible, temperatura de calcinación (550°C).	54
Gráfica 5. Inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i> , resultados Analista 1, réplica uno y dos (R1 y R2).	64
Gráfica 6. Inactivación fotocatalítica de <i>E. coli</i> , resultados Analista N° 2, con réplica uno y dos (R1 y R2).	66
Gráfica 7. Comparación resultados de inactivación con estudio preliminar.	67
Gráfica 8. Tasa de supervivencia de <i>E. coli</i> , resultados Analista 1 y 2, utilizando valores promedio de cada analista.	70
Gráfica 9. Tasa de supervivencia de 0 a 10%.	72

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Reactivos empleados para lavar el sustrato.	35
Tabla 2. Reactivos empleados para elaboración y activación de la mezcla.	36
Tabla 3. Reactivos empleados en la deposición de la mezcla.	38
Tabla 4. Materiales Empleados en la degradación de azul de metileno.	39
Tabla 5. Componentes empleados para la construcción del fotorreactor.	42
Tabla 6. Películas obtenidas.	48
Tabla 7. Equipos usados en la evaluación del método de inactivación fotocatalítico.	57
Tabla 8. Prueba de esterilidad del medio de cultivo	57
Tabla 9. Prueba de promoción y crecimiento.	58
Tabla 10. Resultados réplicas y valores estadísticos de recuento en placa para analista 1.	59
Tabla 11. Resultados réplicas y valores estadísticos de recuento en placa para analista 2.	61
Tabla 12. Resultados inactivación de <i>E. coli</i> , por analista 1.	64
Tabla 13. Resultados inactivación de <i>E. coli</i> , por analista 2.	65
Tabla 14. Eficiencia de la película, analista 1.	68
Tabla 15. Eficiencia de la película, analista 2.	69

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Protocolo lavado de vidrios	85
Anexo B. Cálculos elaboración de la mezcla	86
Anexo C. Cálculos concentración del precursor	87
Anexo D. Prototipo fotorreactor	88
Anexo E. Planos fotorreactor	89
Anexo F. Degradaciones azul de metileno	90
Anexo G. Ficha técnica incubadora	91
Anexo H. Ficha técnica autoclave	92
Anexo I. Ficha técnica micropipeta	94
Anexo J. Certificado de análisis medio de cultivo	95
Anexo K. Resultados tasa de supervivencia	96

GLOSARIO

BANDA DE CONDUCCIÓN: es un nivel electrónico vacante o parcialmente ocupado, se encuentra por encima de la banda de valencia; está formada por electrones que pueden moverse libremente, éstos llegan a la banda de conducción cuando reciben energía suficiente originada por una excitación térmica.

BANDA DE VALENCIA: es el nivel más alto de energía ocupado por electrones en el 0 absoluto (0 K), posee menor energía que la banda de conducción y generalmente se encuentra ocupada por los electrones.

BANDA PROHIBIDA: (en inglés bandgap), es la diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia y la parte inferior de la banda de conducción, en este estado electrónico no pueden encontrarse los electrones.

DOPADO: proceso mediante el cual se introducen impurezas en un semiconductor para cambiar sus propiedades electrónicas, esto ayuda a mejorar la eficiencia del fotocatalizador.

DRX (DIFRACCIÓN DE RAYOS X): es una técnica experimental de caracterización estructural, que permite identificar estructuras cristalinas en un material a partir de la dirección de difracción de un haz de rayos X.

ESCHERICHIA COLI (E. coli): es un bacilo Gram negativo no esporulado, una de las estructuras bacterianas más estudiadas, no sólo por sus capacidades patogénicas, sino también como modelo de investigaciones metabólicas y genéticas. Esta bacteria vive y crece de forma natural en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y los animales, pero si entra en el lugar equivocado por ejemplo, los riñones o la sangre, puede causar enfermedades, se transmite por ingestión de agua o alimentos contaminados.

ESPECTRO DE ABSORCIÓN: es una gráfica que muestra la fracción de radiación electromagnética que absorbe determinado material.

FOTOCATALIZADOR: compuesto necesario para alcanzar o acelerar una reacción química, mediante la absorción de luz que crea pares $e^-/hueco^+$.

FOTODEGRADACIÓN: es la degradación de compuestos orgánicos, inorgánicos o bacterias por la absorción de luz ultravioleta o visible.

FOTORREACTOR: recipiente donde se lleva a cabo la fotorreacción con ayuda de emisores de luz; para tener control de la temperatura se utilizan sensores LM35 y ventiladores que permiten la correcta circulación del aire.

PARES E-/H+: se generan cuando un fotón actúa sobre el semiconductor y carga al electrón para que pase de la banda de valencia a la banda de conducción, el espacio que desocupa el electrón se conoce como hueco y tiene carga positiva.

PRECISIÓN: es una medida que informa sobre la concordancia o similitud entre los valores de dos o más medidas de la misma muestra en condiciones establecidas; indica acerca de la repetibilidad y reproducibilidad que se expresan en términos de parámetros estadísticos como la desviación estándar y el coeficiente de variación.

PRECURSOR: es una sustancia necesaria para producir otra diferente mediante una reacción química.

REPETIBILIDAD: indica la variación del método realizando una serie de análisis sobre la misma muestra en condiciones operativas iguales, es decir, mismo laboratorio, equipos y analista.

REPRODUCIBILIDAD: indica la variación del método realizando una serie de análisis sobre la misma muestra en condiciones operativas diferentes, es decir, distinto laboratorio, equipos y analista.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM: Scanning Electron Microscope): es una técnica para realizar caracterizaciones morfológicas, capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia.

SEMICONDUCTOR: es un material que se comporta como aislante a bajas temperaturas, y al ser calentado aumenta su capacidad de conducir la electricidad. Sus propiedades conductoras se pueden afectar positivamente al introducir impurezas en su estructura cristalina permitiendo la creación de uniones semiconductoras.

SUSPENSIÓN: es una mezcla heterogénea compuesta por pequeñas partículas no solubles dispersas en un medio líquido, dependiendo de la sustancia pueden presentar diferentes tamaños.

VALIDACIÓN: es un proceso de verificación que utiliza ciertos parámetros para demostrar que los resultados obtenidos por cierto método son precisos y exactos.

RESUMEN

En este proyecto se llevó a cabo la validación del método de inactivación fotocatalítico usando la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$, sobre la bacteria *E. coli*, en presencia de luz visible, teniendo como referente los resultados de trabajos preliminares realizados en el grupo de investigación de Materiales Fotoactivos, donde se lograron eficiencias del 98.13% al 99.99% en la eliminación del microorganismo. Se realizó la modificación del TiO_2 con CuSO_4 , por el método de impregnación húmeda, variando la temperatura en los procesos de activación y deposición de la mezcla, manteniendo la concentración del precursor en (1,3% P/P). Se elaboraron películas por Spin Coating depositando la mezcla en un sustrato plano. Para la prueba de funcionalidad de las películas se empleó azul de metileno, donde se evidenció la capacidad de degradación en el espectro visible. La caracterización morfológica y estructural de las películas se efectuó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos x (DRX) respectivamente. Se evaluó la eficiencia de la mezcla fotocatalítica en la inactivación del microorganismo *Escherichia coli*, usando una muestra inoculada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, haciendo uso de un fotorreactor, se llevó a cabo la reacción en un tiempo de 9 horas, se tomaron muestras cada hora, dos por analista, posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes y se procedió a sembrar en las cajas Petri, se realizó el recuento del microorganismo mediante una técnica de conteo en placa, comprobando que usando la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ a la temperatura de calcinación de 550 °C se logra la inactivación de *E. coli* en un 99.99%. Con el análisis estadístico se determinó que existe precisión en la técnica de inactivación y que esta es repetible y reproducible dados los valores de desviación estándar y coeficientes de variación inferiores al 35%, rango aceptado en el uso de técnicas microbiológicas. Adicionalmente se realizó el monitoreo de la temperatura del fotorreactor con un seguimiento en LabVIEW, controlando, además, el sistema de aireación y luz, de ésta manera se garantizaron las condiciones de la reacción y el microorganismo.

Palabras clave: Fotocatálisis, $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$, fotodegradación, luz visible, fotorreactor, tratamiento de aguas, *E. coli*, validación.

INTRODUCCIÓN

La escasez de tratamientos adecuados tanto para aguas de tipo potable como residual es una de las causas directas de enfermedades infecciosas que pueden llegar a ser mortales. Uno de los indicadores de contaminación del agua es la bacteria Gram negativa *E. coli*, que actúa como patógeno infeccioso¹ causando diversas enfermedades, entre ellas la enfermedad diarreica aguda (EDA). Según la OMS (Organización Mundial de Salud) 525.000 niños menores de 5 años mueren anualmente por enfermedades diarreicas ocasionadas por un saneamiento deficiente.² En Colombia para el periodo del 2005 al 2014 se registraron 3065 muertes de menores de 5 años atribuidas al EDA.³ Al ser una enfermedad prevenible, conviene desarrollar nuevas tecnologías que permitan descontaminar el agua de éstos patógenos de manera eficiente. Para la desinfección del agua se han empleado diferentes tratamientos como la cloración y ozonización que, además de ser costosos, generan subproductos nocivos para la salud humana,⁴ la fotocatalisis surge como un método alternativo en el tratamiento de aguas no sólo porque elimina agentes microbianos sino una amplia gama de contaminantes químicos, no genera subproductos y sus costos de operación son más bajos. El grupo de Materiales Fotoactivos entre sus líneas de investigación cuenta con la modificación de materiales para mejorar las propiedades fotocatalíticas, estudiando principalmente la actividad del TiO₂ modificado con colorantes u óxidos. Este trabajo investigó la inactivación de la bacteria *E. coli* con la modificación del TiO₂ usando el precursor CuSO₄, teniendo como referente el trabajo de grado titulado “Evaluación del efecto de la temperatura de calcinación sobre la mezcla TiO₂/CuO_x para la inactivación fotocatalítica de *E. coli* en presencia de luz visible” en el cual se encontraron altas eficiencias de eliminación de la bacteria, las cuales se desean evaluar para tener certeza de que el método es reproducible y puede ser aplicado en el tratamiento de aguas.

¹ GÓMEZ-DUARTE, Oscar G. Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. En: Revista Chilena De Infectología, 2014, vol. 31, no. 5, p. 577-586.

² OMS, Organización Mundial de la Salud, Centro de prensa, Enfermedades diarreicas. [en línea] Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>>.

³ INS, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Informe del evento mortalidad por enfermedad diarreica aguda en menores de cinco años, y morbilidad en todos los grupos de edad, año 2012. [En línea] Disponible en: <<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiolgico/EDA%202012.pdf>>.

⁴ BENABBOU, AK, et al. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. En: Applied Catalysis B: Environmental, 2007, vol. 76, no. 3, p. 257-263

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de inactivación fotocatalítica de la mezcla TiO_2/CuO sobre *E. coli* en presencia de luz visible mediante un método de validación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elaborar la mezcla $\text{TiO}_2 - \text{CuOx}$.
2. Caracterizar las películas de TiO_2 modificadas con CuOx estructuralmente por el método DRX y morfológicamente por medio del método SEM.
3. Adecuar un fotorreactor para realizar la degradación de *E. coli*.
4. Validar el efecto de la fotocatalisis en la inactivación de *E. coli* con la mezcla TiO_2/CuOx en presencia de luz visible.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

Es un proceso de oxidación avanzada (PAO) que permite la degradación y mineralización de contaminantes orgánicos⁵ mediante la absorción de fotones de luz en la superficie de un semiconductor tanto en el espectro UV solar como en el espectro visible.⁶ Se dice que es heterogénea porque los contaminantes se presentan en fase fluida mientras que el catalizador está en fase sólida. El semiconductor actúa como catalizador, entre ellos están ZnO, CeO₂ y Fe₂O₃,⁷ pero el más empleado es el TiO₂ Degussa P25 en forma de anatasa 99% y en forma de rutilo 1%,⁸ ya que presenta una mayor actividad fotocatalítica, alta estabilidad y baja toxicidad.

La fotocatalisis se lleva a cabo de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Difusión de los compuestos a la superficie.
2. Adsorción de los reactivos.
3. Reacción en la fase adsorbida.
 - 3.1 Absorción de los fotones por el sólido.
 - 3.2 Creación de pares electrón- hueco.^{9,10}
 - 3.3 Reacciones de transferencia de electrones.
4. Desorción de los productos.
5. Remoción de los productos de la fotocatalisis de la fase fluida.¹¹

⁵ FINČUR, Nina L., et al. Removal of alprazolam from aqueous solutions by heterogeneous photocatalysis: Influencing factors, intermediates, and products. En: Chemical Engineering Journal, 2017, vol. 307, p. 1105-1115

⁶ AHMED, Saber, et al. Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: a short review. En: Journal of Environmental Management, 2011, vol. 92, no. 3, p. 311-330

⁷ BENABBOU. Op. cit, p. 257-263

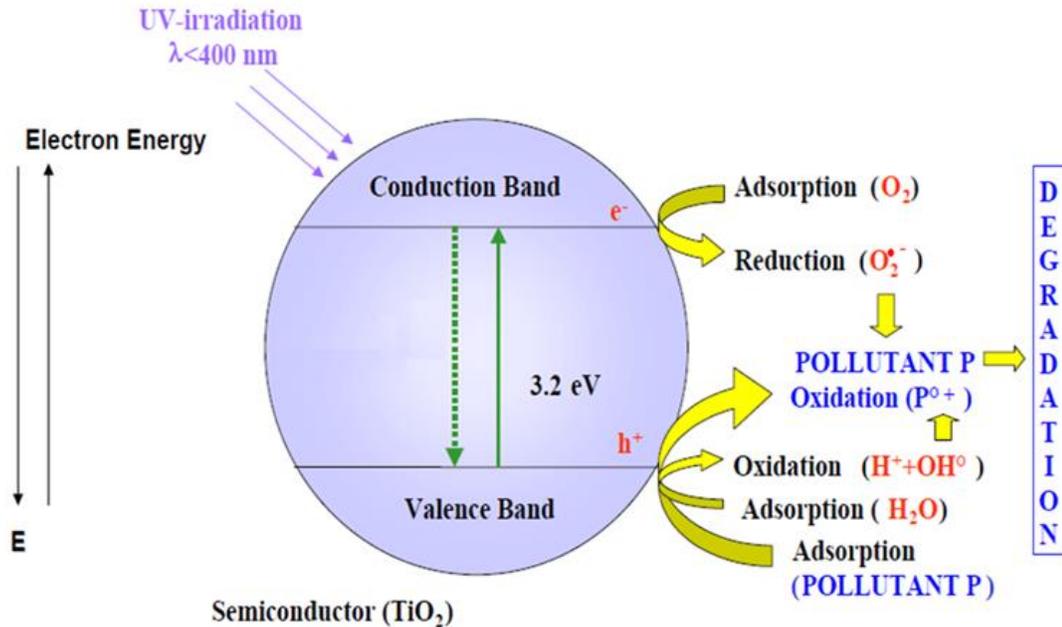
⁸ GARCÉS GIRALDO, Luis Fernando, et al. La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. 2012.

⁹ GAYA, Umar Ibrahim y ABDULLAH, Abdul Halim. Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: a review of fundamentals, progress and problems. En: Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2008, vol. 9, no. 1, p. 1-12

¹⁰ BENABBOU. Op. cit, p. 257-263

¹¹ PENAGOS, Julio Alberto Clavijo. Sobre las reacciones de eliminación de compuestos contaminantes de aguas por fotocatalisis con TiO₂/UV: caso azul de metileno. En: Elementos 2013, vol. 3, no. 3,

Figura 1. Esquema del proceso fotocatalítico con TiO₂



Fuente: LEIPZIG UNIVERSITY, Germany; 8 de octubre del 2015. General mechanism of photocatalysis. [en línea] Disponible en: <<https://itc.chemie.uni-leipzig.de/en/institute/staff/tawari/>>.

La energía luminosa incide sobre el semiconductor, esta debe ser equivalente o superior a la energía de la banda de separación para que el electrón al ser excitado pueda pasar de la banda de valencia a la banda de conducción, este proceso recibe el nombre de fotoexcitación.¹² En la banda de valencia queda un hueco (+) que al reaccionar con un grupo OH⁻ forma al radical hidroxilo (OH^{*}) que es altamente reactivo y oxidante, lo que permite la destrucción de una amplia gama de sustratos químicos orgánicos.¹³ Mientras que en la banda de conducción queda el electrón libre (-) que reacciona con O₂ formando radicales superóxidos.^{14,15}

¹² CHATTERJEE, Debabrata y DASGUPTA, Shimanti. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. En: Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews, 2005, vol. 6, no. 2, p. 186-205

¹³ BARAM, Nir, et al. Enhanced inactivation of E. coli bacteria using immobilized porous TiO₂ photoelectrocatalysis. En: Electrochimica Acta, 2009, vol. 54, no. 12, p. 3381-3386

¹⁴ GAYA. Op. cit, p. 1-12

¹⁵ LEE, Seul-Yi y PARK, Soo-Jin. TiO₂ photocatalyst for water treatment applications. En: Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2013, vol. 19, no. 6, p. 1761-1769

1.2 FOTOCATÁLISIS AMBIENTAL

La gestión del agua como uno de los principales recursos del planeta es una tarea imprescindible para los seres humanos, por esto es importante desarrollar diversas alternativas para su descontaminación. En este contexto los Procesos Avanzados de Oxidación (PAO) se consideran una tecnología de tratamiento de agua altamente competitiva para la eliminación de aquellos contaminantes orgánicos, no tratables por técnicas convencionales, debido a su alta estabilidad química.¹⁶

La fotocatalisis es una técnica prometedora para la purificación del agua. El TiO_2 -UV es el sistema fotocatalítico más investigado, capaz de degradar eficazmente una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos.¹⁷ La fotocatalisis con TiO_2 funciona tanto para la degradación de contaminantes como para la eliminación de agentes microbianos, por lo tanto podría ser un proceso clave en el tratamiento completo del agua,¹⁸ además puede ser empleada reduciendo el costo del proceso, haciendo uso de luz solar.

Los fotocatalizadores basados en dióxido de titanio nanoparticulado (TiO_2), juegan un papel importante en la fotocatalisis ambiental; en la fotodesinfección, debido a su alta estabilidad, biocompatibilidad, reutilización y bajo costo,¹⁹ además las técnicas fotocatalíticas son capaces de descomponer los contaminantes orgánicos tóxicos sin causar problemas secundarios de contaminación.²⁰

1.3 DIÓXIDO DE TITANIO EN FOTOCATÁLISIS

El dióxido de titanio (TiO_2) es uno de los fotocatalizadores más populares y exitosos. Los fotocatalizadores con TiO_2 han sido ampliamente reconocidos como soluciones viables a problemas ambientales, debido a sus excepcionales características como: estabilidad química, baja toxicidad y bajo costo lo que los hace excelentes catalizadores.²¹

¹⁶ OLLER, I.; MALATO, S. y SÁNCHEZ-PÉREZ, JAb. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. En: Science of the Total Environment, 2011, vol. 409, no. 20, p. 4141-4166

¹⁷ GAO, Minghui, et al. The role of catalase and H_2O_2 in photocatalytic inactivation of Escherichia coli: genetic and biochemical approaches. En: Catalysis Today, 2016, vol. 266, p. 205-211

¹⁸ REDDY, P. Venkata Laxma, et al. TiO_2 -based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. En: Environmental Research, 2017, vol. 154, p. 296-303

¹⁹ MICHAL, Robert, et al. Photocatalytic properties and selective antimicrobial activity of TiO_2 (Eu)/CuO nanocomposite. En: Applied Surface Science, 2016, vol. 371, p. 538-546

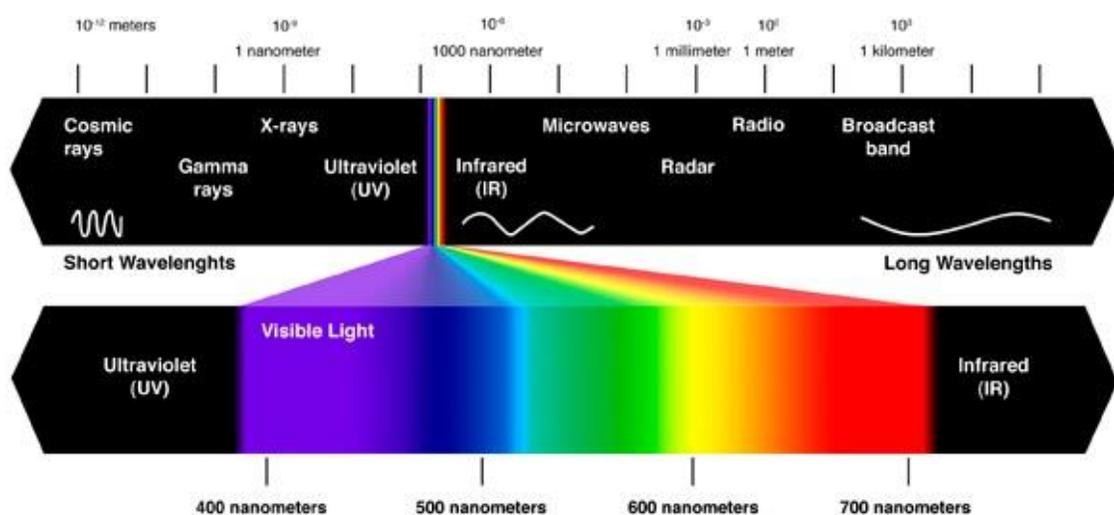
²⁰ YOUSEF, Ayman, et al. CuO-doped TiO_2 nanofibers as potential photocatalyst and antimicrobial agent. En: Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2015, vol. 26, p. 251-258

²¹ PHAM, Thanh-Dong y LEE, Byeong-Kyu. Cu doped TiO_2 /GF for photocatalytic disinfection of Escherichia coli in bioaerosols under visible light irradiation: application and mechanism. En: Applied Surface Science, 2014, vol. 296, p. 15-23

Sin embargo, el TiO_2 sólo puede trabajar bajo luz ultravioleta (UV), (longitud de onda $<388 \text{ nm}$); porque posee un *band gap* de 3.2 eV .²²

Debido al *band gap* de 3.2 eV , las películas elaboradas con dióxido de titanio puro funcionan como fotocatalizadores eficientes bajo luz ultravioleta y no exhiben actividad fotocatalítica en la región espectral visible, presentando las siguientes desventajas: la región UV es sólo alrededor del 3% de la luz existente en el espectro solar, además el uso de luz UV artificial para fines fotocatalíticos es costoso, estos factores limitan la amplia aplicación de TiO_2 desde el punto de vista práctico, por otra parte la exposición prolongada a la luz ultra violeta, es peligrosa para la salud, puede causar daños en la visión, incluso hasta cáncer, haciendo más restringido su uso.²³

Figura 2. Espectro Electromagnético.



Fuente: Light and the Electromagnetic Spectrum. [en línea]. Disponible en internet: < <https://sites.google.com/site/mochebiologysite/online-textbook/light> >

1.3.1 Modificación de TiO_2 con CuO . Para superar las restricciones que posee el TiO_2 de ser activo principalmente en la región ultra violeta, varios equipos de investigación han intentado inducir un cambio en la energía de la banda mediante el dopaje de TiO_2 con metales y tintes orgánicos ampliando así su rango de actividad al espectro visible.²⁴

²² YADAV, Hemraj M., et al. Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO_2 nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity. En: Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2014, vol. 280, p. 32-38

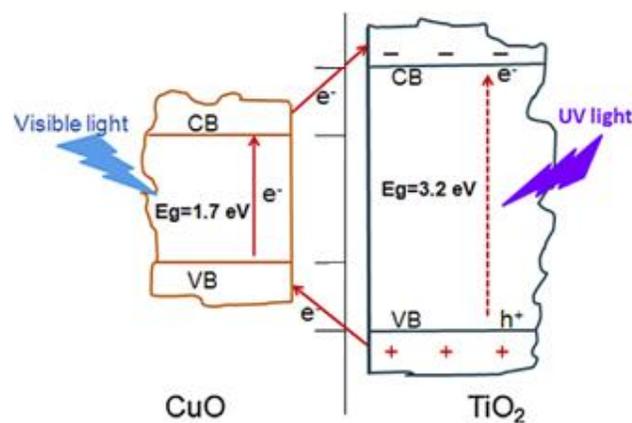
²³ YAO, KS, et al. Comparison of photocatalytic activities of various dye-modified TiO_2 thin films under visible light. En: Surface and Coatings Technology, 2008, vol. 203, no. 5, p. 922-924

²⁴ Ibid., p. 922-924.

Los óxidos de cobre son semiconductores con un band gap de 1.7 eV, por lo tanto pueden absorber la luz solar.²⁵ El Cu es un metal relativamente abundante y de bajo costo comparado con otros metales que se pueden emplear para mejorar la actividad fotocatalítica del TiO₂ en el espectro visible como la plata.²⁶

Los óxidos de cobre se pueden obtener a partir de sales precursoras, el Cu es también un elemento metálico esencial para la salud y se considera un metal de baja toxicidad para los seres humanos;²⁷ lo que los hace seguros de usar para el tratamiento de aguas, sin embargo no son lo suficientemente activos²⁸ para llevar a cabo un proceso de fotodegradación, por lo cual la mezcla TiO₂/CuO constituye un excelente fotocatalizador capaz de trabajar en el espectro visible.

Figura 3. Sistema fotocatalítico TiO₂/CuO.



Fuente: PHAM, Thanh-Dong and LEE, Byeong-Kyu. Cu doped TiO₂/GF for photocatalytic disinfection of Escherichia coli in bioaerosols under visible light irradiation: application and mechanism. En: APPLIED SURFACE SCIENCE.2014, vol. 296, p. 15-23

²⁵ YAO, Mao-hai, et al. Photocatalytic activity of CuO towards HER in catalyst from oxalic acid solution under simulated sunlight irradiation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2010, vol. 20, no 10, p. 1944-1949.

²⁶ PHAM.Op. cit, p. 15-23

²⁷ BORKOW, Gadi y GABBAY, Jeffrey. Copper as a biocidal tool. En: *Current Medicinal Chemistry*.2005, vol. 12, no. 18, p. 2163-2175

²⁸ YAO. Mao-hai. Op. cit, p. 1944-1949

1.4 MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MEZCLA TiO₂/CuO

La modificación se realiza con el fin mejorar las propiedades fotocatalíticas del TiO₂ dopándolo con el precursor CuSO₄; el dopaje es un proceso que introduce intencionalmente impurezas al semiconductor alterando sus estructuras electrónicas y su dinámica térmica.²⁹

1.4.1 Impregnación húmeda. La modificación se realizó mediante el método de impregnación húmeda, un proceso de difusión y adsorción que potencia el rendimiento de la mezcla al combinar el ataque oxidativo de la fotocatalisis con la lixiviación de los iones de Cu.³⁰ Las etapas para realizar la impregnación húmeda son:

1. Impregnación que permite el contacto del soporte con la solución precursora durante cierto tiempo. En el cual se lleva a cabo:
 - 1.1 Difusión del precursor de la solución externa a la superficie del semiconductor.
 - 1.2 Difusión del precursor dentro de los poros del semiconductor.
 - 1.3 Adsorción del precursor sobre los sitios activos.³¹
2. Secado del soporte para evaporar el agua que queda en los poros del semiconductor.
3. Activación de la mezcla mediante la calcinación.

Los factores que pueden interferir en este proceso son: tamaño de poro, área superficial, tamaño del pellet, fracción vacía, entre otros.³²

1.5 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS

Es un método empleado para depositar cierta cantidad de una suspensión en el centro de la lámina de vidrio, por medio de una aceleración centrípeta (típicamente alrededor 3000 rpm),³³ eventualmente se genera una película delgada de la mezcla sobre la superficie.

1.5.1 Spin Coating. El proceso de deposición de películas utilizando Spin Coating es el siguiente:

²⁹ KHRAISHEH, Majeda, et al. Photocatalytic disinfection of Escherichia coli using TiO₂ P25 and Cu-doped TiO₂. En: Journal of Industrial and Engineering Chemistry.2015, vol. 28, p. 369-376

³⁰ Ibid. p. 369-376.

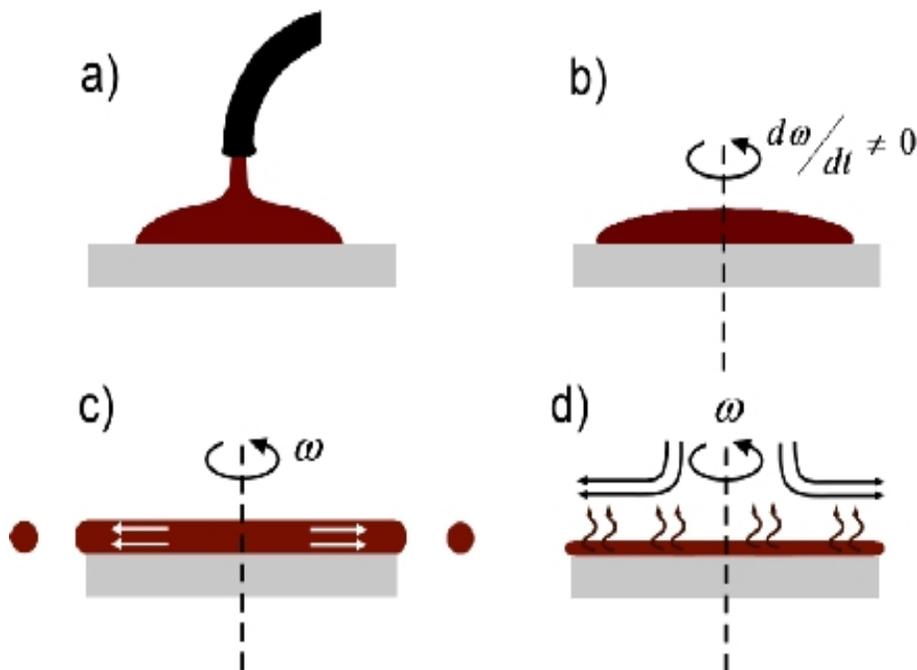
³¹ SUÁREZ, Luis M. Caballero. Introducción a La Catálisis Heterogénea. Univ. Nacional de Colombia, 2002.

³² TEJEDOR, Miguel. Producción de H₂ mediante descomposición fotocatalítica de agua: Estudio de catalizadores Cu-TiO₂ y Ni-TiO₂.2010.

³³ University of Louisville, Spin Coating Process Theory: [en línea] Disponible en: <<http://louisville.edu/micronano/files/documents/standard-operating-procedures/SpinCoatingInfo.pdf>.2013>

1. Deposición: se coloca la suspensión en exceso que se quiere adherir al sustrato.
2. Spin Up: se aplica una velocidad al sustrato para dar uniformidad y formar la película delgada.
3. Spin Off: la velocidad elimina el exceso de la suspensión y reduce espesor de la capa depositada sobre la película.
4. Evaporación: Se evaporan las sustancias volátiles de la película.³⁴

Figura 4. Esquema del proceso de deposición de películas por Spin Coating.



Fuente: STANFORD UNIVERSITY, 28 de octubre del 2007. Basic Models of Spin. [en línea] Disponible en: <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>

1.6 FOTOCATÁLISIS PARA LA DESINFECCIÓN

La escasez de agua se está convirtiendo en un problema progresivo debido a la contaminación, crecimiento industrial y calentamiento global.³⁵ La provisión del

³⁴ Hellstrom, S, L. Basic Models of Spin Coating, Submitted as coursework for Physics 210, Stanford University. 2007

agua potable es indispensable para la población humana y la prioridad es que se suministre bajo las condiciones adecuadas, evitando la presencia de agentes patógenos como *E. coli*,³⁶ que será el tema principal de esta investigación, para ello se han empleado diferentes tratamientos de desinfección como cloración y ozonización que, además de ser costosos, generan subproductos como trihalometanos (THMs) conocidos por su potencial carcinogénico.^{37,38} La fotocatalisis ha surgido como un método alternativo en el tratamiento de agua no sólo porque elimina agentes microbianos sino una amplia gama de contaminantes químicos.^{39,40} Las ventajas de este método son: 1) trabaja con radiación solar lo que reduce el costo de la operación. 2) No se generan subproductos tóxicos como en los tratamientos mencionados anteriormente.⁴¹

1.6.1 Mecanismo de desinfección. El estudio más temprano de la aplicación de TiO₂ en la inactivación microbiana fue divulgado por Matsunaga en 1985.^{42,43} Desde entonces se ha estudiado ampliamente el TiO₂ en la inactividad de microorganismos.

Se cree generalmente que la inactivación bacteriana fotocatalítica comienza con el daño del envoltorio celular (membrana y pared celular) por las especies oxidativas reactivas (ROS), seguido de la fuga de componentes intracelulares, que finalmente conducen a la muerte del microorganismo.⁴⁴ El radical hidroxilo (OH*) ha sido reportado como uno de los principales ROS responsables de la inactivación de estos agentes.^{45,46}

³⁵ LEE. Op. cit, p. 1761-1769

³⁶ MURCIA, JJ, et al. Study of the *E. coli* elimination from urban wastewater over photocatalysts based on metallized TiO₂. En: Applied Catalysis B: Environmental.2017, vol. 200, p. 469-476

³⁷ BENABBOU. Op. cit, p. 257-263

³⁸ PHAM. Op. cit, p. 15-23

³⁹ SONTAKKE, Sharad, et al. Visible light photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* with combustion synthesized TiO₂. En: Chemical Engineering Journal.2012, vol. 189, p. 101-107

⁴⁰ VERÉB, G., et al. Comparison of the photocatalytic efficiencies of bare and doped rutile and anatase TiO₂ photocatalysts under visible light for phenol degradation and *E. coli* inactivation. En: Applied Catalysis B: Environmental.2013, vol. 129, p. 566-574

⁴¹ RIZZO, Luigi, et al. Effect of solar simulated N-doped TiO₂ photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an *E. coli* strain in biologically treated urban wastewater. En: Applied Catalysis B: Environmental.2014, vol. 144, p. 369-378

⁴² MATSUNAGA, Tadashi, et al. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. En: FEMS Microbiology Letters. 1985, vol. 29, no. 1-2, p. 211-214

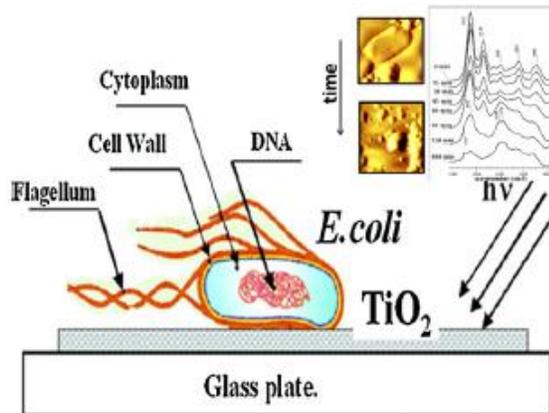
⁴³ GAO. Op. cit, p. 205-211

⁴⁴ GAO. Op. cit, p. 205-211

⁴⁵ CHEN, Yanmin, et al. Naturally occurring sphalerite as a novel cost-effective photocatalyst for bacterial disinfection under visible light. En: Environmental Science & Technology. 2011, vol. 45, no. 13, p. 5689-5695

⁴⁶ PELLER, Julie; WIEST, Olaf y KAMAT, Prashant V. Hydroxyl radical's role in the remediation of a common herbicide, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). En: The Journal of Physical Chemistry A. 2004, vol. 108, no. 50, p. 10925-10933

Figura 5. *E. coli* en contacto con película de TiO₂.



Fuente: PULGARIN, Cesar; KIWI, John and NADTOCHENKO, V. Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO₂ films involving cell-wall damage and lysis. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2012, vol. 128, p. 179-183

Los iones de Cu tienen actividad antimicrobiana frente a *E. coli*,⁴⁷ su toxicidad altera la especificidad de la enzima dañando los ácidos nucleicos.⁴⁸ Si se adhieren adecuadamente estos iones y reaccionan con el oxígeno en presencia de luz, se desencadena la destrucción de la célula objetivo, se producen reacciones fotocitóticas dando muerte al microorganismo sin causar efectos perjudiciales sobre el medio ambiente.⁴⁹

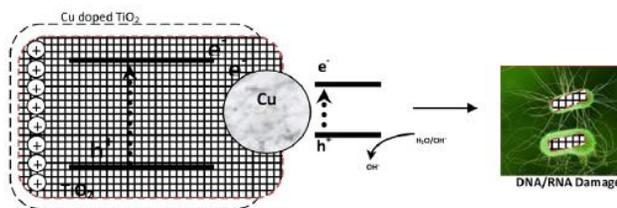
Es importante aclarar que el Cu por sí sólo no puede ocasionar la muerte del microorganismo, necesita que el TiO₂ promueva la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana celular de *E. coli*.

⁴⁷ YOUSEF, Ayman, et al. Inactivation of pathogenic Klebsiella pneumoniae by CuO/TiO₂ nanofibers: a multifunctional nanomaterial via one-step electrospinning. En: Ceramics International.2012, vol. 38, no. 6, p. 4525-4532

⁴⁸ MICHAL. Op. cit, p. 538-546

⁴⁹ APONIENE, Kristina y LUKSIENE, Zivile. Effective combination of LED-based visible light, photosensitizer and photocatalyst to combat Gram (-) bacteria. En: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.2015, vol. 142, p. 257-263

Figura 6. Degradación *E. coli* usando luz visible.



Fuente: KHRAISHEH, Majeda, et al. Photocatalytic disinfection of Escherichia coli using TiO_2 P25 and Cu-doped TiO_2 . En: JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY.2015, vol. 28, p. 369-376

1.7 MÉTODO DE SEGUIMIENTO

Entre los muchos compuestos orgánicos e inorgánicos que se pueden degradar por fotocatalisis con el sistema TiO_2/UV , los colorantes han sido las moléculas más empleadas, debido a que el seguimiento de la degradación puede hacerse a través de espectrofotometría, aprovechando la absorción en el visible, característica de cada colorante.⁵⁰

En este proyecto se utilizará azul de metileno para realizar la prueba de funcionalidad de degradación de las películas elaboradas con la mezcla TiO_2/CuO , debido a que es un indicador normalmente usado en las reacciones fotocatalíticas,^{51,52,53} a medida que la película está en contacto con la solución de azul de metileno, se espera que la concentración vaya disminuyendo, para finalmente evaluar la efectividad de degradación según la concentración final obtenida respecto al tiempo transcurrido en la reacción.

⁵⁰ PENAGOS. Op. cit, vol. 3, no. 3

⁵¹ PELAEZ, Miguel, et al. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. En: Applied Catalysis B: Environmental.2012, vol. 125, p. 331-349

⁵² APONIENE. Op. cit, p. 257-263

⁵³ FISHER, Mike B., et al. Nitrogen and copper doped solar light active TiO_2 photocatalysts for water decontamination. En: Applied Catalysis B: Environmental.2013, vol. 130, p. 8-13

1.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

1.8.1 Estándar de Mc Farland. Son parámetros fijados para determinar la turbidez en las suspensiones de microorganismos, usado para calcular las poblaciones bacterianas. Se realiza la preparación mezclando ácido sulfúrico a una solución de cloruro de bario, produciendo una precipitación de cloruro de bario suspendido.⁵⁴ Se estima que el patrón de 0,5 es una suspensión homogénea de *E. coli* de $1,5 \times 10^8$ células/mL.^{55,56}

Figura 7. Comparación Patrón Mc Farland con la solución preparada.



1.8.2 Escherichia coli. Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, se encuentra en el tracto intestinal de seres humanos y animales de sangre caliente, tiene la capacidad de crecer en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas.⁵⁷ Al ser cilíndricas van de 1,1 a 1,5 μm de diámetro por 2,0 a 6,0 μm de largo, se disponen solas o en parejas.⁵⁸ Es asociada con la

⁵⁴ PASTERÁN, F. y GALAS, M. Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y *E. coli*. En: Departamento De Bacteriología Instituto Nacional De Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr.Carlos G.Malbrán".Centro Regional De Referencia WHO-Global SalmSurv Para América Del Sur.2008

⁵⁵ AGGARWAL, P. y KASHYAP, B. Regression analysis and categorical agreement of fluconazole disk zone diameters and minimum inhibitory concentration by broth microdilution of clinical isolates of Candida. En: Journal De Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology. 2017

⁵⁶ GUPTA, Vivek Kumar, et al. A clerodane diterpene from Polyalthia longifolia as a modifying agent of the resistance of methicillin resistant Staphylococcus aureus. En: Phytomedicine.2016, vol. 23, no. 6, p. 654-661

⁵⁷ ALLOCATI, Nerino, et al. *Escherichia coli* in Europe: an overview. En: International Journal of Environmental Research and Public Health.2013, vol. 10, no. 12, p. 6235-6254

⁵⁸ HANSEN, TA. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Ltd. 2015

EDA (enfermedad diarreica aguda), capaz de colonizar el intestino humano mediante factores de colonización.⁵⁹ *E. coli* es una de las bacterias utilizadas como indicadores biológicos para evaluar la eficiencia de desinfección fotocatalítica.⁶⁰

Figura 8. Bacteria Gram Negativa *E. coli*.



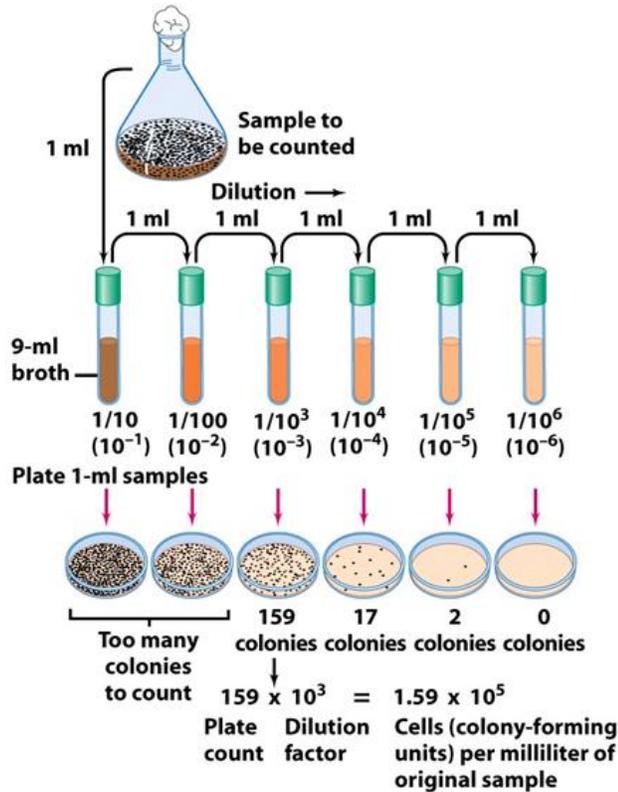
1.8.3 Recuento en placa. Una de las técnicas microbiológicas más fundamentales es el recuento de placas que se usa para determinar el número de células viables en una muestra. Este tipo de recuento de microorganismos consiste en contar las “unidades formadoras de colonia” o (UFC).⁶¹ Primero se debe sembrar la bacteria, para ello se prepara solución salina con el inóculo a un volumen de 9 mL, que luego se diluyen en diferentes tubos para disminuir la concentración de la bacteria, los últimos tubos de las diluciones, se separan para posteriormente ser sembrados en las cajas Petri. El crecimiento de *E. coli* dura de 24 a 48 horas, luego se contarán las UFC.

⁵⁹ GÓMEZ. Op. cit, p. 577-586

⁶⁰ KARUNAKARAN, C., et al. Cu-doped TiO₂ nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light. En: Journal of Colloid and Interface Science.2010, vol. 352, no. 1, p. 68-74

⁶¹ IBERS: INSTITUTE OF BIOLOGICAL, ENVIRONMENTAL AND RURAL SCIENCES, Aberystwyth University's, [en línea] Disponible en: <Microbial Growth Website, http://users.aber.ac.uk/hlr/mpbb/index_files/Page299.html>

Figura 9. Proceso dilución de las muestras.



Fuente. Serial dilution and pour and spread plate, Serial dilution methodology. [en línea] Disponible en: <http://nptel.ac.in/courses/102103015/module5/lec1/5.html> >

1.9 VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Es un método analítico que asegura que los resultados obtenidos sean confiables.⁶² Se busca determinar con fundamentos estadísticos que el procedimiento empleado está dentro de los valores esperados, para ello se emplea:

1. Media aritmética (X): es la cantidad total de la muestra repartida en partes iguales entre cada observación. Dada por:

⁶² CORTÉS, Alejandra; SANDINO, Cecilia y ARIAS, Janeth. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso. En: Revista De La Facultad De Farmacia.2003, vol. 45, p. 1

$$X = \frac{\sum xi}{N}$$

Siendo: Xi valor de una lectura.
N número de lecturas.

2. Desviación estándar (σ , S): es una medida de dispersión de los valores obtenidos. Dada por:

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (xi - X)^2}}{n - 1}$$

Siendo: X promedio total de lecturas.

3. Coeficiente de variación (CV): es el valor de la desviación estándar dividida por la media aritmética, puede ser expresado en porcentaje.⁶³ Dado por:

$$\%CV = \frac{S}{X} * 100$$

1.9.1 Parámetros de validación. Son las características de esta validación:

1. Precisión: se evalúa concordancia entre las múltiples medidas tomadas de una sola muestra. Dada en términos de:

1.1 Repetibilidad: el mismo analista realiza las mediciones, en el mismo laboratorio y con los mismos equipos. Se realizan duplicados.

1.2 Reproducibilidad: los procedimientos se realizan con diferente analista.⁶⁴

⁶³ DUFFAU, Boris, et al. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. En: Aspectos Generales Sobre La Validación De Métodos. Santiago De Chile: Departamento De Salud Ambiental. Instituto De Salud Pública.2010

⁶⁴ VELANDIA CASTELLANOS, Johana Carolina. Validación Del Método Analítico Para La Cuantificación De Bacitracina En El Laboratorio De Control De Calidad De Una Industria Farmacéutica Veterinaria Trabajo de grado, Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2008.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 PROTOCOLO LAVADO DE VIDRIOS

2.1.1 Reactivos empleados

Tabla 1. Reactivos empleados para lavar el sustrato.

Reactivos	Descripción
Detergente neutro	Exento de fosfatos, con emulsificantes y detergentes no iónicos concentrados.
Acetona	Solvente útil para hacer miscibles dos solventes que no lo son.
Isopropanol	Disolvente de grasas ya que presenta baja polaridad.
Metanol	Sirve para limpieza de superficies; mezclado con detergente es un excelente agente desengrasante.
Agua desionizada	Mejora limpieza del sustrato al quitar los residuos de los reactivos.
Peróxido de hidrógeno + Ácido sulfúrico	Al mezclarlos se genera una sustancia altamente fuerte, que elimina las grasas del sustrato, después de utilizarlo se debe enjuagar con abundante agua.

2.1.2 Descripción. Para el desarrollo de la práctica es indispensable contar con un sustrato limpio, libre de impurezas para que la adhesión de la suspensión sea efectiva; primero se deben lavar los sustratos con detergente neutro removiendo las impurezas, se enjuagan con agua desionizada para eliminar los residuos, luego se sonicán con acetona durante 15 minutos, se realiza el mismo procedimiento con isopropanol y metanol; posteriormente se introducen en un envase de vidrio con la solución piraña (mezcla entre 5 mL de peróxido de hidrógeno y 95 mL de ácido sulfúrico concentrado).⁶⁵ Es importante que los reactivos no sean reutilizados debido a que pueden almacenar grasas que contaminarían el sustrato. En el anexo A se encuentra el diagrama del protocolo empleado en este trabajo.

⁶⁵ FRONTIER, Alison. University of Rochester. Supported by a grant from the National Science Foundation. Not Voodoo X 2017. [en línea] Disponible en: <http://chem.chem.rochester.edu/~nvd/pages/how-to.php?page=clean_glassware>

2.2. PROTOCOLO DE ELABORACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LA MEZCLA

2.2.1 Reactivos empleados

Tabla 2. Reactivos empleados para elaboración y activación de la mezcla.

Reactivos	Descripción
Dióxido de titanio (HOMBITAN S130)	Elaborado por la empresa Sachtleben, su estructura cristalina es Anatasa, con área superficial es de 200 m ² /g.
Sulfato de Cobre (CuSO ₄)	Cristales amorfos azules transparentes, gránulos cristalinos o polvo. Actúa como precursor del óxido de cobre.

2.2.2 Descripción. Para iniciar con el protocolo se pesaron 0,4 g de TiO₂ (Hombitan), que se mezclaron con 30 mL de agua desionizada en un beaker de 50 mL, posteriormente se llevaron a un ultrasonido durante 15 minutos; luego la mezcla se llevó a la plancha de agitación, el tiempo de este proceso fue de 5 minutos. Paralelamente se mezclaron 1,248 g (ver anexo B) del precursor CuSO₄ (II) con 100 mL de agua desionizada, de esta mezcla se adicionaron 420 µl (ver anexo C) con la micropipeta al TiO₂ con agua, se dejó homogenizar durante 5 minutos más y se llevó a la plancha de calentamiento con el fin de evaporar la mayor cantidad de agua. Para activar la mezcla se introdujo a la mufla durante 1 hora a las temperaturas de 550°C, 580°C y 600°C que fueron las mejores temperaturas de calcinación obtenidas en el trabajo de estudio preliminar.

Figura 10. Protocolo elaboración y activación de la mezcla.

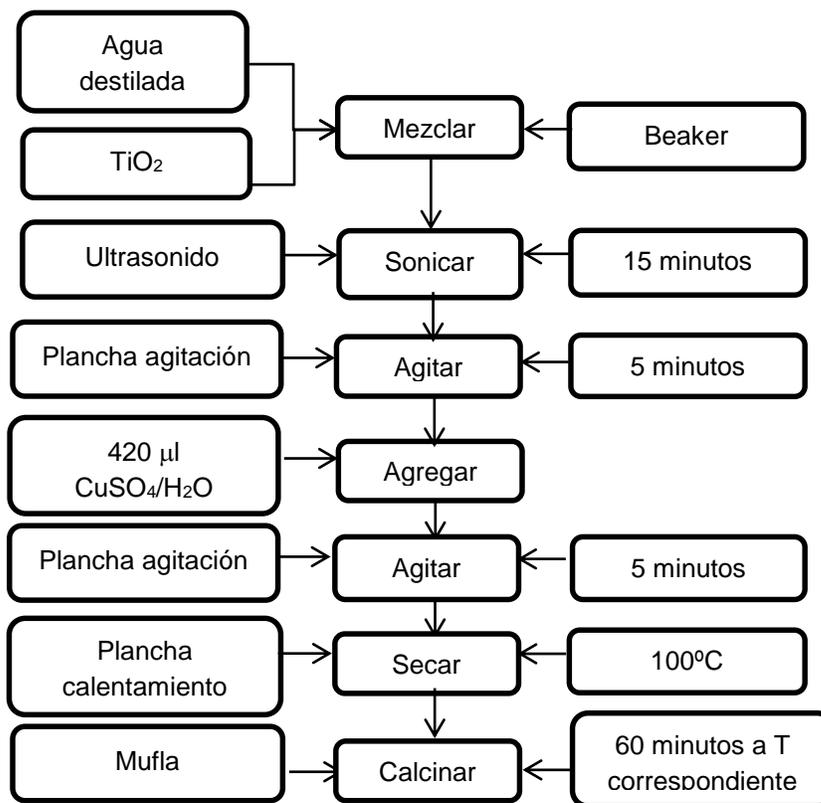


Figura 11. Elaboración de la mezcla TiO₂/CuOx.



2.3. PROTOCOLO DEPOSICIÓN DE LA MEZCLA EN EL SUSTRATO

2.3.1 Reactivos empleados

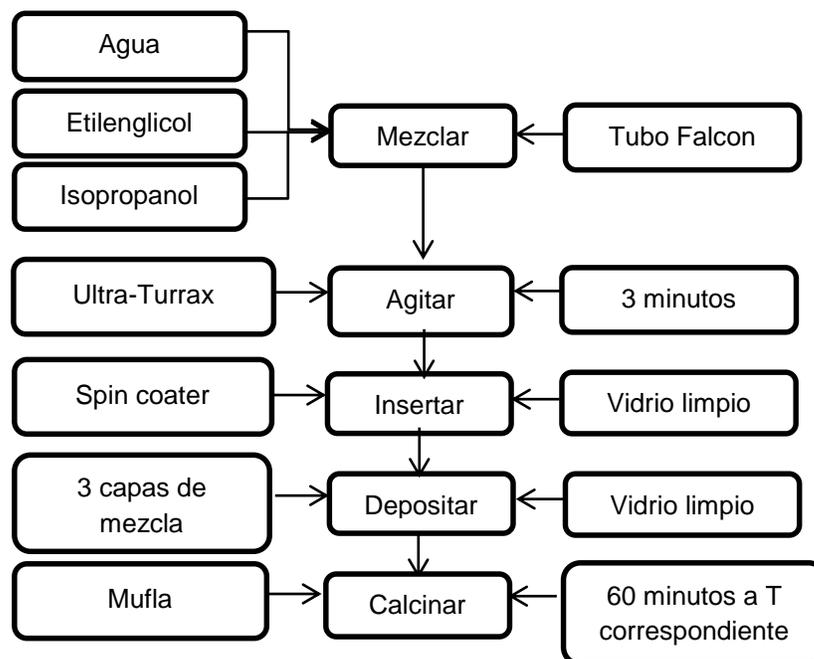
Tabla 3. Reactivos empleados en la deposición de la mezcla.

Reactivos	Descripción
Mezcla TiO ₂ /CuO	Se realizó a diferentes temperaturas (550°C, 580°C y 600°C).
Etilenglicol	Mejora la uniformidad y homogeneidad de las capas de TiO ₂ /CuO _x , facilitando la adhesión de la suspensión.
Isopropanol	Facilita la deposición de la mezcla en el sustrato gracias a su volatilidad.

2.3.2 Descripción. Después de activar la mezcla a diferentes temperaturas, se realiza la suspensión con el fin de depositarla en el vidrio; para llevar esto a cabo se mezclaron los compuestos mencionados anteriormente en tubos Falcon, que posteriormente fueron agitados en el Ultra-Turrax durante 3 minutos.

La suspensión es llevada al spin coater, se asegura el vidrio limpio y con una pipeta Pasteur se aplican cuatro gotas en el centro del sustrato, se enciende el spin a 1000 rpm con un tiempo de aceleración de 10 segundos, cuando alcanza esa velocidad se agrega otra capa y tan pronto se disuelve se adiciona una última capa, este proceso se realiza rápidamente para que la mezcla no se salga del área del sustrato, este paso es de suma importancia debido a que ayuda a que la mezcla se distribuya uniformemente y las capas que se generen queden delgadas recubriendo con totalidad el vidrio. Finalmente se calcinan las películas a la correspondiente temperatura durante 1 hora, para que se fije la mezcla al sustrato.

Figura 12. Protocolo deposición de la mezcla TiO₂/CuOx.



2.4. PRUEBA FUNCIONAMIENTO DE PELÍCULAS CON AZUL DE METILENO

Para verificar la actividad fotodegradativa de las películas elaboradas con la mezcla TiO₂/CuOx se llevaron a cabo degradaciones de azul de metileno (A.M) con cada una de las películas. Cada sistema de reacción estaba compuesto por un reactor, un LED, una bomba y una película de TiO₂/CuO_x.

2.4.1 Materiales Empleados

Tabla 4. Materiales Empleados en la degradación de azul de metileno.

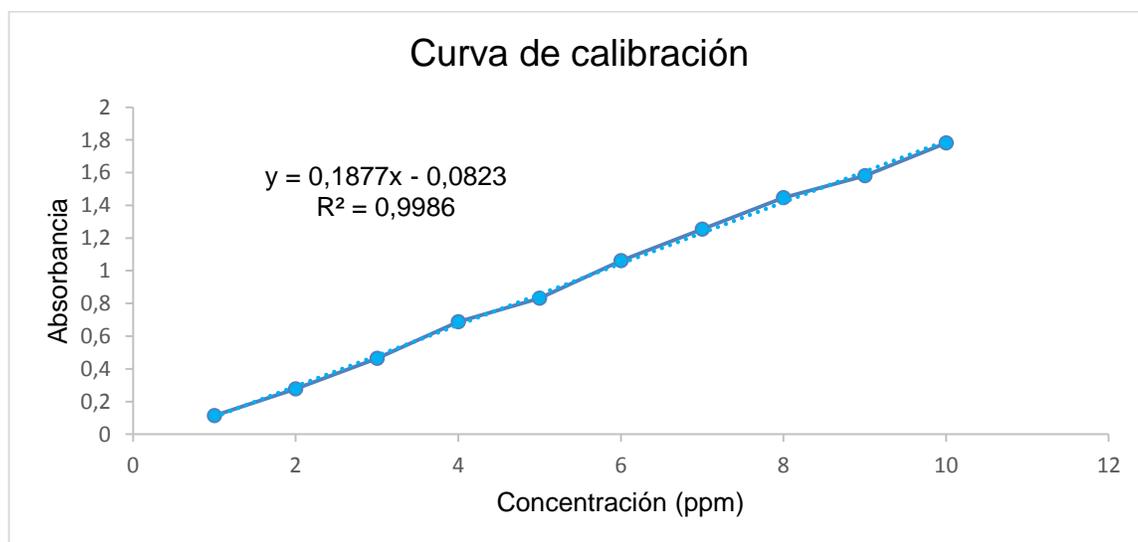
Materiales	Descripción
LED'S	LED'S de alta potencia (3 W), emisores de luz ultravioleta y visible.
Reactor	Se usaron reactores en vidrio de 30 mL de capacidad, dispuestos en una caja, forrados con papel aluminio para que la luz se reflejara en todas las direcciones, la tapa del reactor se realizó en nylon, en ella se soportó el LED.

Tabla 4. (Continuación)

Materiales	Descripción
Bomba de aire	Se utilizaron bombas marca Power Life air pump P-500, con el propósito de agitar la solución y suministrar aire a la reacción.
Espectrofotómetro	Se utilizó un Espectrofotómetro marca Genesys 20 para cuantificar la degradación del A.M

2.4.2 Descripción. Se realizaron soluciones de azul de metileno de 1 a 10 ppm, con el objetivo de elaborar una curva de calibración que permitiera conocer las concentraciones en el proceso, obteniendo la ecuación $Y = 0,1877X - 0,0823$, con un $R^2 = 0,9986$; donde se observa un comportamiento lineal, de acuerdo a la ley de Lambert-Beer, que describe la relación entre la luz que se absorbe en un medio material dado y las características del medio a medida que la luz pasa a través de él.⁶⁶ Se obtuvo la siguiente curva de calibración.

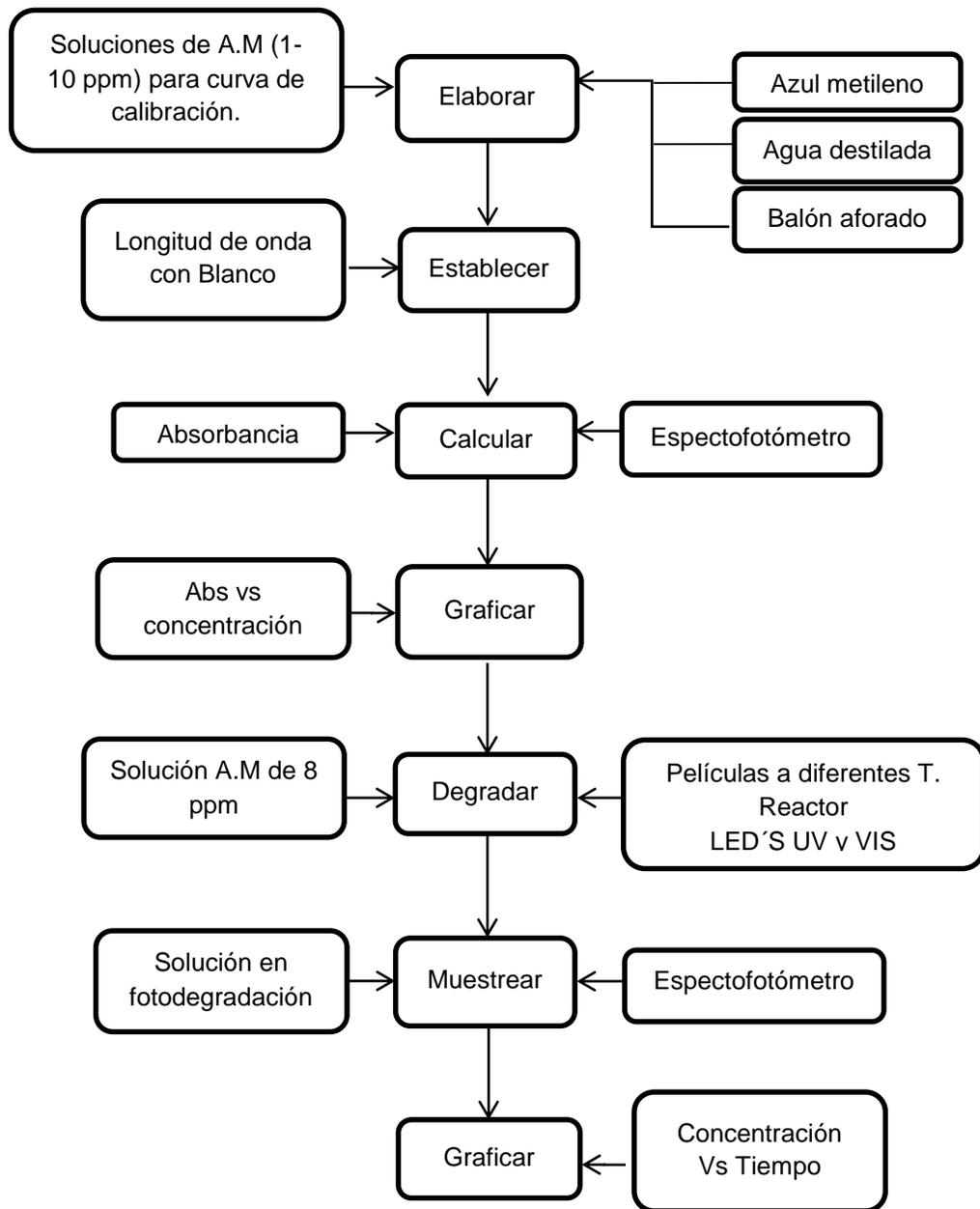
Gráfica 1. Curva de calibración azul de metileno.



Usando una longitud de onda de 665 nm para el azul de metileno, este valor hace referencia a la absorbancia de este colorante. La prueba de degradación se llevó a cabo con una solución de A.M. de 8 ppm.

⁶⁶ SALIDO, Ezequiel M., et al. Phototransduction early steps model based on Beer-Lambert optical law. En: Vision Research.2017, vol. 131, p. 75-81

Figura 13. Protocolo degradación de Azul de Metileno.



2.5 PROTOCOLO MICROBIOLÓGICO

2.5.1 Fotorreactor. El fotorreactor construido presenta las mismas características de los fotorreactores usados en el grupo de Materiales Fotoactivos, (caja de madera forrada en aluminio con: lámparas LED'S de alta potencia, sistema de ventilación y sistema de burbujeo de oxígeno). En los anexos D y E se encuentran

los prototipos y planos del fotorreactor construido para la inactivación fotocatalítica del microorganismo.

2.5.1.1 Componentes fotorreactor

Tabla 5. Componentes empleados para la construcción del fotorreactor.

Materiales	Descripción
LED'S VIS	Se emplearon cuatro lámparas emisoras de luz blanca, tipo riel, referencia NV-HL504, de (4 W) de potencia y 350 Lúmenes.
Biorreactor	Recipiente de vidrio de 50 mL de capacidad, con tapa en caucho vulcanizado, allí se depositó la película modificada para inactivar la bacteria <i>E. coli</i> .
Soporte	Soporte en acrílico transparente para permitir el paso de la luz y no interferir en la reacción fotocatalítica, con capacidad para cuatro biorreactores.
Caja de madera	Madera MDF de 9 mm de espesor, con dimensiones 42 cm x 37 cm x 22 cm, recubrimiento en lámina de aluminio de uso industrial de 3μ de espesor, con el objetivo de reflejar la luz en todas las direcciones. Con tapa de cierre magnético.
Ventiladores	Dos ventiladores de 24 V, puestos en contraflujo, evitando calentamiento.
Bomba de aire	Se emplearon bombas de aire para agitar las muestras con inóculo, evitando la precipitación del microorganismo, además para garantizar un flujo de oxígeno necesario para la reacción fotocatalítica, Ref bomba: Power Life air pump P-500.
Software LabView	Para el monitoreo de la temperatura del proceso, se realizó una programación en el software LabView, empleando dos sensores de temperatura LM35, puestos en esquinas enfrentadas, adicionalmente se automatizó el funcionamiento del sistema de ventilación y agitación con aire.

Figura 14. Fotorreactor usado para la inactivación de *E. coli*.

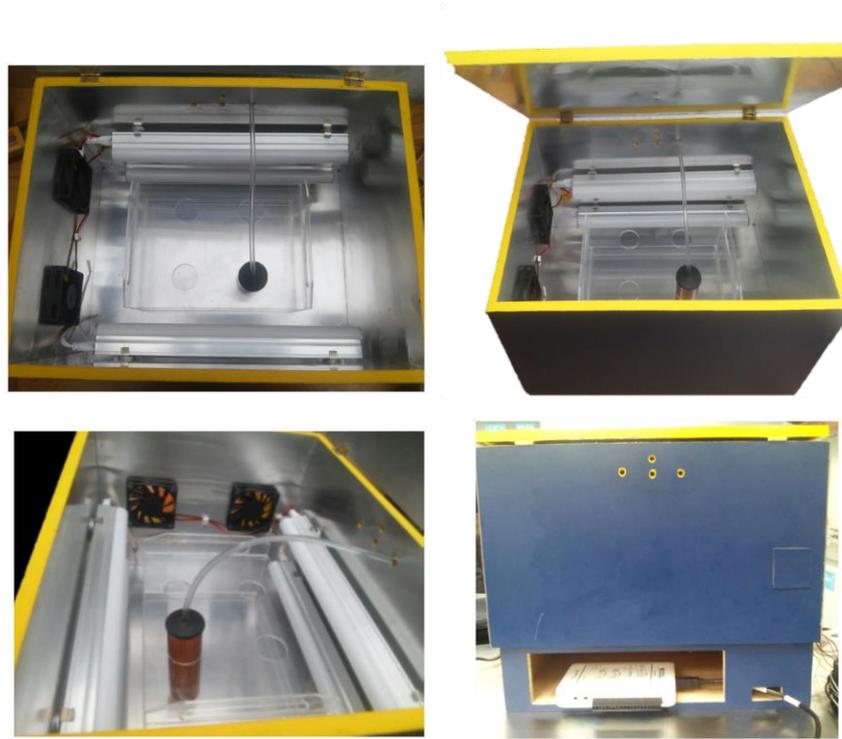


Figura 15. Fotorreactor en funcionamiento.



2.5.2 Descripción metodología microbiológica

2.5.2.1 Activación de la cepa. La cepa de *Escherichia coli*, que se encontraba en crioconservación a -20°C , se depositó en un caldo de cultivo BHI a 37°C , con una agitación de 150 rpm, manteniéndose entre 24 y 48 horas para ser llevada a su fase de crecimiento exponencial, posteriormente se realizó el cultivo en una caja Petri.

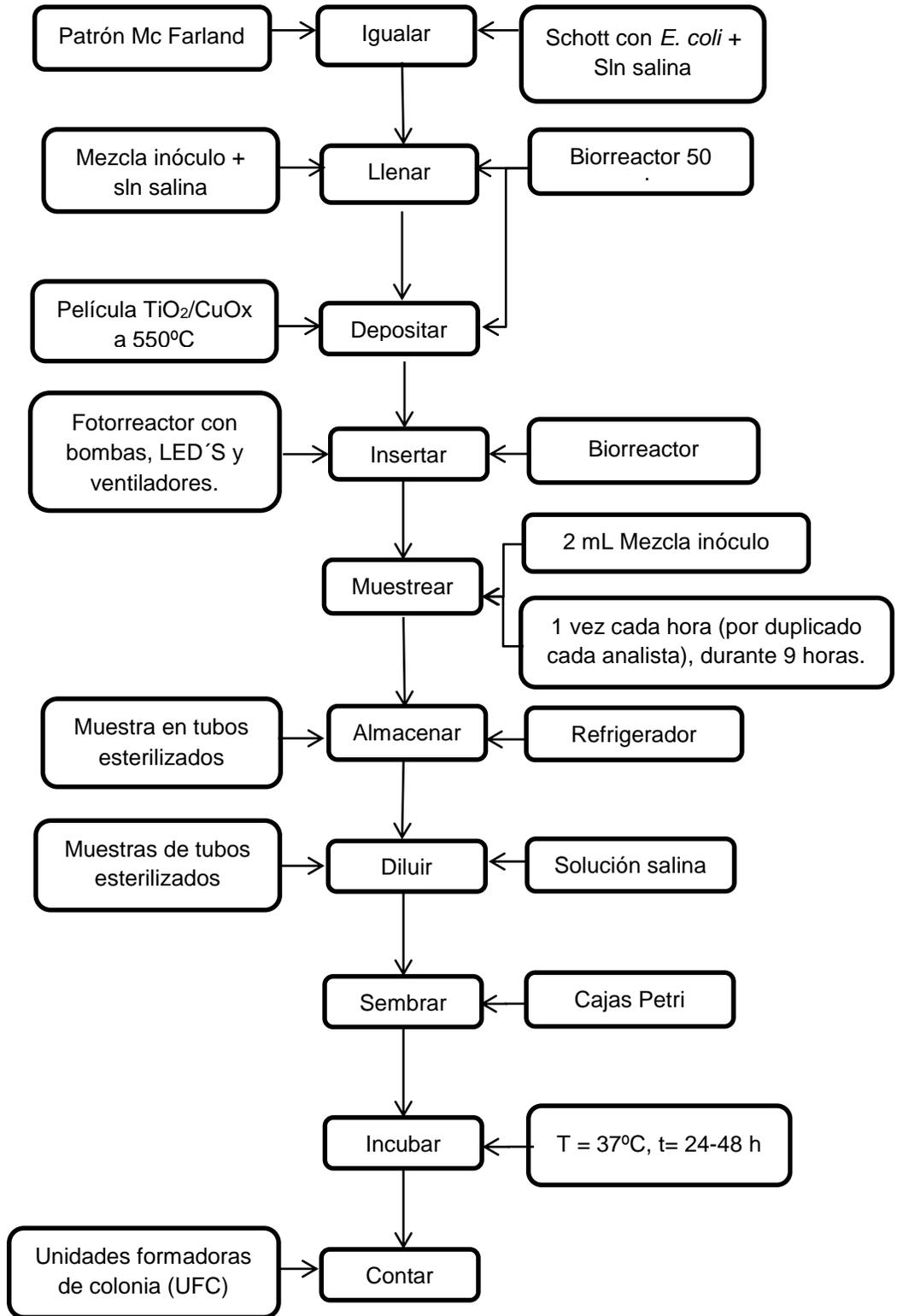
2.5.2.2 Igualación a patrón Mc Farland. Una vez la cepa se encontró activada se tomó muestra del cultivo usando un asa esterilizada en el mechero, ésta se enfrió en el agar, se procedió a recoger la muestra y se igualó al patrón 0,5 de Mc Farland, comparando la turbidez en un tubo Schott, usando 4,5 mL de solución salina 0,85 % P/V, ésta solución se empleó con el propósito de mantener las condiciones isotónicas en el medio, evitando así la muerte del microorganismo, posteriormente se llevó la alícuota de 4,5 mL del inóculo a un volumen de 45,5 mL de solución salina, obteniendo una concentración del microorganismo entre 10^7 - 10^8 UFC/mL.

2.5.2.3 Fotorreacción. Se emplearon dos biorreactores con capacidad de 50 mL cada uno, depositando las películas de $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$, la reacción se llevó a cabo en un tiempo de 9 horas, se tomaron muestras de 2 mL durante cada hora, este proceso lo realizó por duplicado cada analista, adicionalmente se monitoreó la temperatura del fotorreactor con un seguimiento en LabVIEW, se controló la luz y la agitación garantizando las condiciones del proceso y el microorganismo, para crear un ambiente aséptico de trabajo se utilizó un mechero de alcohol.

2.5.2.4 Cuantificación del microorganismo. Se procedió a realizar diluciones consecutivas en base 10, tomando alícuotas de 0,5 mL de los tubos de muestreo y llevándolos a un volumen de 4,5 mL de solución salina previamente esterilizada en autoclave. Se usó una técnica directa de recuento en placa en superficie, depositando en cada caja 0,1 mL de muestra que se homogenizó, se empleó un agar nutritivo básico, llevando inicialmente a una incubadora de levaduras que se encontraba a 30°C , posteriormente se incubó a 37°C , temperatura óptima para el cultivo de bacterias como *E. coli*, en un tiempo de 24-48 horas, todo esto con el objetivo de controlar el crecimiento del microorganismo facilitando su conteo.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia halladas en cada caja, seleccionando las que se encontraran en un rango de 30 a 300 UFC, para evitar errores en su lectura.

Figura 16. Protocolo microbiológico.



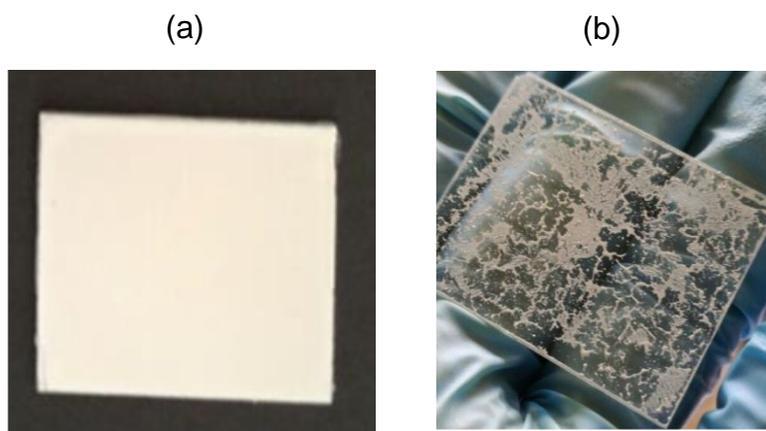
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 LAVADO DE VIDRIOS

El lavado de vidrios es muy importante para el proceso de deposición, ya que, si no se realiza adecuadamente, la mezcla no se puede adherir con facilidad. El uso de la mezcla piraña es efectivo puesto que elimina en su totalidad las grasas del sustrato, esto se evidenció con la correcta adhesión de la suspensión al vidrio. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de sonicado, debido a que permitió aumentar la cavitación removiendo los contaminantes del sustrato.

Figura 17. Resultados protocolo de lavado de vidrios.

(a) Buena adhesión de la suspensión. (b) Mala adhesión de la suspensión.



3.2 ELABORACIÓN DE LAS PELICULAS CON LA MEZCLA TiO_2/CuOx

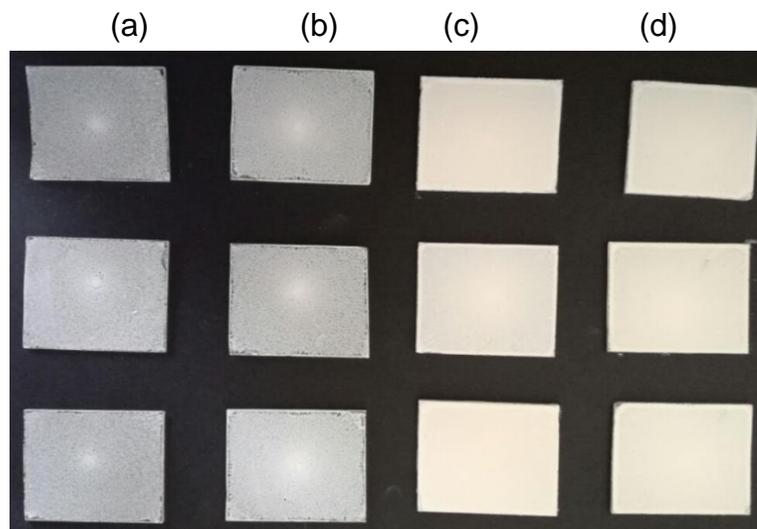
3.2.1 Elaboración y activación de la mezcla. La elaboración se llevó a cabo mediante el método de impregnación húmeda, el proceso se repitió varias veces debido a pérdida del producto en la etapa de secado y calcinación. Se obtuvieron mezclas con temperaturas de 550°C , 580°C y 600°C . En especial se realizó la mezcla a temperatura de 550°C ya que esta película se va a evaluar para determinar su capacidad de inactivación de *E. coli*.

3.2.2 Suspensión de la mezcla. En esta etapa se observó que, al agregar menor cantidad de etilenglicol, la suspensión quedaba muy líquida y su adherencia no era la esperada; al adicionar más de este reactivo, se mejoraban las características de uniformidad y adhesión; el tiempo en el Ultra-turrax debe ser mayor a 3 minutos, para evitar la presencia de aglomerados.

3.2.3 Deposición de la mezcla. La limpieza del sustrato es importante en este proceso, además, es relevante la cantidad de suspensión depositada en el vidrio, si se agrega en exceso el proceso de calcinación se vería afectado y se desprendería la mezcla; si, por el contrario, se agrega en pequeñas cantidades no alcanzaría a cubrir en su totalidad el vidrio. Otro factor a considerar son las revoluciones del spin coating; a 1000 rpm se observa más homogeneidad, uniformidad y concentración de la suspensión, a 2000 y 3000 rpm la concentración disminuye, al igual que la homogeneidad.

Figura 18. Películas depositadas.

(a) 3000 rpm, (b) 2000 rpm (c) 1000 rpm (d) 1000 rpm



3.2.4 Calcinación de las películas. Las películas se calcinaron a las temperaturas correspondientes (550°C, 580°C y 600°C); esta etapa tuvo duración de 1 hora, pero al realizar la prueba de funcionamiento con azul de metileno se observó que la degradación no era tan efectiva, debido a esto, las películas se calcinaron nuevamente para obtener mejoras en los resultados.

3.2.5 Películas depositadas. A continuación, se muestra una tabla con el número total de muestras obtenidas, a una temperatura de 550°C y 1000 rpm se seleccionaron 4 películas para la inactivación de la bacteria, 1 para DRX, 1 para SEM y 2 para la degradación de azul de metileno. Las películas a 2000 y 3000 rpm se utilizaron para degradar azul de metileno.

Las películas elaboradas a temperaturas de 580°C y 600°C a 3000 rpm se emplearon en la prueba de funcionamiento degradando el colorante.

Tabla 6. Películas obtenidas.

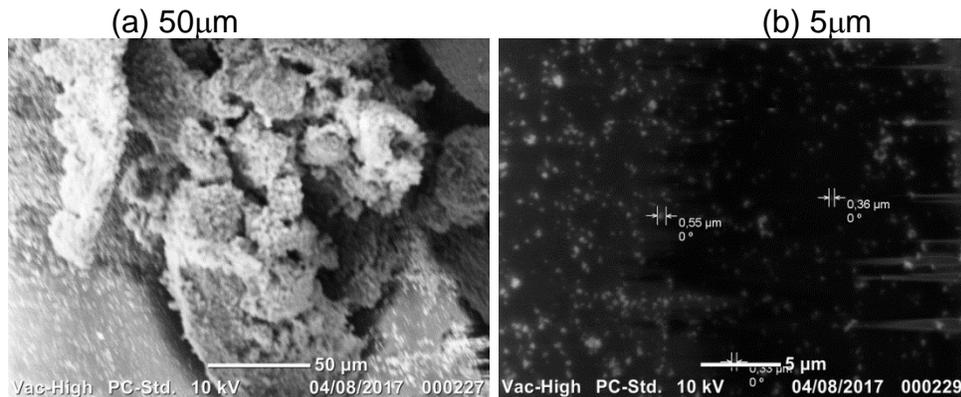
Temperatura (°C)	RPM	Cantidad
550	1000	8
	2000	3
	3000	6
580	3000	3
600	3000	3

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS

3.3.1 Caracterización morfológica (SEM). Para la caracterización morfológica de las películas de $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL NeoScope JCM 5000. La caracterización se realizó en alto vacío para permitir el desplazamiento del haz de electrones, la potencia empleada fue de 10 kV, las películas sometidas a la prueba fueron revestidas previamente con oro mediante sputtering plasma.

En la figura 19 se presentan las películas de dióxido de titanio sin modificar, el literal (a) muestra la película a una longitud de $50\ \mu\text{m}$ mientras que el (b), a $5\ \mu\text{m}$. A $50\ \mu\text{m}$ se identifican aglomerados del dióxido de titanio, esto favorece la degradación de azul de metileno, con respecto a la de $5\ \mu\text{m}$ se observa homogeneidad y uniformidad en la película.

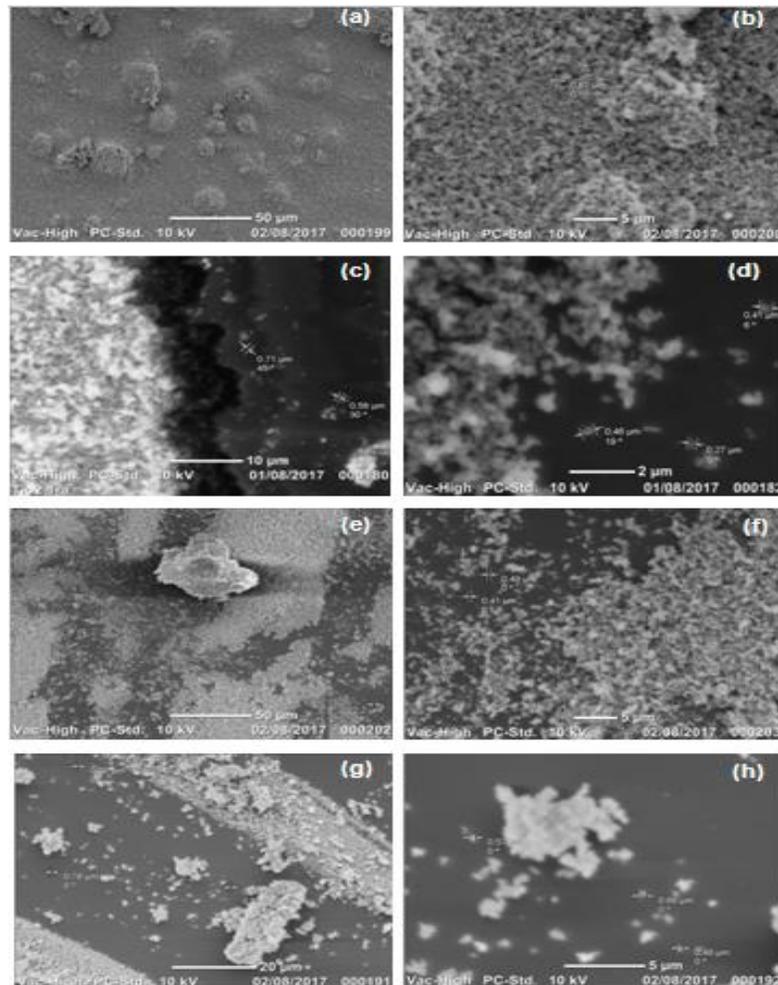
Figura 19. Caracterización morfológica película TiO_2 sin modificar.



Se realizó la caracterización morfológica de las películas obtenidas a las diferentes temperaturas de calcinación.

Figura 20. Imágenes del análisis SEM para las películas elaboradas con TiO_2/CuOx .

A 550°C distancias (a) 50 μm (b) 5 μm ; tamaño partícula (c) 10 μm (d) 2 μm . A 580°C distancia (e) 50 μm (f) 5 μm . A 600°C distancias (g) 20 μm (h) 5 μm .



Con la prueba SEM se pudo evidenciar la correcta deposición de la suspensión por Spin Coating, debido a que no se presentan espacios en las películas, indicando que la mezcla se distribuyó en la mayor parte de la lámina de vidrio, como se observa en la figura 20 (a-b) que corresponden a las películas elaboradas a la temperatura de calcinación de 550°C, las cuales exhibieron mayor degradación de azul de metileno y fueron empleadas en la reacción fotocatalítica

de inactivación de la bacteria. Las diferentes películas obtenidas presentaron homogeneidad, sin embargo, se observó la presencia de algunos aglomerados en la superficie, al igual que picos y valles los cuales determinan la rugosidad de la película. Para observar mejor el tamaño de partícula del catalizador se raspó la superficie de la película, en la figura 20 (c-d) se evidencia de color blanco la mezcla catalítica dispuesta uniformemente en el sustrato, en la región negra se lograron observar partículas aisladas de $0,27\ \mu\text{m}$ a $0,76\ \mu\text{m}$. En la figura 20 (e-f) se evidencian espacios y aglomerados más grandes, esta caracterización corresponde a películas obtenidas a 580°C , las cuales presentaron una degradación de azul de metileno inferior, comparada con las elaboradas a la temperatura de calcinación de 550°C , caso similar se encontró en las películas calcinadas a 600°C pertenecientes a la figura 20 (g-h), las cuales presentaron mayor número de aglomerados. Sin embargo, se determinó que todas las películas elaboradas con la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ presentan actividad fotocatalítica en la región visible y se caracterizan por ser homogéneas y algunas por presentar diversos aglomerados que posiblemente influyen en la degradación del azul de metileno.

3.3.2 Caracterización estructural (DRX). Esta caracterización se realizó por medio de difracción de rayos x (DRX), realizándose en un rango de $2\theta = 22-68$.

Figura 21. Difractograma mezcla preparada a 550°C .



El difractograma generado se analizó con la película de $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ calcinada a $550\text{ }^\circ\text{C}$ representada por el color azul y se comparó con la base de datos para esta mezcla, indicada por las líneas rojas, donde se evidenció que la mezcla presenta de forma predominante la fase cristalina anatasa.

La estructura cristalina anatasa es muy activa ya que genera procesos de oxidación y reducción, además mejora la absorción de fotones en el espectro visible, mientras que la estructura rutilo es menos reactiva, pero favorece la absorción de fotones de los rayos UV. Con el análisis estructural se observó que la modificación al TiO_2 resultó exitosa, debido a que presenta actividad en la región visible.

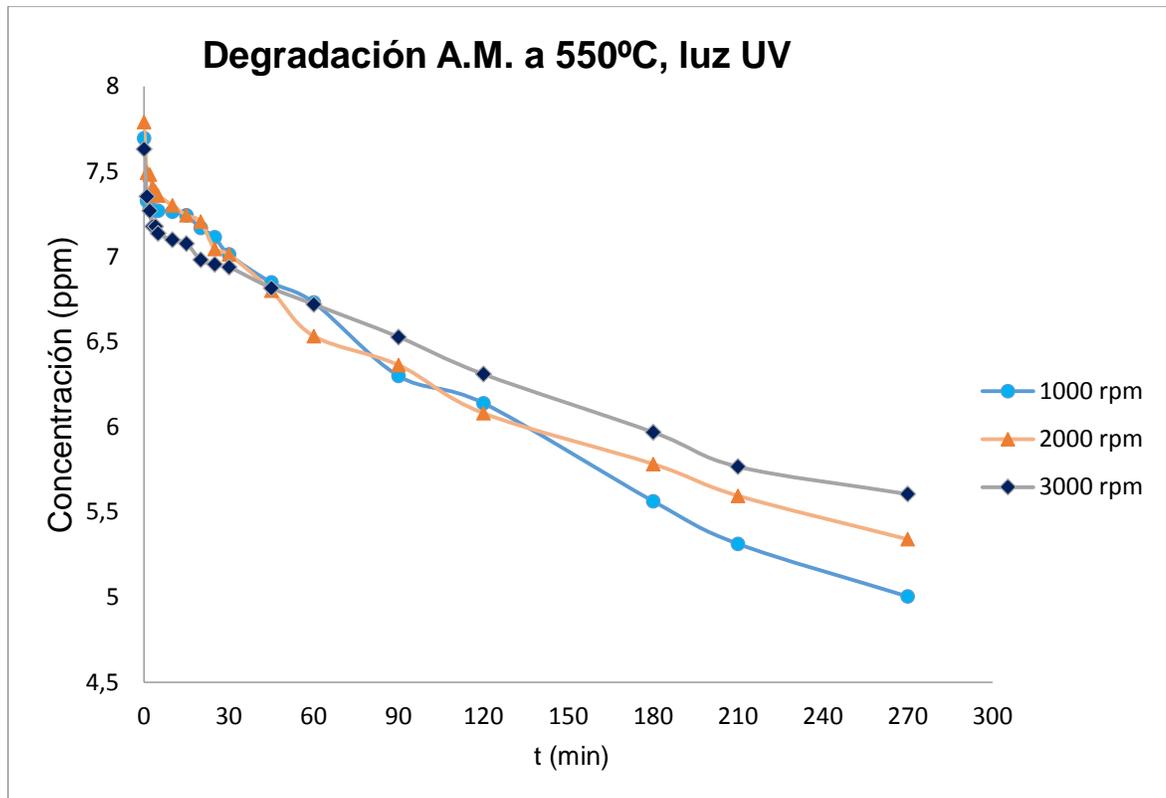
3.4 FOTODEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO

Las películas elaboradas con la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ a las temperaturas de calcinación 550°C , 580°C y 600°C , mostraron los mejores resultados en la inactivación de *Escherichia coli*, según el trabajo de grado realizado en el grupo de *Materiales Fotoactivos*, titulado; “EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CALCINACIÓN SOBRE MEZCLA $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ PARA LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE *E. coli* EN PRESENCIA DE LUZ VISIBLE”, por esta razón fueron puestas a prueba en la evaluación del método de inactivación fotocatalítica del TiO_2 modificado con cobre. Estas películas se sometieron a un examen de funcionalidad haciendo degradaciones de una solución de azul de metileno con una concentración de 8 ppm en un fotorreactor, inicialmente se tomó una muestra de 3 mL cada minuto durante los primeros 5 minutos, luego cada 5 minutos hasta la primera media hora, posteriormente cada 15 minutos hasta completar la primera hora, luego se tomaron dos muestras cada 30 minutos y finalmente dos muestras 60 minutos después.

Usando un espectrofotómetro se evaluó la degradación del colorante midiendo su concentración con el paso del tiempo.

En la gráfica 2 se muestra la influencia de las revoluciones por minuto empleadas en el método de Spin Coating para la elaboración de las películas, a una temperatura de calcinación de 550°C .

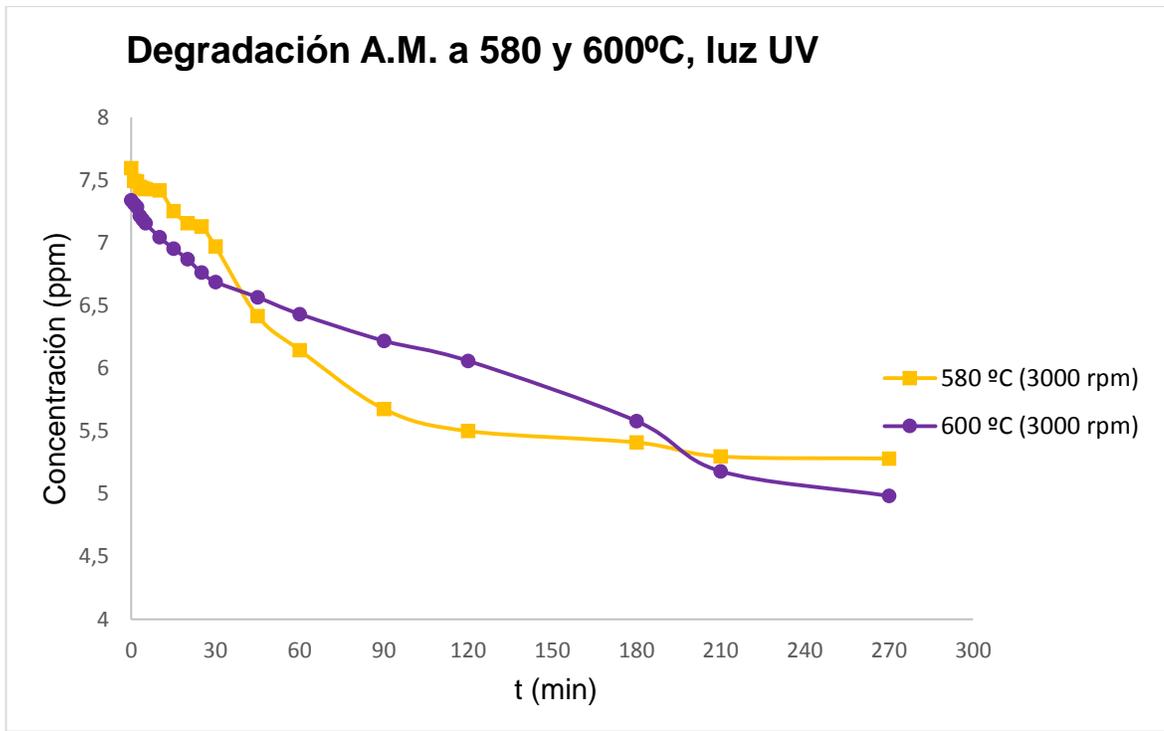
Gráfica 2 Degradación de A.M con películas elaboradas a temperatura de calcinación (550°C).



Los resultados indican que las películas a 1000 rpm logran degradar más rápido el colorante, debido a que la capa de suspensión resultante es más uniforme, sin embargo, las demás películas realizadas a rpm mayores también exhiben actividad fotodegradativa.

Adicionalmente se evaluaron las películas elaboradas a las temperaturas de calcinación de 580°C y 600°C, la gráfica 3 muestra la degradación de azul de metileno con películas realizadas a 3000 rpm por el método spin Coating, pese a que estas revoluciones por minuto generan las películas menos uniformes y con menor suspensión, aun así, se evidencia su potencial en la degradación del colorante.

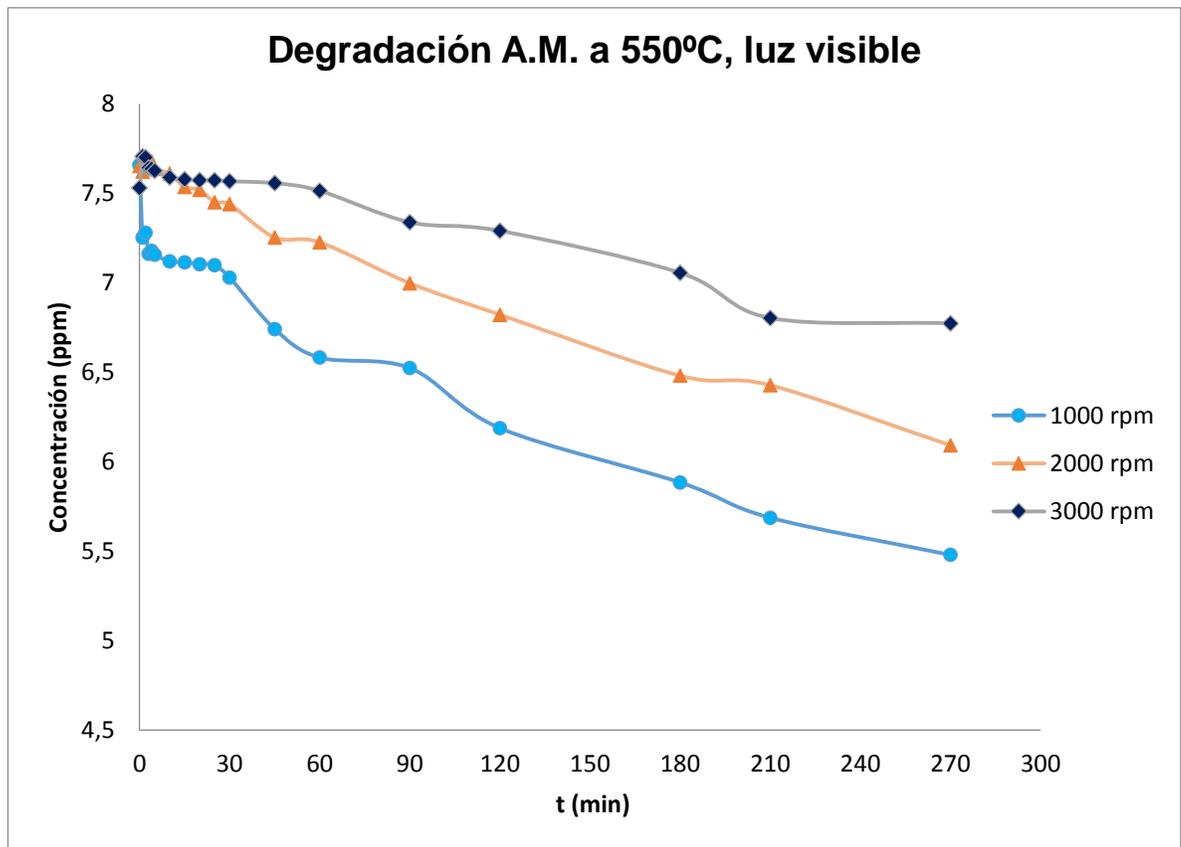
Gráfica 3. Degradación de A.M con películas elaboradas a temperaturas de calcinación (580°C y 600°C).



Las pruebas de funcionalidad se realizaron durante un tiempo de 270 minutos donde se logra comprobar la actividad fotocatalítica de las películas elaboradas con la mezcla TiO_2/CuOx , las tablas de los resultados de las degradaciones de A.M. con las películas sometidas a la reacción, se encuentran en el Anexo F.

De la misma manera se evaluó la capacidad fotocatalítica de la mezcla bajo luz visible, donde se logró comprobar que la modificación del dióxido de titanio dopado con óxido de cobre resultó exitosa, debido a que se presentó actividad fotodegradativa en el espectro visible, degradando hasta 5,5 ppm al azul de metileno, en la gráfica 4 se muestran los resultados.

Gráfica 4. Degradación de A.M bajo espectro de luz visible, temperatura de calcinación (550°C).



En general se observó un buen comportamiento en las películas degradando hasta 3 ppm, resultados similares a los encontrados en los trabajos de grado realizados en el grupo de Materiales Fotoactivos que emplearon la misma modificación al dióxido de titanio.

Con esta prueba se comprobó la funcionalidad de las películas, evidenciando su actividad fotodegradativa, de este modo se continuó con la realización de la evaluación microbiológica para estudiar la capacidad microbicida de la mezcla.

3.5 EVALUACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE UNA VALIDACIÓN

3.5.1 Población de estudio. Cuando están involucrados métodos microbiológicos el diseño experimental de una validación se puede ajustar a razones: económicas, de producción y tiempo.⁶⁷ En este caso la validación es larga y costosa, según cálculos realizados para evaluar un solo tipo de temperatura de calcinación de la mezcla, se requieren hacer 120 cultivos en cajas Petri para verificar la capacidad de inactivación del microorganismo, realizando en total cuatro replicas como mínimo, dos por cada analista, por esta razón se determinó que para el proceso de validación del método, se estudiaría únicamente la película calcinada a la temperatura de 550°C. La reacción de inactivación se llevó a cabo en un tiempo de 9 horas.

3.5.2 Condiciones microbiológicas. El estudio se realizó con una muestra inoculada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de la bacteria *E. coli*, correspondiente al patrón 0.5 de Mc Farland, tomando este valor como referencia de blanco microbiológico, con el objetivo de comprobar la eficiencia real de las películas, al conocer la concentración inicial de la muestra y así poder cuantificar la inactivación del microorganismo a lo largo de la fotorreacción de 9 horas, además éste ya había sido objeto de análisis en diferentes trabajos de grado realizados en el grupo de Materiales Fotoactivos, en los cuales se sometió una muestra de este mismo inóculo a una exposición de luz visible por un tiempo de 9 horas en un fotorreactor, donde no se depositó ninguna película, como resultado, se encontró que la concentración final a la hora 9 fue la misma que la inicial, por lo que se descartó que la temperatura del fotorreactor (25°C) y la luz sean elementos que permitan una acción microbicida.

En éste trabajo se realizó un seguimiento con LabVIEW, para monitorear la temperatura del fotorreactor durante el proceso, utilizando dos sensores LM35, la temperatura promedio registrada fue de 25°C, por lo que se descarta alguna incidencia de ésta en la reacción o sobre el microorganismo.

Como fuente de oxígeno requerido para la fotorreacción se emplearon bombas de pecera que a su vez generaron turbulencia para agitar las muestras y evitar la precipitación del microorganismo. Para determinar el oxígeno disuelto en cada muestra de solución más inóculo, se debe tener en cuenta el efecto combinado de la temperatura y la salinidad sobre el oxígeno, debido a que la presencia de sales disueltas reduce la solubilidad de los gases por una disminución del espacio intermolecular disponible, al igual que, la concentración de oxígeno es inversamente proporcional a la temperatura de la solución. A las condiciones de

⁶⁷ CARRILLO ZAPATA, Eliza Marcela y LOZANO CAICEDO, Aura María, Validación Del Método De Detección De Coliformes Totales y Fecales En Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Trabajo de grado, Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2008.

operación de 25°C y 0.85% P/V de solución salina, el oxígeno disuelto en cada muestra inóculo fue de 8.236 mg/L.⁶⁸

Según investigaciones realizadas, las bacterias como *Escherichia coli*, que en momentos de ayuno nutricional, no esporulan, presentan por el contrario cambios morfológicos y fisiológicos importantes, como la reorganización del metabolismo general y la acumulación de compuestos de reserva (polifosfato y glucógeno) y osmoprotección,⁶⁹ donde se mantiene un metabolismo basal, ésta expresión contribuye a que las células mantengan su viabilidad y muestren mayor resistencia a diversos factores que les causen estrés como: calor, radiación ultravioleta, antibióticos y concentraciones salinas elevadas.⁷⁰ Teniendo en cuenta éstos estudios del modelo biológico de *E. coli* desde el punto de vista bioquímico y genético se logra establecer que la bacteria no puede morir de forma natural durante un tiempo de 9 horas que dura el experimento y que las películas modificadas de TiO₂/CuOx son las que poseen capacidad microbicida, sus resultados se presentan a lo largo de este capítulo.

3.5.3 Parámetros de validación. Para llevar a cabo la validación del método se utilizó un agar nutritivo básico para realizar la siembra del microorganismo y así poder cuantificar por recuento en placa la inactivación de la bacteria por acción de la fotocatalisis empleando la mezcla TiO₂/CuO_x, para lo cual, se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros de validación o variables de estudio:

1. Eficiencia de desinfección del método estudiado, obtenido por cada analista por duplicado.
2. Precisión: llevada a cabo por analistas de un mismo laboratorio, evaluada en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Los parámetros anteriores se analizaron con el cálculo de la desviación estándar (S) de las medidas, del coeficiente de correlación (R²) y el coeficiente de variación (CV).

3.5.4 Prueba preliminar de calibración de equipos. Los equipos empleados para realizar la evaluación del método de inactivación fotocatalítico se presentan a continuación.

⁶⁸ OXIGENO DISUELTO, Solubilidad de oxígeno en función de la temperatura y la salinidad. [en línea] Disponible en <<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-oxigeno.pdf>>

⁶⁹ SANTOS, A. Ramírez; FERRAT, G. Contreras; EICHELMANN, MC Gómez. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Rev., Latinoamericana Microbiología, 2005, vol. 47, p. 92-101.

⁷⁰ *Ibíd.*, p. 93.

Tabla 7. Equipos usados en la evaluación del método de inactivación fotocatalítico.

Equipo	Marca /modelo	Última verificación	Proveedor
Espectrofotómetro	Genesys 20, Thermo Spectronic 3SGJ167008	13 de Enero del 2017	Tecniespectro S.A.S
Autoclave	Tuttauener 3870ML	18 de Febrero del 2017	Tuttauener
Incubadora	Memmert GmgH+Co.KG	15 Febrero del 2017	Memmert
Micropipeta	Socorex Acura 825.0010	14 Marzo del 2016	Socorex

Todos los equipos se encontraban correctamente calibrados, de esta forma se garantiza que no van a incidir a errores en las medidas, las fichas técnicas de la incubadora, autoclave y micropipeta se encuentran en los anexos G, H, I, respectivamente.

3.5.5 Prueba preliminar de esterilidad del medio de cultivo. Para garantizar los resultados del método microbiológico es imprescindible analizar el medio de cultivo empleado, según un informe de control interno de la empresa proveedora MICROGEN LTDA, éste presentó las siguientes características físicas:

1. Aspecto y color del medio preparado: Almendra Pálido
2. pH medio preparado: 7.38

Tabla 8. Prueba de esterilidad del medio de cultivo

24 h	48 h	72 h
Negativo	Negativo	Negativo

Con los resultados presentados se asegura el cumplimiento de la prueba de esterilidad.

3.5.6 Prueba preliminar de promoción de crecimiento. Esta prueba se realiza con el objetivo de asegurar que el microorganismo pueda crecer adecuadamente en el medio de cultivo, para esto se hizo un ensayo de productividad usando la cepa *E. coli*, los resultados completos del certificado de análisis se encuentran en el Anexo J.

Tabla 9. Prueba de promoción y crecimiento.

Microorganismo	Características Macroscópicas en Agar Nutritivo
<i>Escherichia coli</i>	Colonias medianas, color de la colonia y morfología características de la cepa.

La conclusión del análisis indica que el agar nutritivo básico cumple con las condiciones para que se pueda llevar a cabo el crecimiento de la bacteria *E. coli* de manera óptima.

3.5.7 Resultados solución de prueba

Solución de prueba: solución salina + *E. coli*

Analista 1: Dayanna Patricia Ayala Botía

Analista 2: María Alejandra Vargas Buitrago

Para la validación del método de inactivación fotocatalítico de la mezcla $TiO_2/CuOx$ sobre *E. coli*, se analizaron dos muestras que contenían el microorganismo, cada una con un volumen de 50 mL, de los cuales 4,5 mL correspondían al inóculo de la bacteria y el volumen restante a solución salina, la reacción de inactivación se llevó a cabo en un tiempo de 9 horas, durante cada hora se tomaron muestras de 2 mL, la prueba fue realizada por dos analistas, los cuales hicieron dos réplicas cada uno de todo el protocolo microbiológico mencionado anteriormente, evaluando así el método por cuadruplicado.

El conteo del número real de microorganismos se obtuvo mediante la ecuación:

$$\text{Número real de microorganismo} = UFC * \text{dilución}^{-1} * \text{Muestra de siembra}$$

3.5.8 Análisis estadístico. En las tablas No.10 y 11, se muestran los resultados de cada réplica del conteo en placa realizado por los analistas, junto con los valores de desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV), que permite identificar la dispersión de los datos en las muestras, con el propósito de evaluar parámetros como repetibilidad del método.

Tabla 10. Resultados réplicas y valores estadísticos de recuento en placa para analista 1.

Hora/Dilución	RÉPLICA	Diluciones					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
0	1	-	-	-	50	4	1
	2	-	-	-	48	10	1
	PROMEDIO	-	-	-	49	7	1
S					1,41	4,24	0
CV					2,87%	60,57%	0%
1	1	-	-	-	4	2	10
	2	-	-	-	1	2	16
	PROMEDIO	-	-	-	2,5	2	13
S					2,12	0	4,24
CV					84,8%	0%	32,61%
2	1	-	-	2	3	2	-
	2	-	-	1	2	2	-
	PROMEDIO	-	-	1,5	2,5	2	-
S				0,7	0,7	0	
CV				46,6%	28%	0%	
3	1	-	-	5	1	1	-
	2	-	-	4	1	4	-
	PROMEDIO	-	-	4,5	1	2,5	-
S				0,7	0	2,12	
CV				15,5%	0%	84,8%	
4	1	-	-	1	1	3	-
	2	-	-	1	1	0	-
	PROMEDIO	-	-	1	1	1,5	-
S				0	0	2,12	
CV				0%	0%	141,3%	
5	1	-	3	0	0	-	-
	2	-	3	0	2	-	-
	PROMEDIO	-	3	0	1	-	-

Tabla 10. (Continuación).

Hora/Dilución	RÉPLICA	Diluciones					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
S			0	0	1,41		
CV			0%	0%	141%		
6	1	5	0	0	-	-	-
	2	6	0	0	-	-	-
	PROMEDIO	5,5	0	0	-	-	-
S		0,7	0	0			
CV		12,73	0 %	0 %			
		%					
7	1	2	2	-	-	-	-
	2	2	1	-	-	-	-
	PROMEDIO	2	1,5	-	-	-	-
S		0	0,7				
CV		0 %	46,6				
		%					
8	1	1	0	-	-	-	-
	2	1	0	-	-	-	-
	PROMEDIO	1	0	-	-	-	-
S		0	0				
CV		0%	0%				
9	1	0	0	-	-	-	-
	2	0	0	-	-	-	-
	PROMEDIO	0	0	-	-	-	-
S		0	0				
CV		0%	0%				

3.5.8.1 Análisis de repetibilidad analista 1. Para el análisis de repetibilidad es importante aclarar qué; la dispersión de un conjunto de observaciones se refiere a la variedad que estos datos muestran, si los valores obtenidos son iguales, no hay dispersión, si por el contrario no todos son iguales, entonces existe dispersión, una magnitud de dispersión es pequeña cuando los valores, aunque diferentes, son cercanos entre sí.⁷¹

En el ensayo de repetibilidad realizado por el analista 1, se observan coeficientes de variación iguales a 0% haciendo alusión a resultados homogéneos sin dispersión, en el recuento de algunas diluciones se obtuvieron CV con valores entre 2,87 % y 32,61%, estos datos son aceptados, debido a que se encuentran en porcentajes inferiores al 35%, que es el referente de CV para métodos microbiológicos con muestras menores a 10 UFC/placa, es por esto que los

⁷¹ WAYNE, Daniel. Dispersión en las medidas. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición. Editorial Limusa. México. 2002.

resultados indican un alto grado de coincidencia en la prueba individual, haciendo referencia a la precisión de un método cuando lo realiza un mismo analista,⁷² reflejando así que el método es repetible. Se tiene en cuenta que la micropipeta Socorex Acura 825.0010, presenta una inexactitud (E %) de <+/- 0.7% y una imprecisión (CV %) de <0.3%.

A continuación, se presentan los resultados del conteo en placa para el analista 2 junto con el cálculo estadístico correspondiente.

Tabla 11. Resultados réplicas y valores estadísticos de recuento en placa para analista 2.

		DILUCIONES					
Hora/Dilución	RÉPLICA	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶
RECuento EN PLACA							
0	1	-	-	-	77	4	6
	2	-	-	-	42	9	6
	PROMEDIO	-	-	-	59	6,5	6
S					24,74	3,53	0
CV					41,93%	54,30%	0%
1	1	-	-	-	7	0	3
	2	-	-	-	2	2	3
	PROMEDIO	-	-	-	4,5	1	0
S					3,53	1,41	0
CV					78,4%	141%	0%
2	1	-	-	0	1	1	-
	2	-	-	10	1	4	-
	PROMEDIO	-	-	5	1	2,5	-
S				7,07	0	2,12	
CV				141,4%	0%	84,8%	
3	1	-	-	2	1	4	-
	2	-	-	1	4	4	-
	PROMEDIO	-	-	1,5	2,5	4	-
S				0,7	2,12	0	
CV				46,67%	84,8%	0%	
4	1	-	-	1	0	4	-
	2	-	-	0	0	1	-
	PROMEDIO	-	-	1	1	2,5	-
S				0,7	0	2,12	

⁷² VELANDIA CASTELLANOS. Op. cit , p 41

Tabla 11. (Continuación).

Hora/Dilución	RÉPLICA	Diluciones					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
CV				70%	0%	84,8%	
5	1	-	0	1	1	-	-
	2	-	0	0	0	-	-
	PROMEDIO	-	0	1	1	-	-
S			0	0,7	0,7		
CV			0	70%	70%		
6	1	0	0	3	-	-	-
	2	2	1	1	-	-	-
	PROMEDIO	1	1	2	-	-	-
S		1,41	0,7	1,41			
CV		141%	70%	70,5%			
7	1	1	1	-	-	-	-
	2	4	1	-	-	-	-
	PROMEDIO	2,5	1	-	-	-	-
S		2,12	0				
CV		84,8%	0%				
8	1	3	0	-	-	-	-
	2	1	1	-	-	-	-
	PROMEDIO	2	1	-	-	-	-
S		1,41	0,7				
CV		70,5%	70%				
9	1	0	0	-	-	-	-
	2	1	0	-	-	-	-
	PROMEDIO	1	0	-	-	-	-
S		0,7	0				
CV		70%	0%				

3.5.8.2 Análisis de repetibilidad analista 2. En el ensayo de repetibilidad realizado por el analista 2 en un tiempo de 9 horas indica qué tan preciso es el método de recuento en placa, midiendo la concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica varias veces a muestras semejantes y separadas; con los resultados obtenidos, se observan coeficientes de variación iguales al 0%, lo que indica que no hay dispersión entre los datos; al no presentarse una diferencia significativa se demuestra que el método evaluado es repetible.⁷³

⁷³ CARRILLO, E and LOZANO. Op. cit, p 18-20

3.5.9 Sensibilidad de la técnica. En el análisis estadístico tanto para el analista 1 como para el analista 2, se encontró que existían recuentos con valores de CV mayores al 35%, estos resultados se presentan debido a que están sujetos a errores de muestreo y de dilución,⁷⁴ porque se está empleando una técnica manual, donde se está analizando un fracción de volumen, de una capacidad total del biorreactor (V=50 mL) se analizaron 2 mL, en cada replica, por lo que pudo variar una parte de la concentración de la muestra, estos resultados se evidenciaron principalmente en el recuento de las cajas más diluidas, debido a que están implicadas diluciones anteriores, todo esto es característico de la técnica microbiológica, sin embargo la razón principal de los coeficientes de variación mayores, es la alta sensibilidad de la técnica de recuento en placa, que presenta una sensibilidad de 1 UFC/g cuando se siembran muestras líquidas directamente, o bien sembrando 10 mL de una dilución 1:10,⁷⁵ por lo que en réplicas donde por ejemplo aparecieron 2 UFC y 1 UFC.

Estadísticamente se observan coeficientes de variación del 46.6%, esto se debe a que numéricamente un valor es el doble del otro, lo que aumenta la dispersión en la medida, pero teniendo en cuenta la alta sensibilidad de la técnica microbiológica de una UFC/g y el volumen de dilución tan pequeño que se está empleando, se concluye que estos resultados no son representativos, este mismo comportamiento se observa en los demás CV de mayor porcentaje, con las características del método microbiológico de recuento empleado se resaltan los resultados obtenidos en la cuantificación de *E. coli* luego de ser sometida a una reacción de inactivación fotocatalítica empleando la mezcla TiO₂/CuO_x.

3.5.10 Inactivación fotocatalítica de *E. coli*. Las diferentes diluciones de la muestra del inóculo de cada hora, se realizaron con el propósito de seleccionar las cajas de Petri donde se observa mejor el comportamiento de la película en la inactivación.

Los resultados escogidos para el recuento del analista 1, se presentan a continuación:

⁷⁴ ORTIZ, Diana Sofía, Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. Trabajo de grado Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. 2008. p 26-30

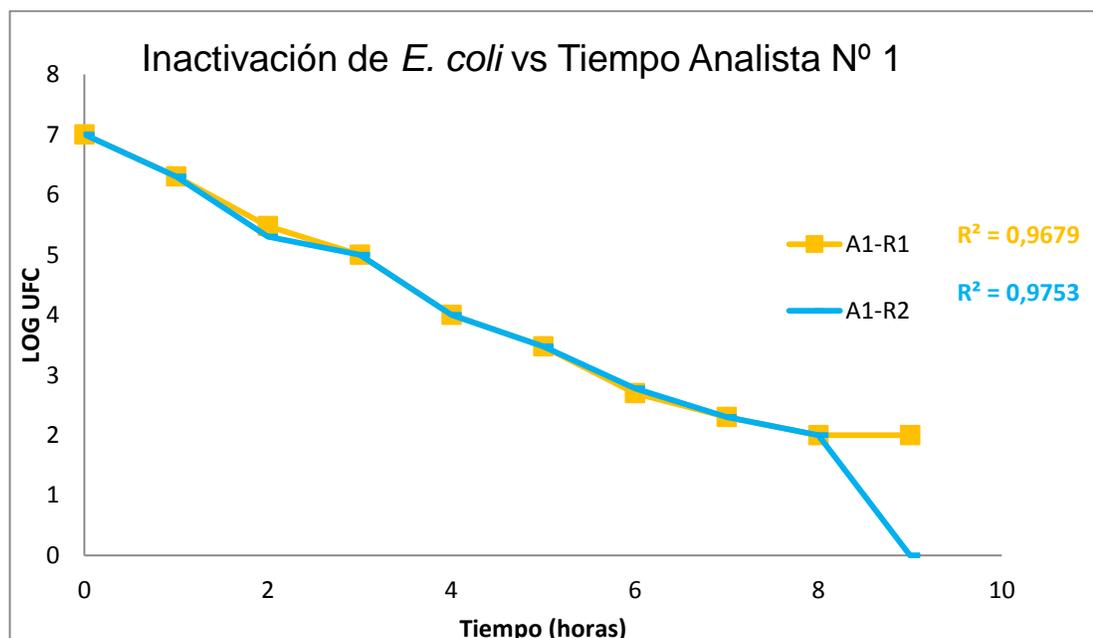
⁷⁵ IBQ LECEA, Eduardo, 3M. Placas Petrifilm, Sensibilidad para Recuento de Coliformes Totales. [en línea] Disponible en: <http://solutions.3m.com.mx/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1318366179000&locale=es_MX&assetType=MMM_Image&assetId=1273696937831&blobAttribute=ImageFile>

Tabla 12. Resultados inactivación de *E. coli*, por analista 1.

ANALISTA N° 1			
REPLICA N. 1		REPLICA N. 2	
Tiempo (horas)	UFC	Tiempo (horas)	UFC
0	1,00E+07	0	1,00E+07
1	2,00E+06	1	2,00E+06
2	3,00E+05	2	2,00E+05
3	1,00E+05	3	1,00E+05
4	1,00E+04	4	1,00E+04
5	3,00E+03	5	3,00E+03
6	5,00E+02	6	6,00E+02
7	2,00E+02	7	2,00E+02
8	1,00E+02	8	1,00E+02
9	1,00E+02	9	0,00E+00

Con los resultados obtenidos se procedió a graficar la inactivación de la bacteria durante las horas de la reacción fotocatalítica.

Gráfica 5. Inactivación fotocatalítica de *E. coli*, resultados Analista 1, réplica uno y dos (R1 y R2).



En el análisis de las gráficas se determinaron los Coeficientes de correlación (R^2), debido a que el R^2 cuantifica la mejora o reducción del error originado por la representación de los datos por medio de una línea recta en vez de emplear un valor promedio,⁷⁶ con los valores seleccionados de las réplicas de recuento en placa del analista 1, se realizó una regresión lineal donde se obtuvieron coeficientes de correlación de $R^2=0.9679$ y $R^2=0.9753$ para la réplica uno y dos respectivamente, se evidencia que los dos coeficientes obtenidos presentan cercanía a la unidad, con una diferencia de solamente 0,0074, dado que un coeficiente de correlación cercano a uno indica un correcto ajuste de los datos al modelo,⁷⁷ se evidencia la precisión en el resultado de las medidas realizadas, mostrando así el mismo comportamiento en la inactivación de *E. coli* a lo largo de la reacción fotocatalítica, se logró establecer que la técnica posee una metodología repetible, la variación que se observa en la hora 9, se presentó a causa de que en un recuento se halló 1 UFC/mL y en el otro 0 UFC/mL, pero teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica de 1 UFC/mL, no es una diferencia que sea considerable, por lo que no representa un error en el método, adicionalmente, la eficiencia de inactivación de la bacteria para las réplicas 1 y 2 fue del 99.99% y 100% respectivamente, debido a los valores obtenidos en el recuento, se evidenció la precisión y repetibilidad en el método realizado por el analista 1 y como se mostró en el análisis estadístico para el conjunto de diluciones seleccionadas según el recuento realizado para cada hora por el analista 1, el 80% de los resultados presentan coeficientes de correlación iguales al 0% ,indicando de esta forma la alta precisión en la técnica, en el 20 % restante de los datos se hallaron valores de CV del 28% y 12,73%, encontrándose en el rango permisible para métodos microbiológicos, señalado previamente, todo este análisis permite concluir que el método es repetible y logra precisión en sus resultados.

Los resultados de las réplicas del recuento para cada hora, del analista N° 2 se presentan a continuación.

Tabla 13.Resultados inactivación de *E. coli*, por analista 2.

ANALISTA N° 2			
REPLICA N° 1		REPLICA N° 2	
Tiempo (horas)	UFC	Tiempo (horas)	UFC
0	6,00E+07	0	6,00E+07
1	3,00E+07	1	3,00E+07

⁷⁶ ORTIZ, Salomón. MÉTODOS NUMÉRICOS APLICADOS A LA INGENIERÍA, [en línea] Disponible en: <http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/c&d_9_art_16.pdf>. p. 79-82.

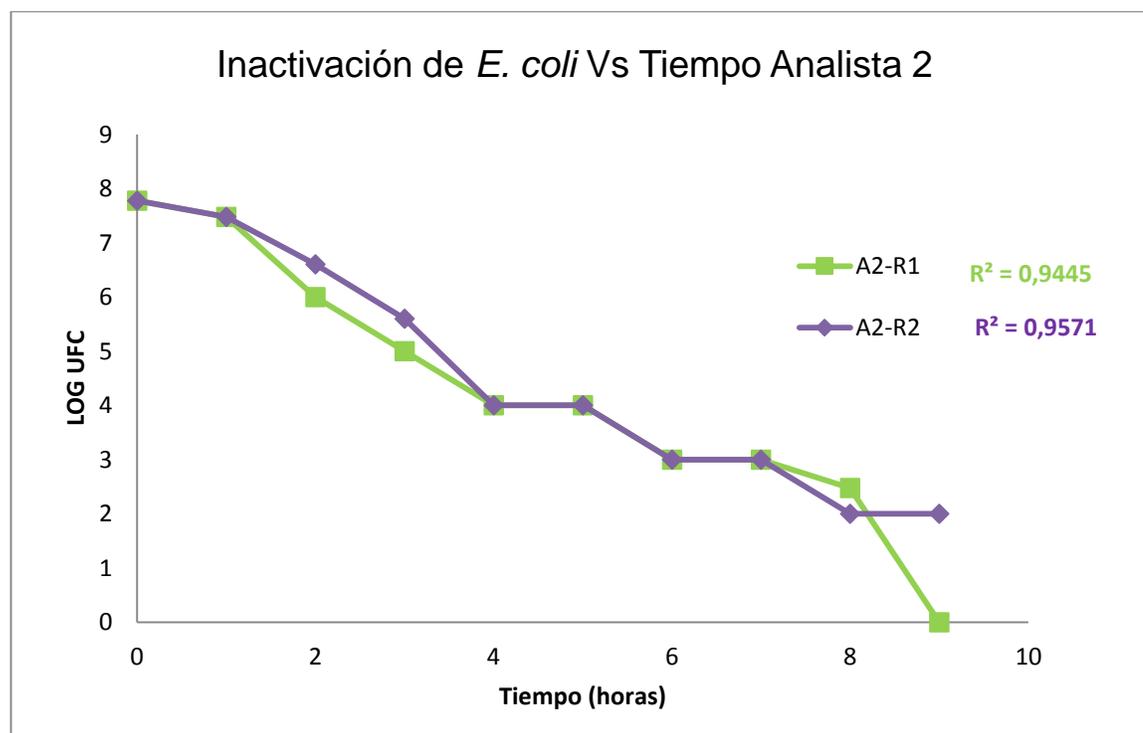
⁷⁷ Ibid, p. 80.

Tabla 13. (Continuación).

REPLICA Nº 1		REPLICA Nº 2	
2	1,00E+06	2	4,00E+06
3	1,00E+05	3	4,00E+05
4	1,00E+04	4	1,00E+04
5	1,00E+04	5	1,00E+04
6	1,00E+03	6	1,00E+03
7	1,00E+03	7	1,00E+03
8	3,00E+02	8	1,00E+02
9	0,00E+00	9	1,00E+02

Los valores obtenidos en el recuento se graficaron con el propósito de observar la inactivación de *E. coli* a lo largo del tiempo de reacción, la gráfica obtenida fue la siguiente.

Gráfica 6. Inactivación fotocatalítica de *E. coli*, resultados Analista Nº 2, con réplica uno y dos (R1 y R2).

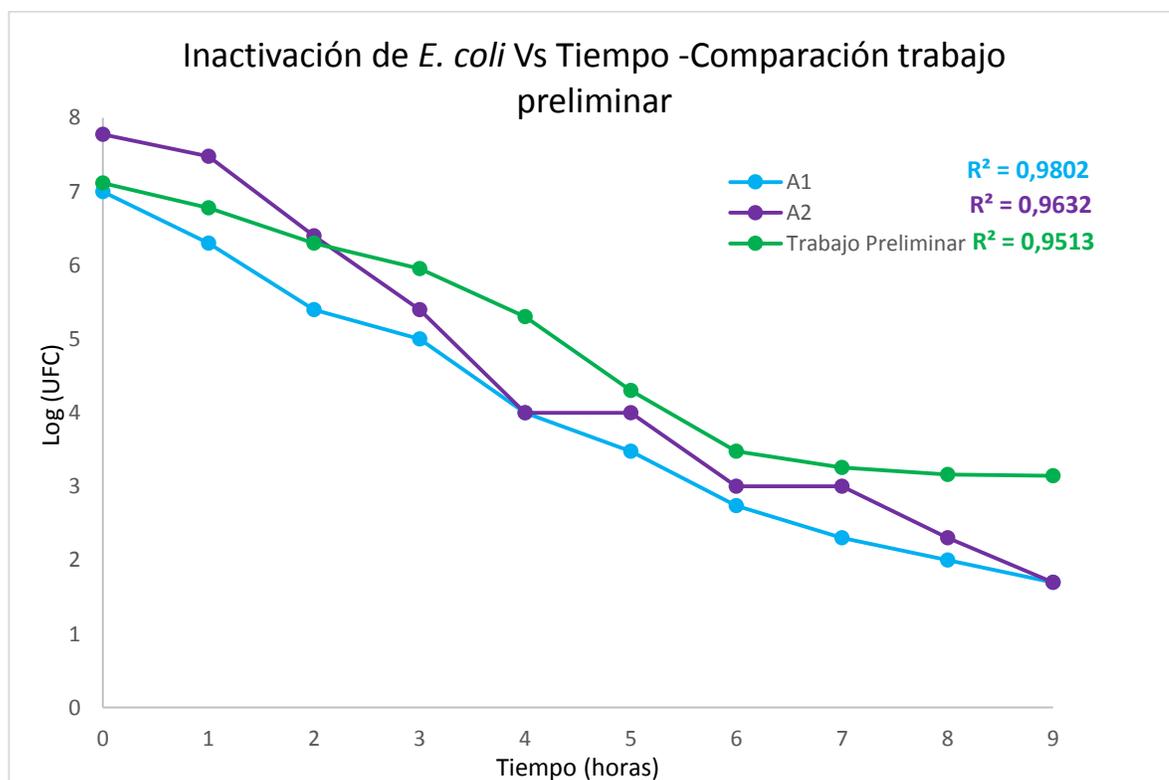


Se realizó una regresión lineal donde se obtuvieron coeficientes de correlación de $R^2=0.9445$ y $R^2=0.9571$ para la réplica 1 y réplica 2, respectivamente. El

coeficiente de correlación cercano a 1 muestra que la relación entre los datos es directa y presenta buen ajuste, los coeficientes obtenidos presentan una diferencia de 0.0126 lo que indica precisión en el resultado de las medidas realizadas, por esta razón se establece que la técnica es repetible, las variaciones que se presenciaron en la hora 9 se atribuye al crecimiento de 1 UFC en la caja Petri en la réplica 1, mientras que en la réplica 2 no creció la bacteria, teniendo en cuenta que el método es sensible, estos valores obtenidos son insignificantes comparados con los resultados de inactivación total de la bacteria empleando la mezcla $TiO_2/CuOx$.

3.5.11 Comparación resultados entre analistas. Empleando los promedios obtenidos de los recuentos seleccionados de cada analista, se procedió a graficar la inactivación de *E. coli* por el método estudiado y se comparó con el comportamiento de inactivación obtenido en el trabajo de grado preliminar.

Gráfica 7. Comparación resultados de inactivación con estudio preliminar.



En las gráficas de inactivación de *E. coli* obtenidas en la evaluación del método por el analista 1, analista 2 y el trabajo preliminar, se presentan coeficientes de correlación lineales de $R^2=0.9802$, $R^2=0.9632$ y $R^2=0.9513$ respectivamente, indicando en todos los casos el mismo comportamiento de inactivación de la

bacteria durante la reacción fotocatalítica, donde se implica una relación lineal con pendiente positiva, debido al porcentaje de aceptación obtenido superior al 95%, se puede establecer que la técnica de inactivación fotocatalítica empleando la mezcla TiO₂/CuOx posee una metodología repetible y reproducible, dada la cercanía de los R² obtenidos entre los analistas 1 y 2, que presentan una diferencia de únicamente 0.017, según el análisis de correlación realizado por los analistas se cuenta con un 96% de aceptación de los valores obtenidos entre los dos analistas y con un 95% de aceptación o similitud comparando los resultados con el trabajo de estudio, dando de esta manera validez a los resultados obtenidos, logrando verificar la capacidad microbiciada sobre la bacteria *E. coli*, llevando a cabo una reacción fotocatalítica en el espectro de luz visible, haciendo uso de la mezcla TiO₂/CuOx calcinada a 550°C y modificada con el precursor CuSO₄.

Adicionalmente para evaluar mejor el método de inactivación de *E. coli*, se calcularon las eficiencias de las películas modificadas y la tasa de supervivencia del microorganismo, los resultados se presentan a continuación.

3.5.12 Eficiencia del método. La eficiencia del método fotocatalítico con la mezcla TiO₂/CuOx, se cuantificó respecto a la inactivación del microorganismo; empleando la siguiente fórmula.⁷⁸

$$\% \text{ Eficiencia película} = \frac{UFC_{INICIAL} - UFC_{FINAL}}{UFC_{INICIAL}} * 100$$

Las películas elaboradas presentaron la siguiente eficiencia de inactivación de *E. coli*.

Tabla 14. Eficiencia de la película, analista 1.

Película TiO₂/CuO_x (T 550 ° C)	
ANALISTA N° 1	
REPLICA N°	EFICIENCIA (%)
1	99,99
2	100
PROMEDIO	99,99

En las réplicas realizadas por el analista 1, se obtuvieron eficiencias de 99,99% y del 100% para las réplicas 1 y 2 respectivamente, se evidenció la ventaja de este

⁷⁸ RAHMANI AR, Photocatalytic Disinfection of Coliform Bacteria Using UV/TiO₂, Journal of Research in Health Sciences, 2009, vol 9. p 1-6

método de inactivar las bacterias impidiendo que puedan regenerarse, debido a que llega hasta la lisis celular por la acción de los radicales (OH*), formados en el proceso fotocatalítico, siendo estos los encargados del daño del envoltorio celular, generando así la fuga de componentes intracelulares, que finalmente conducen a la muerte inminente del microorganismo.

Tabla 15. Eficiencia de la película, analista 2.

Película TiO₂/CuO_x (T 550 ° C)	
ANALISTA N° 2	
REPLICA N°	EFICIENCIA (%)
1	100
2	99,99
PROMEDIO	99,99

En las réplicas realizadas por el analista 2 se muestran eficiencias del 100% y 99,99% para las réplicas 1 y 2, respectivamente.

La eficiencia reportada en el trabajo de grado preliminar fue del 99.99% de eliminación del microorganismo *E. coli*, empleando la película de TiO₂/CuO_x calcinada a 550°C, con un inóculo inicial de 1,5x10⁸ de la bacteria, en un tiempo de 9 horas de fotorreacción haciendo uso de luz visible.

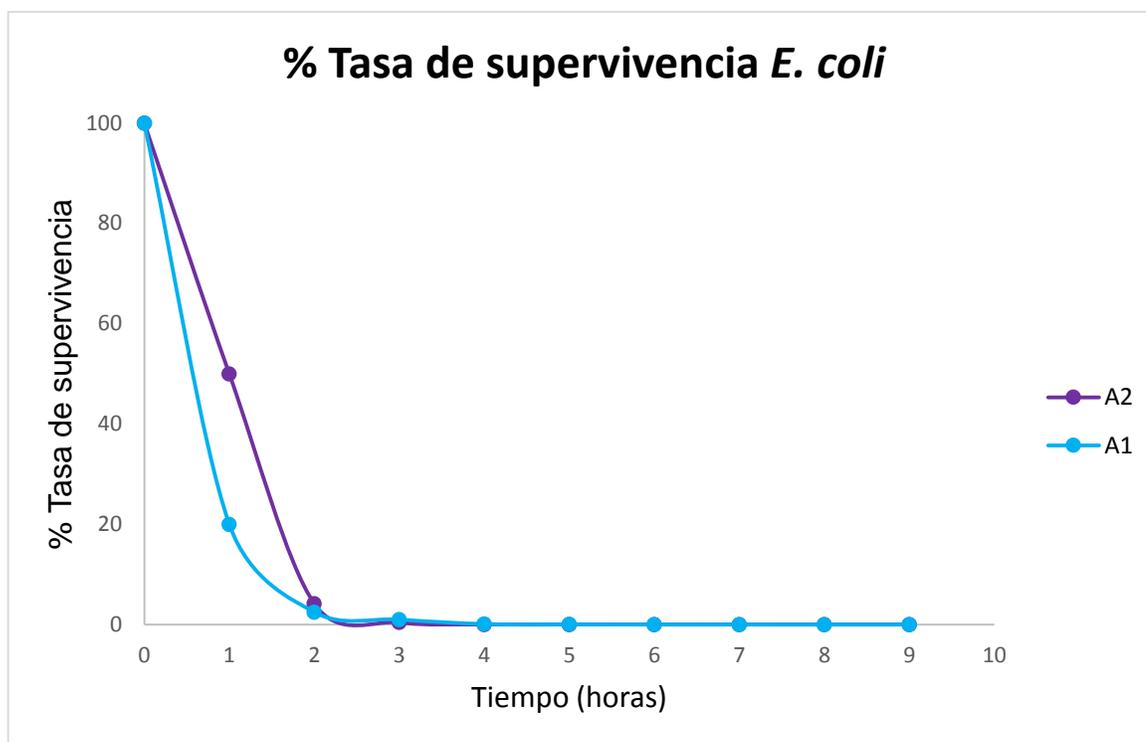
3.5.13 Tasa de supervivencia de *E. coli*. Una vez se evidenció la inactivación del microorganismo, se realizó el seguimiento de su mortandad, por medio de la tasa de supervivencia, que para las bacterias se puede definir mediante la fórmula que se muestra a continuación.⁷⁹

$$\% \text{ Tasa de supervivencia de } E. coli = \frac{Y}{X} * 100$$

Donde X y Y son las UFC antes y después de la exposición a las películas, respectivamente.

⁷⁹ SHIEH, Kuan-Jiunn, et al. Antibacterial performance of photocatalyst thin film fabricated by deflection effect in visible light. En: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.2006, vol. 2, no. 2, p. 121-126

Gráfica 8. Tasa de supervivencia de *E. coli*, resultados Analista 1 y 2, utilizando valores promedio de cada analista.



La gráfica 8 se realizó con los datos promedio de cada analista para evidenciar la inactivación del microorganismo en el transcurso de la prueba. En los primeros minutos se observa un decrecimiento en la gráfica, la inactivación es lenta debido a la resistencia de la bacteria ante el ataque de la especie activa, que oxida gradualmente su membrana externa,⁸⁰ el microorganismo en respuesta a estos ataques resiste con mecanismos de autodefensa generando enzimas de reparación. Al alcanzar la primera hora, las enzimas ya no pueden proteger la membrana bacteriana contra la oxidación, por ello el proceso de inactivación se acelera permitiendo que ROS actúe y perfore la membrana.⁸¹ En la hora 3 la membrana externa ha sido totalmente afectada, esto genera un daño en su permeabilidad, seguido de la lisis celular que produce la salida del material intracelular.

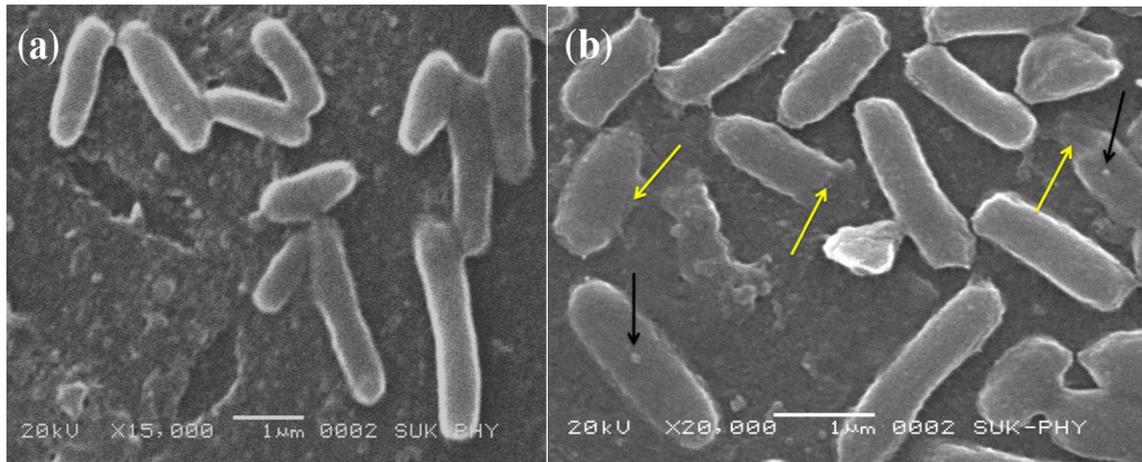
En el artículo “Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO₂ nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity” realizado por Sagar D. Delekar y sus colaboradores, dopan el TiO₂ con un precursor de cobre,

⁸⁰ PULGARIN, Cesar; KIWI, John y NADTOCHENKO, V. Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO₂ films involving cell-wall damage and lysis. En: Applied Catalysis B: Environmental.2012, vol. 128, p. 179-183.

⁸¹ BERNABBOU. Op. cit, p. 257

se realizan pruebas SEM para identificar el daño causado a la bacteria, las imágenes se muestran a continuación:

Figura 22. SEM *E. coli* sin y con presencia de nanopartículas de Cu.



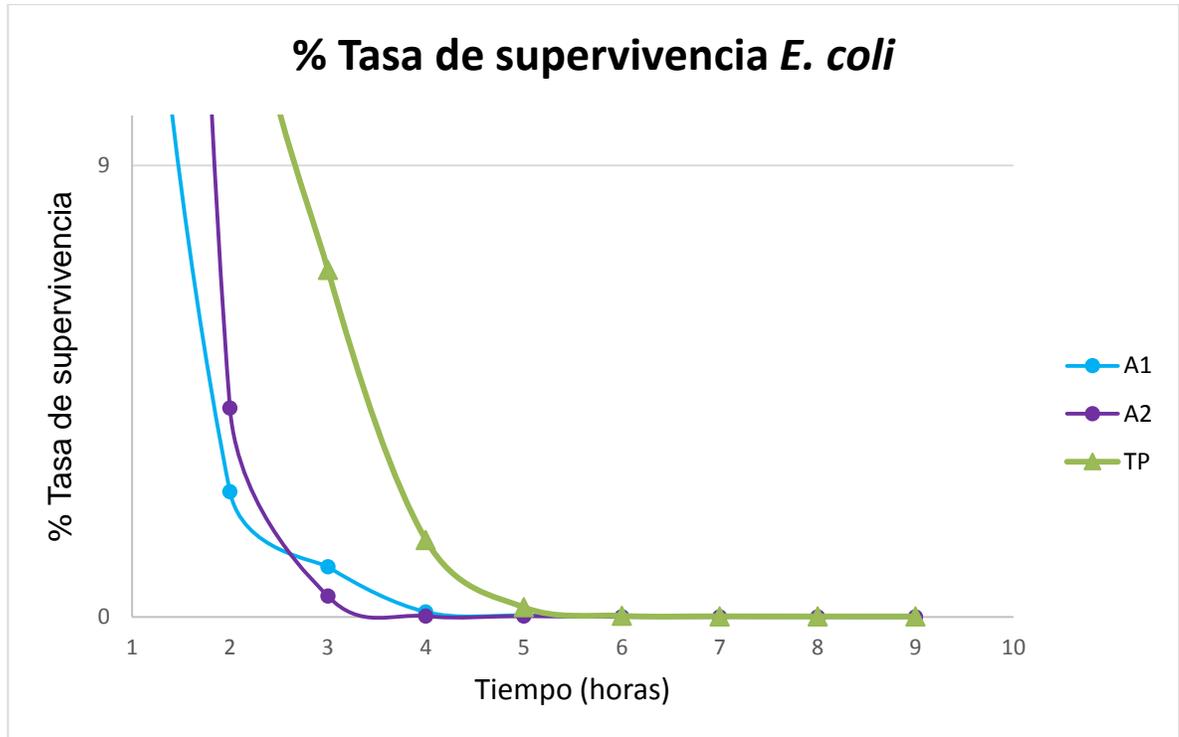
Fuente: YADAV, Hemraj M., et al. Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO₂ nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2014, vol. 280, p. 32-38.

En la imagen (a) se muestra la bacteria *E. coli* en los primeros minutos, expuesta únicamente a luz visible, su membrana está sana y sin ningún tipo de alteración.

En la imagen (b) la bacteria es tratada con las nanopartículas Cu/TiO₂ irradiadas con luz visible y después de 2 horas comienza a presentarse un deterioro en la membrana de la bacteria debido a la peroxidación de los fosfolípidos. La supervivencia en las siguientes horas es casi nula.

A continuación, se muestra la comparación de las tasas de supervivencia de la bacteria *E. coli* de las dos analistas con el trabajo preliminar.

Gráfica 9. Tasa de supervivencia de 0 a 10%.



La gráfica 9 muestra los resultados obtenidos para la tasa de supervivencia del 0 al 10%, con el objetivo de evidenciar mejor la disminución de la supervivencia del microorganismo. En la prueba realizada por los analistas, la eliminación de la bacteria en la cuarta hora presentó valores próximos al 0.017%, en la quinta hora fue casi del 0%; el trabajo preliminar presenta en la cuarta hora un porcentaje de destrucción del 1,538 %, para la quinta hora su porcentaje desciende a 0,194%. Se presentó una inactivación más rápida en los experimentos realizados por los analistas, debido a que las películas obtenidas presentaron mayor homogeneidad, lo que facilitó la absorción de los fotones, generando más fotoexcitaciones y por consiguiente, más radicales OH^* ; estas especies son las principales responsables de fotooxidación de la membrana, el Cu acogido en la red del TiO_2 mejora la transferencia de las cargas fotogeneradas, impidiendo su recombinación y provocando daños en funciones celulares.⁸²

La supervivencia después de la sexta hora es casi nula para los tres experimentos. Los datos de los resultados obtenidos de la tasa de supervivencia se encuentran en el Anexo K.

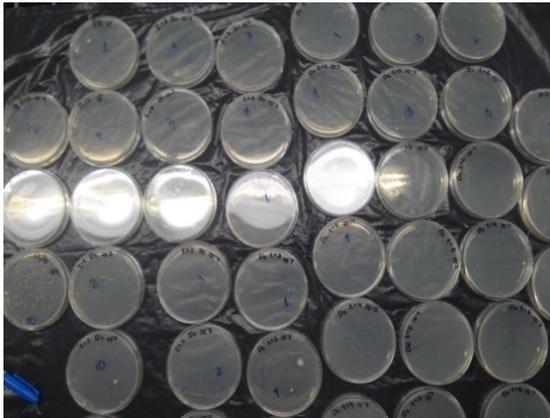
⁸² KHRAISHEH. Op. cit, p. 369-376.

En las figuras 23 y 24 se pueden observar los recuentos obtenidos en la hora 0, donde se evidencian colonias de *E. coli*, así mismo se muestran los resultados encontrados en las cajas Petri de la hora 9, que indican la eliminación total de las bacterias, una vez llevada a cabo la fotorreacción con las películas de TiO_2/CuOx .

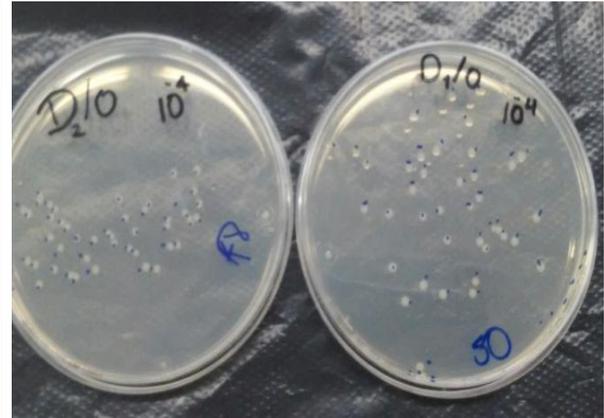
Figura 23. Resultados siembra por analista 1

(a) Cajas Petri replicas. (b) Caja Petri hora 0. (c) Caja Petri hora 9

(a)



(b)



(c)

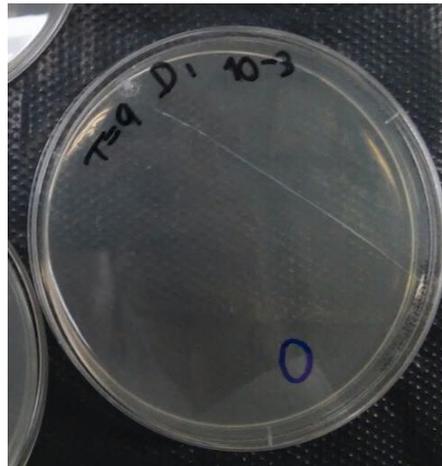
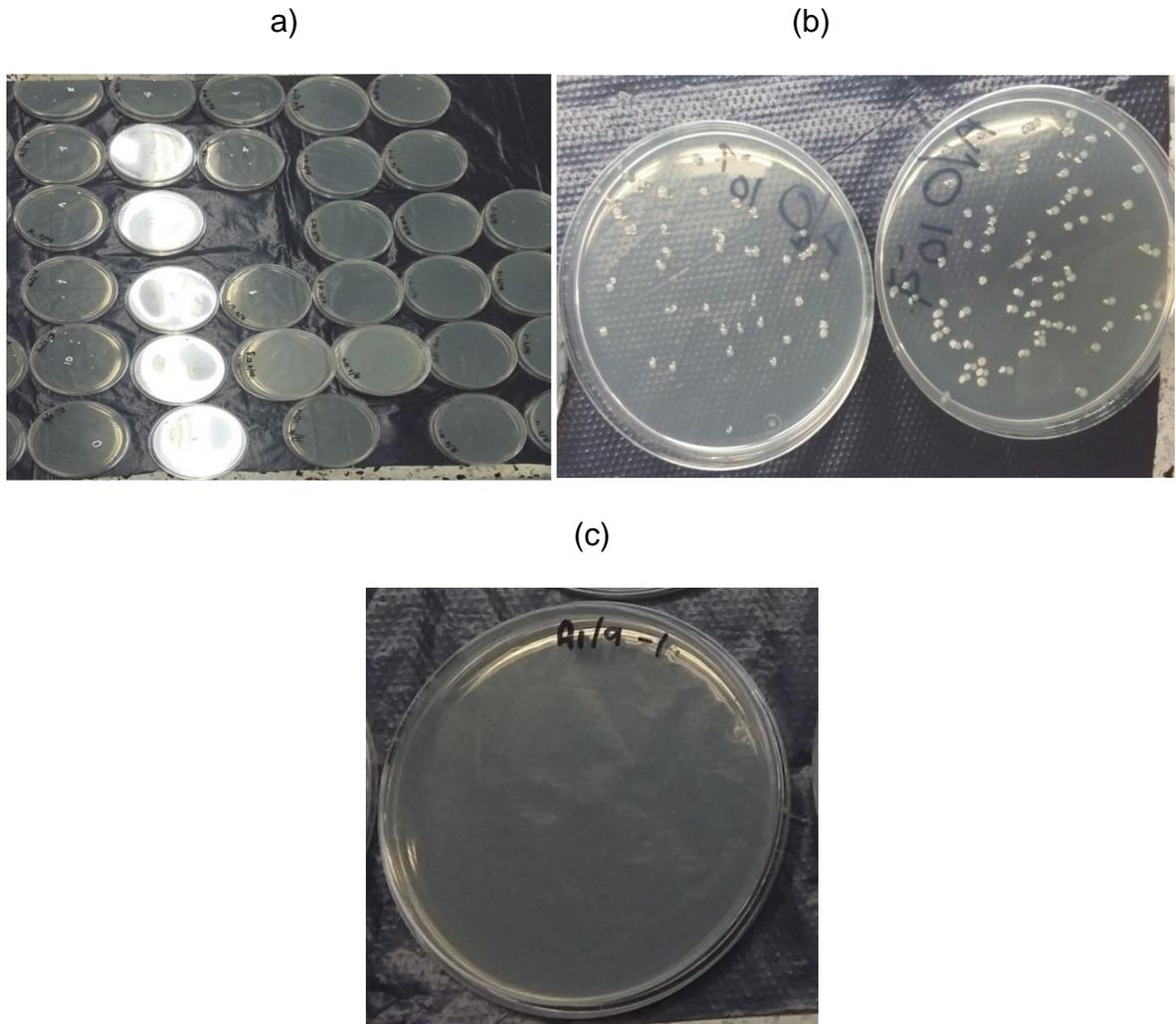


Figura 24. Resultados siembra por analista 2,

(a) Cajas Petri replicas. (b) Caja Petri hora 0. (c) Caja Petri hora 9



Luego de realizar la prueba por cuadruplicado, dos veces por analista y obtener coeficientes de variación menores al 35%, en la mayoría de las muestras de estudio, se validan los resultados obtenidos por el método fotocatalítico usando la mezcla TiO_2/CuOx en la inactivación de *E. coli*, comprobándose además que la eficiencia del método para la eliminación de la bacteria si es del 99.99%, valor reportado en el trabajo preliminar. Con el análisis estadístico se evidencio que la técnica posee una metodología repetible dados los valores de los coeficientes de variación y desviación estándar igual a 0, además de los coeficientes de correlación R de Pearson próximos a la unidad y con 95% de aceptación de los resultados, que demostraron que el método es también reproducible.

Adicionalmente en la evaluación del método fotocatalítico se tuvo en cuenta la prueba de funcionalidad de las películas elaboradas con la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$, donde se comprobó que ésta logra degradar hasta 3 ppm del azul de metileno, durante una reacción fotocatalítica de 270 min, resultado similar al encontrado en trabajos de grado que hicieron uso de esta modificación preparada por el método de impregnación húmeda, se logró establecer que todos los protocolos realizados en el presente trabajo son importantes para elaborar películas delgadas de $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ soportadas en láminas de vidrio, con apariencia homogénea, que presentan las mismas características estructurales y morfológicas, donde su efecto de inactivación sobre la bacteria *E. coli* va a ser igual, dando eficiencias próximas al 100%.

4. CONCLUSIONES

- Al realizar la validación del método se comprobó que usando la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ a la temperatura de calcinación de 550°C , en presencia de luz visible, se logra la inactivación de la bacteria *E. coli* en un 99,99%.
- En la elaboración de las películas por el método de spin Coating se determinó que a 1000 rpm se obtienen películas más homogéneas, que a su vez presentan mayor degradación de azul de metileno, de hasta 3 ppm, comparadas con las elaboradas a 2000 rpm y 3000 rpm, que logran en promedio degradar 2,5 ppm una solución de A.M.
- La caracterización morfológica de las películas se realizó mediante un análisis SEM, donde se evidenció que las películas que presentaron mayor degradación son las de superficie más homogénea, con aglomerados más pequeños, características correspondientes a las películas elaboradas a 550°C , en el análisis estructural por DRX se evidenció que la fase cristalina predominante en las películas de $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$ es la anatasa, lo que favoreció la fotorreacción en el espectro visible.
- Con el análisis estadístico se comprobó que la técnica de inactivación estudiada presenta una metodología que es repetible y reproducible, dados los coeficientes de variación inferiores al 35%, obtenidos al realizar la prueba por cuadruplicado.
- Los coeficientes de correlación obtenidos en las gráficas de inactivación del microorganismo, presentaron un 96% de validez en sus resultados, demostrando así la capacidad microbicida de la mezcla $\text{TiO}_2/\text{CuO}_x$.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar los ciclos de trabajo de las películas elaboradas con la mezcla TiO_2/CuOx , para tener un estimado de su vida útil.
- Se recomienda evaluar la eficiencia de desinfección de las películas de TiO_2/CuOx , con una muestra de agua de río.
- Se recomienda evaluar la actividad fotocatalítica de las películas con luz solar.
- Se recomienda evaluar la capacidad microbicida de la mezcla TiO_2/CuOx sobre otros microorganismos.
- Se recomienda establecer un modelo que relacione la capacidad de degradación del azul de metileno con la inactivación de *E. coli*, empleando las películas de TiO_2/CuOx en el espectro de luz visible.

BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, P. and KASHYAP, B. Regression analysis and categorical agreement of fluconazole disk zone diameters and minimum inhibitory concentration by broth microdilution of clinical isolates of *Candida*. En: JOURNAL DE MYCOLOGIE Médicale/Journal OF MEDICAL MYCOLOGY. 2017

AHMED, Saber, et al. Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: a short review. En: JOURNAL OF ENVIRONMENTAL MANAGEMENT. 2011, vol. 92, no. 3, p. 311-330

ALLOCATI, Nerino, et al. *Escherichia coli* in Europe: an overview. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH. 2013, vol. 10, no. 12, p. 6235-6254

APONIENE, Kristina and LUKSIENE, Zivile. Effective combination of LED-based visible light, photosensitizer and photocatalyst to combat Gram (-) bacteria. En: JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY. 2015, vol. 142, p. 257-263

BARAM, Nir, et al. Enhanced inactivation of *E. coli* bacteria using immobilized porous TiO₂ photoelectrocatalysis. En: ELECTROCHIMICA ACTA. 2009, vol. 54, no. 12, p. 3381-3386

BENABBOU, AK, et al. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL. 2007, vol. 76, no. 3, p. 257-263

BORKOW, Gadi and GABBAY, Jeffrey. Copper as a biocidal tool. En: CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY. 2005, vol. 12, no. 18, p. 2163-2175

Bustamante, N. (2016, 11 de mayo). "Casos de EDA se disparan en el Cesar". *El Pílon*. Recuperado el 11 de octubre de 2016, en <http://elpilon.com.co/casos-eda-se-disparan-cesar/>.

CARRILLO ZAPATA, Eliza Marcela y LOZANO CAICEDO, Aura María, Validación Del Método De Detección De Coliformes Totales y Fecales En Agua Potable Utilizando Agar Chromocult. Trabajo de grado, Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2008.

CHATTERJEE, Debabrata and DASGUPTA, Shimanti. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. En: JOURNAL OF

PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY C: PHOTOCHEMISTRY REVIEWS. 2005, vol. 6, no. 2, p. 186-205

CHEN, Yanmin, et al. Naturally occurring sphalerite as a novel cost-effective photocatalyst for bacterial disinfection under visible light. En: ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY. 2011, vol. 45, no. 13, p. 5689-5695

CORTÉS, Alejandra; SANDINO, Cecilia y ARIAS, Janeth. Validación de la prueba de esterilidad para vacunas virales preparadas en vehículos oleoso y acuoso. En: REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA. 2003, vol. 45, p. 1

DUFFAU, Boris, et al. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. En: ASPECTOS GENERALES SOBRE LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS. SANTIAGO DE CHILE: DEPARTAMENTO DE SALUD AMBIENTAL. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2010

FINČUR, Nina L., et al. Removal of alprazolam from aqueous solutions by heterogeneous photocatalysis: Influencing factors, intermediates, and products. En: CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. 2017, vol. 307, p. 1105-1115

FISHER, Mike B., et al. Nitrogen and copper doped solar light active TiO₂ photocatalysts for water decontamination. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL. 2013, vol. 130, p. 8-13

GAO, Minghui, et al. The role of catalase and H₂O₂ in photocatalytic inactivation of Escherichia coli: genetic and biochemical approaches. En: CATALYSIS TODAY. 2016, vol. 266, p. 205-211

GARCÉS GIRALDO, Luís Fernando, et al. La fotocatalisis como alternativa para el tratamiento de aguas residuales. 2012

GAYA, Umar Ibrahim and ABDULLAH, Abdul Halim. Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: a review of fundamentals, progress and problems. En: JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY C: PHOTOCHEMISTRY REVIEWS. 2008, vol. 9, no. 1, p. 1-12

GÓMEZ-DUARTE, Oscar G. Enfermedad diarreica aguda por Escherichia coli enteropatógenas en Colombia. En: REVISTA CHILENA DE INFECTOLOGÍA. 2014, vol. 31, no. 5, p. 577-586

GUPTA, Vivek Kumar, et al. A clerodane diterpene from Polyalthia longifolia as a modifying agent of the resistance of methicillin resistant Staphylococcus aureus. En: PHYTOMEDICINE. 2016, vol. 23, no. 6, p. 654-661

HANSEN, TA. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.2010

IBERS: INSTITUTE OF BIOLOGICAL, ENVIRONMENTAL AND RURAL SCIENCES, Aberystwyth University's, en internet: <Microbial Growth Website, http://users.aber.ac.uk/hlr/mpbb/index_files/Page299.html>

IBQ LECEA, Eduardo, 3M. Placas Petrifilm, Sensibilidad para Recuento de Coliformes Totales. [en línea] Disponible en: <http://solutions.3m.com.mx/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1318366179000&locale=es_MX&assetType=MMM_Image&assetId=1273696937831&blobAttribute=ImageFile>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización, Bogotá: el Instituto, 2008, p. 1.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: el Instituto, 2008, p. 12.

_____Referencias documentales para fuentes de informaciones electrónicas. NTC 4490. Bogotá: el Instituto, 1998, p.12

INS, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Informe del evento mortalidad por enfermedad diarreica aguda en menores de cinco años, y morbilidad en todos los grupos de edad, año 2012. [En línea] Disponible en: <<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/EDA%202012.pdf>>.

KARUNAKARAN, C., et al. Cu-doped TiO₂ nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light. En: JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE.2010, vol. 352, no. 1, p. 68-74

KHRAISHEH, Majeda, et al. Photocatalytic disinfection of Escherichia coli using TiO₂ P25 and Cu-doped TiO₂. En: JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY.2015, vol. 28, p. 369-376

LEE,Seul-Yi and PARK, Soo-Jin. TiO₂ photocatalyst for water treatment applications. En: JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY. 2013, vol. 19, no. 6, p. 1761-1769

MATSUNAGA, Tadashi, et al. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. En: FEMS MICROBIOLOGY LETTERS.1985, vol. 29, no. 1-2, p. 211-214

MICHAL, Robert, et al. Photocatalytic properties and selective antimicrobial activity of TiO₂ (Eu)/CuO nanocomposite. En: APPLIED SURFACE SCIENCE.2016, vol. 371, p. 538-546

MURCIA, JJ, et al. Study of the E. coli elimination from urban wastewater over photocatalysts based on metallized TiO₂. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2017, vol. 200, p. 469-476

OLLER, I.; MALATO, S. and SÁNCHEZ-PÉREZ, JAb. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. En: SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT.2011, vol. 409, no. 20, p. 4141-4166

OMS, Organización Mundial de la Salud, Centro de prensa, Enfermedades diarreicas. [en línea] Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>>.

ORTIZ, Diana Sofía, Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. Trabajo de grado Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. 2008. p 26-30

ORTIZ, Salomón. MÉTODOS NUMÉRICOS APLICADOS A LA INGENIERÍA, [en línea] Disponible en: <http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/c&d_9_art_16.pdf>. p. 79-82.

OXIGENO DISUELTO, Solubilidad de oxígeno en función de la temperatura y la salinidad. [en línea] Disponible en <<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-oxigeno.pdf>>

PASTERÁN, F. and GALAS, M. Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en Salmonella, Shigella y E. coli. En: DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS ANLIS “Dr. CARLOS G. MALBRÁN”. CENTRO REGIONAL DE REFERENCIA WHO-GLOBAL SalmSurv PARA AMÉRICA DEL SUR.2008

PELAEZ, Miguel, et al. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2012, vol. 125, p. 331-349

PELLER, Julie; WIEST, Olaf and KAMAT, Prashant V. Hydroxyl radical's role in the remediation of a common herbicide, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). En: THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A.2004, vol. 108, no. 50, p. 10925-10933

PENAGOS, Julio Alberto Clavijo. Sobre las reacciones de eliminación de compuestos contaminantes de aguas por fotocatalisis con TiO₂/UV: caso azul de metileno. En: ELEMENTOS.2013, vol. 3, no. 3,

PHAM, Thanh-Dong and LEE, Byeong-Kyu. Cu doped TiO₂/GF for photocatalytic disinfection of Escherichia coli in bioaerosols under visible light irradiation: application and mechanism. En: APPLIED SURFACE SCIENCE.2014, vol. 296, p. 15-23

PULGARIN, Cesar; KIWI, John and NADTOCHENKO, V. Mechanism of photocatalytic bacterial inactivation on TiO₂ films involving cell-wall damage and lysis. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2012, vol. 128, p. 179-183

RAHMANI AR, et al. Photocatalytic Disinfection of Coliform Bacteria Using UV/TiO₂, Journal of Research in Health Sciences. 2009, vol. 9, p. 1-6

REDDY, P. Venkata Laxma, et al. TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. En: ENVIRONMENTAL RESEARCH.2017, vol. 154, p. 296-303

RIZZO, Luigi, et al. Effect of solar simulated N-doped TiO₂ photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an E. coli strain in biologically treated urban wastewater. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2014, vol. 144, p. 369-378

SALIDO, Ezequiel M., et al. Phototransduction early steps model based on Beer-Lambert optical law. En: VISION RESEARCH.2017, vol. 131, p. 75-81

SANTOS, A. Ramírez; FERRAT, G. Contreras; EICHELMANN, MC Gómez. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Rev, Latinoamericana Microbiología, 2005, vol. 47, p. 92-101.

SHIEH, Kuan-Jiunn, et al. Antibacterial performance of photocatalyst thin film fabricated by defection effect in visible light. En: NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE.2006, vol. 2, no. 2, p. 121-126

SONTAKKE, Sharad, et al. Visible light photocatalytic inactivation of Escherichia coli with combustion synthesized TiO₂. En: CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. 2012, vol. 189, p. 101-107

SUÁREZ, Luis M. Caballero. Introducción a la catálisis heterogénea. Univ. Nacional de Colombia, 2002.

TEJEDOR, Miguel. Producción de H₂ mediante descomposición fotocatalítica de agua: Estudio de catalizadores Cu-TiO₂ y Ni-TiO₂. 2010

University of Louisville, Spin Coating Process Theory: de internet <http://louisville.edu/micronano/files/documents/standard-operating-procedures/SpinCoatingInfo.pdf>.2013

VELANDIA CASTELLANOS, Johana Carolina. Validación Del Método Analítico Para La Cuantificación De Bacitracina En El Laboratorio De Control De Calidad De Una Industria Farmacéutica Veterinaria Trabajo de grado, Microbiología industrial Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2008.

VERÉB, G., et al. Comparison of the photocatalytic efficiencies of bare and doped rutile and anatase TiO₂ photocatalysts under visible light for phenol degradation and E. coli inactivation. En: APPLIED CATALYSIS B: ENVIRONMENTAL.2013, vol. 129, p. 566-574

WAYNE, Daniel. Dispersión en las medidas. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición. Editorial Limusa. México. 2002.

YADAV, Hemraj M., et al. Preparation and characterization of copper-doped anatase TiO₂ nanoparticles with visible light photocatalytic antibacterial activity. En: JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY A: CHEMISTRY.2014, vol. 280, p. 32-38

YAO, KS, et al. Comparison of photocatalytic activities of various dye-modified TiO₂ thin films under visible light. En: SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY.2008, vol. 203, no. 5, p. 922-924

YAO, Mao-hai, et al. Photocatalytic activity of CuO towards HER in catalyst from oxalic acid solution under simulated sunlight irradiation. En: TRANSACTIONS OF NONFERROUS METALS SOCIETY OF CHINA.2010, vol. 20, no. 10, p. 1944-1949

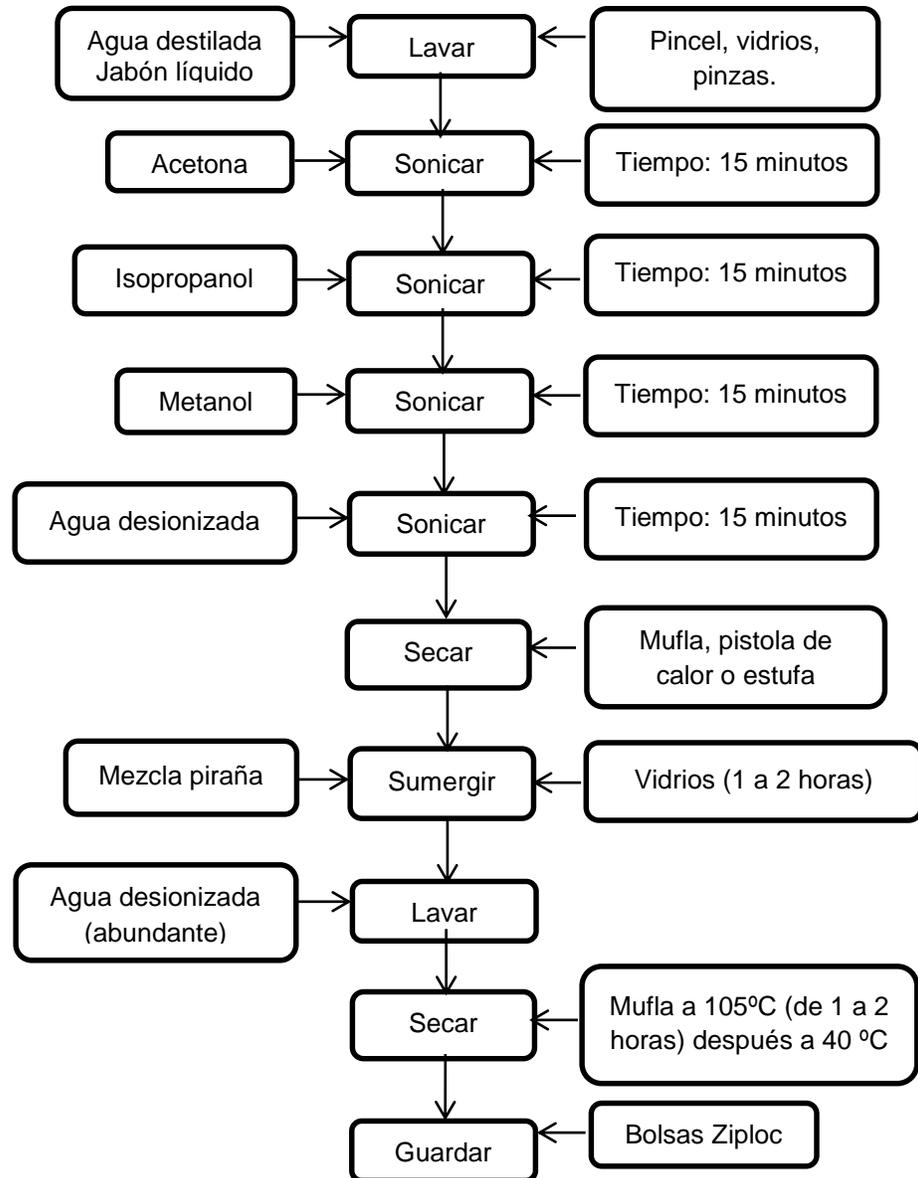
YOUSEF, Ayman, et al. Inactivation of pathogenic Klebsiella pneumoniae by CuO/TiO₂ nanofibers: a multifunctional nanomaterial via one-step electrospinning. En: CERAMICS INTERNATIONAL. 2012, vol. 38, no. 6, p. 4525-4532

YOUSEF, Ayman, et al. Cu 0-doped TiO₂ nanofibers as potential photocatalyst and antimicrobial agent. En: JOURNAL OF INDUSTRIAL AND ENGINEERING CHEMISTRY.2015, vol. 26, p. 251-258

ANEXOS

Anexo A

PROTOCOLO DE LAVADO DE VIDRIOS



Anexo B

CÁLCULOS ELABORACIÓN DE LA MEZCLA

Se inicia con la preparación de una solución de 100 mL y una concentración de 0,05 M de Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), a continuación, se presenta la cantidad de reactivo que debe ser adicionado al volumen antes mencionado.

$$\frac{0,05 \text{ n CuSO}_4}{1 \text{ L}} * \frac{249,7 \text{ g}}{1 \text{ n}} = 12,485 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Se debe utilizar 1,248 g de precursor en 100 mL de agua destilada.

Anexo C

CÁLCULOS CONCENTRACIÓN DEL PRECURSOR

La concentración requerida del precursor es de 1,3% P/V del TiO_2 para la conocer la cantidad requerida en la etapa de agitación para la activación de la mezcla, se realizó el siguiente cálculo:

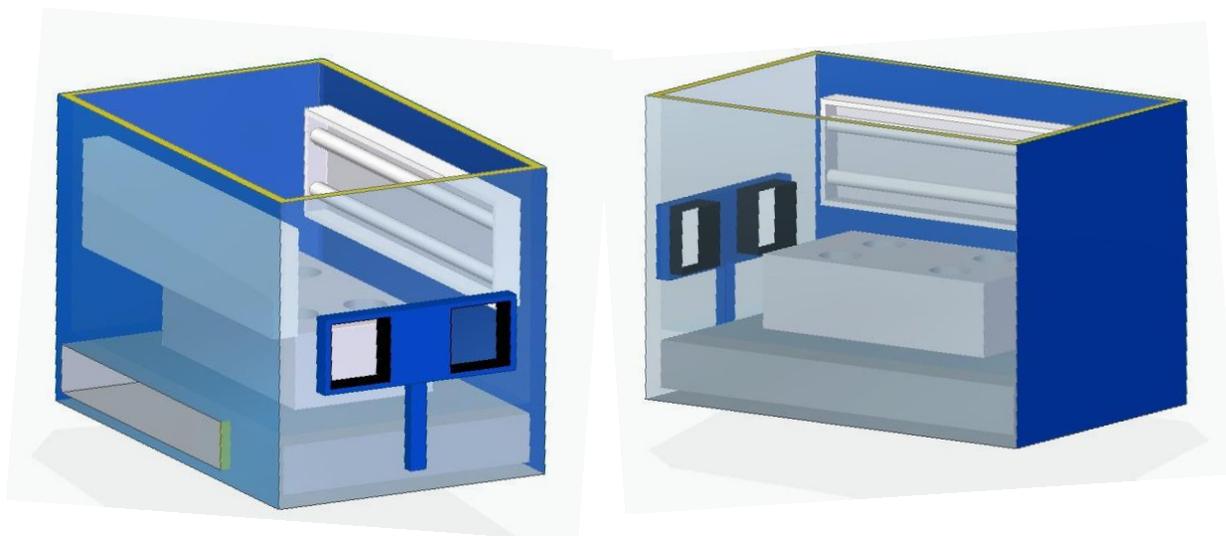
$$1,3\% \frac{g CuSO_4}{g TiO_2} * 0,4 g TiO_2 = 0,0052 g CuSO_4$$

Conocida la cantidad de precursor se decide utilizar la solución de 0,05 M preparada anteriormente debido a que el valor obtenido es mínimo, el cálculo se presenta a continuación:

$$\frac{0,0052 g CuSO_4}{249,7 \frac{g}{n} * 0,05 \frac{n}{L}} = 0,00042 L$$

Para medir ese volumen se empleó una micropipeta, tomando 420 μL de la solución de 0,05 M del $CuSO_4$, obteniendo así la concentración deseada del precursor.

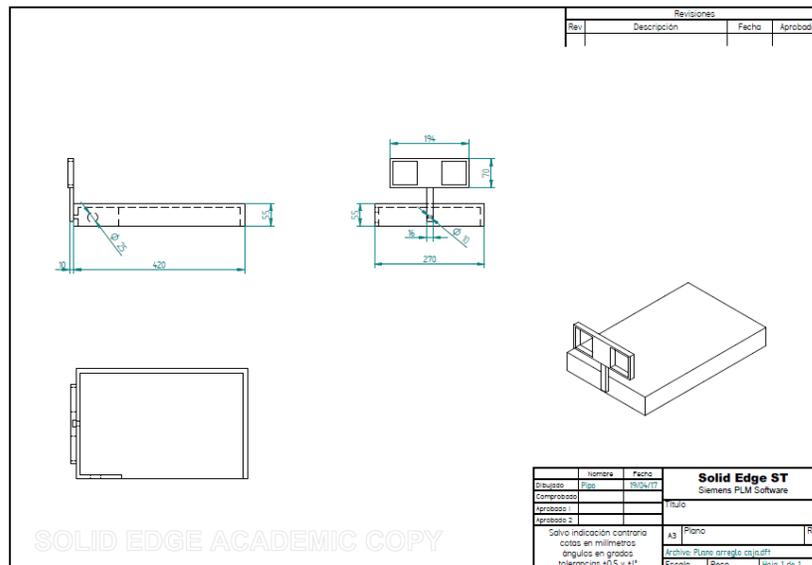
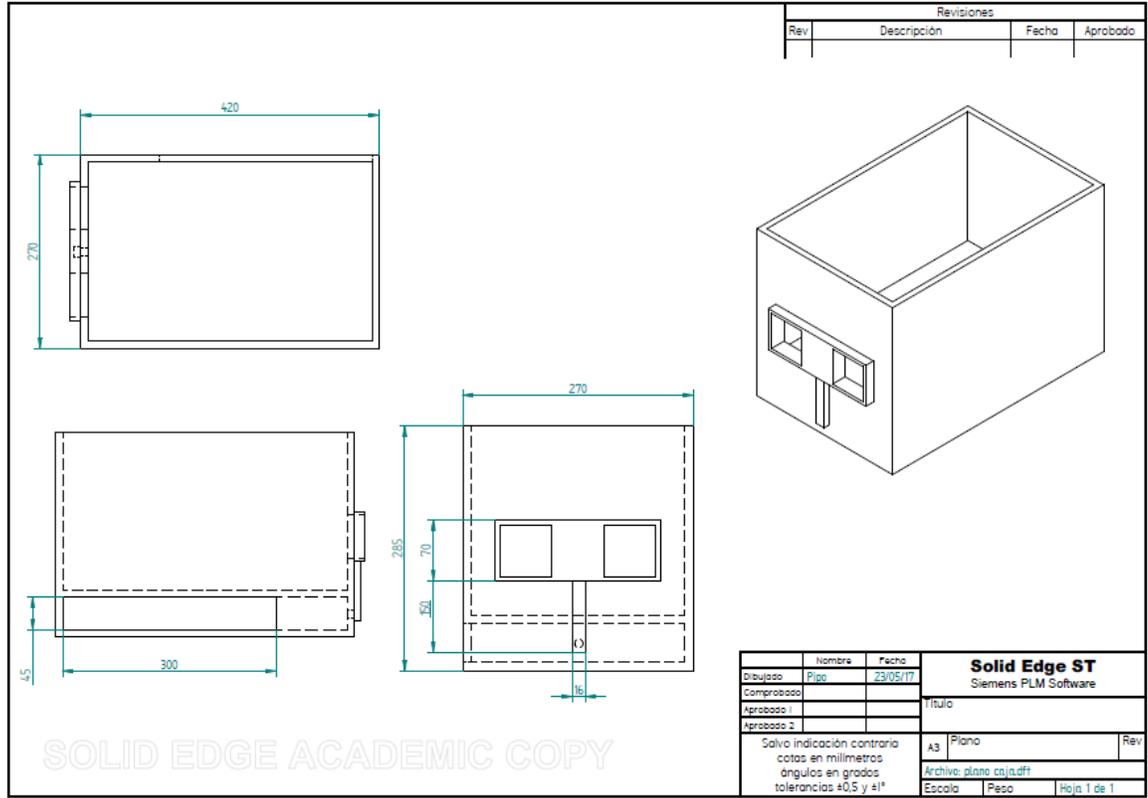
Anexo D
PROTOTIPO FOTORREACTOR



Dibujo por: Felipe Pinto

Anexo E

PLANOS FOTORREACTOR



Planos por: Felipe Pinto

Anexo F

DEGRADACIONES AZUL DE METILENO

TABLAS DE DEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO, PELICULAS ELABORADAS A DIFERENTES (RPM) A (550 °C), PRUEBA CON LUZ UV.

550 ° C (1000 rpm)		550 ° C (2000 rpm)		550 ° C (3000 rpm)	
Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Concentración (ppm)
0	7,695	0	7,790	0	7,630
1	7,327	1	7,492	1	7,353
2	7,279	2	7,481	2	7,268
3	7,274	3	7,407	3	7,177
4	7,269	4	7,380	4	7,177
5	7,268	5	7,359	5	7,135
10	7,263	10	7,300	10	7,098
15	7,241	15	7,241	15	7,076
20	7,167	20	7,204	20	6,980
25	7,114	25	7,044	25	6,954
30	7,012	30	7,012	30	6,938
45	6,847	45	6,799	45	6,815
60	6,730	60	6,533	60	6,719
90	6,298	90	6,362	90	6,527
120	6,139	120	6,080	120	6,309
180	5,563	180	5,782	180	5,968
210	5,313	210	5,595	210	5,766
270	5,004	270	5,339	270	5,605

TABLAS DE DEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO, PELICULAS ELABORADAS A 3000 RPM (580 °C Y 600 °C)

580 ° C - UV (3000 rpm)		600 °C - UV (3000 rpm)	
Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Concentración (ppm)
0	7,593500266	0	7,337773042
1	7,492274907	1	7,31113479
2	7,486947256	2	7,284496537
3	7,444326052	3	7,21523708
4	7,433670751	4	7,183271177
5	7,428343101	5	7,156632925
10	7,4176878	10	7,044752264
15	7,252530634	15	6,954182206
20	7,156632925	20	6,868939798
25	7,129994672	25	6,762386787
30	6,970165157	30	6,68779968
45	6,416089505	45	6,565263719
60	6,144379329	60	6,432072456
90	5,675546084	90	6,218966436
120	5,499733617	120	6,059136921
180	5,409163559	180	5,579648375
210	5,297282898	210	5,180074587
270	5,281299947	270	4,982951518

TABLAS DE DEGRADACIÓN DE AZUL DE METILENO, PELICULAS ELABORADAS A DIFERENTES (RPM) A (550 °C), PRUEBA CON LUZ VISIBLE.

550 ° C- VIS (1000 rpm)		550 ° C - VIS (2000 rpm)		550 ° C -VIS (3000 rpm)	
Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Concentración (ppm)
0	7,657432072	0	7,652104422	0	7,52956846
1	7,252530634	1	7,620138519	1	7,705380927
2	7,279168887	2	7,694725626	2	7,700053277
3	7,161960575	3	7,689397975	3	7,641449121
4	7,177943527	4	7,678742674	4	7,63612147
5	7,156632925	5	7,63612147	5	7,625466169
10	7,119339371	10	7,609483218	10	7,588172616
15	7,114011721	15	7,534896111	15	7,577517315
20	7,10335642	20	7,518913159	20	7,572189664
25	7,098028769	25	7,449653703	25	7,572189664
30	7,028769313	30	7,438998402	30	7,566862014
45	6,741076185	45	7,2252530634	45	7,556206713
60	6,58124667	60	7,225892381	60	7,513585509
90	6,522642515	90	6,99680341	90	7,337773042
120	6,187000533	120	6,820990943	120	7,289824188
180	5,883324454	180	6,480021311	180	7,055407565
210	5,686201385	210	6,426744806	210	6,802344166
270	5,478423015	270	6,091102824	270	6,773042088

Anexo G
FICHA TÉCNICA INCUBADORA



Kalibrier-Zertifikat

Calibration Certificate

Zertifikat-Nr.	certificate no.	215.2180
Gegenstand	description of instrument	Brutschrank
Typ-Bezeichnung	instrument type	IN110
Hersteller	manufacturer	MEMMERT GmbH + Co.KG
Geräte-Nr.	instrument no.	D415.0410

Hiermit bestätigen wir, dass das oben genannte Gerät, unter Beachtung eines zertifizierten vollständigen Qualitätssicherungssystems (nach: 1) Richtlinie 93/42/EEG, Anhang II; 2) DIN EN ISO 13485; 3) DIN EN ISO 9001), kalibriert wurde.

Die für die Kalibrierung verwendeten Meßeinrichtungen werden regelmäßig kalibriert und sind rückführbar auf die nationalen Normale der Physikalisch Technischen Bundesanstalt (PTB) Deutschlands oder auf andere nationale Normale. Wo keine nationalen Normale existieren, entspricht das Meßverfahren den derzeit gültigen technischen Regeln und Normen. Die für diesen Vorgang angefertigte Dokumentation kann bei Bedarf eingesehen werden. Alle erforderlichen Meßdaten sind auf dieser Seite des Kalibrierzertifikates aufgelistet.

We hereby confirm that the above mentioned unit was calibrated under the observation of a certified full quality assurance system (according: 1) Directive 93/42/EEC, Annex II; 2) DIN EN ISO 13485; 3) DIN EN ISO 9001).

The measuring installation used for calibration are regularly calibrated and are based on the national standards of the German Federal Physical and Technical Institute (PTB) or on the national standards. Should no national standards exist, the measuring procedure corresponds with the technical regulations and norms valid at the time of the measurement. The documents established for this procedure are available for reference. All the necessary measured data can be found on this page of the calibration certificate.

Kalibriervorschrift / calibration instruction	Memmert D32779/D32780 <small>(berücksichtigt DIN ISO 9000 II, DIN 1319, DIN 10012)</small>
Meßeinrichtungen / measuring installations <small>Traceable by certificate N° 9956 D-K-15141-01-00 2013-07</small>	AKS-calibration line N°2 reference sensor PT100 N°105
Umgebungsbedingungen / environment	24,0 °C ± 1 °C

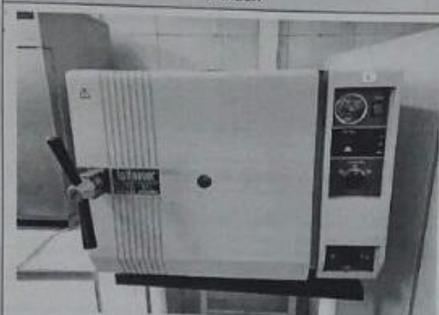
	Sollwert nominal value	Istwert-Anzeige actual value	Referenz-Messwert in Raummitte value of reference measuring in the middle of the interior
Temperatur / temperature	37,0 °C	37,0 °C	37,2 °C

Kalibrierdatum / date of calibration 15.06.2015	Dieses Kalibrierzertifikat wurde automatisch erstellt und ist ohne Unterschrift gültig. <i>This calibration certificate was produced automatically and is valid also without signature.</i>
----------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

memmert - Kalibrierservice

Anexo H

FICHA TÉCNICA AUTOCLAVE

NOMBRE DEL EQUIPO:		AUTOCLAVE		
IMAGEN		INFORMACIÓN GENERAL		
		Nº Placa de Inventario PUJ:	PUJ - 137083	
		Nº Identificación Interno:	137083	
		Ubicación:	LAB 130	
		Marca:	TUTTAUNER	
		Modelo:	3870ML	
		Serie:	2801868	
		Fabricante:	TUTTAUNER	
		Fecha de recepción:		
Fecha inicio de servicio:				
Proveedor:	TUTTAUNER			
Factura Nº / Valor:				
CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS A CONTROLAR				
Temperatura de trabajo:	Humedad de trabajo:	Corriente: MONOFASICO		
Rango de Medición:	Rango de trabajo:	Voltaje: 127 V		
Clasificación del equipo:	Medición:	Auxiliar: X	Patrón:	
COMPONENTES O ACCESORIOS				
Nombre-Marca	Modelo	Serie	Nº Placa Inventario PUJ	
DOCUMENTACIÓN DE SOPORTE				
Nombre del Documento	Idioma	Cantidad	Lugar de Archivo	
CONDICIONES DE INSTALACIÓN				
CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS				
MEDIDAS	APLICA		MEDIDA	UNIDADES
	SI	NO		
Exactitud:				
Precisión:				
Escala de medición:				
Otra especificación metrológica conocida. Cual (es)?				
División de escala				
INTERVENCIONES METROLÓGICAS APLICABLES				
ACTIVIDAD	APLICA		PERIODICIDAD SUGERIDA	
	SI	NO		
Mantenimiento preventivo:	X		SEMESTRAL	
Verificación externa:	X		SEMESTRAL	
Verificación interna:	X		SEMESTRAL	
Calibración:				
POSIBLES PROVEEDORES DE MANTENIMIENTO ESPECIALIZADO AUTORIZADO				
Empresa:	EQUITECNOS LTDA			
Dirección:	CRA 67 No 9A-04			
Ciudad:	BOGOTÁ			
Teléfono:	290 7505	Fax:		Móvil:

ANEXO H (CONTINUACIÓN)



CRA 67 N° 9A - 04 TEL 2907505
www.sterlief.com
ventas@equitecnos.com

ORDEN DE SERVICIO
CONSECUTIVO N° **S4899**

1. INFORMACION DEL CLIENTE

CLIENTE	PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA	EQUIPO	AU <input checked="" type="checkbox"/> CF <input type="checkbox"/> CE <input type="checkbox"/> CB <input type="checkbox"/> BLH <input type="checkbox"/> HD <input type="checkbox"/> OT <input type="checkbox"/>
DEPENDENCIA	Laboratorio	MARCA	TUTTAUNER
ENCARGADO	Dña. Pauline Molina	MODELO	3870ML
OPERARIO		REFERENCIA	
DIRECCION	Cra 7 NO. 40-62	FECHA DE SOLICITUD	15-feb-16
TELEFONO	8625207	FECHA EJECUTADA	18-feb-16 HRA. SERV.

2. TIPO DE ORDEN

ORDEN <input checked="" type="checkbox"/>	CONTRATO <input type="checkbox"/>	GARANTIA <input type="checkbox"/>	FACTURA SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
-------------------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------

3. TIPO DE MANTENIMIENTO

<p>3.1. POR MANTENIMIENTO PREVENTIVO POR CONTRATO</p> <p>CONTRATO <input type="checkbox"/> POSTVENTA <input type="checkbox"/></p> <p>VISITA No. 1-4 <input type="checkbox"/> 2-4 <input type="checkbox"/> 3-4 <input type="checkbox"/> 4-4 <input type="checkbox"/></p> <p>ORDEN CONTRATO N. _____ FIN G/TIA _____</p>	<p>3.2. POR MANTENIMIENTO PREVENTIVO PUNTUAL</p> <p>G/TIA X MTO <input type="checkbox"/> PUNTUAL CORREC <input type="checkbox"/> PUNTUAL PREV <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>ORDEN CONTRATO N. _____ FIN G/TIA _____</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4. INFORME DEL SERVICIO

4.1. CONCEPTO DE VISITA: MANTENIMIENTO PREVENTIVO

4.2. FALLA REPORTADA (aplica solo para mantenimiento por garantía):

4.3. DESCRIPCION DEL SERVICIO:

REVISION FIENTO ELECTRONICO <input checked="" type="checkbox"/>	REVISION SISTEMA MECANICO <input checked="" type="checkbox"/>	REVISION SISTEMA ELECTRICO <input checked="" type="checkbox"/>	LIMPIEZA DE VALVULAS <input checked="" type="checkbox"/>
AJUSTE DE LA PUERTA <input type="checkbox"/>	LIMPIEZA DE PANELES EXTERNOS <input checked="" type="checkbox"/>	OTRO, CUAL:	AJUSTES GENERALES <input checked="" type="checkbox"/>
LIMPIEZA GENERADOR VAP <input checked="" type="checkbox"/>			

4.4. CONCEPTO TECNICO:

4.5. INSTALACION DE REPUESTOS:

REPUESTO	CANT.	INSTALADO	OBSERVACION
Empaque siliconado (suministrado por la universidad).	1	Si	Funcional.

5. RESULTADOS DEL MANTENIMIENTO

5.1. CICLO DE PRE-PRUEBA

CICLO DE PRUEBA	TIEMPO	PRESION CICLO ESTERILIZACION		NUMERO DE CICLO ACTUAL	A SATISFACCION
		CAMARA	PRECAMARA		
Si	15'	20	-	-	Si

5.2. CICLOS DE PRUEBA

CICLO DE PRUEBA	TIEMPO	PRESION CICLO ESTERILIZACION		NUMERO DE CICLO ACTUAL	A SATISFACCION
		CAMARA	PRECAMARA		

Anexo I
FICHA TÉCNICA MICROPIPETA



CARACTERÍSTICAS Y DESEMPENHO
INFORMACIÓN DE PEDIDO INFORMAÇÕES PARA REQUISITAR

Acura 825, adjustable volume micropipettes

Volume μL	Division μL	Inaccuracy (E%)			Imprecision (CV%)			Tip style	Cat. No.
		Min. vol.	Mid. vol.	Max. vol.	Min. vol.	Mid. vol.	Max. vol.		
0.1 - 2	0.002	<± 6.0 % ¹⁾	<± 4.0 %	<± 2.0 %	< 5.0 % ¹⁾	< 3.3 %	< 1.5 %	Ultra 10 μl	825.0002
0.5 - 10	0.01	<± 2.5 % ²⁾	<± 1.8 %	<± 1.0 %	< 1.8 % ²⁾	< 1.2 %	< 0.5 %	Ultra 10 μl	825.0010
1 - 10	0.01	<± 2.5 %	<± 1.8 %	<± 1.0 %	< 2.5 %	< 1.6 %	< 0.7 %	200 μl	825.0010Y
2 - 20	0.02	<± 2.5 %	<± 1.8 %	<± 1.0 %	< 1.7 %	< 1.1 %	< 0.5 %	200 μl	825.0020
5 - 50	0.1	<± 1.5 %	<± 1.3 %	<± 1.0 %	< 1.0 %	< 0.7 %	< 0.4 %	200 μl	825.0050
10 - 100	0.1	<± 1.5 %	<± 1.2 %	<± 0.8 %	< 1.0 %	< 0.6 %	< 0.2 %	200 μl	825.0100
20 - 200	0.2	<± 1.5 %	<± 1.1 %	<± 0.6 %	< 0.6 %	< 0.4 %	< 0.2 %	200 μl	825.0200
100 - 1000	1.0	<± 1.5 %	<± 1.0 %	<± 0.5 %	< 0.5 %	< 0.4 %	< 0.2 %	1000 μl	825.1000

¹⁾ Measured at 0.5 μL. Indicative data at 0.2 μL: E<± 12%, CV<8%. ²⁾ Measured at 1 μL. Indicative data at 0.5 μL: E<±5%, CV<3%.

Quality Control Certificate

Instrument

MODEL/CAT. NO. : ACURA 825.0010
VOLUME RANGE : 0.5-10 μl
SERIAL NO. : 26022041 NEW

Test data

CONTROL DATE : 14-Mar-2016
OPERATOR ID : V. Davoli
BALANCE : checked against Swiss master standard
AIR TEMP : Between 20-25°C [+/- 0.5°C]
AIR PRESSURE : 976 hPa
WATER TEMP : 21.4 °C
LIQUID DENSITY : 0.997902 g/cm³
METHOD : Based on ISO 8655

Anexo J

CERTIFICADO DE ANÁLISIS MEDIO DE CULTIVO

	MICROGEN LTDA	Código: FL26
	CERTIFICADO DE ANÁLISIS	Versión: 1 Mayo 5/2016

PRODUCTO:	AGAR NUTRITIVO
LOTE:	207-17
CÓDIGO:	0410-AC
REGISTRO SANITARIO:	2014RD-0003082
FECHA DE FABRICACIÓN:	Mayo 31 de 2017
FECHA DE VENCIMIENTO:	Agosto 31 de 2017

CONTROL INTERNO

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:

Aspecto y Color del Medio Preparado: Almendra Pálido

pH Medio Preparado: 7.38

Prueba de Esterilidad:

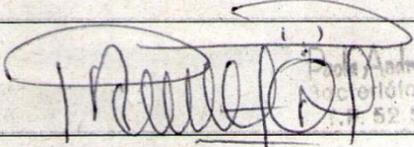
24 H	48 H	72 H
NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

CONTROL EXTERNO

ENSAYO	CEPA UTILIZADA	ATCC	DILUCIÓN	ESTANDAR	RESULTADO	CRECIMIENTO
Productividad	E. coli	25922	1/1000	≥ 100 UFC	120 UFC	Colonias medianas, morfología características de la cepa.
Productividad	S. enteritidis	8759	1/1000	≥ 100 UFC	160 UFC	Colonias medianas redondas, morfología características de la cepa.

CONCLUSIÓN:	El Agar Nutritivo cumple con las características de crecimiento exigidos por la ISO 11133, numeral 7.2.2.1.1, microbiology of food, animal feed and water - preparation, production, storage and performance testing of culture media.
--------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Bacterióloga
 Dra. Paola Andrea Ossa M.
 T.P.: 52529944



ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
PAOM	COM	Comité de Calidad

Análisis por: Microgen Ltda.

Anexo K
RESULTADOS TASA DE SUPERVIVENCIA

% Tasa de supervivencia Analista 1			% Tasa de supervivencia Analista 2		
Tiempo (horas)	PROMEDIO		Tiempo (horas)	PROMEDIO	
	UFC	% Tasa de supervivencia		UFC	% Tasa de supervivencia
0	1,00E+07	100	0	6,00E+07	100
1	2,00E+06	20	1	3,00E+07	50
2	2,50E+05	2,5	2	2,50E+06	4,16
3	1,00E+05	1	3	2,50E+05	0,41
4	1,00E+04	0,1	4	1,00E+04	0,017
5	3,00E+03	0,03	5	1,00E+04	0,017
6	5,50E+02	0,0055	6	1,00E+03	0,0017
7	2,00E+02	0,002	7	1,00E+03	0,0017
8	1,00E+02	0,001	8	2,00E+02	0,00033
9	5,00E+01	0,0005	9	5,00E+01	8,33E-05

Datos Trabajo preliminar		
Hora	UFC/mL	Log 10
0	1,30E+07	7,11394335
1	6,00E+06	6,77815125
2	2,00E+06	6,30103
3	9,00E+05	5,95424251
4	2,00E+05	5,30103
5	2,00E+04	4,30103
6	3,00E+03	3,47712125
7	1,80E+03	3,25527251
8	1,45E+03	3,161368
9	1,40E+03	3,14612804

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros Dayanna Patricia Ayala Botia y María Alejandra Vargas Buitrago en calidad de titulares de la obra **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE LA MEZCLA TiO₂/CuOx SOBRE E. coli** EN PRESENCIA DE LUZ VISIBLE MEDIANTE UN MÉTODO DE VALIDACIÓN, elaborada en el año 2016, autorizamos al Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establezco establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la licencia Creative Commons que se señala a continuación:

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	X
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	

Licencias completas: http://es.creativecommons.org/?page_id=18

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D.C. a los 16 días del mes de Agosto del año 2017.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Dayanna Patricia	Ayala Botia
Documento de identificación No	Firma
1'026.289.803	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Maria Alejandra	Vargas Buitrago
Documento de identificación No	Firma
1'019.081.731	