



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

**“Efecto Biocida del Cobre Frente a
Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

José Romero Reyes
Patrocinante y Director
Químico(UCH)

Luis López Valladares
Director
Químico Farmacéutico (UCH)

Cristóbal Humberto Olea Flores

Santiago – Chile
2016

ÍNDICE GENERAL

Índice general	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	iv
Índice de gráficos	v
Resumen	vi
Summary	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Bacterias en alimentos	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2 Cobre	8
2.2.1 Consumo de cobre en personas	10
2.2.2 Presencia de cobre en agua potable	10
2.2.3 Mecanismo de acción del cobre frente a bacterias	11
2.2.3.1 Peroxidación lipídica o formación de radicales libres	12
2.2.3.2 Despolarización de la membrana	15
2.2.3.3 Interacción de iones cúprico con el ADN	18
2.2.4 Aplicaciones del cobre	22
2.2.4.1 Área de contacto constante	22
2.2.4.2 Ventilación, calefacción y aire acondicionado	22
2.2.4.3 Área de preparación de alimentos	22
3 HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
4.1 Lugar de ensayo	25

4.2	Materiales y equipos	26
4.3	Diseño de trabajo	27
4.4	Métodos	28
4.4.1	Método de dilución en caldo	28
4.4.1.1	Preparación del antimicrobiano	29
4.4.1.1.1	Preparación del Cu^{+2}	29
4.4.1.1.2	Preparación del Cu^{+1}	29
4.4.1.1.3	Preparación del Cu^0	29
4.4.1.2	Concentración mínima inhibitoria	30
4.4.1.3	Concentración mínima bactericida	30
4.4.2	Cinética de muerte de ambas cepas en diferentes superficies	31
4.4.3	Análisis estadístico	31
5	RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
5.1	Concentración mínima inhibitoria	32
5.1.1	Cobre en su estado Cu^{+2}	32
5.1.2	Cobre en su estado Cu^{+1}	35
5.1.3	Cobre en su estado Cu^0	37
5.2	Concentración mínima bactericida	38
5.2.1	Cobre en su estado Cu^{+2}	39
5.3	Cinética de muerte en tres superficie; cobre, acero inoxidable y azulejo	42
5.3.1	Cinética de muerte con una elevada carga inicial de bacterias	42
5.3.2	Cinética de muerte con una baja carga inicial de bacterias	44
5.4	Cinética de muerte en cobre: comparación entre bacterias	46
6	CONCLUSIONES	48
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8	ANEXOS	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades del cobre	8
Tabla 2	Concentraciones de Cu^{+2} utilizadas para hallar la CMI para concentraciones iniciales 10^2UFC/ml y 10^6 UFC/ml	32
Tabla 3	Concentraciones de Cu^{+1} utilizadas para determinar la CMI para concentraciones iniciales 10^2UFC/ml y 10^6 UFC/ml	35
Tabla 4	Concentraciones de Cu^{+2} utilizadas para hallar la CMB para concentraciones iniciales 10^2UFC/ml y 10^6UFC/ml	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estados de oxidación del cobre	9
Figura 2	Reacciones para la formación de ROS	13
Figura 3	Peroxidación lipídica	14
Figura 4	Corrosión de cobre metálico para la formación de Cu^{2+}	16
Figura 5	Unión de cobre a enzimas deshidratasa	18
Figura 6	Mecanismo de eliminación bacteriana	21
Figura 7	Orden de sucesos en que ocurre la muerte de bacteria en presencia de cobre	21

Figura 8	Usos del cobre	24
Figura 9	Diagrama diseño de trabajo	27
Figura 10	Método dilución de bacterias	28
Figura 11	Concentración mínima inhibitoria de Cu^{2+} , para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml	33
Figura 12	Concentración mínima bactericida de Cu^{2+} , para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/m	40
Figura13	Comparación de superficies con una elevada carga de <i>S.aureus</i>	43
Figura 14	Comparación de superficies con una elevada carga inicial de <i>E.coli</i>	43
Figura 15	Comparación entre superficies con una baja carga inicial de <i>S.aureus</i>	45
Figura 16	Comparación entre superficies con una baja carga inicial de <i>E.coli</i>	45
Figura 17	Comparación entre bacterias con una alta carga inicial	46
Figura 18	Comparación entre bacterias con una baja carga inicial	46

RESUMEN

El cobre desde el 2008 es reconocido por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, como un material que tiene propiedades antimicrobianas siendo efectivo frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*, entre otros microorganismos. Aún no está totalmente dilucidado cual es el mecanismo de su acción bactericida, pero se postulan 3 posibles mecanismos como son la formación de radicales libres, la despolarización de la membrana y la interacción del cobre con el ADN.

Se realizaron pruebas con cobre frente a dos bacterias que se encuentran principalmente en los alimentos, un Gram negativo, *Escherichia coli* y un Gram positivo, *Staphylococcus aureus*. Se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida y posteriormente se determinó la acción bactericida que presentan superficies tales como cobre (99,7%), acero inoxidable y azulejos.

La Concentración Mínima Inhibitoria para Cu^{2+} fue de 0,5 M para *E. coli* y 0,1 M para *S. aureus* al usar una concentración inicial de 10^6 UFC/ml y de 0,3 M para *E. coli* y 0,05 M para *S. aureus* para un inóculo inicial de 10^2 UFC/ml.

La Concentración Mínima Bactericida del Cu^{2+} fue de 0,6 M para *E. coli* y 0,15 M para *S. aureus* para una concentración inicial de 10^6 UFC/ml y de 0,4 M para *E. coli* y 0,1 M para *S. aureus* con un cultivo inicial de 10^2 UFC/ml. Para Cu^{1+} y Cu^0 no se obtuvo Concentración Mínima Inhibitoria ni Concentración Mínima Bactericida.

Finalmente, el análisis del efecto bactericida en superficies dio como resultado, que ambas bacterias se comportan igual frente a cobre a distintos tiempos, produciéndose la primera reducción luego de 30 min y posteriormente un ciclo logarítmico cada 15 min. No se evidenció efecto bactericida en las otras superficies ensayadas.

Por consiguiente, el cobre ejerce efectos biocida sobre estas dos cepas dependiendo de la concentración de cobre y el tiempo de exposición.

SUMMARY

Since 2008 copper has been recognized by the EPA (Environmental Protection Agency), as an antimicrobial material, being effective against *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, and other microorganisms. The mechanism of the bactericidal action from copper has not been completely elucidated, it is believed in 3 possible ways of action: the formation of free radicals, the membrane depolarization copper and the interaction with DNA.

Tests were conducted with copper against two bacteria found mainly in foods, a Gram negative, *Escherichia coli* and a Gram positive, *Staphylococcus aureus*. The Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bactericidal Concentration were evaluated and then a surface analysis in order to compare the bactericidal effect of copper (99.7%), stainless steel and tile was performed.

The Minimum Inhibitory Concentrations for Cu^{2+} was 0.5 M for *E. coli* and 0.1 M for *S. aureus* using an initial concentration of bacteria of 10^6 CFU/ml and 0.3 M for *E. coli* and 0.05 M for *S. aureus* with an initial concentration of 10^2 CFU / ml.

The Minimum Bactericidal Concentration of Cu^{2+} was 0.6 M for *E. coli* and 0.15 M for *S. aureus* when an initial concentration of bacteria of 10^6 CFU/ml was used and 0.4 M for *E. coli* and 0.1 M for *S. aureus* with an initial concentration of 10^2 CFU/ml. For Cu^0 and Cu^{1+} neither Minimum Inhibitory Concentration nor Minimum Bactericidal Concentration were obtained.

Finally, surface analysis gave as a result, that both bacteria have the same behavior against copper at different times, decreasing a log cycle at 30 min and every 15 minutes thereafter. No bactericidal effect was observed when assaying the other 2 surfaces.

Therefore, copper exerts biocide effects on these two strains depending on the copper concentration and exposure time.

1. INTRODUCCIÓN

El cobre y el oro son los metales más antiguos conocidos por el hombre y fueron descubiertos en su forma original, ya que su color brillante los hizo fácilmente visibles (EuropeanCopperInstitute, 2013).

El uso del cobre se remonta a los orígenes de la civilización hace unos 10.000 años, cuando en algún lugar del mundo el ser humano dejó de depender de las herramientas de piedra y comenzó a usar un metal disponible en la naturaleza, manipulable, dúctil y con una resistencia hasta entonces desconocida. El objeto de cobre más antiguo encontrado por los arqueólogos apareció en el norte del territorio del actual Irak y corresponde a un pendiente fabricado hacia el año 8.700 antes de Cristo (AC) (Codelco, 2013).

Un texto médico egipcio, escrito entre 2600 y 2200 AC, describe la aplicación de cobre para esterilizar el agua potable y una herida en el pecho. Los antiguos griegos de la era pre-cristiana de Hipócrates (400 AC), descubrieron el poder desinfectante del cobre hace miles de años, prescribiéndolo para enfermedades pulmonares y para purificar el agua potable (Elguindi, 2011).

En la actualidad la producción de cobre se ha multiplicado y expandido en forma global, ampliando permanentemente sus usos, aleaciones y aplicaciones. Es debido a esto que hoy la comunidad científica está mostrando interés y se está enfocando en las propiedades o aplicaciones del cobre en su uso como agente biocida (Figuroa, 2013).

La Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA, por sus siglas en inglés), reconoció el 2008 las propiedades antimicrobianas del cobre, demostrando a través de pruebas de laboratorio que a partir de dos horas de exposición a este metal, se lograba la destrucción del 99,9% de patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Antimicrobialcopper, 2012).

Unas de las posibles causas que afecta la supervivencia de estos patógenos frente al cobre es la conformación estructural de las bacterias. Estas se encuentran constituidas por una pared celular presente en el exterior de la membrana de la célula bacteriana siendo esencial para su supervivencia y que está conformada de polisacáridos y péptidos constituyendo el peptidoglicano. Las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano. En contraste, las bacterias Gram negativas tienen una pared relativamente delgada que consiste en unas pocas capas de éste (Theivasanthi and Alagar, 2011). Se cree que estas diferencias estructurales en la pared celular podrían ser una de las causas de muerte bacteriana.

En lo que se refiere al uso del cobre como agente antibacteriano en alimentos, se han realizado diversos estudios sobre la eficacia que tiene este material para inhibir el crecimiento de microorganismos. Microorganismos enteropatógenos como *Salmonella* Enteritidis y *Campylobacter jejuni*, frecuentemente causantes de infecciones intestinales asociados a la ingestión de carnes, huevos y productos lácteos, son inhibidos al ponerse en contacto con este metal (Faúndez, 2004). Es debido a lo mencionado anteriormente que la industria alimentaria está en continuo proceso de investigación para que estos microorganismos sean reducidos a concentraciones que no causen daño a la salud (Mead *et al.* 1999).

Por consiguiente, el presente estudio tiene por finalidad aportar nuevos antecedentes acerca del uso de este elemento como agente bactericida frente a dos bacterias representativas presentes en la industria alimentaria, evaluando su concentración mínima inhibitoria y concentración máxima bactericida para sus tres estados de oxidación, además de determinar la cinética de muerte en tres tipos de superficies.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacterias en alimentos

Entre los microorganismos que se encuentran en los alimentos, hay 14 patógenos de importancia según el Food and Drug Administration (FDA, 2014), de los cuales 13 corresponden a bacterias y un virus. Estos son: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* patogénica, *Listeria monocytogenes*, Novovirus (Virus del tipo Norwalk), *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Yersinia enterocolitica*.

Para efectos del presente estudio, se seleccionó de acuerdo a su prevalencia en la industria de alimentos, a un Gram negativo, *E. coli* y a un Gram positivo, *S. aureus*.

2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es parte de la flora intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el intestino, se utiliza como un indicador para detectar y cuantificar la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos (FAO, 2015).

Presenta un rango de temperatura de crecimiento de 7°C a 46°C siendo el óptimo entre 35°C y 40°C; un pH mínimo de 4,4 (3,4 para el caso de *E. coli* enterohemorrágica) y máximo de 10, siendo su pH óptimo entre 6 y 7. Puede además desarrollarse con un mínimo de actividad de agua de 0,95 (Elika, 2013).

Gran parte de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo, hay ciertos serotipos que provocan enfermedades diarreicas, en base a factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos, y que se diferencian de acuerdo a sus antígenos O y H (Doyle, 1997).

Las cepas patógenas que provocan estos trastornos intestinales son:

- i. EPEC (*E. coli* enteropatógena): se relaciona principalmente con brotes en jardines y en hospitales infantiles, pudiendo producir una diarrea grave. (Romero, 2007).
- ii. ETEC (*E. coli* enterotoxigénica): esta cepa es la causa principal de diarrea infantil en países desarrollados y frecuentemente responsable de la diarrea del viajero. (Doyle, 1997; Romero, 2007).
- iii. EIEC (*E. coli* enteroinvasora): tienen la capacidad de colonizar el colon, específicamente el epitelio de la mucosa, produciendo necrosis focales con desprendimiento de mucosa y lesiones sangrantes que se manifiestan en las deposiciones. (Romero, 2007).
- iv. DAEC (*E. coli* de adherencia difusa): estas cepas producen una diarrea leve, no elaboran toxinas termoestables o termolábiles o niveles elevados de toxinas Shiga (Stxs), no poseen plasmidios del factor de adherencia de EPEC. Se ha reportado en niños de 1 a 5 años, se desconocen las razones de selección por edad y el modo de transmisión. Es la cepa menos estudiada incluso no está completamente determinada como una enfermedad humana (Cabello, 2002).
- v. EAggEC (*E. coli* enteroagregativa): se relaciona con diarrea constante en bebés y niños de gran cantidad de países en vías de desarrollo. No tiene un tratamiento óptimo determinado (Cabello, 2002).
- vi. EHEC (*E. coli* enterohemorrágica): este tipo de cepas produce un cuadro de diarrea con colitis hemorrágica. El serotipo más conocido es

*E.coli*O157:H7, siendo la transmisión más importante por alimentos o agua y tolerando pH muy bajos, cercanos a 3,4. Las dosis infectivas son bajas, se necesitan de 100 a 200 organismos para producir una infección. El serotipo O157:H7 corresponde al 50% a 80 % de las EHEC, mientras que el porcentaje restante se divide en más de 50 serotipos, siendo los más comunes O26:H11, O103:H2, O111: NM y O113:H21. El período de incubación es de 1 a 8 días y la enfermedad dura aproximadamente 10 d, sin secuelas aparentes, pero puede llegar a producir el Síndrome Hemolítico Urémico (S.H.U.), afectando principalmente al sistema inmune, produciendo hemólisis e insuficiencia renal (Elika, 2013).

Otras cepas de *E. coli* que no producen trastornos gastrointestinales, son:

E. coli Uropatogénica: Residentes en la flora intestinal, infecta las vías urinarias adheriéndose y colonizando el periné y la uretra, migrando hacia las vías urinarias donde desencadenan una respuesta inflamatoria en el urotelio. Afecta principalmente a mujeres (Campbell, 2007).

E. coli causante de meningitis neonatal: Los factores predisponentes en las infecciones neonatales son infecciones maternas intraparto, embarazo en menos de 37 semanas, bajo peso al nacimiento y la rotura prolongada de membranas. La galactosemia, la hipoxia fetal y la acidosis pueden ser también factores de riesgo. Los neonatos con anomalías en el tubo digestivo o el del aparato genital corren un riesgo mayor de infecciones por bacterias Gram negativas. Los signos clínicos de la meningitis son fiebre, inestabilidad térmica, anomalías en la frecuencia cardíaca, respiraciones ruidosas, apnea, irritabilidad, vómitos, y diarrea.

2.1.3 *Staphylococcus aureus*

Unas de las causas más frecuentes de enfermedades alimentarias se atribuyen a *Staphylococcus aureus*, el cual produce una o más enterotoxinas que ingresan al organismo por la ingesta de alimentos contaminados. En el ser humano el microorganismo se encuentra principalmente en mucosas, piel y heridas (Doyle, 1997).

Son bacterias Gram positivas, esféricas, dependiendo de las condiciones de cultivo sus diámetros van desde los 0,5 μm hasta 1,5 μm . Son microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, inmóviles y no esporulados, fermentadores de hidratos de carbono y toleran altas concentraciones salinas (Negroni, 2009).

La especie principal y de mayor importancia del género *Staphylococcus* es *Staphylococcus aureus*. Una de sus características, que la diferencian de las otras especies, es que produce la enzima coagulasa que causa la aglomeración y coagulación de la fibrina, las otras especies son coagulasa negativa. La coagulasa es una proteína capaz de coagular el plasma citrado u oxalatado, con factores presentes en el suero.

Puede producir una variedad de enfermedades que afectan al aparato respiratorio (sinusitis, otitis, faringitis y abscesos pulmonares pleurales); al sistema nervioso (meningocefalitis); a las vías urinarias (cistitis, prostatitis, nefritis); a los músculos esqueléticos (osteomielitis, artritis, miositis); al corazón (endocarditis, miocarditis, periocarditis); a los tejidos blandos (celulitis, fascitis, abscesos, miositis); a los ojos (conjuntivitis, foliculitis); al aparato digestivo (enterocolitis, abscesos del hígado, peritonitis) y además pueden producir septicemia o shock endotóxico (Romero, 2007).

La temperatura mínima, óptima y máxima para la producción de toxinas de *Staphylococcus aureus* son 10°C, 40°C a 45°C y 48°C, respectivamente. El pH mínimo es 4,0, el óptimo es 7 a 8 y el máximo es 9,6. La actividad de agua

óptima es 0,98, y el rango para mantener la producción de las toxinas es entre 0,85 y 0,99 (Elika, 2013).

Entre los factores de patogenicidad de esta bacteria se encuentran: Adhesinas; Coagulasa; Lipasas; Hialuronidasa; Estafiloquinasa; Nucleasa; Toxina alfa o hemolisina; Toxina beta o esfingomielinasa; Toxina delta o hemolisina delta; Toxina gamma o hemolisina gamma; Leucocidina; Exfoliacina; Exotoxinas pirógenas; ADNasa y β lactamasay Enterotoxinas de las cuales se han identificado 7 (A, B, C₁, C₂, D, E y F). Estas últimas producen un cuadro gastrointestinal al ser ingeridas a través de alimentos contaminados, presentando síntomas después de 0,5 h a 6 h de consumido el alimento, provocando náuseas, vómitos, diarrea y cólicos (Romero, 2007).

El tratamiento para combatir esta bacteria es mediante antimicrobianos. El antimicrobiano de primera selección es aquel que sea resistente a las betas lactamasas, debido a que alrededor de un 50 % de estas bacterias son productoras de ellas. La meticilina se utiliza como indicador de resistencia, ya que cepas meticilina resistentes son poco vulnerables a varios antimicrobianos. Algunos de los antimicrobianos ocupados son dicloxacilina, cefalosporina de primera generación, vancomicina y teicoplanina (Romero, 2007).

2.2 Cobre

El cobre no es un metal abundante, pero se encuentra ampliamente distribuido en los sulfuros, arseniuros, cloruros y carbonatos. El mineral más común es la calcopirita, CuFeS_2 . El cobre se extrae por combustión oxidativa y fundición, o por lixiviación ayudada por microorganismos, seguida por electrodeposición a partir de soluciones de sulfato. Se utiliza en aleaciones como el latón y es completamente miscible en oro. Se oxida fácilmente de modo muy superficial con aire húmedo formándose a veces un recubrimiento verde de hidroxicarbonato e hidroxosulfato (a partir del SO_2 de la atmósfera) (Cotton, 2001).

Las propiedades del cobre se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades del Cobre

Símbolo	Cu
Número Atómico (Z)	29
Masa Atómica (u)	63,546
Punto de Fusión (C°)	1085
Punto de Ebullición (C°)	2570
Densidad (g/cm ³)	8,92
Radio Atómico	128

Barajas ,2002

Dependiendo de su estado de oxidación, el Cu puede presentarse como:

- I. Cobre metálico: Tiene estado de oxidación cero, siendo su configuración electrónica $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$, reacciona con ácido sulfúrico concentrado y caliente y con ácido nítrico a cualquier concentración. En presencia de aire el cobre reacciona con varios ácidos diluidos y también puede ser disuelto con NH_3 acuoso (Housecroft, 2006). En condiciones fisiológicas, como cuproenzimas, dos estados de oxidación de cobre son accesibles, la forma cuproso Cu (I) y la forma cúprico Cu (II).

- II. Cobre (I): también denominado Cuproso, tiene una configuración d^{10} debido a la pérdida de un electrón (Housecroft, 2006), siendo, por lo tanto, diamagnético, al tener todos sus electrones apareados por las líneas de flujo de un campo magnético externo (Stevenson, 2012). En solución acuosa solo pueden existir en equilibrio a concentraciones muy bajas (menores a 10^{-2} M). Los únicos compuestos cuprosos estables en el agua son los muy insolubles, como el CuCl o CuCN. En general la vida media del ion Cu (I) en agua es muy corta, menor a segundos (Cotton, 2001). Es muy inestable en agua en condiciones aeróbicas, debido a su propensión a someterse a reacciones de desproporción (el cobre se oxida y se reduce al mismo tiempo en una reacción), produciendo Cu (II) y cobre metálico, y debido también a la naturaleza insoluble del Cu (I) dada su baja energía de hidratación. Se requiere condiciones anaeróbicas para que se mantenga como Cu (I) en solución, y se debe tener un gran cuidado para asegurar que el cobre presente en la solución se mantenga en forma cuproso (Stevenson, 2012).
- III. Cobre (II): antiguamente llamado Cúprico. Tiene una configuración d^9 (Housecroft, 2006) por tanto es un ion paramagnético, siendo atraído por las líneas de flujo de un campo magnético (Stevenson *et al*, 2012). La mayoría de los compuestos de Cu (I) se oxidan con bastante facilidad a Cu (II) (Cotton, 2001). El Cu (II) es mucho más pequeño que el Cu (I) por tanto, su entalpia de hidratación es mucho más grande permitiendo atravesar más fácilmente membranas biológicas.

La actividad redox del cobre lo hace un potente catalizador de reacciones de tipo Fenton y Haber-Weiss, que conducen a la generación de radicales libres.

Los potenciales redox de cada estado de oxidación se ven en la Figura 1.

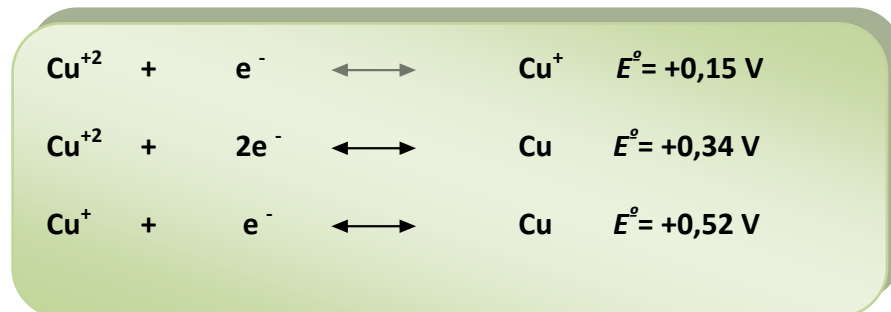


Figura 1: Estados de oxidación del cobre.

2.2.1 Consumo de cobre en personas

Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, por sus siglas en inglés), del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., se recomienda una ingesta diaria (Recommended Dietary Allowance, RDA, por sus siglas en inglés) de 340 µg/día de cobre para niños de 1 a 3 años de edad, 440 µg/día para niños de 4 a 8 años de edad, 700 µg/día para niños de 9 a 13 años de edad, 890 µg/día para niños de 14 a 18 años de edad y 900 µg/día para adultos (ATSDR, 2004). El cobre una vez que cumple con los requisitos nutricionales es liberado en la bilis para posteriormente ser excretado en las heces (Borkow et al, 2005).

2.2.2 Presencia de cobre en agua potable

La fuente más probable de exposición al cobre es el agua potable, especialmente el primer chorro de agua que sale de la llave en la mañana, después de haber estado en las cañerías de cobre durante la noche. Es conveniente, por lo tanto, dejar correr el agua por lo menos 15 seg. a 30 seg. antes de usarla (ATSDR, 2004). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, determinó que el agua potable no debe contener más de 1,3 mg de cobre por litro (Borkow et al, 2005).

2.2.3 Mecanismo de acción del cobre frente a bacterias

El cobre en bajas concentraciones es un micronutriente celular, pero en elevadas concentraciones posee actividad citotóxica (Kappes, 2012). Es un elemento que puede adoptar distintos estados de reducción, tanto oxidado como Cu (II) o en la forma reducida como Cu (I) y posee un elevado potencial redox. Debido a esta propiedad, es que el cobre es denominado tóxico para microorganismos, ya que las transiciones entre Cu (II) y Cu (I) de los iones libres pueden dar lugar a la generación de radicales superóxido e hidroxilo (Marrero *et al*, 2009).

Los efectos tóxicos del cobre han sido poco estudiados, debido a que sus efectos pleiotrópicos tienden a confundir a los investigadores, por tanto, se hace difícil conocer exactamente su mecanismo de acción. Por otra parte, el cobre puede ser tóxico tanto en solución como al estado sólido (Stevenson *et al*, 2012).

Existen diversas teorías de cómo el cobre actúa en presencia de bacterias, ya sea como agente inhibidor o bactericida. En lo que se refiere a estos dos últimos conceptos es necesario considerar las diferencias. Un agente inhibidor detiene el crecimiento bacteriano, en cambio un agente bactericida elimina completamente el microorganismo. En la actualidad no hay certeza de cuáles son los mecanismos de toxicidad del cobre, pero sí está claro que es un metal antimicrobiano, el cual está respaldado por la EPA, quien dio a conocer que el cobre y sus aleaciones tienen poder biocida. Algunos principios generales que alude la EPA sobre el cobre son evidentes: un mayor contenido de cobre en aleaciones, temperaturas altas, y humedad relativa alta, incrementan la eficiencia en la muerte de microorganismos. Por el contrario, los tratamientos que bajan las tasas de corrosión, redujeron la eficacia antimicrobiana de las superficies de cobre, como, por ejemplo, la aplicación de inhibidores de corrosión o una espesa capa de óxido de cobre (Grasset *et al*, 2011).

Diversas investigaciones han confirmado que el cobre inhibe patógenos tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, y *Legionella pneumophila* (Konieczny *et al*, 2012).

Según diversos estudios, cuando el microorganismo se encuentra en ambientes con exceso de cobre, la toxicidad y ulterior muerte celular podría deberse a mecanismos tales como:

2.2.3.1 Peroxidación lipídica o formación de radicales libres

Estudios previos han concluido que el objetivo principal de las superficies de cobre es la membrana celular bacteriana, siendo el principal factor de muerte la oxidación de fosfolípidos, mediante reacciones redox (Hong *et al*, 2012). Estas propiedades redox presentes en algunos metales, como es el caso del cobre, pueden contribuir a la toxicidad de un gran número de microorganismos (Borkow *et al*, 2005). El cobre mediante un ciclo redox genera especies reactivas de oxígeno, a través de reacciones de tipo Fenton. Para que se lleve a cabo esta reacción es necesario obtener peróxido de hidrógeno el cual se sintetiza intracelularmente a través de la oxidación de NADPH. Es así como el peróxido de hidrógeno interactúa con el cobre para producir especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species ROS, por su sigla en inglés) (Gail *et al*, 2006). Estas ROS, son subproductos radicales de la respiración aeróbica, siendo una parte importante del mecanismo de muerte que sufren microorganismos expuestos a un estrés oxidativo o falta de equilibrio entre las formas reactivas del oxígeno y la capacidad biológica de desintoxicación de los subproductos de las reacciones por exceso de cobre (Konieczny *et al*, 2012), pudiendo infligir directamente daño a ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos (Warnes *et al*, 2011). Esto ha sido propuesto como un mecanismo clave de la toxicidad del cobre, sin embargo, la evidencia para la generación de ROS catalizada por cobre *in vivo* es escasa (Stevenson *et al*, 2012).

Las reacciones que participan en la formación de especies reactivas de oxígeno se presentan en la Figura 2:

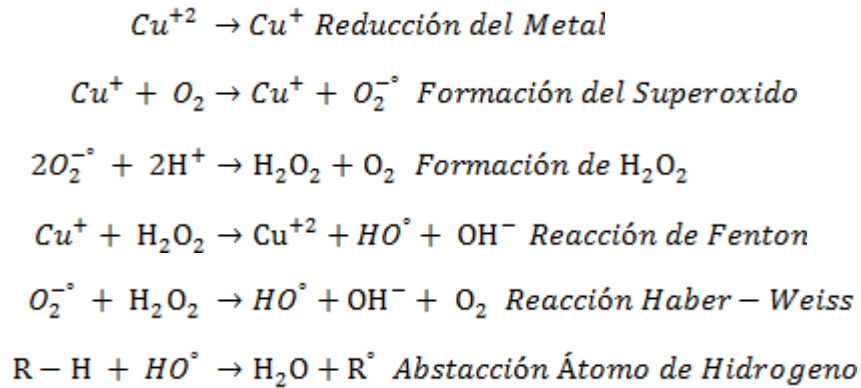


Figura 2. Reacciones para la formación ROS (Dabrowiak, 2009)

El peróxido de hidrógeno es un reductor de 2 electrones de oxígeno y por lo tanto, no es un verdadero radical pero tiene la capacidad de difundir a través de las membranas celulares. Tiene una vida media prolongada en presencia de superóxido (Warnes *et al*, 2011), que en conjunto con el cobre comienzan con la reacción de Fenton induciendo al stress oxidativo, pudiendo dañar la membrana celular a través de la lipídoperoxidación, principalmente por daño a la permeabilidad de la membrana y muerte celular (Gail *et al*, 2006). Los efectos tóxicos de los iones de cobre aumentan en presencia de H_2O_2 ya sea producida endógena o exógenamente (Patikarnmonthorn *et al*, 2010).

El electrón desapareado del radical hidroxilo, altamente reactivo, es capaz de causar daño oxidativo a macromoléculas celulares. Reacciona con el componente principal de las membranas plasmáticas, los fosfolípidos. Este consiste en un grupo de cabeza polar (compuesta de glicerol, un grupo fosfato y colina, etanolamina o serina) covalentemente unido a dos ácidos grasos de cadena larga que típicamente varían en longitud de 14 a 20 átomos de carbono y pudiendo contener una o más insaturaciones. Los radicales hidroxilos ($\cdot OH$) formado por el Cu (I) que dependen de la reacción de Fenton, como se describe

anteriormente, son capaces de conducir la peroxidación no enzimática de los ácidos grasos insaturados, iniciando de este modo una serie de reacciones que dan como resultado grandes cambios estructurales en la bicapa de fosfolípido conllevando a la pérdida de integridad de la membrana (Hong *et al*, 2012).

La peroxidación lipídica no enzimática es un proceso de tres pasos: iniciación, propagación y terminación. El radical hidroxilo producido por Cu (I) a través de la reacción de Fenton, inicia en la membrana la peroxidación de lípidos mediante la eliminación de un hidrógeno de un grupo CH₂- cerca del doble enlace carbono de un ácido graso insaturado (reacción a). Esto es seguido por la reacción con el oxígeno molecular y el reordenamiento molecular para producir un lípido radical peroxilo (reacción b), que, a su vez, es capaz de eliminar otro hidrógeno a partir de un sitio cercano a un doble enlace insaturado diferente. En la reacción c, la etapa de propagación, se produce predominantemente en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales son muy sensibles a la peroxidación produciendo de este modo una reacción en cadena que amplifica la cantidad de la peroxidación lipídica (Patikarnmonthone *et al*, 2010). Lo citado anteriormente se ve expresado en las reacciones presentadas en la Figura 3.

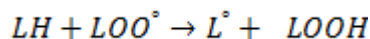
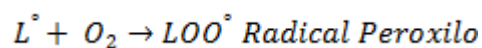
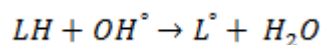


Figura 3. Peroxidación lipídica

La propagación puede ser rescindida por una reacción "chain-breaking" como:

- (i) la ruptura de LOO· a varios productos, incluyendo aldehídos,
- (ii) la reacción de LOO· con un antioxidante para formar LOOH, o
- (iii) la reacción de LOO· con otro radical (Hong Robert *et al*, 2012).

Estas alteraciones provocadas por la lípidoperoxidación alteran las propiedades físicas de las membranas biológicas pudiendo provocar cambios

notables en las actividades de muchas de las funciones esenciales en la membrana, incluyendo transporte de proteínas, fagocitosis, y la permeabilidad de iones. Las propiedades físicas de una membrana se determinan en gran medida por su composición de lípidos, uno de cuyos factores importantes es el grado de insaturación de los ácidos grasos. La composición de ácidos grasos de la membrana microbiana es muy variable y está influenciado por factores ambientales e intrínsecos (Borkow *et al*, 2005).

La relación entre la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática y la toxicidad de cobre se estudió en *S. cerevisiae*. Se encontró que el cobre induce permeabilización de la membrana plasmática y la toxicidad de las células se incrementó notablemente en células enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados (Grasset *et al*, 2011). Por lo que hay una estrecha relación entre las insaturaciones que tiene la membrana y la muerte bacteriana.

2.2.3.2 Despolarización de la membrana

Estudios han propuesto que la despolarización de la membrana citoplasmática es el objetivo principal para el efecto antimicrobiano del cobre (Gorman *et al*, 2012). Esto alteraría el potencial eléctrico produciendo la salida de iones potasio hacia el exterior. Como consecuencia de ello, se produce un bloqueo de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, provocando la muerte bacteriana (Calvo *et al*, 2009; Espírito *et al*, 2010). En el cobre metálico la manera de actuar sería a través de la formación de Cu^{+2} , provocando la despolarización y formación de ROS. La síntesis de Cu^{2+} a partir de cobre metálico se observa en la siguiente reacción:

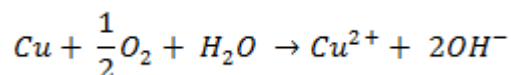


Figura 4. Corrosión de cobre metálico para la formación de Cu^{2+} (Merkel, 2002)

La corrosión del cobre mostrada en la reacción de la Figura 4 podría afectar tanto a la membrana celular como a las proteínas.

Se postula que a concentraciones elevadas de Cu^{+2} , el sitio inicial de acción de este metal, sería la membrana celular, teniendo como efecto la pérdida de la integridad. Esto se manifiesta en la fuga de solutos, tales como iones potasio causando lesiones en la barrera de permeabilidad de la membrana plasmática ocasionando la muerte celular (Borkow *et al*, 2005).

Por otra parte, la atracción electrostática entre Cu^{+2} y la membrana plasmática conducen a la reducción de algunos iones (formación Cu^{+}), pudiendo así atravesarla. Esto debido a que los iones Cu^{+} pueden moverse más fácilmente por la bicapa lipídica uniéndose a proteínas y/o peroxidando lípidos (Bogdanović *et al*, 2014).

Las propiedades químicas del cobre le permiten formar complejos con ligandos excepcionalmente estables. Esto da lugar a la posibilidad de que la toxicidad pueda ser causada por uniones no específicas en exceso de iones de cobre a proteínas (Espírito *et al*, 2011), desencadenando el agotamiento de los grupos sulfhidrilo, encargados de dos funciones: estabilizar las proteínas para la formación de los puentes disulfuro y los mecanismos de desintoxicación celular; además uniéndose a cisteína, aminoácido endógeno que se encuentra en muchas proteínas inactivando funciones celulares esenciales (Konieczny *et al*, 2012). La estabilidad del complejo de cobre hace difícil separarlo de la unión con la metaloproteína, por tanto, la función normal se ve bloqueada (Stevenson *et al*, 2012).

Los mecanismos moleculares de la actividad antibacteriana resultan de la estructura atómica del cobre, especialmente a partir de la estructura de su capa electrónica externa, teniendo la capacidad de dar o recibir electrones fácilmente, lo que se ve expresado en alto potencial electroquímico (Konieczny *et al*, 2012). El potencial electroquímico de los iones de cobre libre que interactúan con las proteínas de las bacterias, resulta en la supresión de su actividad proporcionando al cobre su carácter antibacteriano. Sin embargo, es imperioso mencionar que el mecanismo antibacteriano es muy complejo y

acontece, tanto en el interior de las células como en los espacios intercelulares (Konieczny *et al*, 2012).

Borkow *et al* (2005) reporta que la manera de actuar del cobre para bacterias con diferente estructura de envoltura celular, una Gram positiva y otra Gram negativa como lo son *Streptococcus lactis* y *E. coli*, respectivamente, sería semejante. El objetivo de esta investigación se basó en que la muerte celular y la pérdida de la integridad estaban directamente relacionadas, sugiriendo que el ion cobre podría estar relacionado con la pérdida de la integridad celular de las bacterias, afectando la conductancia de los canales iónicos, como también lo reporta Marrero *et al* (2009). Por consiguiente, el cruce del cobre a través de la membrana se produce por un estrés oxidativo afectando los canales iónicos para luego dañar las enzimas vitales que desencadenan la muerte celular (Malek *et al*, 2014).

Las enzimas que se ven afectadas por iones cobre corresponden al grupo catalítico de las deshidratasas. Esta familia de enzimas tiene representación en el catabolismo central y las vías biosintéticas. Estudios muestran que el O_2 y H_2O_2 son lo suficientemente pequeños para invadir el sitio activo, donde coordinan y oxidan el cluster hierro-azufre a una valencia inestable. Es ese el sitio que el cobre tiene como objetivo principal, desplazando los átomos de hierro cuando se coordinan con el tiolato o ligandos inorgánicos de azufre. La avidez extrema con la que lo hace, significa que los entornos celulares que contienen estas enzimas no pueden tolerar incluso niveles reducidos de cobre activo (Macomber *et al*, 2009).

En enzimas que contengan cisteína, el cobre en exceso, actuaría uniéndose a los puentes disulfuros de proteínas que no requieren su presencia para su funcionamiento, cambiando la conformación y por consiguiente la pérdida de su función, suscitando la muerte celular (Grasset *et al*, 2011). Probablemente esta unión puede ser suficiente para la inactivación de la

enzima (Stevenson *et al*, 2012), la cual se ve expresada en la siguiente reacción:

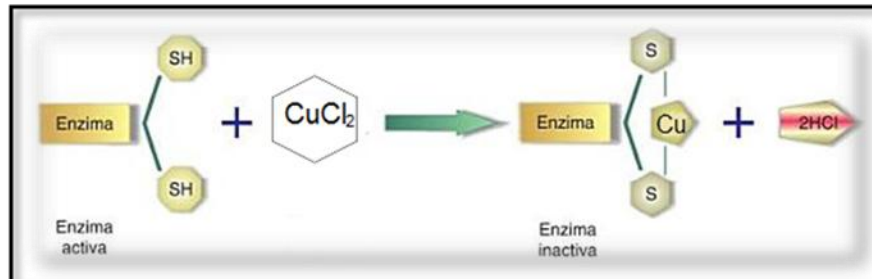


Figura 5. Unión de cobre a enzimas deshidratatasas (Montoya *et al*, 2008)

2.2.3.3 Interacción de iones cúprico con el ADN

El tercer mecanismo que genera muerte en bacterias es el que ocasiona mayor controversia y discusión entre investigadores.

El quiebre de la molécula de ADN sugiere directa participación de cobre (II), luego del contacto del cobre con la membrana, que generaría afluencia de iones desde el exterior hacia el interior de la célula desencadenando lesiones en el ADN (Warneset *al*, 2011).

Hoy en día está claro que Cu^{+2} tiene una afinidad específica por el ADN y puede unirse y desordenar las estructuras helicoidales porreticulación(crosslinking) dentro y entre las hebras. Estudios cinéticos demostraron que la doble hélice de ADN contiene al menos dos clases de sitios de unión para el cobre. Un sitio está presente en cada cuatro nucleótidos y tiene una alta afinidad por el cobre, el otro es un sitio de intercalación para el cobre que está presente en cada par de bases. Se ha demostrado que se unen preferentemente a los pares G-C(Borkowet *al*, 2005).

Para que haya una degradación de los ácidos nucleicos es necesario que en sitios específicos de unión se origine la reacción de Fenton. Por consiguiente, habrían repetidos ciclos redox que generarían una cantidad

necesaria de radicales para causar daños a los ácidos nucleicos(Borkowet *al*, 2005).

La muerte por genotoxicidad, se debería a una baja disponibilidad de hierro y a altas concentraciones de H₂O₂, lo que sugiere que los iones de cobre sólo se convierten en disponibles en el entorno intracelular en ausencia de hierro y bajo un severo estrés oxidativo. Mayor sería el mecanismo de destrucción si se produjera la reducción de la oxidasa a través de la adición de NADH, derivado de la reacción de Cu⁺¹ con H₂O₂, mejorando el daño del ADN a través de un ciclo redox (Borkowet *al*, 2005).

Por tanto, la muerte bacteriana, según los datos anteriormente mencionados apoyaría una actividad perjudicial del cobre sobre el ADN genómico (Weaveret *al*, 2010), sin embargo, no está claro si esto generaría la muerte inmediata de los microorganismos.

Según Espírito Santo *et al* (2012), la genotoxicidad no puede ser responsable de la muerte de las células, sino más bien apoya la teoría de que una membrana citoplasmática comprometida es la que conduce a la cesación de los procesos vitales. Por consiguiente, propone el modelo de que las membranas se dañan en primera instancia, causando letalidad, seguido por la oxidación de proteínas y degradación del ADN. Lo mismo es propuesto por Warneset *al*(2011), quien hace referencia a que el cobre no tiene como objetivo inicial el ADN, sino, en una última instancia, como un evento secundario una vez muerta la célula.

En contraste, Weaveret *al*(2010) propone que la muerte celular ocurre debido a un efecto en la respiración y una pérdida de la integridad del ADN, sin acción sobre la integridad de la membrana celular. Por tanto, numerosas enzimas y complejos proteicos podrían ser objetivos inactivando la respiración celular en presencia de cobre. Espírito Santo *et al*, (2012) hace alusión a esta investigación señalando que la respiración es un proceso ligado a la membrana citoplasmática, siendo difícil asegurar que la inhibición de la respiración no le

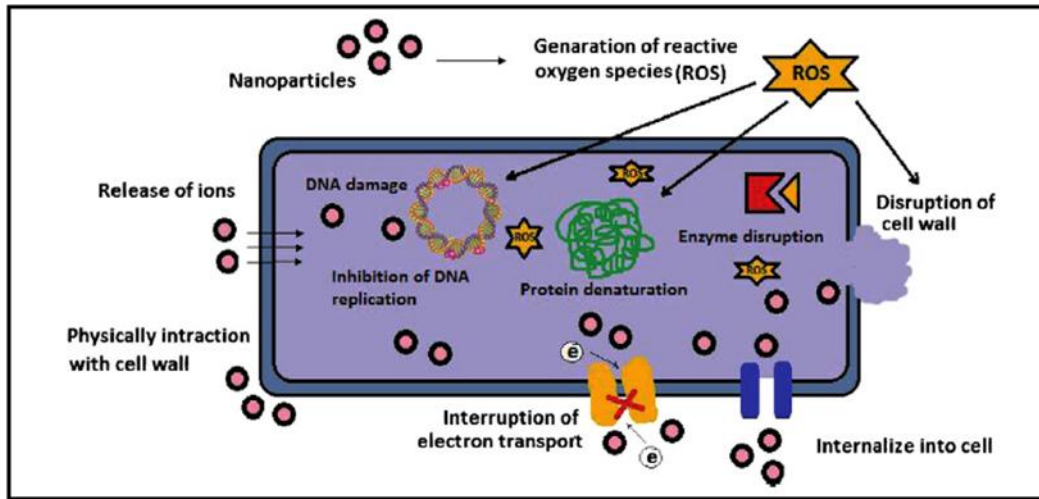
cause algún perjuicio, debido a que es difícil que el daño observado devenga solo de las proteínas respiratorias incrustadas en la membrana, pero no de la propia membrana.

Probablemente la degradación de ADN sea un evento secundario en la muerte celular de bacterias, pero no deja de ser uno de los mecanismos más importantes, máxime cuando tiene directa relación con la nula resistencia que tienen las bacterias al cobre, principalmente por las siguientes razones:

- (i) el ADN es completamente degradado después de la muerte celular evitando la transferencia entre los organismos que permite la resistencia al cobre
- (ii) la eliminación es muy rápida, y las células no se dividen en la superficie de cobre lo que impide la adquisición de resistencia, y
- (iii) todavía no se han reportado bacterias totalmente resistentes al contacto con cobre (GrassGregoret *et al*, 2011; Gorman *et al*, 2012).

Por consiguiente, considerando los 3 mecanismos expuestos una gran mayoría de investigadores concuerdan que la génesis del deceso celular comienza en la membrana.

En la Figura 6 se pueden observar los mecanismos mencionados anteriormente y a continuación en la Figura 7 el orden de los sucesos desde que el cobre entra en contacto con la bacteria hasta la muerte celular



Figur

a 6. Mecanismo de eliminación bacteriana.

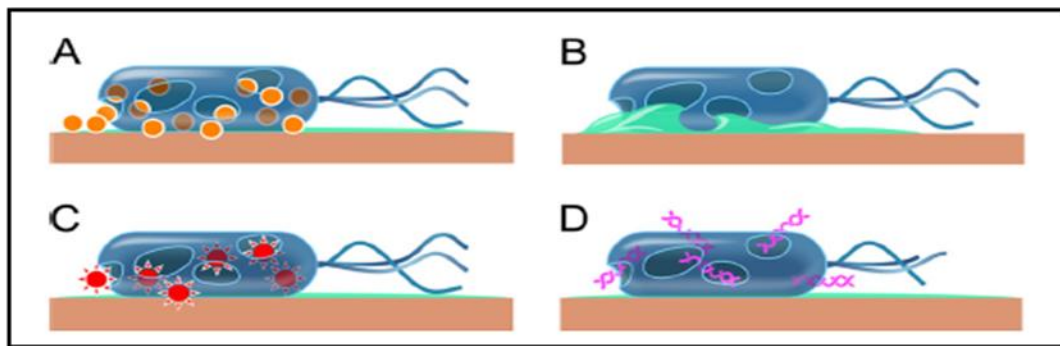


Figura 7. Orden de suceso que producen la muerte de la bacteria en presencia de cobre. (Grasset *al*, 2011)

- A. Liberación de iones cobre.
- B. Ruptura de la membrana celular a causa del cobre y otros fenómenos de estrés como reacciones del tipo Fenton y corrosión, pérdida de la integridad de la membrana.
- C. Ingreso de cobre al interior de la célula
- D. Cobre se une a las cadenas de ADN, degradándolas.

2.2.4. Aplicaciones del cobre

La capacidad del cobre como un agente microbiano puede ser utilizada en una amplia gama de aplicaciones, tales como superficies donde se esté en constante contacto, área de preparación de alimentos, ventilación, calefacción y aire acondicionado, entre otras.

2.2.4.1 Área de contacto constante

En estos últimos años se ha informado que la principal fuente de contagio de enfermedades causadas por microorganismos se debe al contacto por contaminación cruzada. Es debido a esto que el cobre tiene un papel fundamental en evitar estos contagios debido a infecciones que pasan de una persona a otra, ya que colocando este metal en lugares estratégicos pueden llegar a evitar el traspaso de enfermedades. Ejemplos de los lugares catalogados como de alto riesgo son hospitales en donde se encuentran las barandas de las camas, equipos de uso continuo, muebles, manijas de las puertas, interruptores de luz, etc.; escuelas, guarderías, aeropuertos, transporte público y todo lugar o superficie que sea propicio para la contaminación (Antimicrobialcopper, 2013)

2.2.4.2 Ventilación, calefacción y aire acondicionado.

Se cree que el 60% de las enfermedades que ocurren en un edificio se debe a microorganismos que se encuentran en áreas de ventilación y que pueden contaminar y propagar gérmenes a otras áreas. Utilizando cobre en estos conductos se puede evitar el traspaso de microorganismos mejorando la calidad del aire que estos utilizan.

2.2.4.3 Área de preparación de alimentos

Las medidas en la preparación de alimentos no siempre son demasiado eficaces en la reducción de la contaminación por microorganismos. Es debido a que materiales o aleaciones de cobre en el procesamiento de alimentos solo minimizarían el riesgo de infecciones. El cobre tiene capacidad biocida frente a bacterias, virus y hongos tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración, siendo más eficaz su mecanismo en productos secos.

La industria alimentaria está permanentemente abocada a la obtención de alimentos inocuos, por este motivo es que requiere de preservantes que en sinergia con cobre tenga un efecto controlador de microorganismos patógenos. Un ejemplo de aditivos naturales es el ácido láctico en combinación con cobre. Estudios demuestran que ambos ingredientes inhibirían sinérgicamente algunas bacterias, como *Salmonella* y *E. coli* (Ecosea, 2014).

En superficies con mayor cantidad de cobre, *E. coli* O157, se ve inhibido dependiendo del tiempo de exposición y la concentración de bacteria. Estudios revelan que bacterias en concentraciones bajo 10^3 expuestas a cobre, son eliminadas completamente (Ecosea, 2014).

El uso de cobre se ve limitado a la utilización de superficies de cobre, debido a que, al usar productos líquidos o sólidos como polvos, se está muy al límite, pudiendo originar contaminación química. De todas maneras, el objetivo principal es evitar la contaminación cruzada, producida mayormente por contacto con productos crudos o bien, alimentos contaminados.

En la siguiente Figura se observa aplicaciones del cobre en distintas actividades.

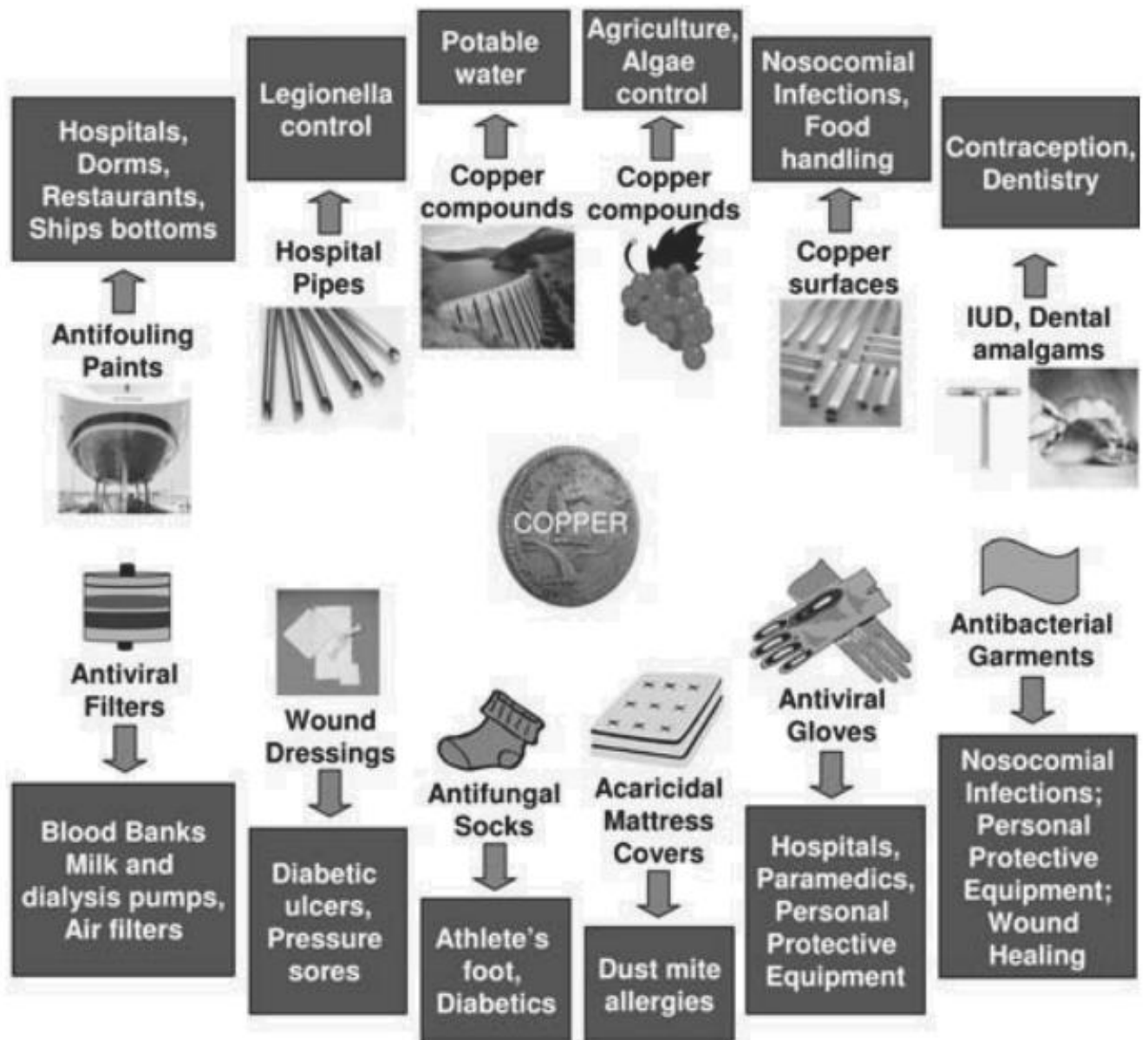


Figura 8. Usos del cobre

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ❖ El cobre permite el control de la contaminación microbiana.

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto bactericida del cobre sobre cepas representativas presentes en la industria alimentaria

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del cobre en tres estados de oxidación (Cu^0 , Cu^{+1} y Cu^{+2}) determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) frente a *E. coli* y *S. aureus*.
- Determinar la cinética de muerte de ambas bacterias en diferentes superficies.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Lugar de ensayo

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.2 Material y equipos

- A. Las cepas utilizadas en este estudio fueron cepas silvestres de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aisladas de alimentos.
- B. Las especies de Cobre ensayadas fueron:
 - Sulfato de cobre(II) pentahidratado para análisis. WINKLER
 - Cloruro de cobre (I) para análisis. MERCK
 - Lámina de Cobre 99,7%, (Cu⁰). MERCK
- C. Superficies utilizadas:
 - Azulejo
 - Acero Inoxidable laminado AIST316 L. Sanitario, fabricado para el uso en Industria alimentaria.
 - Lámina de Cobre 99,7%. MERCK
- D. Equipos:
 - Autoclave KSG Modelo KSG 112
 - Estufa LABTECH Modelo LIB-300.
- E. Medio de cultivos
 - TSA: Triptona Soya Agar. OXOID CMO131
 - TSB: Triptona Soya Broth. OXOID CMO129
- F. Medio de dilución: agua peptonada al 0,1%. Peptone 3214. MERCK
- G. Material de vidrio propio del Laboratorio de Microbiología

4.3 Diseño de trabajo

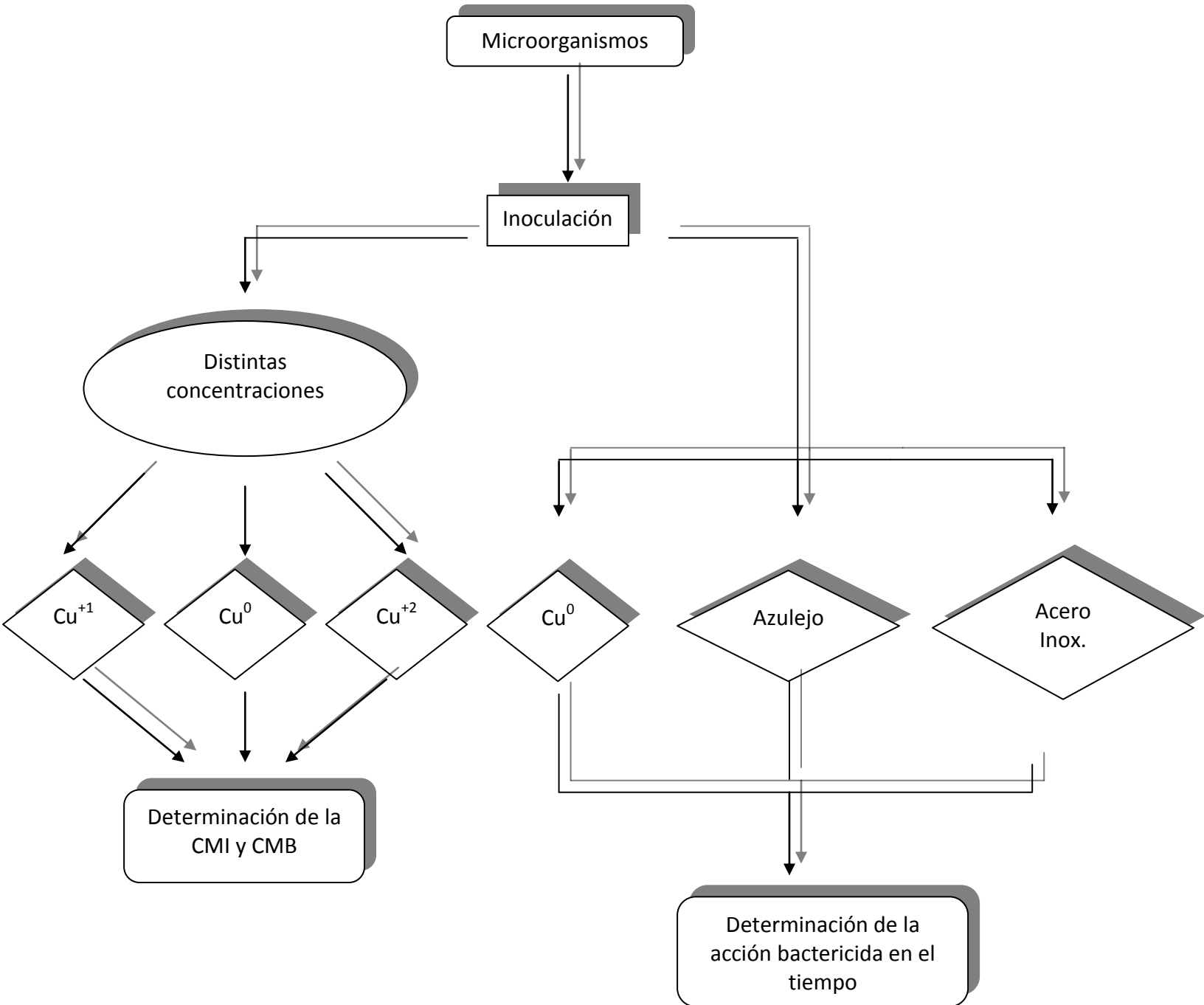


Figura 9. Diagrama diseño de trabajo

4.4 Métodos

4.4.1 Método de dilución en caldo

Se utilizó el método de macrodilución adaptado por el Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012). El inóculo para ambas cepas (*E. coli* y *S. aureus*) se diluyó hasta las concentraciones requeridas de análisis (10^6 UFC y 10^2 UFC), tanto para realizar CMI y CMB, como para la cinética de muerte en las distintas superficies de acuerdo al procedimiento señalado en la Figura 10. El diluyente utilizado fue agua peptonada al 0,1%.

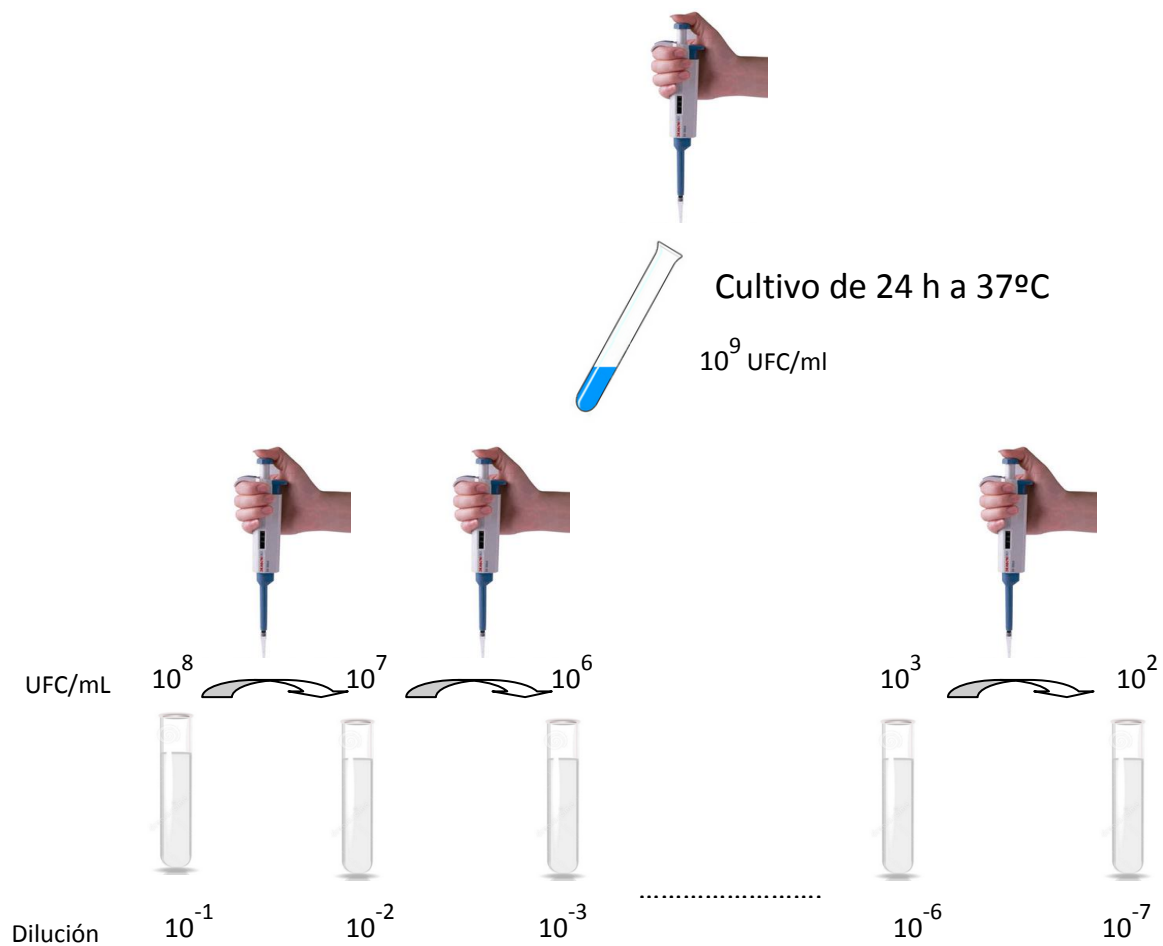


Figura 10. Método de dilución de bacterias

4.4.1.1 Preparación del antimicrobiano

Para la obtención de las concentraciones mínimas en la cual las bacterias se inhibirían, se realizó un barrido a distintas concentraciones de cobre, tanto para Cu^{2+} , Cu^{1+} y Cu^0 . Una vez encontrada la concentración donde se observó inhibición, se efectuó el barrido entre esos puntos para encontrar el valor preciso de inhibición.

Los análisis de CMI y CMB se realizaron a dos concentraciones de inóculo, un alta y una baja (10^6 UFC/ml y 10^2 UFC/ml), para simular distintas cargas microbianas que pudiesen encontrarse a nivel de industria de alimentos.

4.4.1.1.1 Preparación del Cu^{2+}

Se utilizó sulfato de cobre pentahidratado, soluble en agua, color azul intenso. Para obtener la CMI y CMB se realizó un barrido a distintas concentraciones de sulfato de cobre mediante diluciones seriadas.

4.4.1.1.2 Preparación del Cu^{1+}

Se utilizó cloruro de cobre (I). Esta sal neutra es muy poco soluble, además en medios aeróbicos es inestable pudiendo oxidarse a cobre (II) (Botanni, 2005). Se realizó el mismo procedimiento utilizado en la preparación de Cu^{2+} para obtener distintas concentraciones. Las concentraciones utilizadas se basaron en la solubilidad del cloruro de cobre (I) en agua, la cual, según ficha técnica del proveedor, varía entre 0,01 mM y 1 mM.

4.4.1.1.3 Preparación del Cu^0

Para determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida, del cobre metálico, se utilizó distintos cortes de alambre de cobre (filamentos de 8 cm de largo y 0,3 mm de diámetro aprox.) y en otra experiencia pequeños trozos de 1mm de largo aproximadamente, que se sumergieron en el medio de cultivo con cada cepa.

4.4.1.2 Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (Suárez, 2009). En el método de macrodilución se empleó por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Se preparó una batería de tubos con 9 ml de TSB.

A cada tubo con TSB se agregaron distintas concentraciones de antimicrobiano y 1 ml de inóculo. La serie de tubos se completó con uno de control de medio de cultivo sin antimicrobiano ni cepa bacteriana.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 18 h a 20 h. Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados, observando el crecimiento (turbidez) o no crecimiento (transparencia) del cultivo. La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

4.4.1.3 Concentración mínima bactericida

La CMB, se define como la concentración mínima de antimicrobiano que puede producir la muerte bacteriana en un determinado tiempo y es igual o ligeramente superior a la CMI (Suárez, 2009).

Se obtuvo a través del recuento en placa, de inóculos provenientes de los tubos en que no se observó turbidez.

El número de colonias que crece, después de incubar durante 24 h a 37°C, se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. La mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos del 0,1 % del inóculo original es la concentración mínima bactericida.

4.4.2 Cinética de muerte de ambas cepas en diferentes superficies

Se utilizó el método del hisopado, que es aplicable a superficies regulares e irregulares. En este caso se usó una lámina de cada superficie dividida en áreas de 40 cm^2 para cada tiempo ensayado.

Se diluyó el cultivo de ambas bacterias, hasta la concentración inicial requerida ($10^6 \text{ UFC}/40 \text{ cm}^2$ y $10^2 \text{ UFC}/40 \text{ cm}^2$) y se inoculó sobre las distintas superficies. Posteriormente a los tiempos de 0 min, 15 min, 30 min, 45 min y 60 min, se extrajo muestra mediante frotación con una tórula y se depositó ésta en un tubo con 10 ml de diluyente. Luego utilizando una nueva tórula se siguió frotando a fin de obtener la mayor remoción de la muestra y se agregó al tubo que contenía la primera tórula utilizada (ISPCH, 2008). El tubo se agitó en Vortex por un minuto, se efectuaron las diluciones decimales y se procedió a sembrar en profundidad utilizando TSA.

Se incubó en estufa de 18 h a 20 h a 37°C para su posterior recuento. Los resultados fueron expresados en UFC/cm^2 para cada tiempo.

4.4.3 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurión XV para efectuar el análisis de varianza multifactorial para los resultados de cinética de muerte (Anexo 1).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Concentración mínima inhibitoria

Primero que todo, fue necesario realizar un barrido de concentraciones para disminuir el rango de experimentación y acotar los análisis. Posteriormente, una vez encontrado el rango posible de CMI se procedió a usar concentraciones específicas alrededor de los valores. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada estado de oxidación del cobre.

5.1.1 Cobre en su estado Cu^{+2}

En la Tabla 2 se encuentra el rango de concentraciones utilizadas para encontrar la CMI para ambas bacterias.

	<i>S. aureus</i> (10^6 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^6 UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (10^2 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^2 UFC/ml)
Concentraciones (M)	CMI	CMI	CMI	CMI
0,9	-	-	-	-
0,8	-	-	-	-
0,7	-	-	-	-
0,65	-	-	-	-
0,6	-	-	-	-
0,55	-	-	-	-
0,5	-	CMI	-	-
0,45	-	+	-	-
0,4	-	+	-	-
0,3	-	+	-	CMI
0,25	-	+	-	+
0,2	-	+	-	+
0,15	-	+	-	+
0,1	CMI	+	-	+
0,05	+	+	CMI	+
0,02	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+

Tabla 2. Concentraciones de Cu^{+2} utilizadas para determinar la CMI para concentraciones iniciales 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml

El rango de concentraciones utilizado en primera instancia fue desde los 0,01 M a 0,9 M, datos sombreados. Luego de observar la inhibición se acortó el rango en concentraciones más específicas las cuales están marcadas en las tablas mediante bordes negros, el signo “+” indica que para esas concentraciones hubo desarrollo bacteriano, en color amarillo se observa la CMI. Para poder visualizar las diferencias entre cepas y entre concentraciones de bacterias, de mejor manera, es que se realizó un gráfico, el cual se muestra a continuación.

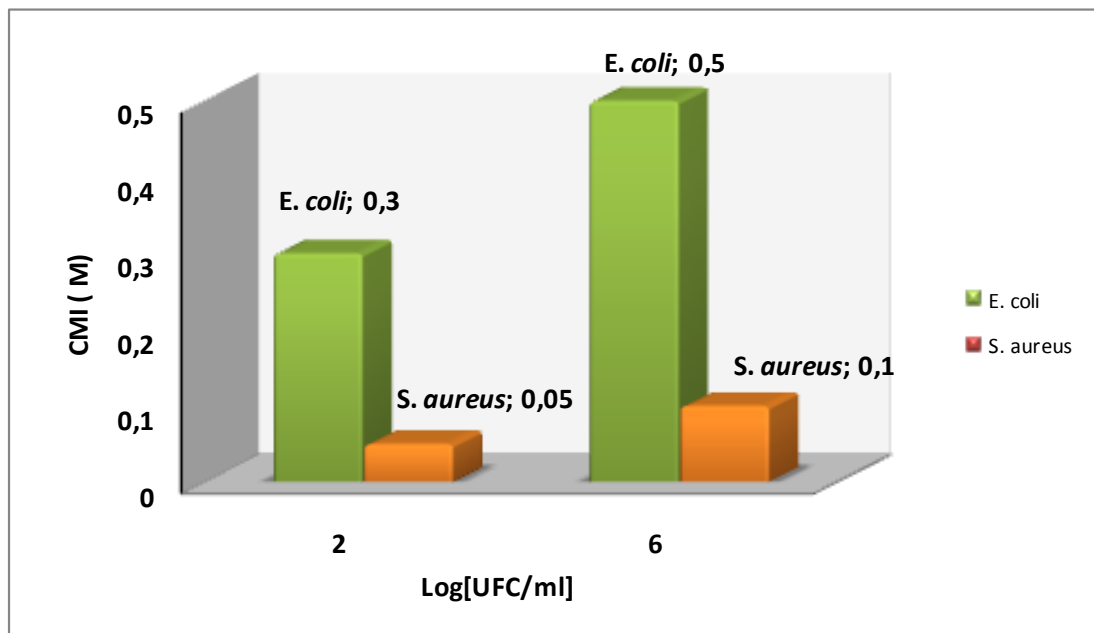


Figura 11. Concentración Mínima Inhibitoria de Cu^{2+} , para *S. aureus* y *E. coli*, 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml.

Según Kappes *et al.* (2012) en sus estudios utilizando sulfato de cobre, la concentración mínima inhibitoria de *E. coli* a concentraciones de 10^4 UFC fue de 6mM, cantidad muy baja en comparación con las CMI obtenido en el presente estudio, para ambas concentraciones de bacterias (10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml). Esta diferencia tan marcada puede deberse a que la cepa ocupada por

Kappes *et al.* (2012) eran del American Type Culture Collection (ATCC), por lo cual son cepas puras certificadas y mantenidas en ambientes favorables para su desarrollo, a diferencia de las cepas utilizadas en el presente estudio, las cuales son silvestres, siendo más resistentes a ambientes adversos. Por consiguiente, la cepa ATCC requiere ciertos cuidados para mantener su estabilidad a diferencia de las silvestres que son más resistentes a todo tipo de condiciones tanto físicas como químicas. Hong *et al.* (2012) tuvo valores muy cercanos a los de Kappes *et al.* (2012), obteniendo una concentración mínima inhibitoria entre 4 a 5 mM de CuSO_4 justificando en su investigación que no hubo incremento en los niveles de UFC, por inhibición de enzimas hidratasas vía unión cluster F-S, por lo que el cobre sería bacteriostático (Hong *et al.*, 2012). Esta justificación es sólo suposición debido a que todavía no está totalmente dilucidado cuál podría ser el método de inhibición, ya que hay una gran cantidad de maneras de cómo el cobre podría actuar frente a bacterias.

Para el caso de *Staphylococcus aureus* la CMI encontrada en otras investigaciones también es baja, siendo 0,2 mM, ocupando sulfato de cobre (Baker, 2010). Las razones de por qué es tan baja la concentración obtenida para el CMI en este Gram positivo son las mismas argumentadas en el párrafo anterior y que dicen referencia al uso de cepas de colección.

Para el caso de concentraciones bajas de bacterias no hay reportes, debido a que si a concentraciones altas, el cobre actúa como un inhibidor o bactericida, a concentraciones bajas no habría problemas en ejercer su toxicidad.

Otro cobre (II) ocupado en un gran número de trabajos es el óxido de cobre, utilizado principalmente como nanopartículas, esto debido a que tiene un mayor efecto, en gran parte a su tamaño y a la razón superficie-volumen mayor, que tienen las partículas micrométricas. Hay distintos métodos para la obtención de nanopartículas, en este caso, se obtuvieron mediante un proceso sonoquímico encontrándose una concentración mínima inhibitoria para *S.*

aureus de 0,03 M y para *E. coli* 0,06 M, con una concentración inicial de bacteria de 1×10^7 UFC/mL (León *et al.*, 2011). Comparando estos resultados con los de la Figura 11, se infiere una amplia diferencia entre concentraciones de inhibición, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. Claramente las nanopartículas gracias a su tamaño ejercen un mayor efecto sobre las bacterias pudiendo abarcar mayor superficie relativa para ejercer su toxicidad. Lo mencionado anteriormente sumado al tipo de bacteria (silvestre) es lo que da estas diferencias entre los datos experimentales y los datos bibliográficos.

5.1.2 Cobre en su estado Cu^{+1}

Los análisis con cloruro de cobre (I), dieron como resultado que esta sal no tiene incidencia sobre *E. coli* y *S. aureus*, por lo que no fue posible determinar ni la CMI ni la CMB. En todas las concentraciones ensayadas, se observó desarrollo del cultivo, después del período de incubación correspondiente, como se muestra en la Tabla 3.

	<i>S. aureus</i> (10^6 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^6 UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (10^2 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^2 UFC/ml)
Concentraciones (mM)	CMI	CMI	CMI	CMI
0,5	+	+	+	+
0,4	+	+	+	+
0,3	+	+	+	+
0,2	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+

Tabla 3. Concentraciones de Cu^{+1} utilizadas para determinar la CMI para concentraciones iniciales 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml

Según Suárez *et al.* (2002), la primera interacción que hay entre un metal y una bacteria ocurre por atracción electrostática, entre los iones en solución y los grupos funcionales de la superficie microbiana. Probablemente la atracción que tiene el Cu (II) es más fuerte que el Cu (I) en primera instancia, fijándose en la bacteria. Al adherirse se oxida a Cu (I) afectando el potencial transmembrana

debilitándola y generando perforaciones (AntimicrobialCopper, 2012). A su vez este Cu (I) también forma especies reactivas de oxígeno dañando la integridad de la membrana. Todo esto a partir de Cu(II), quizás el cobre (I) al no ser atraído, no ingresa a la célula, quedándose en solución sin poder adherirse a la bacteria y por ende no puede formar ni radicales, ni cambios en el potencial redox de las bacterias no pudiendo afectarla en forma negativa.

Pramaniket *al.* (2012) son los primeros en explorar la utilización de Cu⁺¹ como agente bactericida. Como se ha mencionado anteriormente el Cu⁺² es el que tiene la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano, pero en esta investigación ocupan nanopartículas de yoduros de cobre (I), como agente bactericida, afirmando que la actividad tóxica está mediada por la generación de ROS y daños a la membrana bacteriana. La forma bivalente (Cu⁺²) genera un potencial bajo siendo solubles y es más fácil que se incorpore a los microorganismos, caso contrario con el Cu⁺¹. Sin embargo, en la investigación de Pramaniket *al.* (2012) ocupan nanopartículas de Cu⁺¹, con una carga inicial de 10⁷ UFC, obteniendo CMI y CMB, resultados que se deben fundamentalmente a que su tamaño tiene la capacidad de abarcar una mayor superficie bacteriana uniéndose a grupos amino, alterando la membrana y ejercer su toxicidad. El CMI fue de 5,25x10⁻⁴M, tanto para *E. coli* como para *S. aureus* y el CMB fue 7,87x10⁻⁴ M para *S. aureus* y 5,77x10⁻⁴ M para *E. coli*. Si se compara con los CMI utilizando sulfato de cobre, estos últimos siguen siendo mucho mayores.

Ahora, si se comparan los resultados obtenidos entre León *et al.* (2011), que ocupa nanopartículas de óxido de cobre (II), y Pramaniket *al.* (2012), el cual ocupa yoduro de cobre (I), se puede observar cierta discrepancia entre los valores. Como se ha mencionado en varias oportunidades en esta investigación el Cu⁺² tiene un efecto comprobado como biocida, no así el Cu⁺¹, el cual tiene efectos en investigaciones recientes como biocida, pero como nanopartícula. La diferencia de resultados entre estos dos investigadores, en donde el Cu⁺¹ es

más letal, puede deberse al tamaño de la nanopartícula ocupada. Pramanik *et al.* (2012) ocupa un tamaño de nanopartícula promedio de 8 nm, en cambio, León *et al.* (2011), tiene un tamaño de nanopartícula que va desde los 20 nm a los 100 nm. Estos tamaños podrían marcar la diferencia entre los resultados obtenidos por estos dos investigadores y en el cual, como se ha mencionado anteriormente, el tamaño de la nanopartícula de cobre sería una variable fundamental para su efectividad.

5.1.3 Cobre en su estado Cu⁰

El estudio fue realizado mediante distintos gramajes de cobre cortados en filamentos y también en trozos de 1 mm, tal como se explica en la metodología, y colocados en un caldo de cultivo a concentraciones de 10⁶ UFC/ml y 10² UFC/ml.

Para obtener todas las variables que pudiesen interferir en la muerte de las bacterias, es que se sometió a incubación una batería de tubos inoculados a agitación por 18 h, para ambos tipos de corte, y otro set de baterías se mantuvieron sin agitación.

La agitación se debió principalmente a que se buscaba tener una mayor superficie de contacto Cu/bacteria y sin agitación, porque en condiciones normales un alimento contaminado no está en constante movimiento con trozos de cobre.

Los resultados demostraron que el cobre metálico, introducidos en caldo de cultivo, no destruye ni inhibe a ambas bacterias, debido principalmente a que la superficie de contacto de las bacterias con el cobre y el volumen del cobre es muy baja para ejercer su función tóxica frente a estos 2 microorganismos, tanto sin agitación como en agitación.

En referencia al cobre sometido a agitación ocurrió un cambio químico de color, pasando de amarillo a verde, el cual se debió a que al agitarse el cobre entra en mayor contacto con el oxígeno y en sinergia con el agua, forman óxido

de cobre que tiñen el caldo en concentraciones en que no ejerce un efecto biocida. (Appold, 2005)

Por tanto, el cobre metálico introducido dentro de un caldo cargado con bacterias no tiene efectos inhibitorios o bactericidas debido a su razón de área/volumen.

Más adelante, en la presente investigación, se demostrará que la razón área/ volumen es sumamente importante, ya que, al inocularse una placa de cobre de mayor superficie, los efectos fueron contrarios. La EPA y gran cantidad de autores han comparado estos efectos empíricamente.

5.2 Concentración mínima bactericida

Al igual que en los análisis de CMI, la Concentración Mínima Bactericida se obtuvo solamente con Cu^{2+} y no para Cu^{1+} y Cu^0 . A continuación, en la siguiente página, se muestran los resultados para la concentración mínima bactericida de *E. coli* y *E. aureus*

5.2.1 Cobre en su estado Cu^{+2}

	<i>S. aureus</i> (10^6 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^6 UFC/ml)	<i>S. aureus</i> (10^2 UFC/ml)	<i>E.coli</i> (10^2 UFC/ml)
Concentraciones (M)	CMB	CMB	CMB	CMB
0,9	-	-	-	-
0,8	-	-	-	-
0,7	-	-	-	-
0,65	-	-	-	-
0,6	-	CMB	-	-
0,55	-	+	-	-
0,5	-	+	-	-
0,45	-	+	-	-
0,4	-	+	-	CMB
0,3	-	+	-	+
0,25	-	+	-	+
0,2	-	+	-	+
0,15	CMB	+	-	+
0,1	+	+	CMB	+
0,05	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+

Tabla 4. Concentraciones de Cu^{+2} utilizadas para determinar la CMB para concentraciones iniciales 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml

La tabla muestra las CMB, las cuales como era de esperar están por sobre las CMI. Para poder visualizar y comparar mejor las concentraciones, se realizó el gráfico que se presenta a continuación

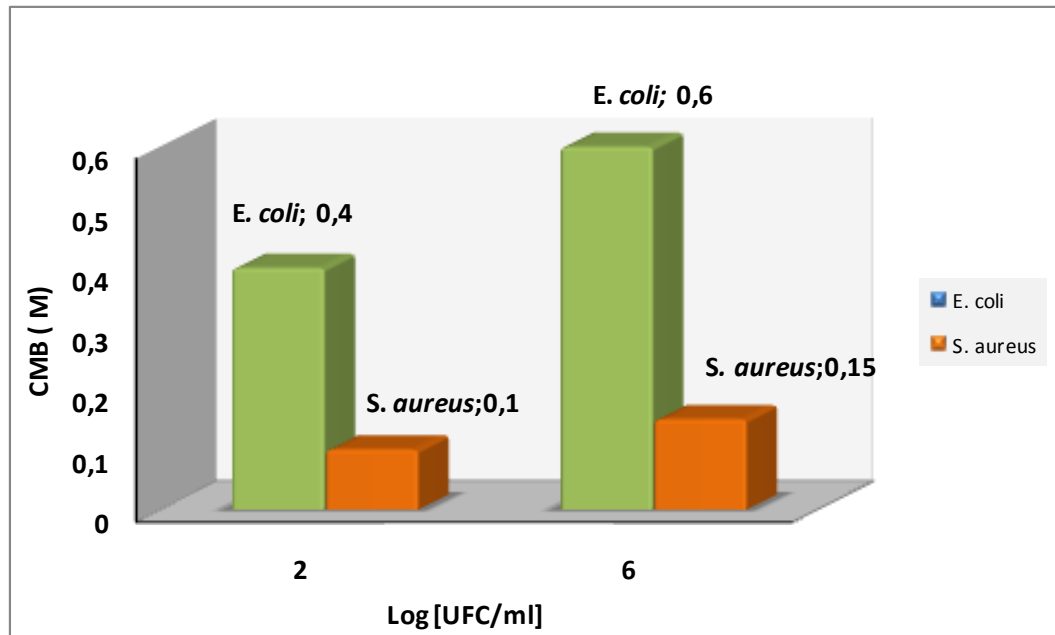


Figura 12. Concentración Mínima Bactericida de Cu^{2+} , para *S. aureus* y *E. coli*, en concentración de 10^2 UFC/ml y 10^6 UFC/ml.

Hong *et al.*, (2012) reporta que el sulfato de cobre actúa destruyendo niveles de 10^8 UFC de *E. coli*, a concentraciones de 7 a 8 mM, concentraciones muy bajas en relación a los resultados de la Figura 12, siguiendo las mismas tendencias de las concentraciones mínima inhibitorias. Otras investigaciones usan principalmente cobre como nanopartículas para ver su actividad bactericida. Lahaet *al.* (2014) obtiene nanopartículas de Cu (II) a partir de acetato de cobre e hidróxido de sodio mediante calor para luego centrifugar el precipitado y secar, obteniendo un polvo. Estas nanopartículas se utilizaron frente a dos Gram positivas (*B. subtilis* y *M. luteus*) y dos Gram negativas (*E. coli* y *P. vulgaris*). Sus resultados demuestran que el cobre es más efectivo frente a Gram positivos que a Gram negativos, de la misma manera como se presenta en los resultados de las Figuras 11 y 12. El CMB para *E. coli* fue de 1,5 mM y para Gram positivas entre 1,1mM y 1,2mM (Lahaet *al.*, 2014). En otra investigación usando nanopartículas de cobre a partir de nitrato de cobre se

obtuvo un CMB de 0,02mM para *S. aureus* y 0,01mM para *E. coli*, concentraciones muy bajas en comparación a los resultados citados y graficados en la presente investigación. Además, las concentraciones utilizadas fueron mayor en *E. coli* que *S. aureus*, contrariamente a lo expuesto anteriormente, justificando este resultado en que bacterias Gram negativas tienen una mayor carga negativa, gracias a grupos carboxilos y fosfatos, siendo más fuerte la interacción con cobre (Valodkaret *al.*, 2012). Esto último no está del todo comprobado, debido a que, las interacciones con la superficie de bacterias, son diferentes entre Gram positivos y Gram negativos. Los sitios catiónicos de unión de Gram positivos son D- alanina (ácido teicoico), los grupos aminos de los azúcares (glicano) y del ácido diaminopimélico (porción peptídica del peptidoglicano), y para Gram negativos son los grupos fosforilos de los lipopolisacáridos y algunos grupos carboxilos del peptidoglicano, pero en menor escala en comparación con Gram positivos. Por lo tanto, debido a su diferencia de composición estructural es que este último mencionado, tiene mayor capacidad de unir especies metálicas (Suárez *et al.*, 2002). Esta explicación concordaría con los resultados del presente estudio, en el cual se necesitó menos cobre para poder inhibir y destruir una bacteria Gram positiva.

Esta menor cantidad de cobre para destruir a *S. aureus*, no significa que el cobre esté en bajas cantidades en la célula, por el contrario, para que tenga estos efectos debe haber un exceso de cobre. Este exceso de cobre es la primera razón de toxicidad en la célula, el cual es transportado al citoplasma continuamente debido a que transportadores inespecíficos son expresados constitutivamente en estos niveles de estrés, generando una entrada que no puede cerrarse (Marrero *et al.*, 2010).

Seguidamente, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, la actividad bactericida comienza con el paso de Cu^{+2} a Cu^{+1} para formar especies reactivas de oxígeno y peróxido de hidrógeno en la superficie, dañando la

membrana celular, provocando mayor ingreso de cobre dentro de la célula (Espírito *et al.*, 2011; Hoshino *et al.*, 1999).

Otro factor que implicaría el daño a bacterias es el grado de insaturación. A medida que haya más insaturaciones en los ácidos grasos, mayores son las posibilidades que se produzcan oxidaciones y por ende, pérdida de la integridad en bacterias (Hong *et al.*, 2012). Los porcentajes de ácidos grasos insaturados en *E. coli* son: 2,59% de ácido trans-oleico, ácido cis-oleico 2,53% y 3% de ácido cis-linoleico. Para *S. aureus* el porcentaje de ácidos grasos insaturados son: 2,66 % ácido trans-oleico y 1,8% ácido cis-linoleico. *E. coli* posee una leve mayoría de insaturaciones en comparación a *S. aureus*, que al parecer es exigua para marcar una diferencia, siendo, entonces, un conjunto de mecanismos los que en sinergia influenciarían en la muerte celular

Por consiguiente, las insaturaciones pueden no ser un factor de diferencia, entre *E. coli* y *S. aureus*, pero si tiene un papel preponderante en la inhibición y muerte de bacterias.

5.3 Cinética de muerte en tres superficies: cobre, acero inoxidable y azulejo

Las superficies de cobre cumplen una función bactericida dependiendo del porcentaje de cobre (mayor a 55%) y del tiempo de exposición (Grasset *al.*, 2011). El mecanismo de muerte bacteriana es el mismo señalado anteriormente. Se cree que el proceso de muerte del cobre metálico es a través de la liberación de iones los cuales inician el proceso de eliminación de microorganismos (Espírito *et al.*, 2011).

5.3.1 Cinética de muerte con una elevada carga inicial de bacterias.

Las bacterias fueron inoculadas en superficies de 40 cm² con una carga inicial de 10⁶UFC. Los resultados fueron expresados por cm², por lo cual, la conversión hace que la carga inicial aproximada sea de 10⁴UFC/cm², como se

observa en los siguientes gráficos en donde se analiza el comportamiento de cada bacteria al ser expuesto a las 3 superficies.

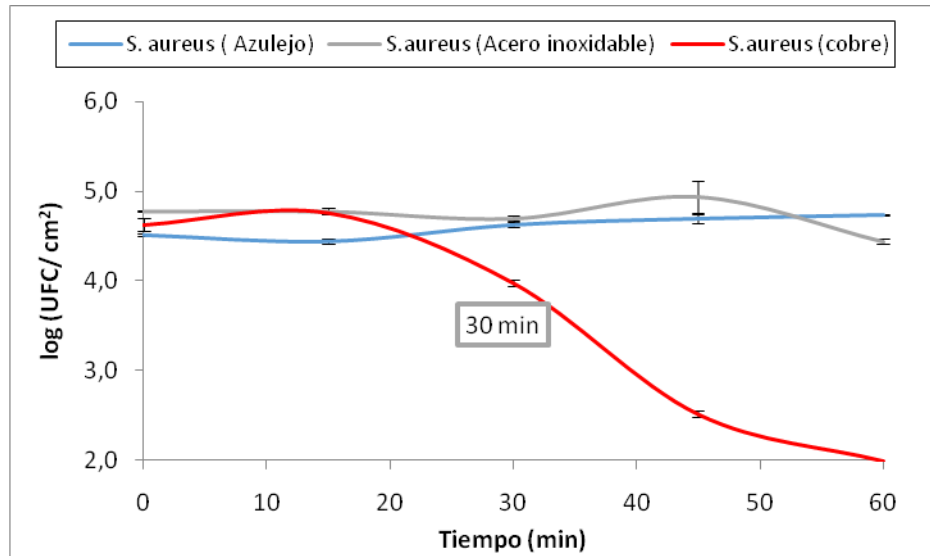


Figura 13: Cinética de muerte en superficies con una elevada carga inicial de *S.aureus*

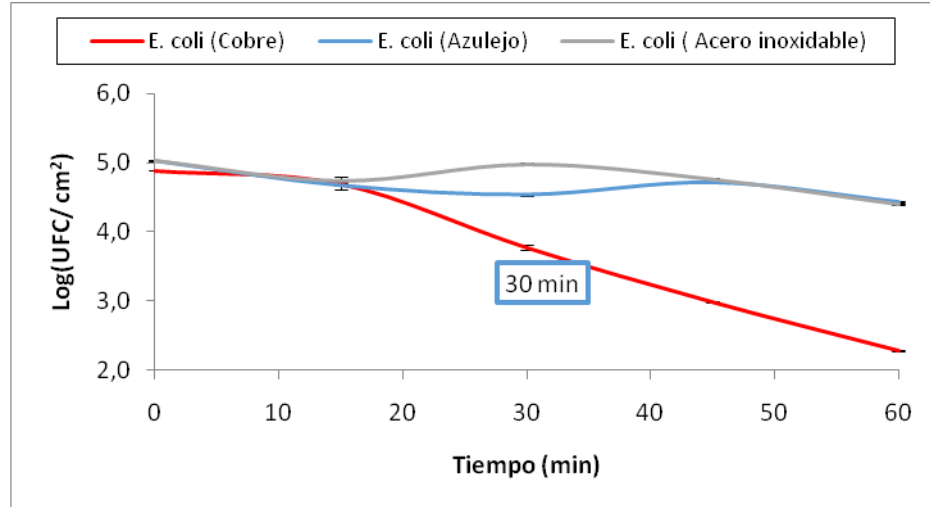


Figura 14. Cinética de muerte en superficies con una elevada carga inicial de *E.coli*

En la Figura 13 se puede observar que existe diferencias significativas entre las distintas superficies ($p < 0,05$) en donde el cobre se diferencia del acero y el azulejo en el paulatino decrecimiento de la carga bacteriana. Hasta los 15 min la cantidad de bacterias se mantuvo constante para las 3 superficies, pero llegando a los 30 min, en el cobre se observó una reducción de

aproximadamente un ciclo logarítmico. Posteriormente la baja se hace constante en un ciclo logarítmico cada 15 min, es decir a los 45 min habían 10^2 UFC y a los 60 min la curva seguía decreciendo. Lo mismo sucedió con *Escherichia coli*, presentado en el Figura 14. A los 30 min ocurre la primera reducción de la carga bacteriana, la cual continúa disminuyendo, con proyecciones de seguir bajando en un ciclo logarítmico a los 60 min. Hong *et al.* (2012) en su investigación acerca del tiempo de muerte bacteriana en superficie de cobre establece que para *E. coli* en los primeros 15 min la disminución de la carga bacteriana es baja y significativamente más rápida después de los 15 min de exposición. Para acero inoxidable no hay mayores variaciones con respecto a su carga inicial. Estos resultados concuerdan con los realizados en este estudio, debido a que pasado los 15 min comenzó una rápida destrucción, que conllevó a que a los 30 min la carga bacteriana bajara un ciclo logarítmico. Por tanto, el tiempo de exposición y porcentaje de cobre tienen una correlación directa con la velocidad de muerte. Según Hong *et al.* (2012), en láminas de 99,90% de cobre, la degradación rápida del ADN comienza a los 30 min y es completa a los 45 min, no encontrándose nada a los 60 min de exposición a la superficie, observando una relación directa entre porcentaje de cobre y velocidad de degradación de ADN.

5.3.2 Cinética de muerte con una baja carga inicial de bacterias.

En los siguientes gráficos se muestra a *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones menores para ver si estos influyen en la cinética de muerte. Los resultados están graficados en UFC/cm².

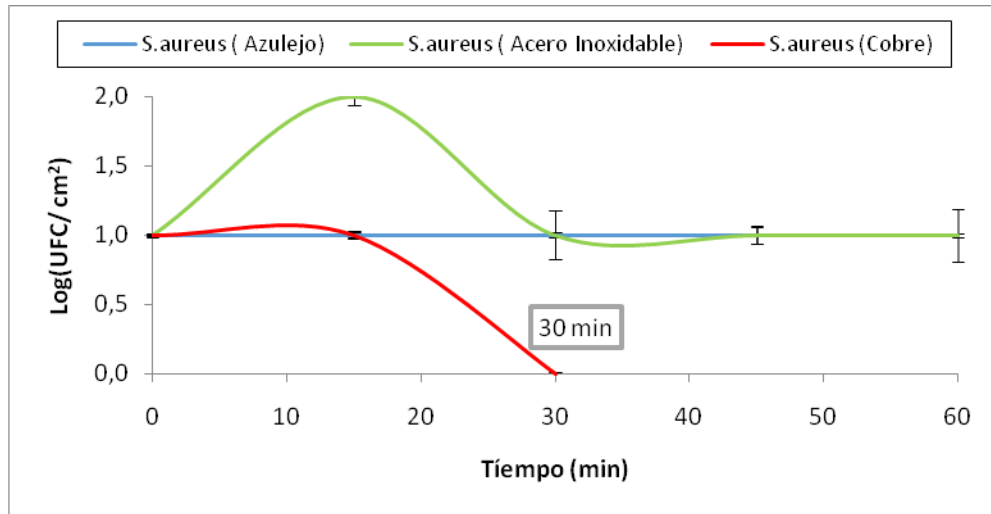


Figura15:Cinética de muerte ensuperficies con una carga inicial baja de *S.aureus*

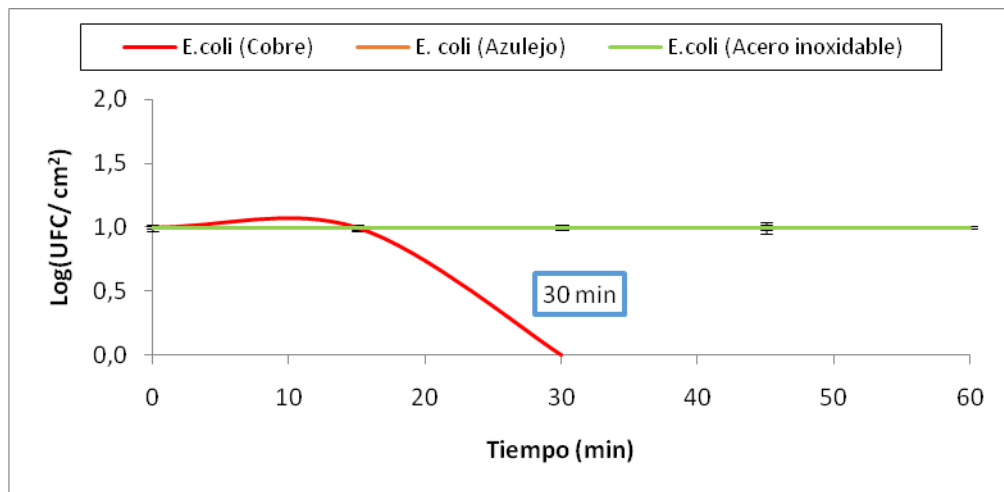


Figura16:Cinética de muerte ensuperficies con una cargabaja de *E.coli*

En las Figura 15 y 16 se puede apreciar, tal como sucedió con cargas más altas, que a los 30 min la carga bacteriana disminuyó en un ciclo logarítmico, encontrándose a ese tiempo la destrucción total, tanto para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*. Para el caso del azulejo y el acero inoxidable no hubo variaciones, manteniéndose en las mismas concentraciones iniciales, en tiempo 0 como a los 60 min. Las diferencias entre cobre y las demás superficies fueron significativas (p valor < 0,05)

5.4 Cinética de muerte en cobre: comparación entre bacterias

A continuación, se comparan ambas bacterias frente a cobre a concentraciones altas y bajas.

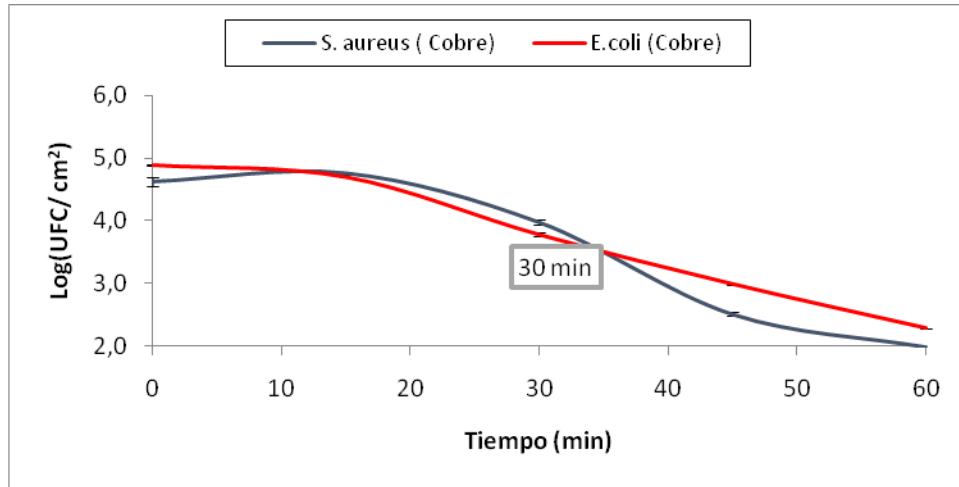


Figura17: Cinética de muerte entre bacterias con una alta carga inicial

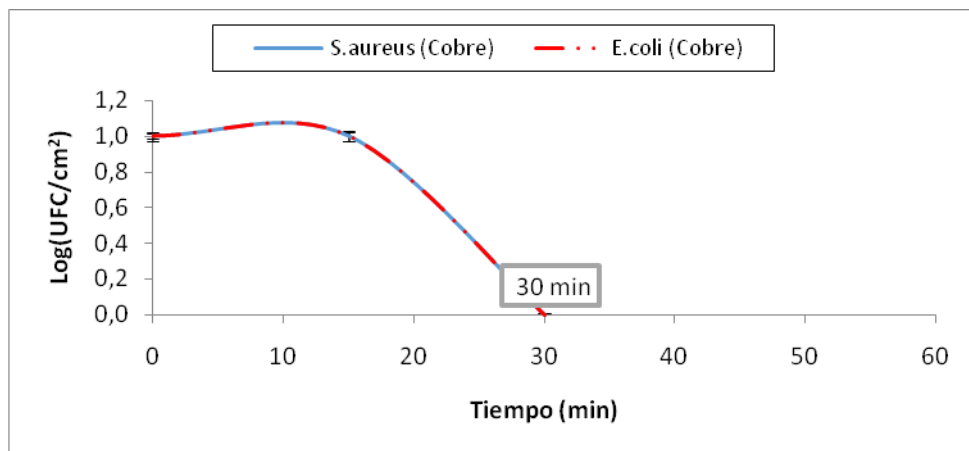


Figura 18: Cinética de muerte entre bacterias con una carga inicial baja

Para ambos Gráficos, no hay diferencias significativas entre bacterias. Tanto la Figura 17 como la Figura 18, muestran como a los 30 min el cobre baja un ciclo logarítmico. Para concentraciones altas de bacterias, después de la media hora la reducción se observa que es de 1 log cada 15 min aproximadamente. Para el caso de concentraciones bajas (Figura18), a los 30 minno se encuentran colonias visibles a simple vista. Por consiguiente, todo depende de la carga inicial que tenga un producto para que el cobre tenga

efectividad en el tiempo. Es decir, con una carga inicial de 10^1 UFC/cm² la eliminación de estas dos bacterias sería completa a los 30 min en cambio con una carga inicial elevada, recién a los 30 min bajaría un ciclo logarítmico, no significando que se llega a niveles aceptables que aseguren la inocuidad, ya que la carga remanente aún puede ser considerada como un potencial riesgo para la salud.

Resultados de otras investigaciones sostienen que para 10^7 UFC de *Staphylococcus aureus*/ cm² la muerte en superficies de cobre al 99,90 % sería luego de 90 min, y para aleaciones con un 80 % de cobre la reducción significativa sería después de 3 h. Para acero inoxidable no habría cambios en la concentración de *S. aureus* hasta 72 h de exposición (Stevenson *et al.*, 2012; Konieczny *et al.*, 2012).

Hong *et al* (2012) señalan que para *E.coli* sucede lo mismo, al aumentar el cobre aumenta la tasa de velocidad de muerte y como se dijo anteriormente pasado los 15 min comienza a aumentar la reducción bacteriana en forma más rápida alcanzando a destruir en 45 min una contaminación de 10^8 UFC /cm²

De todas maneras, hay coincidencia en que tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas la muerte comienza con daños a la membrana siendo el factor principal, alterando las propiedades de la bicapa lipídica, afectando la fluidez y por tanto, indirectamente la actividad de proteínas integrales y enzimas para la síntesis de lípidos, y en segundo lugar dañando al ADN (Espírito *et al*, 2010; Hong *et al*, 2012). Esta similitud en el método explicaría la igualdad en los tiempos de muerte.

Por consiguiente, los resultados demuestran que el cobre tiene propiedades antibacterianas que pueden utilizarse en lugares expuestos a contacto con alimentos, reduciendo principalmente la contaminación cruzada, siendo necesario considerarlo como un complemento y no como un sustituto del control de prácticas higiénicas para la prevención de infecciones (Gorman *et al*, 2012; Konieczny *et al*, 2012).

5. CONCLUSIONES

- Se determinó el efecto del cobre sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, el cual demostró una disminución de la carga bacteriana teniendo un efecto biocida frente a estos microorganismos.
- Se obtuvieron resultados inhibitorios y bactericidas para el cobre en su estado de oxidación Cu^{+2} pero no a los estados de Cu^{+1} y Cu^0 (cobre metálico en trozos y filamentos). La CMI fue 0,3 M y 0,05 M para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente, a concentraciones de 10^2 UFC/ml. Para concentraciones de 10^6 UFC/ml, la CMI fue de 0,5 M y 0,1 M para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.
- La CMB para concentraciones de 10^2 UFC/ml fue de 0,4 M y 0,1 M para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Para concentraciones de 10^6 UFC/ml la CMB fue de 0,6 M y 0,15 M, para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.
- En la superficie de cobre la cinética de muerte fue la misma a las distintas concentraciones de *E. coli* y *S. aureus* ensayadas. A los 30 min se observó una reducción de un ciclo logarítmico en la carga bacteriana, la que continúa en ese tenor cada 15 min.
- En superficies de acero inoxidable y azulejo, no hubo reducción en la cantidad de microorganismos, manteniéndose constantes en el tiempo.
- Por tanto, el Cu^0 (utilizado en superficie) y el Cu^{+2} tiene la capacidad de inhibir y eliminar bacterias dependiendo de la concentración de la carga bacteriana inicial y el tiempo de exposición, ayudando a combatir la contaminación cruzada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR. 2004. Resumen de Salud Pública: Cobre [En línea] 1600 Clifton Road NE Atlanta<http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs132.pdf> [Consulta: 16 de mayo 2014]
- ❖ Ahamed, M., Alhadlaq, H., Majeed, M., Karuppiah, P. y Al-Dabhi, N. (2014). Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. Volume 2014, Article ID 637858, 4 pages
- ❖ Antimicrobial copper. 2012. Laboratory testing of Antimicrobial copper reveals 3 key benefits. [En línea]<<http://www.antimicrobialcopper.com/us/scientific-proof/epa-registration.aspx>> [Consulta: 29 de Abril 2013]
- ❖ Antimicrobialcopper. 2012. La ciencia detrás de AntimicrobialCopper[Enlínea].<<http://www.antimicrobialcopper.com/es/evidencias-científicas/cómo-funciona.aspx>> [Consulta: 8 de marzo 2015]
- ❖ Appold Hans *et al* ,2005. Tecnología de los Metales. Editorial Reverté. [EnLínea]<https://books.google.cl/books?id=_e0h1WvbEpYC&pg=PA81&dq=cobre+metalico+reacciona+con+oxigeno&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwji5fvcyrvKAhXMHZAKHW83CWoQ6AEIRjAl#v=onepage&q=cobre%20metalico%20reacciona%20con%20oxigeno&f=false>. [Consulta: 5 de marzo 2015]

- ❖ Arilla F., E. 1999. Estructura y metabolismo de carbohidratos. En: Hernández, M. y Sastre, A. (Eds). Tratado de Nutrición. Madrid, Editorial Díaz de Santos S.A. pp. 53-100.

- ❖ Baker, J. 2010. Copper stress induces a global stress response in *Staphylococcus aureus* and represses *sae* and *agr* expression and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 150-160.

- ❖ Biología celular y molecular. 2005. Por Harvey Lodish “et al”. 5ª ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.

- ❖ Bogdanović, U. 2014. Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters* 128: 75-78.

- ❖ Borkow, G. 2005. Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry* 12(18): 2163-2175.

- ❖ Botanni, E. y Odetti, H. 2005. Introducción a la Química Inorgánica. 3ª ed. Santa Fe, Universidad Nacional del Litoral. 420p.

- ❖ Campbell Walsh, 2007. Urología. Novena edición. [Consulta en Línea]https://books.google.cl/books?id=ONKWVHU5SNMC&pg=PA229&dq=e+coli+uropatogena&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMIr_v5z4_NyAIVCfyACh0ayAh6#v=onepage&q=e%20coli%20uropatogena&f=false.> [Consulta: 05 de mayo 2013].

- ❖ Calvo, J. y Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(1): 44-52.

- ❖ CODELCO, 2013. Historia del Cobre. [en línea] Chile. <http://www.codelco.com/historia-del-cobre/prontus_codelco/2011-06-03/222414.html> [Consulta: 05 de mayo 2013].

- ❖ Conocimientos Fundamentales de Biología. 2006. Por Luis Jiménez “et al”. México, Pearson Educación. Vol. I. 192p.

- ❖ Cotton, F. y Wilkinson, G. 2001. *Química Inorgánica Básica*. México, Editorial Limusa. 473-478.

- ❖ Dabrowiak, J. 2009. *Metals in Medicine*. Department of Chemistry. New York, John Wiley & Sons. 234p.

- ❖ Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. 1997. *Microbiología de Alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza, Editorial Acribia. 816p.

- ❖ Elguindi, J., Hao, X., Lin, Y., Alwathnani, H., Wei, G. y Rensing, C. 2011. Advantages and challenges of increased antimicrobial copper use and copper mining. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91:237-249.

- ❖ Ecosea.2014. Cobre salud, medio ambiente y nuevas tecnologías. [En línea] http://www.ecosea.cl/pdfs/Cobre_Salud_Medio_Ambiente_Nuevas_Tecnologias.pdf. [Consulta: 05 de mayo 2013].

- ❖ Espírito, C. 2011. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 77(3): 794-802.
- ❖ Espírito, C. 2012. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiology Open* 1(2): 46-52.
- ❖ EuropeanCopperInstitute. 2013. El cobre en el tiempo. [En línea]. <<http://www.eurocopper.org/cobre/historiacobreeneltiempo.html>> [Consulta 5 de mayo 2013].
- ❖ FAO 2015. Preventing *Escherichia coli* in Food. [en línea] <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/e-coli0/es/> [Consulta: 8 de enero 2015].
- ❖ Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P. y Figueroa, G. 2004. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiology* 4:19.
- ❖ FDA 2014. Food and Drug Administration. [en línea] <<http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/ucm091976.htm>> [Consulta: 7 enero 1015].
- ❖ Figueroa, G. 2013. Cobre: salud, medio ambiente y nuevas tecnologías. [En línea] www.ecosea.cl/pdfs/Cobre_Salud_Medio_AmbienteNuevas_Tecnologias.Pdf> [Consulta: 29 de abril 2013]
- ❖ Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, ALIKA. 2013. *Escherichiacoli*. [En línea] <http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf> [Consulta: 9 de enero 2015]

- ❖ Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, ALIKA. 2013. *Staphylococcus*[Enlíneahttp://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf] [Consulta: 9 de enero 2015]

- ❖ Grass, G., Rensing, C. y Solioz, M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1541-1547

- ❖ Housecroft, K. y Sharpe, A. 2006. *Química Inorgánica*. 2ª ed. Madrid, Pearson Educación S.A. 950p.

- ❖ Hong, R. 2012. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6): 1776-1784.

- ❖ Hoshino, N. 1999. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes. *Free Radical Biology & Medicine* 27(11/12): 1245-1250.

- ❖ ISPCH, 2008. Instituto de Salud Pública de Chile. Procedimiento recuento de microorganismos en suspensión por método de torunda en superficie. [Enlínea]<http://www.ispch.cl/lab_amb/doc/microbiologia_alimentos/PRT-077.pdf> [Consulta: 8 de enero 2015].

- ❖ Kappes, T. 2012. Actividad de cobre sobre bacilos Gram negativos multi-resistentes aislados en hospitales chilenos. *Revista Chilena de Infectología* 29(6): 622-627.

- ❖ Konieczny, J. y Rdzawski, Z. 2012. Antibacterial properties of copper and its alloys. *Archives of Materials Science and Engineering*. 56(2): 53-60.
- ❖ Laha, D. 2014. Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *MaterialsResearchBulletin* 59: 185-191.
- ❖ Ledermann, W. 2007. *Una Historia Personal de las Bacterias*. Santiago, RIL editores. 438p.
- ❖ León K., López, A., Gago, J. y Solís, J. 2011. Synthesis of nanostructured copper oxide assisted with gamma or ultrasound irradiation and its antimicrobial properties. *Revista Eciperú* 8(1).
- ❖ Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. 2003. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 10ª ed. Madrid, Editorial Pearson Educación. 1096p.
- ❖ Maleki, S. 2014. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *MaterialsScience and Engineering* 44: 278-284.
- ❖ Marrero-Coto, J. 2010. Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 41(1): 67-78.
- ❖ Marrero, K. y Fando, R. 2009. Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. *Revista CENIC* 40(3): 186-198.

- ❖ Mead, P., Slutshker, L., Dietz, V., Mccaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., Griffin, P. y Tauxe R. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5(5): 607-625.

- ❖ Merkel, H. 2002. Copper corrosion by-product release in long-term stagnation experiments. *Water Research* 36: 1547-1555.

- ❖ Microbiología. 1992. Por Roger Stanier "et al". 2ª ed. Barcelona, Editorial Reverté. 753p

- ❖ Montoya, H. H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Colombia, Universidad de Antioquia. 254p.

- ❖ Negroni, M. 2009. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2ª ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. 656p.

- ❖ O`Gorman, J. y Humphreys, H. 2012. Application of copper to prevent and control infection. Where are we now?. *Journal of Hospital Infection* 81: 217-223.

- ❖ Patikarnmonthon, N., Nawapan, S., Buranajitpakorn, S., Charoenlap, N., Mongkolsuk, S. y Vattanaviboon, P. 2010. Copper ions potentiate organic hydroperoxide and hydrogen peroxide toxicity through different mechanisms in *Xanthomonascampestrispv. campestris*. *Microbiology Letters* 313(1): 75-80.

- ❖ Pramaniket *al.* (2012). A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. Volume 96, 1 August 2012, Pages 50–55
- ❖ Química Inorgánica. 2002. Por Claudia Barajas “et al”. México, Mc Graw-Hill. 101p.
- ❖ Reed Book, 2007. Atlas of Pediatric Infectious Diseases. Editorial Médica Panamericana. [Consulta en Línea]
<https://books.google.cl/books?id=rMyC96RxP68C&pg=PA84&dq=e+coli+meningitis+neonatal&hl=es&sa=X&ved=0CCcQ6AEwAWoVChMlrOuYkZHNYAlVxdSACH1WrQa#v=onepage&q=e%20coli%20meningitis%20neonatal&f=false>. [Consulta: 05 de mayo 2013].
- ❖ Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra ed. México, Editorial Médica Panamericana. 1802p.
- ❖ Romero, R. y Herrera, I. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. México, editorial médica panamericana. 659p.
- ❖ Suarez, C. y Gudiol, F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 27(2): 116-129.
- ❖ Suárez, P. y Reyes, R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. Revista Interciencia. 27(4): 160-164.
- ❖ Stevenson, J., Barwinska-Sendra, A., Tarrant, E., y Waldron, K. 2013. Mechanism of action and applications of the antimicrobial properties of

copper. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education. 468-479.

- ❖ Teitzel, G., Geddie, A., De Long, S., Kirisits, M., Whiteley, M. y Parsek, M. 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 188(20): 7242-7256.
- ❖ Theivasanthi, T. y Alagar, M. 2011. Studies of copper nanoparticles effects on microorganisms. Annals of Biological Research, 2(3): 368-373.
- ❖ Tortora, G., Funke, B. y Case, C. 2007. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires, Editorial Panamericana. 988p.
- ❖ Valenzuela Rodrigo, Rene Cortez, Miguel Zazopulos, Jaime Carmi, 2012. Determinación del perfil de ácidos grasos de bacterias del género Vibrio por cromatografía de gases. Universidad Técnica Santa María. Scientia Chromatographica 2012; 4(4):271-280
- ❖ Valodkar, M. 2012. Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles. Journal of Hazardous Materials 201- 202: 244-249.
- ❖ Warnes, S. y Keevil, C. 2011. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant Enterococci following wet or dry surface contact. Applied and Environmental Microbiology. 77(17): 6049-6059.

- ❖ Weaver, L. 2010. Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2200-2202

7.Anexos

Análisis estadístico.

❖ *S. aureus*: comparación entre superficies con una carga inicial de 10^6 UFC/cm²

❖ Análisis de Varianza para Concentración [LOG] - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Superficie	6,5576	2	3,2788	9,01	0,0013
B:Tiempo	5,49258	4	1,37315	3,77	0,0168
RESIDUOS	8,37164	23	0,363984		
TOTAL (CORREGIDO)	20,4218	29			

Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración [LOG] por Superficie

Método: 95,0 porcentaje LSD

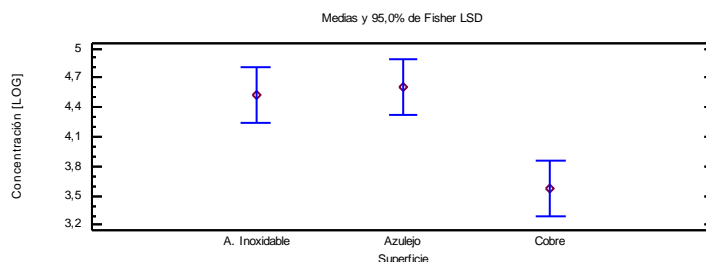
Superficie	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Cobre	10	3,57239	0,190784	X
A. Inoxidable	10	4,52322	0,190784	X
Azulejo	10	4,6006	0,190784	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A. Inoxidable - Azulejo		-0,07738	0,558143
A. Inoxidable - Cobre	*	0,95083	0,558143
Azulejo - Cobre	*	1,02821	0,558143

* indica una diferencia significativa.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 2 pairs, indicating that these pairs show statistically significant differences at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.



- ❖ *E. coli*: comparación entre distintas superficies con una carga inicial de 10^6 UFC/cm²

Análisis de Varianza para Concentración [LOG] - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Superficie	6,76623	2	3,38312	15,85	0,0000
B:Tiempo	5,84631	4	1,46158	6,85	0,0009
RESIDUOS	4,91056	23	0,213503		
TOTAL (CORREGIDO)	17,5231	29			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

* denota a statistically significant difference.

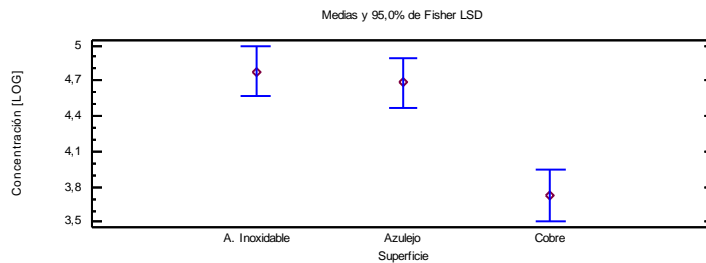
Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración [LOG] por Superficie

Método: 95,0 porcentaje LSD

Superficie	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Cobre	10	3,72784	0,146117	X
Azulejo	10	4,68228	0,146117	X
A. Inoxidable	10	4,78101	0,146117	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A. Inoxidable - Azulejo		0,09873	0,42747
A. Inoxidable - Cobre	*	1,05317	0,42747
Azulejo - Cobre	*	0,95444	0,42747

* indica una diferencia significativa.



- ❖ Diferencia entre *E. coli* y *S. Aureus* con una carga inicial de 10^6 UFC/cm²

Análisis de Varianza para Concentración - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bacterias	0,00992351	1	0,00992351	0,17	0,6899
B:Tiempo	16,9162	4	4,22905	70,73	0,0000
RESIDUOS	0,837032	14	0,059788		
TOTAL (CORREGIDO)	17,7632	19			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

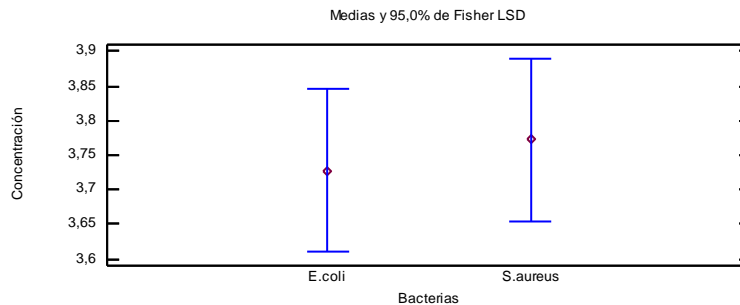
Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración por Bacterias

Método: 95,0 porcentaje LSD

Bacterias	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
E.coli	10	3,72784	0,0773227	X
S.aureus	10	3,77239	0,0773227	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
E.coli - S.aureus		-0,04455	0,234535

* indica una diferencia significativa.



- ❖ Comparación entre superficies para *S. aureus* con una carga inicial de 10^2 UFC/cm²

Análisis de Varianza para Concentración - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Superficie	4,22522	2	2,11261	18,31	0,0000
B:Tiempo	1,85247	4	0,463116	4,01	0,0130
RESIDUOS	2,65359	23	0,115373		
TOTAL (CORREGIDO)	8,73127	29			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Concentración en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Concentración con un 95,0% de nivel de confianza.

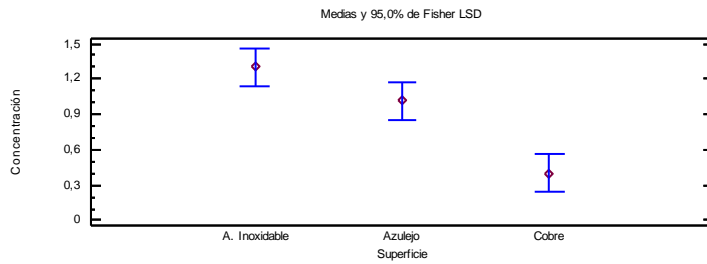
Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración por Superficie

Método: 95,0 porcentaje LSD

Superficie	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Cobre	10	0,4	0,107412	X
Azulejo	10	1,01212	0,107412	X
A. Inoxidable	10	1,3	0,107412	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A. Inoxidable - Azulejo		0,28788	0,314237
A. Inoxidable - Cobre	*	0,9	0,314237
Azulejo - Cobre	*	0,61212	0,314237

* indica una diferencia significativa.



❖ *E.coli* : comparación entre superficies con una carga inicial de 10^2 UFC/cm²

Análisis de Varianza para Concentración - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Superficie	2,4	2	1,2	17,25	0,0000
B:Tiempo	0,8	4	0,2	2,88	0,0456
RESIDUOS	1,6	23	0,0695652		
TOTAL (CORREGIDO)	4,8	29			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Concentración en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Concentración con un 95,0% de nivel de confianza.

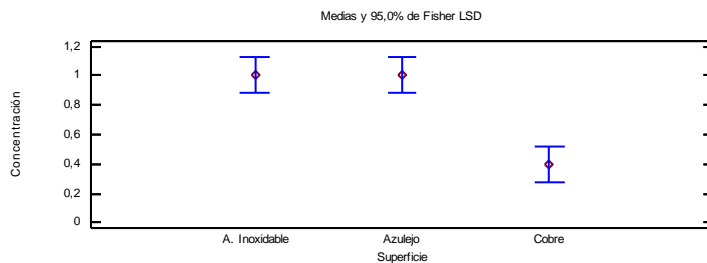
Pruebas de Múltiple Rangos para Concentración por Superficie

Método: 95,0 porcentaje LSD

Superficie	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Cobre	10	0,4	0,0834058	X
Azulejo	10	1,0	0,0834058	X
A. Inoxidable	10	1,0	0,0834058	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A. Inoxidable - Azulejo		0,0	0,244006
A. Inoxidable - Cobre	*	0,6	0,244006
Azulejo - Cobre	*	0,6	0,244006

* indica una diferencia significativa.



- ❖ Comparación entre bacterias con concentraciones iniciales de 10^2 UFC/cm²

Análisis de Varianza para Concentración - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bacterias	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B:Tiempo	4,8	4	1,2	*	0,0000
RESIDUOS	0,0	14	0,0		
TOTAL (CORREGIDO)	4,8	19			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Concentración en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0,05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Concentración con un 95,0% de nivel de confianza.

