

# Capítulo 4

## Evaluación de propiedades fisicoquímicas de sustratos

### 4.1. Introducción

En el presente Capítulo se evaluarán las propiedades fisicoquímicas de los sustratos que podrían ejercer alguna influencia sobre los procesos de adhesión bacteriana. En particular se estudiarán las propiedades de mojado y carga superficial. También se analizará el comportamiento electroquímico de los metales en soluciones de interés biológico que contienen sustancias orgánicas.

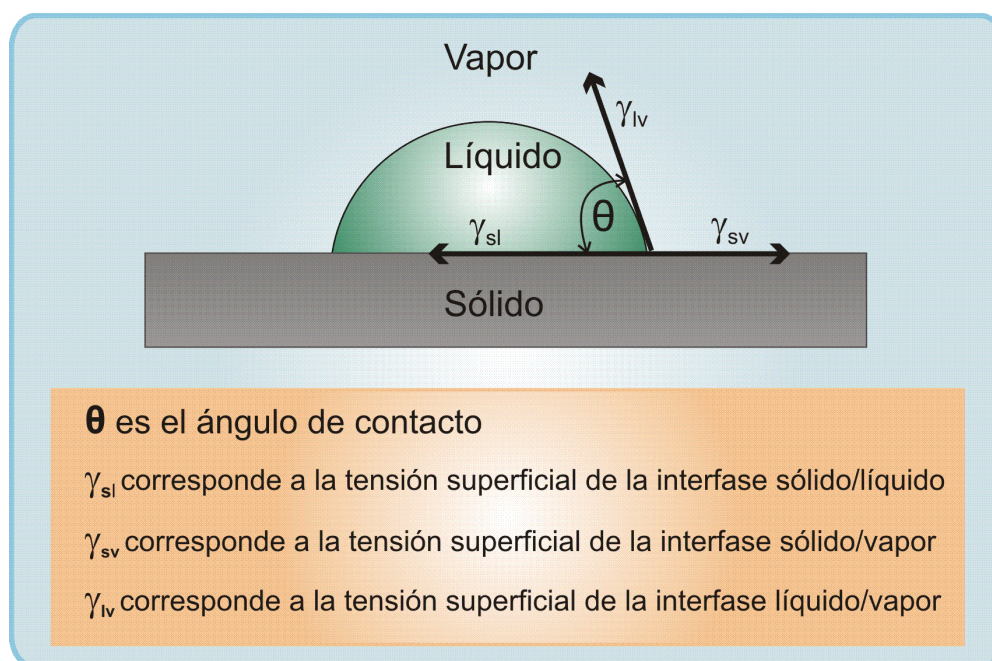
## 4.2. Propiedades de mojado. Ángulos de contacto

Las mediciones de ángulos de contacto es un método fiable para caracterizar la interacción entre un líquido y una superficie. Cuando la gota de agua no penetra en el sustrato, la interacción puede ser caracterizada por un ángulo de contacto si la superficie es suave y homogénea. Cuando el líquido penetra o se expande en el sustrato la interacción puede ser caracterizada por el ángulo de contacto dinámico como función del tiempo.

El ángulo de contacto es una función de la tensión superficial del líquido y de la energía libre superficial del sustrato. Puede evaluarse mediante una gota de un líquido puro dispuesta sobre un sólido. El ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor, cuyo vértice está donde las tres interfaces se encuentran, constituye el ángulo de contacto (Figura 4.1).

La ecuación de Young que se muestra a continuación describe las interacciones entre las fuerzas de adhesión y cohesión y a partir de esta ecuación puede determinarse la energía superficial por unidad de área.

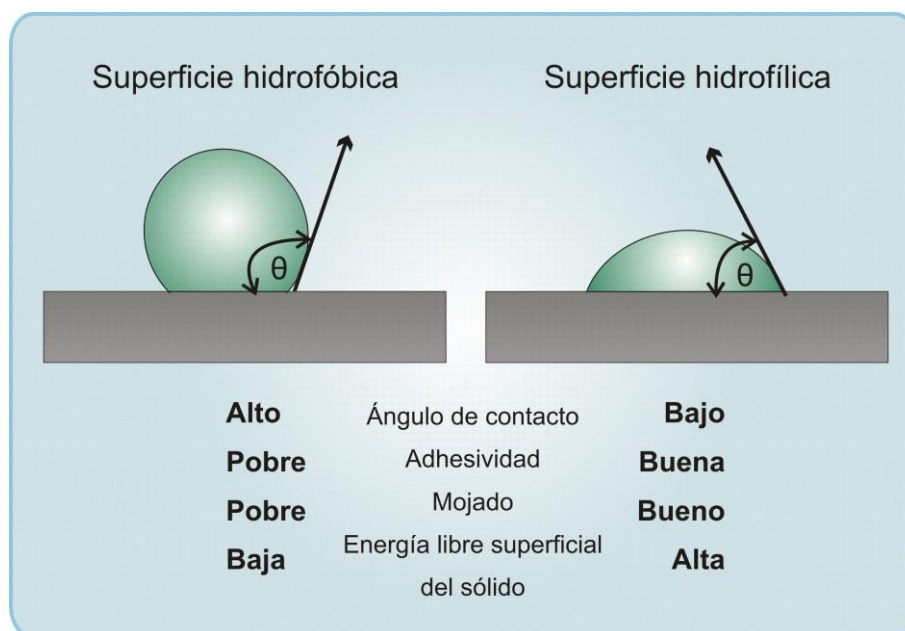
$$\gamma^{sv} = \gamma^{sl} + \gamma^{lv} \cos\theta$$



**Figura 4.1.** Esquema representando el ángulo formado entre la interfaz sólido/líquido y la interfaz líquido/vapor y el vértice en el que las tres interfaces se encuentran constituye el ángulo de contacto

Una superficie en la cual la gota forma un ángulo de contacto mayor que  $90^\circ$ , es una superficie hidrofóbica. Esta condición implica que la mojabilidad, adhesividad y la energía superficial del sólido son bajas. En cambio, si la superficie es hidrofílica, se

observará un ángulo de contacto menor a  $90^\circ$  y tanto la mojabilidad, adhesividad como la energía superficial del sólido serán altas (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Esquema representando los ángulos de contacto de una superficie hidrofóbica e hidrofílica y las distintas propiedades de los mismos.

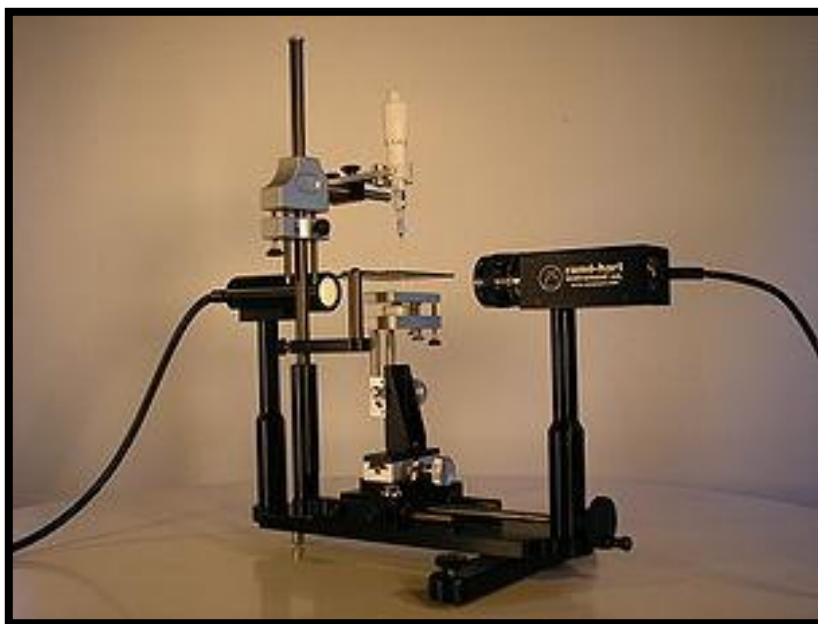
#### 4.2.1. Evaluación de ángulos de contacto de sustratos

El método empleado para determinar el ángulo de contacto se basa en el método de la gota yacente que surge a partir del método de mojabilidad. El ángulo de contacto  $\theta$  puede medirse con un instrumento llamado goniómetro, que realiza mediciones estáticas y dinámicas de los ángulos de contacto. En nuestro caso, se empleó la medición estática debido a que los sustratos utilizados son superficies planas, rígidas, químicamente homogéneas y además el líquido no penetra en los sustratos. Se deposita una gota de agua y se mide el ángulo de contacto haciendo una captura digital de la imagen y utilizando programas informáticos específicos.

Para determinar los componentes de tensión superficial de las superficies, se necesitan realizar medidas de ángulos de contacto utilizando líquidos con propiedades de tensión superficial conocidas. Los líquidos más frecuentemente utilizados son el agua ( $\gamma=72,75$  mN/m donde  $\gamma$  es la tensión superficial a  $20^\circ\text{C}$ ) y formamida ( $\gamma=58,20$  mN/m) como solventes polares y diiodometano ( $\gamma=50,80$  mN/m) como solvente no polar (1-2). El agua fue seleccionada como el líquido más adecuado para los ensayos debido a que el

mismo puede utilizarse tanto para superficies abióticas (metales, polímeros, etc) como para la determinación de la hidrofobicidad de la superficie del microorganismo (3), tal cual se describe en el Capítulo 5.

La determinación de los ángulos de contacto correspondientes a los diferentes sustratos utilizados en este trabajo, se realizó mediante el empleo de un goniómetro Ramé Hart 200 (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Equipo Ramé-Hart utilizado para la medida de los ángulos de contacto.

Cada dato de ángulo de contacto determinado es el resultado del promedio de 10 medidas de ángulos de contacto estáticos medidos tanto en la zona derecha como izquierda de la gota formada sobre la superficie en estudio. Estas imágenes fueron analizadas con un software específico, DROP Image Advanced 2.2v. El tipo de imagen y los datos que se obtienen se muestran en la Figura 4.4.

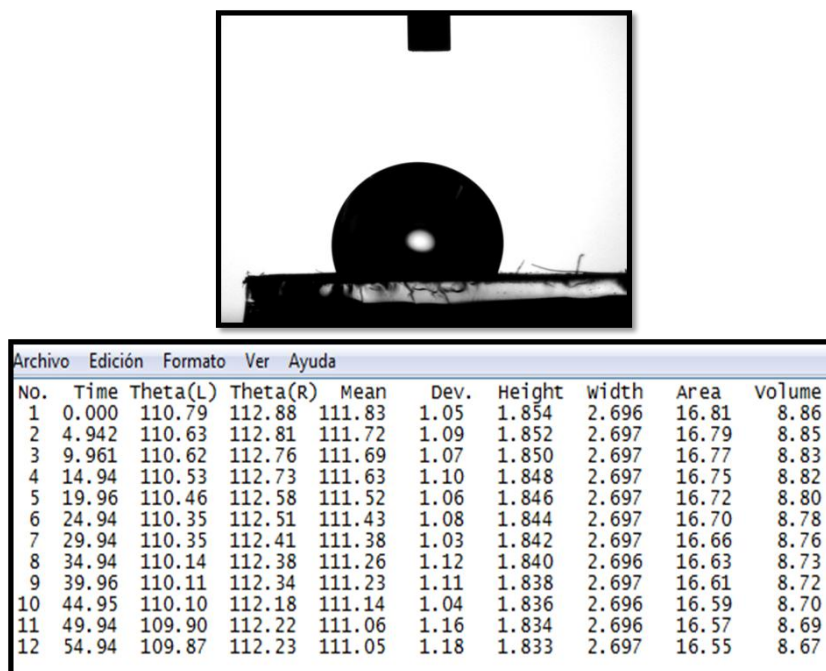


Figura 4.4. Imagen de la gota de agua bidestilada sobre una superficie obtenida con la cámara del goniómetro Ramé–Hart y las medidas obtenidas utilizando el software DROP Imagen Advanced 2.2v.

Los ángulos de contacto fueron determinados a temperatura ambiente, colocando una gota de agua bidestilada sobre la superficie del sustrato correspondiente y los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Ángulos de contacto de los diferentes sustratos

Au		Ángulo de contacto
NSa		51,7 ± 0,3
MS1		97,5 ± 0,1
NSnb		95,6 ± 0,3
Cu		Ángulo de contacto
NSa		98,6 ± 0,1
MS1		90,1 ± 0,1
PBCA		Ángulo de contacto
NSa		78,1 ± 0,1
MS1		83,7 ± 0,1
MSg		82,8 ± 0,2

Como puede observarse los mayores valores corresponden a la superficie Cu-NSa y los menores a la superficie Au-NSa. Es interesante notar que esta última difiere significativamente de los valores correspondientes a la superficie Au-MS1 y Au-NSnb. Estas diferencias no se observaron en los sustratos de Cu y PBCA.

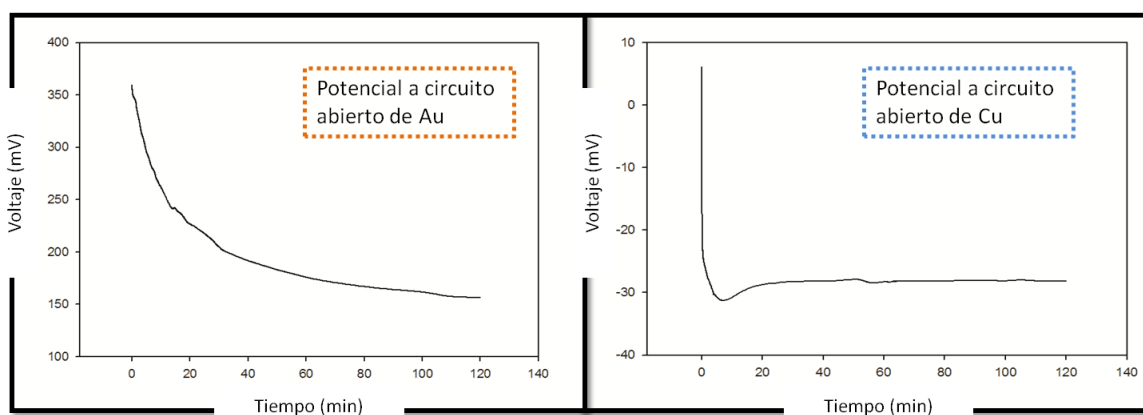
### 4.3. Determinación de la carga superficial de los sustratos metálicos.

Para la evaluación de la carga superficial de los sustratos metálicos se determinó el potencial a circuito abierto y se obtuvo de la literatura el potencial de carga cero (pcz) (4-5) y el punto isoeléctrico (PI) en el caso del Cu (6).

El potencial a circuito abierto (también conocido como potencial de reposo o potencial de corrosión) es el potencial del electrodo de trabajo relativo al electrodo de referencia utilizado, cuando no se aplica voltaje ni corriente a la celda.

El potencial fue medido contra un electrodo de calomel saturado (SCE) y mediante el empleo de un potenciostato *PAR 632 EG&G Instruments*. El contraelectrodo utilizado fue una chapa de Pt.

Para las medidas de potencial a circuito abierto, se emplearon los sustratos de Au-NSa y Cu-NSa como electrodos de trabajo y un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo como solución electrolítica. Los gráficos registrados para la determinación de los potenciales a circuito abierto de Au y Cu se muestran en la Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Potenciales de circuito abierto de un electrodo de Au y Cu con un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo como solución electrolítica.

El análisis de los gráficos anteriores muestran que los valores de potencial a circuito abierto para el Au y Cu después de 2 h de inmersión en un cultivo de *P. fluorescens* en medio nutritivo fueron los indicados en la Tabla 4.2:

**Tabla 4.2.** Potenciales a circuito abierto y potenciales de carga cero de Au y Cu vs SCE.

	Potencial a circuito abierto vs SCE	Potencial de carga cero vs SCE
Au	153 mV	-600 mV (a)
Cu	-28 mV	-310 mV (b)

(a) De la referencia (4); (b) De la referencia (5)

Para el caso del Au, el potencial a circuito abierto (153 mV) tiene un valor más positivo que el pcz (-600 mV) (4), entonces, se puede concluir que la superficie de Au presenta una carga superficial positiva.

El potencial a circuito abierto del electrodo de Cu (-28 mV) también es más positivo que el pcz (-310 mV) (5). Sin embargo, los datos electroquímicos indican que las superficies de Cu se cubren progresivamente de Cu<sub>2</sub>O en medio neutro (6), por lo tanto el PI es una variable más adecuada para la determinación de la carga superficial del sustrato de Cu. Cabe recordar que el PI es el pH al que una molécula o superficie tiene carga cero. Debe tenerse en cuenta que el valor del PI varía con la adsorción de moléculas a la superficie (7). Como el PI del Cu es aproximadamente 9,5 a 25 °C en medio acuoso, la carga superficial del Cu también es positiva debido a que el pH del medio de cultivo es 7,6.

La carga superficial del PBCA es levemente negativa (8) según datos obtenidos de bibliografía.

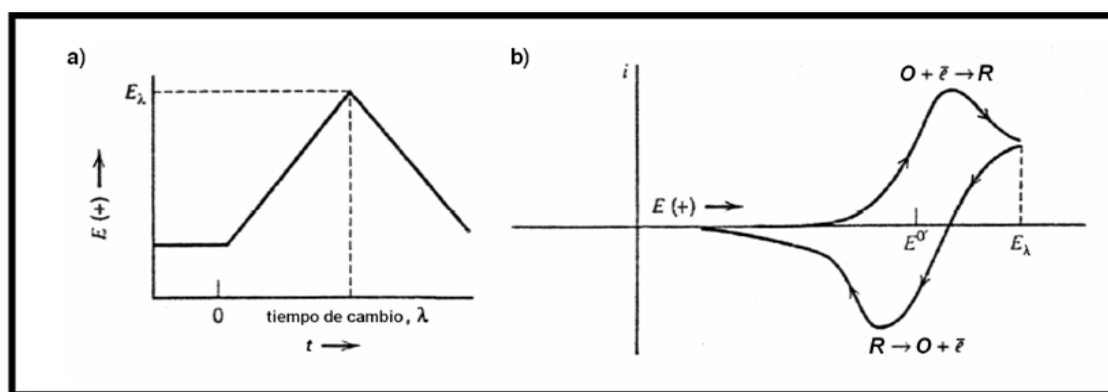
#### 4.4. Adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie de sustratos metálicos.

Para evaluar la posible adsorción de compuestos orgánicos sobre la superficie de sustratos metálicos se realizaron medidas de capacidad de la doble capa en el caso de sustratos de Au. En el caso de sustratos de Cu, se emplearon medidas de ángulo de contacto, debido a que la electroquímica de superficies de Cu oxidadas en medios que contienen cloruros es muy compleja.

Cuando dos fases de distinta composición química se ponen en contacto, entre ellas se establece una diferencia de potencial que va acompañada por una separación de

cargas: un lado de la interfaz se carga positivamente y el otro negativamente y se establece una doble capa eléctrica. En particular, cuando la interfaz consiste en un metal y un electrolito, la doble capa actúa como un capacitor que es cargado cuando la interfaz se polariza. Uno de los métodos más aceptados para estudiar especies adsorbidas es el análisis de la respuesta electroquímica del metal mediante voltamperometría cíclica en la ventana de potencial correspondiente a la doble capa. La formación de una capa de especies adsorbidas disminuye la capacidad de la doble capa, comparada con la del electrodo desnudo (9).

La voltamperometría cíclica es un tipo de medida electroquímica en donde se usa una señal de potencial que varía con el tiempo según una función lineal (10). Permite el estudio de las propiedades redox de compuestos químicos y de estructuras interfaciales. Es una herramienta útil para el estudio de la doble capa eléctrica. En la voltamperometría cíclica, el potencial aplicado varía con el tiempo según una velocidad ( $\Delta E/\Delta t$ ) determinada. Para las medidas que se llevaron a cabo en este trabajo se utilizaron variaciones lineales de potencial hasta un cierto límite anódico y luego un barrido inverso hasta el potencial inicial (Figura 4.6), es decir, curvas de barrido triangulares. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante debida al potencial aplicado. Si se grafica la corriente vs. el potencial aplicado, se obtiene un voltamperograma como el que se observa en la Figura 4.6b, que es una función de un gran número de parámetros fisicoquímicos. Estas curvas brindan información acerca de la naturaleza de la solución y de los electrodos y acerca de las reacciones que ocurren en la interfaz.



**Figura 4.6.** (a) Rampa triangular de voltaje aplicada durante la realización de un voltamperograma. (b) Ejemplo de un voltamperograma obtenido con la aplicación de una rampa triangular de voltaje.

La celda electroquímica empleada posee tres electrodos: electrodo de trabajo (ET), contraelectrodo (CE) y electrodo de referencia (ER). En este arreglo la corriente

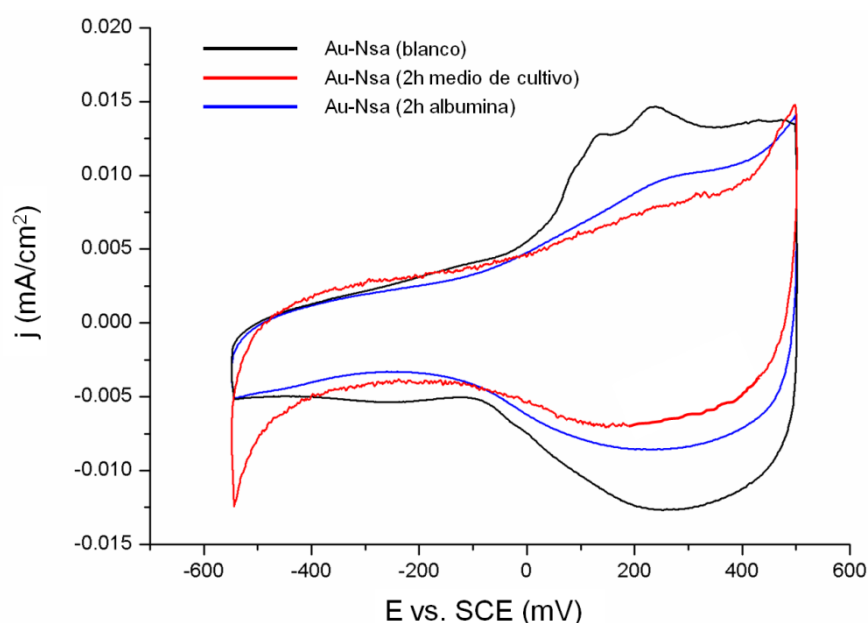


circula entre el ET y CE, y la diferencia de potencial se mide entre el ET y ER. El CT, en este caso de Pt, debe ser inerte. Como electrodos de trabajo se utilizaron sustratos de Au-NSa. Se ha utilizado un electrodo de calomel saturado (SCE) como electrodo de referencia. La solución electrolítica es una solución 0,5% p/v de NaCl.

Los sustratos de Au fueron sumergidos previamente, tanto en caldo nutritivo como en una solución de albúmina durante distintos tiempos y luego fueron utilizados como electrodos de trabajo en la celda electroquímica. La concentración de albúmina (Sigma 99.9%) utilizada para simular la concentración de la misma en sangre fue de 34 g/l. El solvente empleado para la disolución fue una solución tampón de fosfatos (PBS), 5mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , de pH 7,2.

Los voltamperogramas se obtuvieron a una velocidad de barrido de potencial de 100 mV/s.

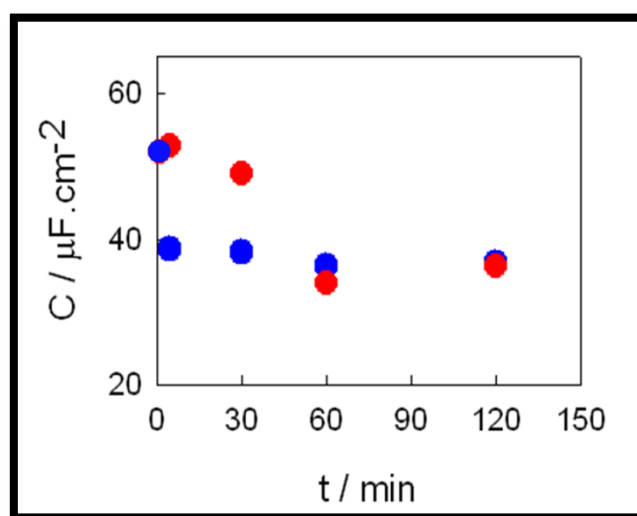
El voltamperograma de color rojo de la Figura 4.7 corresponde al sustrato de Au-NSa que fue sumergido en una disolución de caldo nutritivo durante 2 h, la misma solución que fue utilizada para el crecimiento de las bacterias y los ensayos de adhesión. El gráfico de color azul en la Figura 4.7, corresponde al electrodo de Au-NSa inmerso en una solución de albúmina durante 2 h. El voltamperograma de color negro de esta Figura corresponde al sustrato de Au-NSa limpio, sin tratamiento previo de inmersión en soluciones de compuestos orgánicos (blanco).



**Figura 4.7.** Voltamperogramas de electrodos de Au-NSa. El voltamperograma de color negro corresponde al electrodo limpio (blanco); el rojo corresponde al electrodo luego de 2 h de exposición en medio nutritivo y el azul corresponde al electrodo sumergido durante 2 h en la solución de albúmina.

Para confirmar la presencia de moléculas orgánicas adsorbidas, se calcula la capacidad de la doble capa a partir de los voltamperogramas cíclicos. La capacidad de la doble capa  $C_{dl}$  ( $\mu F\ cm^{-2}$ ), se obtuvo dividiendo la densidad de corriente total,  $j_{tot}$  ( $A\ cm^{-2}$ ), es decir el promedio de las densidades de las corrientes catódicas y anódicas ( $(j_{anódica}+j_{catódica})/2$ ) por la velocidad de barrido,  $v$  [ $V/s$ ]. Las densidades de corriente ( $j$ ), para dicho cálculo fueron tomadas a  $-200\ mV$ . El método empleado para el cálculo de las capacidades de la doble capa resulta útil para comparar cualitativamente la adsorción de moléculas orgánicas sobre los sustratos. Sin embargo, para la correcta determinación de los valores de capacidad de la doble capa se debería utilizar otro tipo de técnica, como por ejemplo la espectroscopia de impedancia electroquímica.

En el gráfico de la Figura 4.8 se muestra cómo la capacidad disminuye significativamente luego de la inmersión del electrodo de Au-NSa en el medio de cultivo (círculos rojos). Los compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo bloquean rápidamente la superficie de Au y obstaculizan la transferencia de electrones.



**Figura 4.8.** Gráfico de Capacidad (C) vs. tiempo de inmersión del sustrato de Au en caldo nutritivo (●) y en solución de albúmina (●)

En el gráfico también pueden observarse las capacidades de la doble capa del electrodo de Au-NSa (círculos azules) para los distintos tiempos de inmersión en la solución de albúmina (34 g/l). La representación gráfica muestra el mismo comportamiento, con una evidente disminución de la capacidad de la doble capa eléctrica con el tiempo en coincidencia con trabajos previos (9, 11). Sin embargo, el proceso de adsorción de proteínas es más rápido que para el caso del caldo nutritivo.

## Referencias Bibliográficas

1. Brant, J. A., y Childress, A. E. (2002) Assessing short-range membrane-colloid interactions using surface energetics, *Journal of Membrane Science* 203, 257-273.
2. Ong, Y.-L., Razatos, A., Georgiou, G., y Sharma, M. M. (1999) Adhesion forces between *E. coli* bacteria and biomaterial surfaces, *Langmuir* 15, 2719-2725.
3. Dong, H., Onstott, T. C., Ko, C.-H., Hollingsworth, A. D., Brown, D. G., y Mailloux, B. J. (2002) Theoretical prediction of collision efficiency between adhesion-deficient bacteria and sediment grain surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 24, 229-245.
4. Yu, Y., y Jin, G. (2003) Study of the adsorption of fibrinogen on gold-coated silicon wafer by an impedance method, *Journal of Colloid and Interface Science* 268, 288-292.
5. Lukomska, A., y Sobkowski, J. (2004) Potential of zero charge of monocrystalline copper electrodes in perchlorate solutions, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 567, 95-102.
6. Feng, Y., Teo, W. K., Siow, K. S., Tan, K. I., y Hsieh, A. K. (1996) The corrosion behaviour of copper in neutral tap water. Part I: Corrosion mechanisms, *Corrosion Science* 38, 369-385.
7. Torres Sánchez, R.M., Castro Luna, A.M., Zerbino, J.O. (2003) CO adsorption on copper in alkaline electrolytes: an electrochemical and ellipsometric study, *Journal of Colloid and Interface Science* 264 (1), 114-120.
8. Kusonwiriawong, C., Lipipun, V., Zhang, Q., y Ritthidej, G. C. (2008) Poly([alpha]-butyl cyanoacrylate) nanoparticles for intracellular delivery of protein: Physicochemical properties, cytotoxicity study and cellular uptake in dendritic cells, *Journal of Controlled Release* 132, e6-e8.
9. Moulton, S. E., Barisci, J. N., Bath, A., Stella, R., y Wallace, G. G. (2004) Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions, *Electrochimica Acta* 49, 4223-4230.
10. Bard, A. J., Faulkner, L.R., (Ed.) (1980) *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, New York.

11. Busalmen, J. P., Berna, A., y Feliu, J. M. (2007) Spectroelectrochemical examination of the interaction between bacterial cells and gold electrodes, *Langmuir* 23, 6459-6466.