

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
POSGRADO EN QUÍMICA**

**INFLUENCIA DE MEDIADORES QUÍMICOS
Y POTENCIAL SOBRE EL METABOLISMO
DE *Pseudomonas sp.***

**TESIS QUE PRESENTA EL
I.B.I. JUAN CARLOS MAYA CASTELLANOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN QUÍMICA**

**ASESORES:
DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES**

MÉXICO, D.F. JULIO DE 2006

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE ELECTROQUÍMICA
R-109 Y TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES W-106 DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO CON LA BECA PROPORCIONADA POR EL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA CONACYT CON
NÚMERO DE REGISTRO: 169489.

IZTAPALAPA, MÉXICO D.F. A 20 DE JULIO DE 2006

EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA APROBÓ LA TESIS

**INFLUENCIA DE MEDIADORES QUÍMICOS Y POTENCIAL SOBRE EL
METABOLISMO DE *Pseudomonas sp.***

QUE PRESENTÓ

JUAN CARLOS MAYA CASTELLANOS

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES: DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES

JURADO

PRESIDENTE: DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

SECRETARIO: DRA. ANNE CLAIRE TEXIER

VOCAL: DRA. ADRIANA MÓRALES PÉREZ

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO LA DIRECCIÓN CONJUNTA DE LOS DOCTORES IGNACIO GONZÁLES Y FLORINA RAMÍREZ DURANTE LA ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

A MIS FAMILIARES POR SU PACIENCIA Y APOYO QUE ME BRINDARON.

A TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL LABORATORIO R-109 DE ELECTROQUÍMICA: DORA, NORA, YÁRA, CRISTINA, MELINA, ARISTEO, BAYARDO, CARLOS, CÁNDIDO, GERARDO, JORGE, JOSÉ LUIS, ROMÁN Y VÍCTOR. DEL LABORATORIO W-106 DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES: CITLALLI TORRES, CITLALLI GARCÍA, GEOVANA, ISABEL NERIA, PATRICIA, ARTURO, JOE, RICARDO HUIZACHE, RICARDO BERISTAIN, ULISES GARCÍA, ULISES DURÁN Y JAVIER.

A LOS DOCTORES: OSCAR MONROY, JORGE GÓMEZ, GERARDO SAUCEDO, FABELA, JORGE GRACIDA, MARIANO GUTIÉRREZ , IDELFONSO. ASÍ COMO A LAS DOCTORAS: CARMEN DE CROMATOGRFÍA, MÓNICA, MARGARITA. POR PERMITIRME UTILIZAR SUS INSTALACIONES.

A LA MAESTRA ISEO GONZÁLEZ, DOCTORA MARGARITA VINIEGRA Y EL LICENCIADO ATENCO POR SU ACCESORIA Y APOYO

A LOS MIEMBROS DEL JURADO, POR SU CUIDADOSA REVISIÓN Y POR LAS CONTRIBUCIONES HECHAS AL PRESENTE TRABAJO.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS DE POSGRADO.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	ii
1. Introducción	1
1.1 Problemática general	1
2. Antecedentes	3
2.1 Género microbiano <i>Pseudomonas</i>	3
2.2 Metabolismo celular de <i>Pseudomonas</i>	3
2.3 Función y propiedades de las quinonas	10
2.4 Quinonas en el metabolismo celular	11
2.5 Metabolismo celular influenciado por electrodos	14
2.6 Efecto del potencial en el metabolismo celular	15
3. Justificación	17
4. Establecimiento de la hipótesis	18
5. Objetivo general y particulares del trabajo	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
6. Metodología	20
6.1 Etapa electroquímica	20
6.2 Etapa microbiológica	22
6.3 Etapa bioelectrocatalítica	26
7. Resultados y Discusión	28
7.1 Resultados electroquímicos	28
7.2 Resultados microbiológicos	46
7.3 Resultados de bioelectrocatalisis	48
8. Conclusiones	56
9. Bibliografía	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de colonias de <i>Pseudomonas</i>	3
Figura 2. Resumen simplificado del metabolismo celular	4
Figura 3. Ruta metabólica de oxidación de glucosa vía respiración aerobia	6
Figura 4. Estructuras químicas de antraquinonas	11
Figura 5. Utilización de antraquinonas para acelerar el metabolismo celular	11
Figura 6. Utilización de sustancias húmicas para reducir hierro III a hierro II	12
Figura 7. Utilización de antraquinonas para reducir compuestos azo	13
Figura 8. Regeneración de antraquinonas por medio de dos microorganismos	14
Figura 9. Utilización de compuestos químicos para obtener energía	14
Figura 10. Electrodo con <i>Shewanella putrefaciens</i> para obtener energía	15
Figura 11. Utilización de antraquinonas y un electrodo para acelerar el metabolismo celular	16
Figura 12. Estructuras químicas de antraquinonas estudiadas	21
Figura 13. Curva patrón de UFC ml ⁻¹ vs. absorbancia	24
Figura 14. Curva patrón de glucosa con presencia y ausencia de AQ2S 1 mM	25
Figura 15. Diseño de la celda electroquímica de tres electrodos	27
Figura 16. Grafica de perturbación en la técnica de voltamperometría cíclica	29
Figura 17. Voltamperograma típico	30
Figura 18. Voltamperogramas para las antraquinonas electroattractoras	31
Figura 19. Voltamperograma para las antraquinonas electrodonadoras	32
Figura 20. Función voltamperométrica vs. Logaritmo de la velocidad	34
Figura 21. Diferencia de potenciales de pico vs. Logaritmo de la velocidad	35
Figura 22. Potencial de reducción (E _{pc}) vs. Velocidad	37
Figura 23. Voltamperograma típico vs. Logaritmo de la velocidad de la AQ26S	39
Figura 24. (E _{pa} +E _{pc})/2 vs. Sigma (σ _p) de Hammett, para diferentes antraquinonas	41
Figura 25. Diagrama de predicción de reacciones para las diferentes antraquinonas	45
Figura 26. Unidades Formadoras de Colonias (UFC ml ⁻¹). vs. Tiempo	46
Figura 27. Consumo de glucosa de <i>Pseudomonas sp.</i> vs. Tiempo.	47
Figura 28. Efecto de la adición de 1 mM de las antraquinonas en el consumo de glucosa de <i>Pseudomonas sp.</i>	48
Figura 29. Efecto de la adición de 1 mM de las antraquinonas en el crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i>	49
Figura 30. Efecto de la imposición de -200 mV de potencial en el consumo de glucosa en <i>Pseudomonas sp.</i>	50
Figura 31. Efecto de la imposición de -200 mV de potencial en el crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i>	51
Figura 32. Efecto de la adición de 1 mM de las antraquinonas y -200 mV de potencial en el consumo de glucosa en <i>Pseudomonas sp.</i>	52
Figura 33. Efecto de la adición de 1 mM de las antraquinonas y -200 mV de potencial en el crecimiento de <i>Pseudomonas sp.</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.Pares <i>redox</i> de importancia microbiológica	5
Tabla 2.Composición del medio enriquecido Luria	22
Tabla 3.Composición del medio de cultivo	22
Tabla 4.Potenciales de reducción y oxidación de las antraquinonas a 100 mV s ⁻¹	39
Tabla 5.Potenciales de reducción de medio pico experimental, σ_p teórico y diferencia del potencial de medio pico menos el potencial de medio pico de la referencia de la Antraquinona	41
Tabla 6.Relación de la corriente anódica y catódica para las diferentes antraquinonas a dos velocidades de barrido 50 mV y 500 mV	43
Tabla 7.Valores de velocidad de consumo de sustrato y velocidad específica de crecimiento para los diferentes experimentos realizados	54

RESUMEN

En este trabajo se propuso una metodología que integra el uso de un conductor electrónico o electrodo en solución y la adición de mediadores químicos naturales de tipo antraquinona mono y di sustituidos en la posición 2 y 2-6, para estudiar su efecto individual y simultáneo sobre el metabolismo celular del microorganismo *Pseudomonas sp.* Encontrándose que las antraquinonas del tipo ácido sustituidas en la posición 2, son sistemas reversibles y eficientes en las condiciones experimentales y al estar en contacto en solución con *Pseudomonas sp.* no permiten acelerar el consumo de glucosa, pero el crecimiento se ve modificado. Por otra parte, la imposición de un potencial electroquímico de -200 mV, respecto al potencial de circuito abierto de la solución, se encontró que el consumo de glucosa y crecimiento de *Pseudomonas sp.* se aceleraba, indicando de esta manera que la imposición de un potencial es la variable adecuada para modificar el metabolismo celular del microorganismo *Pseudomonas sp.*

ABSTRACT

Presently work we proposed a methodology that integrates the use of an electrode and natural chemical mediators (Anthraquinones) substituted in the position 2 and 2-6 in solution, with the purpose of seeing their individual and simultaneous effect on the cellular metabolism of microorganism *Pseudomonas sp.* We found that the 2 acid anthraquinones are reversible and efficient systems under the experimental conditions and when the 2 acid anthraquinones are in the solution with *Pseudomonas sp.* the consumption of glucose is not modified while the growth increases. But the imposition of an electrochemical potential of -200 mV allowed accelerating the consumption of glucose and growth of *Pseudomonas sp.* Indicating that the imposition of -200 mV of potential is the appropriate variable to modify the cellular metabolism of the microorganism *Pseudomonas sp.*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PROBLEMÁTICA GENERAL

La contaminación ambiental en suelos y agua que el hombre ha provocado en los ecosistemas, es uno de los principales factores de preocupación hoy en día. Ante tal problema surge la necesidad de rescatar los ecosistemas a través de metodologías que ayuden a tal propósito. Por ejemplo: Prince (1993); Field y colaboradores (2000) y González Neria (2002), han utilizado a microorganismos vivos en forma individual o en poblaciones mixtas (consorcios) para degradar mezclas complejas de contaminantes del tipo de los hidrocarburos. Estos procesos donde participan microorganismos son conocidos como procesos biotecnológicos, los cuales resultan ser más atractivos, al compararlos con los procesos químicos; debido a que los primeros implican menor costo, son recursos renovables y en la mayoría de los casos existe una mineralización completa de los compuestos contaminantes hasta agua (H_2O) y bióxido de carbono (CO_2). Sin embargo, una limitante de estos procesos biotecnológicos es el tiempo que invierten los microorganismos en la transformación de los contaminantes. Por tal motivo Lovley D.R. y colaboradores (1996 y 1999); Bechtold T. y colaboradores (1999), Cervantes-Carrillo (2002) y Cadena Ramírez (2004); han adicionado a estos procesos biotecnológicos agentes biológicos (otro microorganismo) y agentes químicos naturales de tipo quinona respectivamente, como regeneradores de especies *redox* y mediadores que actúan en el metabolismo celular, aceptando y donando electrones haciéndolo más rápido. Además Riondet Christophe y colaboradores (1999 y 2000), ha aplicado un potencial eléctrico, por medio de un conductor electrónico (electrodo), para acelerar los procesos metabólicos en microorganismos.

En este trabajo se utilizó el metabolismo celular de un microorganismo *Pseudomonas sp.* que fue aislado de un pozo petrolero y es eficaz en el consumo de hidrocarburos, además este microorganismo se caracterizó en las tesis de licenciatura y maestría de González P.T. (1997); Grimaldo J.C. (1997) y González Neria I. (2002), respectivamente.

Además el proponer una metodología que integra el uso de un electrodo y la adición de antraquinonas mono y di sustituidas en la posición 2 y 2-6 en solución, para estudiar y evaluar el efecto, en forma individual y simultánea de ambas variables sobre el metabolismo celular de consumo de glucosa y crecimiento del microorganismo *Pseudomonas sp.*, teniendo como las variables de respuesta las velocidades de consumo de sustrato y crecimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 GÉNERO MICROBIANO PSEUDOMONAS

El género *Pseudomonas* se encuentra clasificado como células procariotas y se caracteriza en general por poseer una forma de bacilos rectos o curvados con flagelación polar. Su tamaño varía entre 0.5 μm y 1.0 μm por 1.5 μm a 4.0 μm , (Figura 1). Son Gram negativos y además este grupo microbiano ha sido empleado por González P.T. (1997); Grimaldo J.C. (1997); Vasu R. (1997); y Wuley J. (2000); entre otros para el tratamiento de aguas y suelos contaminados particularmente por hidrocarburos, debido a que las especies de *Pseudomonas* son muy versátiles en la utilización de diferentes fuentes de carbono y se adaptan fácilmente a las condiciones ambientales.



Figura 1. Fotografía de colonias de *Pseudomonas cepacia* en una placa de agar. ⁽¹⁶⁾

2.2 METABOLISMO CELULAR DE PSEUDOMONAS

En general el metabolismo celular de los microorganismos, para degradar los contaminantes, depende de la forma de obtención de energía de éstos; de esta forma se clasifican: Los que utilizan luz, como fotótrofos, los que utilizan compuestos orgánicos, como quimiorganótrofos; y los que son capaces de utilizar compuestos

inorgánicos, se conocen como quimiolitótrofos. La Figura 2 muestra un resumen del metabolismo celular.

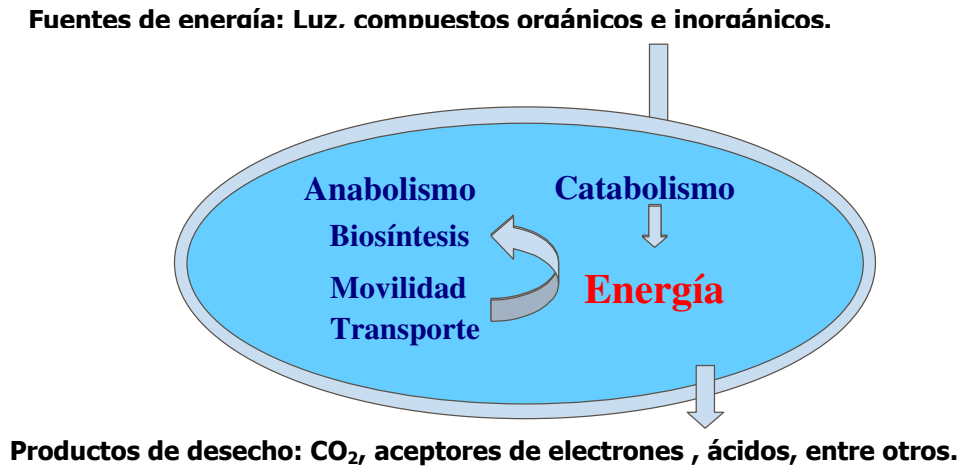


Figura 2. Resumen simplificado del metabolismo celular. ⁽¹⁶⁾

En particular el metabolismo celular de las especies *Pseudomonas* es quimioorganotrófico aerobio, es decir; utilizan compuestos orgánicos y los procesos *redox* ocurren en presencia de aceptores terminales de electrones como son: Oxígeno (O₂) y otros oxidantes. La presencia del oxígeno es importante debido a que provoca una gran diferencia de los potenciales de reducción entre los donadores y aceptores de electrones (pares *redox*), permitiendo la oxidación total de los compuestos orgánicos hasta bióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). Produciendo mucho más adenosín trifosfato (ATP) a comparación de la respiración anaerobia (sin presencia de oxígeno). La Tabla 1 muestra algunos de los diferentes pares *redox* de importancia microbiológica.

Tabla 1. Potenciales de reducción de pares redox de importancia microbiológica, determinados a 1 atm de presión de gas H₂, 1 M H⁺, 25 °C y pH 7.⁽¹⁶⁾

Par redox	Eo' (mV)	Par redox	Eo' (mV)
SO ₄ ²⁻ /HSO ₃ ⁻	-520	Tubredoxina ox/red	-57
CO ₂ /Formiato ⁻	-430	Glicina / acetato ⁻ +NH ₄ ⁺	-10
CO ₂ /Glucosa	-430	S ₄ O ₆ ²⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻	+24
2H ⁺ /H ₂	-410	Fumarato ²⁻ / succinato ²⁻	+33
S ₂ O ₃ ²⁻ /HS ⁻ + HSO ₃ ⁻	-400	Citocromo b ox/red	+35
Ferredoxina ox/red	-390	Ubiquinona ox/red	+113
Falvodoxina ox/red	-370	AsO ₄ ³⁻ /AsO ₃ ³⁻	+139
NAD ⁺ /NADH	-320	Dimetil sulfóxido (DMSO)/Dimetil sulfuro (DMS)	+160
Citocromo c ₃ ox/red	-290	Fe(OH) ₃ + HCO ₃ ⁻ /FeCO ₃	+200
CO ₂ / acetato ⁻	-290	S ₃ O ₆ ²⁻ /S ₂ O ₃ ²⁻ + HSO ₃ ⁻	+225
FAD/FADH	-220	Citocromo c ₁ ox/red	+230
SO ₄ ²⁻ /HS ⁻	-217	NO ₂ ⁻ /NO	+360
Acetaldehído / etanol	-197	Citocromo a ₃ ox/red	+385
Piruvato ⁻ / lactato ⁻	-190	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	+430
FMN/FMNH	-190	SeO ₄ ²⁻ /SeO ₃ ²⁻	+475
Dihidroxiacetona fosfato / glicerofosfato	-190	Fe ³⁺ /Fe ²⁺	+770
HSO ₃ ⁻ /S ₃ O ₆ ²⁻	-170	O ₂ /H ₂ O	+820
Falvodoxina ox/red	-120	NO/ N ₂ O	+1180
HSO ₃ ⁻ /HS ⁻	-116	N ₂ O/NO	+1360
Menaquinona ox/red	-75	N ₂ O/N ₂	+1360
APS/AMP +HSO ₃ ⁻	-60		

La respiración aerobia, la cual se presenta cuando se oxida un compuesto en presencia de oxígeno (O₂), implica dos mecanismos bioquímicos:

1. Las vías bioquímicas involucradas en la oxidación de compuestos orgánicos hasta CO₂.
2. La forma en que los electrones son transferidos desde el compuesto orgánico hasta el aceptor terminal promoviendo la síntesis de ATP.

Las rutas involucradas, y la forma en que los electrones son transferidos para la degradación del sustrato glucosa hasta CO₂, vía respiración aerobia, se detalla en la Figura 3. La cual se divide en tres etapas:

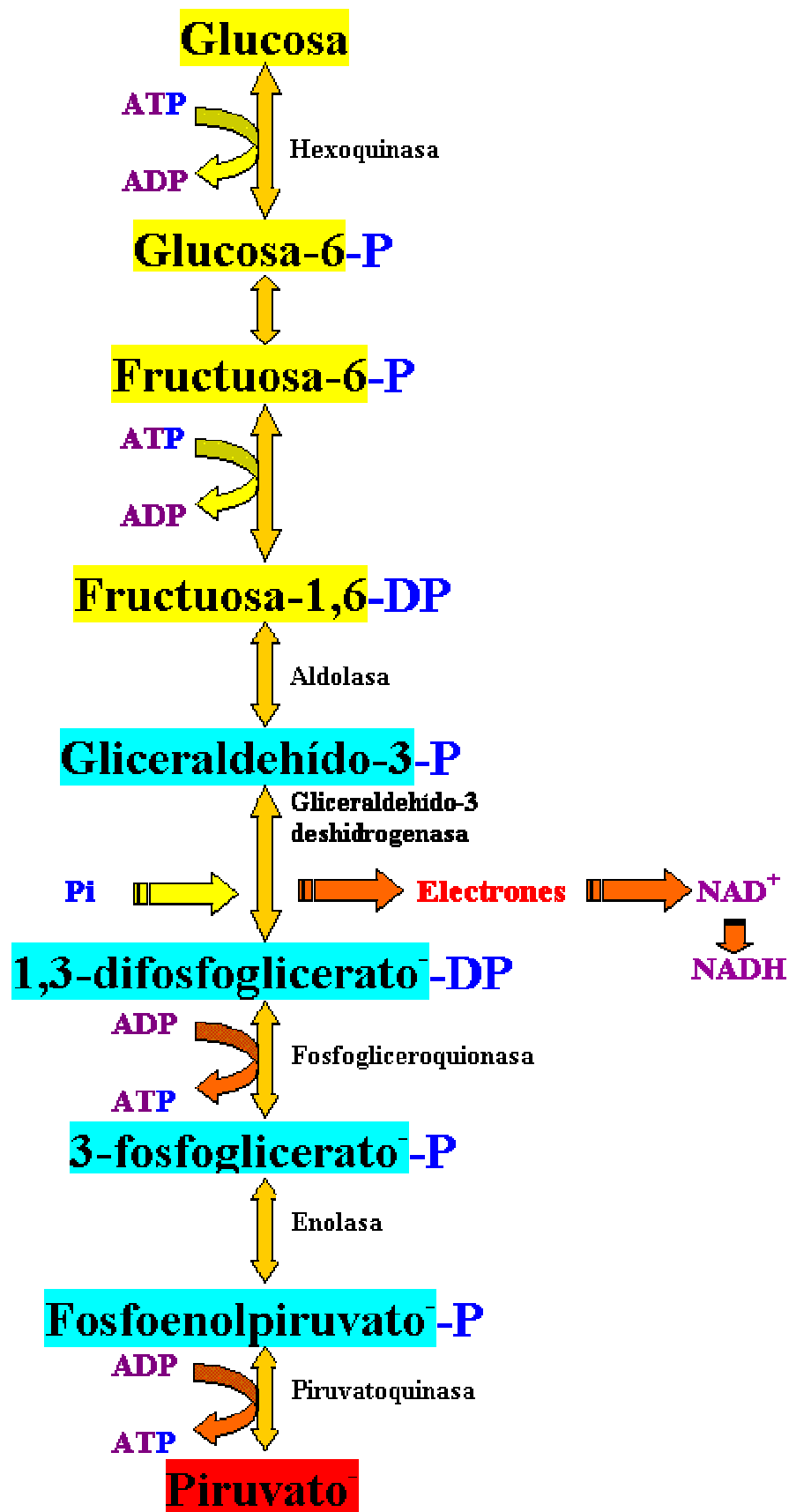


Figura 3 a. Ruta metabólica de oxidación de glucosa (Movilización del acetil-coenzima A). ⁽¹⁶⁾

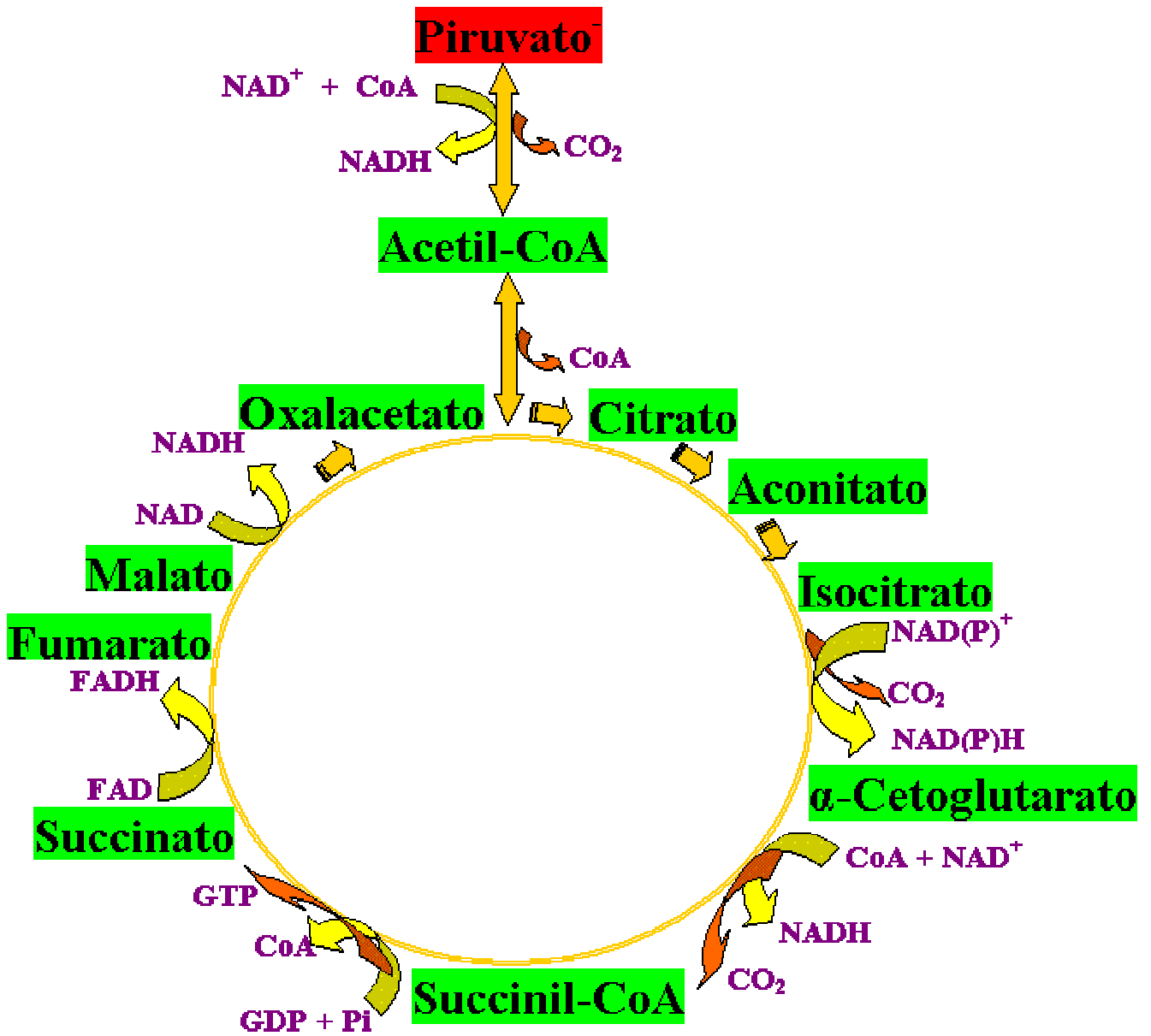


Figura 3 b. Ruta metabólica de oxidación de glucosa (Ciclo de los ácidos tricarboxílicos). ⁽¹⁶⁾

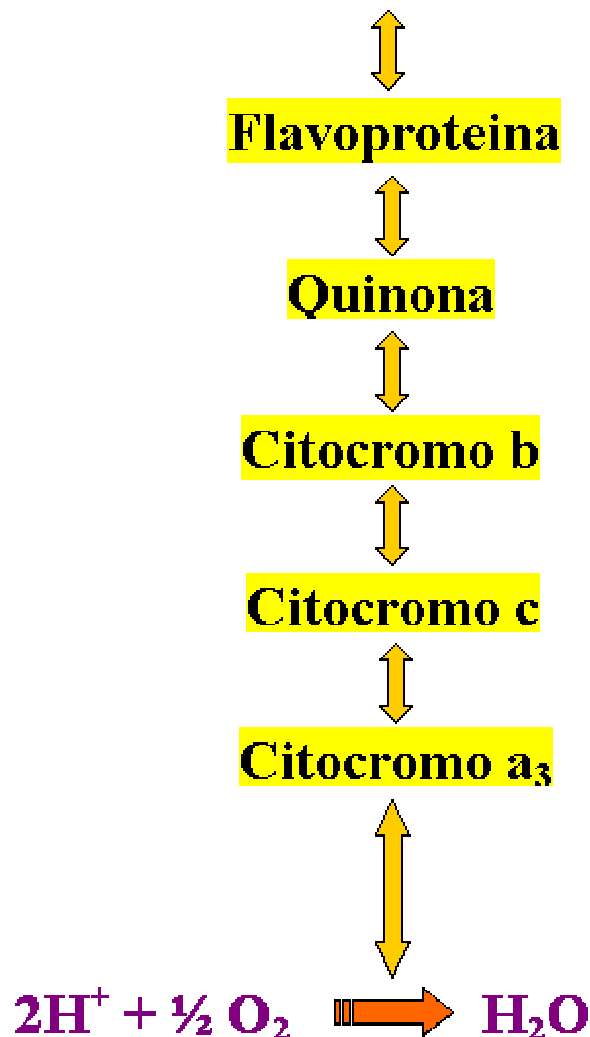


Figura 3 c. Ruta metabólica de oxidación de glucosa (Transporte electrónico).⁽¹⁶⁾

1. Movilización del acetil-coenzima A (acetil-CoA) Figura 3 a: Proceso donde la glucosa sufre reacciones preparatorias para producir gliceraldehído-3-fosfato; posteriormente una etapa de oxidación del gliceraldehído-3-fosfato hasta piruvato y finalmente el piruvato es descarboxilado produciendo una molécula de NADH y una acetil-CoA.

2. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, Figura 3 b: El grupo acetilo del acetil-CoA se combina con el compuesto tetracarbonado oxalacetato, promoviendo la formación de ácido cítrico. A continuación tiene lugar reacciones de deshidratación, descarboxilación y oxidación produciendo dos moléculas adicionales de CO_2 . Finalmente se genera oxalacetato que puede aceptar grupos acetilo y nuevamente comenzar el ciclo.

3. Transporte electrónico o sistema de transporte de electrones, Figura 3 c: Proceso donde la energía liberada durante la síntesis de ATP es almacenada y simultáneamente liberada a través de donar y aceptar electrones promoviendo formación de moléculas como el H_2O y el crecimiento celular al utilizar el ATP almacenado en reacciones anabólicas.

La transferencia de carga en el interior de la célula, es llevada a cabo a través de intermediarios, denominados transportadores de electrones, éstos se dividen en dos clases: Aquéllos que difunden libremente en el citoplasma; y los que se encuentran firmemente anclados, en enzimas de la membrana citoplasmática de la célula, como lo informan Morton R. A. (1965) y Yasuhiro Ogino y colaboradores (2000); y los que difunden libremente que incluyen las coenzimas nicotinamida adenín dinucleótido (NAD^+) y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADP^+).

El potencial de reducción de los pares NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ es de -320 mV vs. electrodo estándar de hidrógeno (SHE) ¹⁶; sin embargo, aunque el NAD^+ y el NADP^+ tienen el mismo potencial de reducción, trabajan de forma muy distinta dentro de la célula, así el NAD^+/NADH está directamente involucrado en reacciones catabólicas,

mientras el NADP^+ /NADPH en reacciones anabólicas.

Los sistemas transportadores de electrones que están asociados a las membranas, tienen dos funciones básicas: La primera, consiste en aceptar electrones de un donador y transferirlos a un aceptor; la segunda, es conservar algo de energía liberada durante la transferencia de los electrones para la síntesis de ATP. Además de los tipos de transportadores electrones como: NADH deshidrogenasas, transportadores que contienen riboflavina (flavoproteínas), proteínas con hierro y por último, citocromos que son proteínas que contienen un anillo porfirínico o hemo. Hernández M. E. & Newman D. K. (2001); han informado que especies de *Pseudomonas*, presentan en su membrana otro tipo de transportadores de electrones no proteicos conocidos como quinonas.

2.3 FUNCIÓN Y PROPIEDADES DE LAS QUINONAS

Las quinonas son dicetonas derivadas de compuestos aromáticos, en los cuales, los dos grupos carbonilos pueden estar en el mismo o en diferentes anillos. Además de encontrarse como constituyentes de una gran variedad de organismos vivos, forman parte de las cadenas transportadoras de electrones, involucradas en la respiración celular o en la fotosíntesis. Éstas pueden difundir libremente, a través de la membrana, transfiriendo electrones desde proteínas sulfuradas, hasta los citocromos. Bechtold T. & Turcanu A. (1999); han informado sobre la utilización de este tipo de quinonas como mediadores en la transferencia de electrones, principalmente la familia de antraquinonas.

Cervantes-Carrillo (2002); utilizó tanto el 2-6 ácido disulfónico y 2-6 ácido sulfónico antraquinona (Figura 4), para incrementar la actividad enzimática de un lodo en condiciones anaerobias.

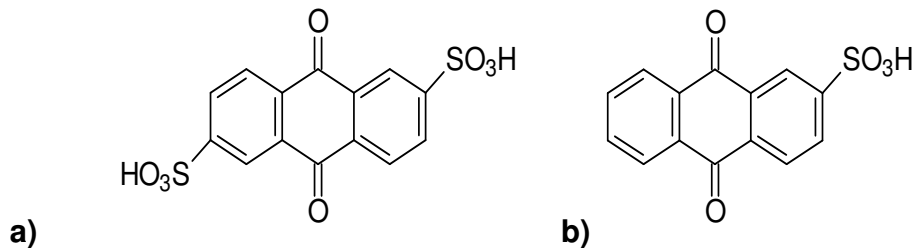


Figura 4. Estructuras químicas de antraquinonas. a) 2-6 ácido disulfónico antraquinona y b) 2 ácido sulfónico antraquinona.

2.4 QUINONAS EN EL METABOLISMO CELULAR

En los estudios de Field y colaboradores (2001 y 2002) y Cadena Ramírez (2004) utilizando principalmente el 2-6 ácido disulfónico antraquinona en presencia de un lodo en condiciones anaerobias, se encontró para los estudios de Field; que la velocidad de oxidación de sustratos como: acetato, butirato y propionato se incrementaba, de la igual forma en los trabajos de Cadena informó que la velocidad de oxidación de acetato se incrementaba un 43% y en un 17% la reducción de nitrato al compararlo cuando no se adiciona la quinona. La aportación principal de estos trabajos es la utilización de antraquinonas, para acelerar el metabolismo de un lodo anaerobio (Figura 5).

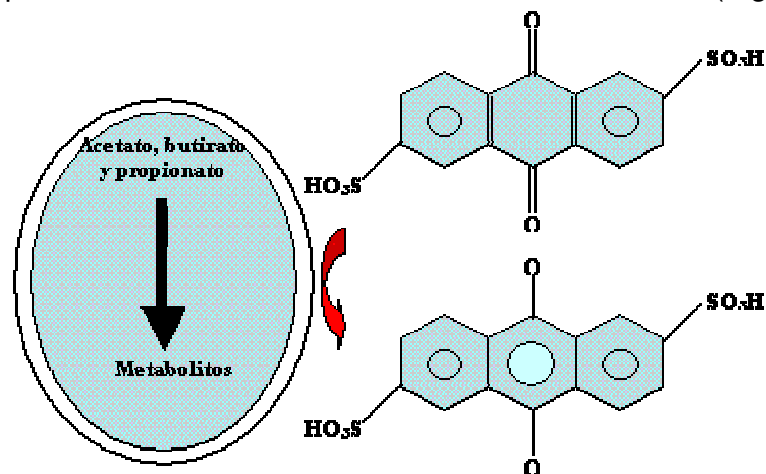


Figura 5. Esquema de utilización de antraquinonas para acelerar el metabolismo celular. (5, 24, 25)

Fraga Coates y colaboradores (1999); utilizaron sustancias húmicas (que son compuestos que están constituidos por diversos tipos de quinonas, y son muy abundantes en la biósfera), en el metabolismo del microorganismo *Geobacter metallireducens*, con la finalidad de disminuir la cantidad de hierro III, (Figura 6). La aportación de este trabajo fue que las sustancias húmicas pueden utilizarse como aceptores de electrones y ser reducidas por un microorganismo y estas especies reduzcan otros compuestos, en este caso, hierro III a hierro II.

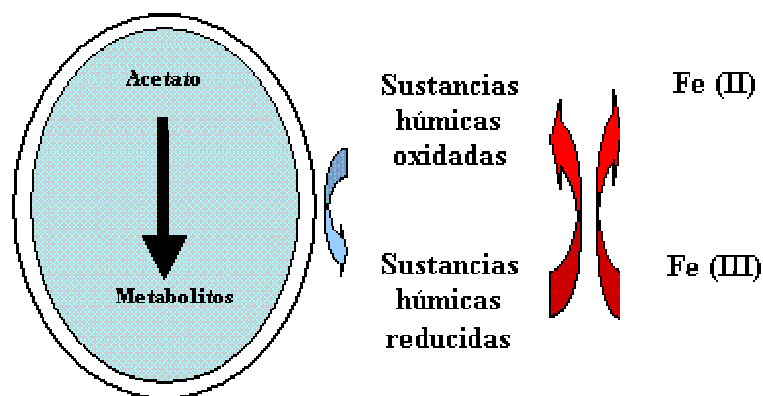


Figura 6. Esquema de utilización de sustancias húmicas para reducir hierro III a hierro II. ⁽¹⁴⁾

Conociendo los estudios de Lovley D.R. y colaboradores (1996 y 1999), en donde se muestra que las quinonas pueden utilizarse como mediadores químicos, Stolz Andreas y colaboradores (2001 y 2002) realizaron trabajos con el microorganismo *Sphingomonas sp* y la participación de los mediadores, la 2-6 disulfonato ácido de antraquinona y la 2 hidroxí naftoquinona, para reducir compuestos azo (estos compuestos tienen la estructura: $R_1-N=N-R_2$ donde el grupo R es un grupo aromático sustituido), (Figura 7). La principal aportación de este trabajo es la utilización de los microorganismos para reducir las quinonas y mediante éstas reducir compuestos de difícil degradación, como los compuestos azo.

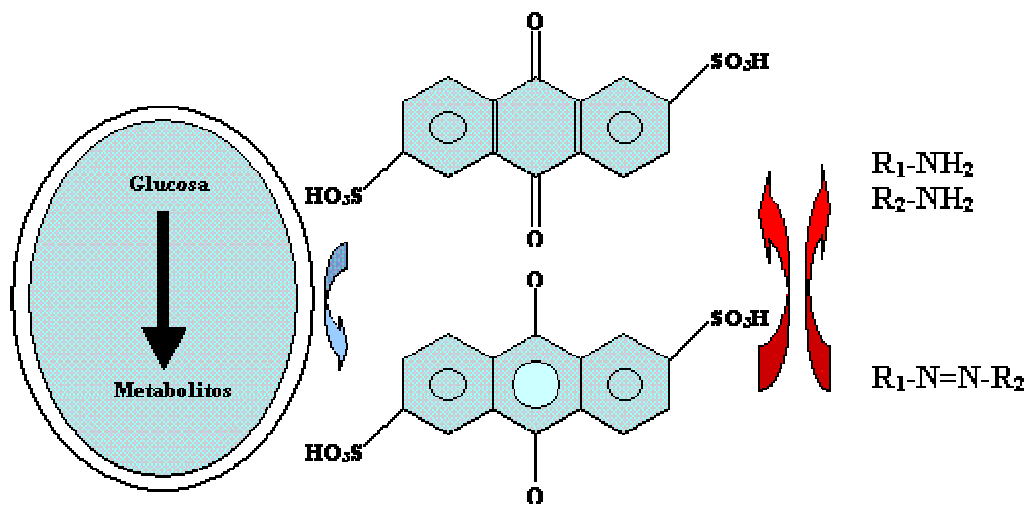


Figura 7. Esquema de utilización de antraquinonas para reducir compuestos azo. (7, 22, 23, 26)

Van der Zee y colaboradores (2002); estudiaron el efecto de la 2-6 disulfonato ácido de antraquinona, en la reducción de compuestos azo, que desecha la industria textil, a compuestos de fácil asimilación, utilizando un reactor de lodo granular expandido (Expanded Granular Sludge Blanket) EGSB, en condiciones termofílicas. La aportación de este trabajo es que mediadores del tipo antraquinonas sustituidas, pueden utilizarse en reactores EGSB, en condiciones termofílicas y anaerobias, para tratar aguas residuales, provenientes de la industria textil.

Basándose en los estudios antes mencionados Lovley D.R. (1996), estudió el comportamiento de dos microorganismos diferentes con la adición de la 2-6 disulfonato ácido antraquinona, donde el microorganismo, *Geobacter metallireducens* reduce la quinona 2-6 disulfonato ácido, mientras el microorganismo *Wolinella succinogenes* oxida la hidroquinona formada, (Figura 8), mostrándose en este trabajo que la quinona puede ser regenerada en el medio y que dos procesos de diferente índole pueden llevarse a cabo simultáneamente.

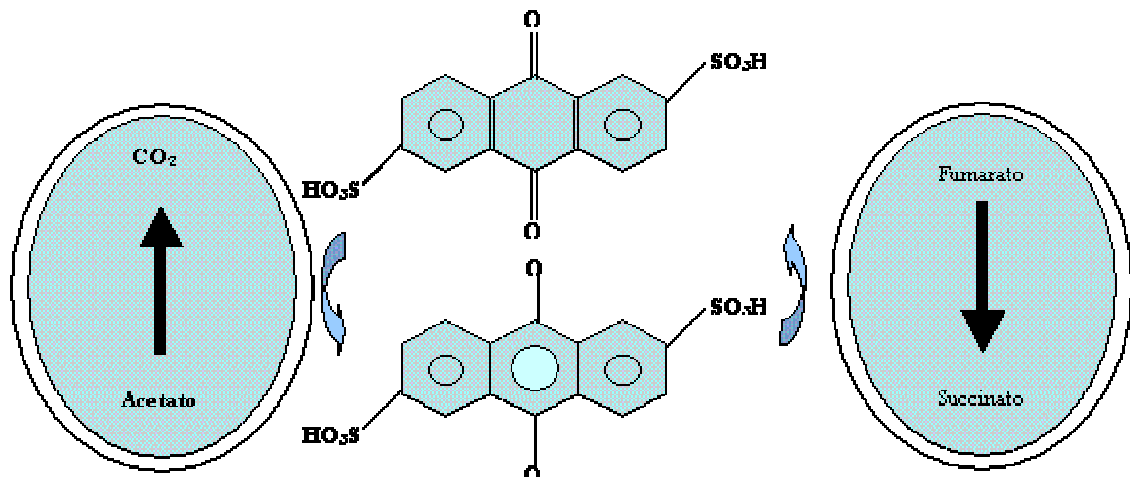


Figura 8. Esquema de utilización de regeneración de antraquinonas por medio de la participación de dos microorganismos.⁽¹⁵⁾

2.5 METABOLISMO CELULAR INFLUENCIADO POR ELECTRODOS

Benneto H. Peter y colaboradores (1984); informaron sobre la utilización de electrodos en combinación con mediadores químicos (estos mediadores son principalmente colorantes por ejemplo: O-touidina, azul de metileno, safranina, entre otros), y diferentes microorganismos. En este trabajo el metabolismo celular de los microorganismos fue aprovechado para reducir los mediadores, y a través de un electrodo recuperaban los electrones para generar electricidad y aplicarse a pilas microbiológicas de combustible. (Figura 9)

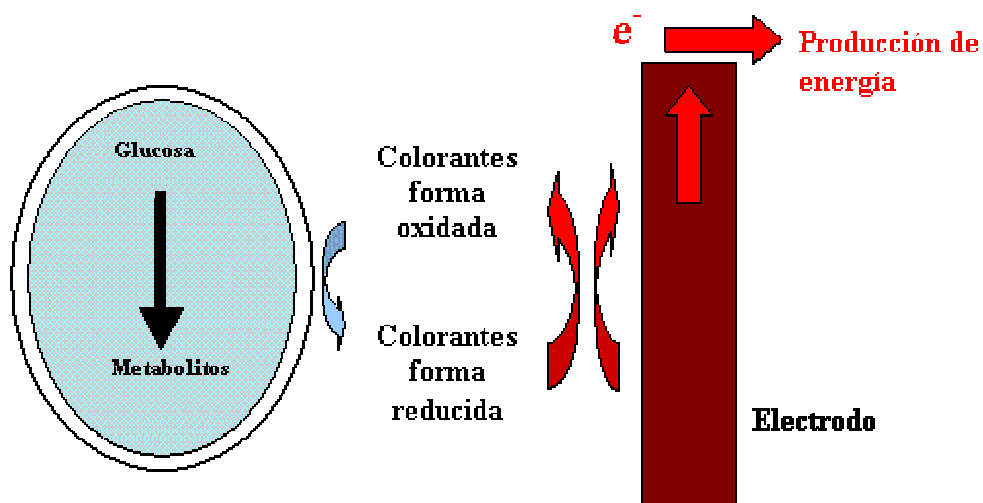


Figura 9. Esquema de utilización de compuestos químicos para obtener energía.^(3, 4)

Por otra parte, existen los estudios de Hyung Joo Kim y colaboradores (2002); donde no se utiliza mediador alguno, implicando solamente la interacción del electrodo y el microorganismo *Shewanella putrefaciens* (Figura 10). En este trabajo se propone que la transferencia directa de electrones del microorganismo al electrodo, puede llevarse a cabo por proteínas extracelulares (éstas tienen la propiedad de captar electrones liberados en la respiración de los microorganismos), pero estos sistemas dependen de la cantidad presente de estas proteínas en cada microorganismo.

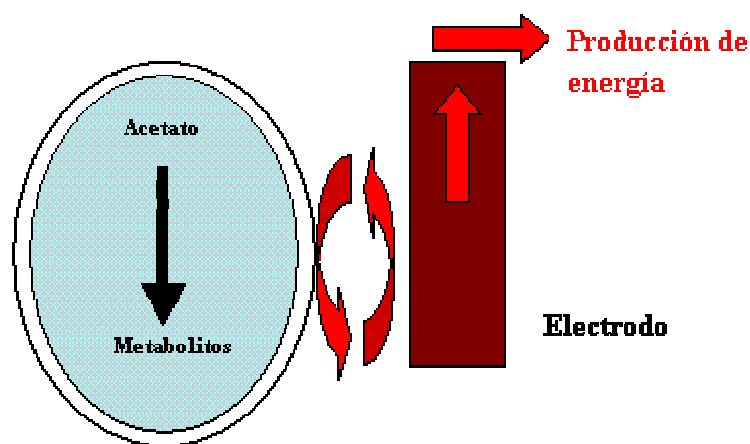


Figura 10. Electrodo en contacto con *Shewanella putrefaciens* para obtener energía. ⁽¹³⁾

2.6 EFECTO DEL POTENCIAL EN EL METABOLISMO CELULAR

Riondet Christophe y colaboradores 1999 y 2000; han informado en la literatura que los microorganismos regulan sus funciones metabólicas por cambios de potencial, a través de gradientes de concentración de iones metálicos (sodio y potasio), así como protones. Los cambios de potencial por gradientes de pH del microorganismo *E. Coli*; dependen en gran medida del potencial externo de óxido-reducción (ORP), por ello la aplicación de un potencial electroquímico es una variable muy importante, el cual modifica la permeabilidad de protones en la membrana celular, además este ORP extracelular regula algunas actividades enzimáticas en los microorganismos.

El área de los electrodos es importante en el tipo de proceso que se desea modificar con potencial, por ejemplo: en los estudios de Benneto H. Peter y colaboradores (1984), el área de los electrodos fue del orden de 800 cm².

La investigación aquí propuesta plantea la utilización de mediadores de la familia antraquinonas, debido a que son las más informadas en la literatura y se han tenido buenos resultados al utilizarlas. Así mismo el uso de un microorganismo *Pseudomonas sp* en condiciones aerobias y la aplicación de un potencial óxido reductor, con la finalidad de regenerar los pares *redox* de las antraquinonas, en el medio de cultivo y acelerar el metabolismo celular del microorganismo, para degradar un sustrato prueba (glucosa) Figura 11.

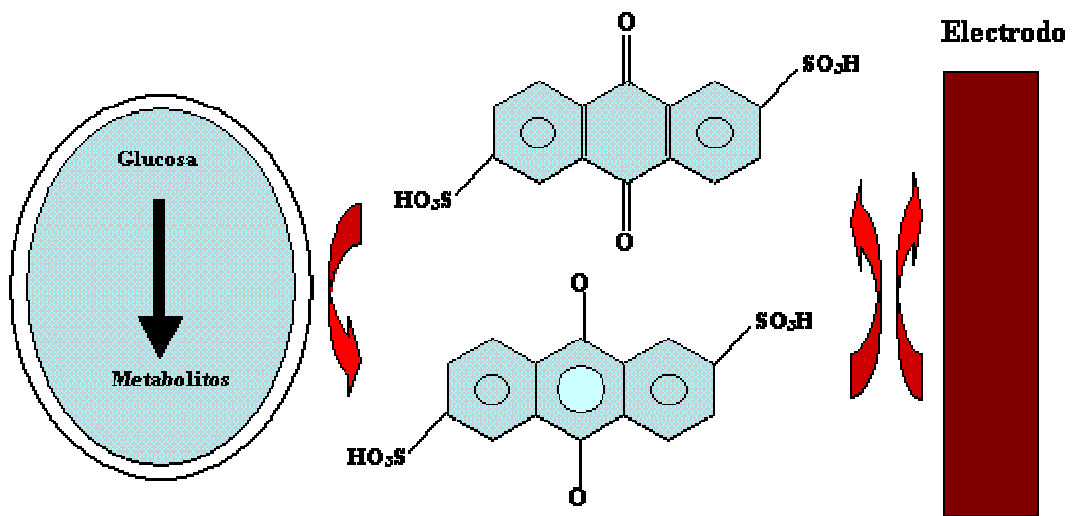


Figura 11. Esquema de utilización de antraquinonas y un electrodo para acelerar el metabolismo celular.

3.JUSTIFICACIÓN

Los procesos mencionados en la sección de antecedentes, muestran la gran variedad de procedimientos para catalizar el metabolismo celular y la generación de energía, mediante procesos *redox*, para fines tecnológicos. Estas investigaciones implican la participación de un microorganismo y adición de un mediador ^(6, 25); la interacción de dos microorganismos, para regenerar el par *redox* de los mediadores en el medio de cultivo, llevando acabo dos procesos simultáneos ⁽¹⁴⁾ y la adición de otras sustancias químicas, por ejemplo, sustancias húmicas. Por otra parte, en los procesos de producción de energía se encuentran los que no utilizan ningún mediador ⁽¹³⁾ y los que utilizan compuestos con propiedades *redox*; colorantes. ^(3, 4)

En general estas metodologías se ven limitadas, unas por el tipo de mediador empleado, otras por la regeneración de los mediadores, al medio de cultivo y; otras, por la transferencia de carga entre el microorganismo y el electrodo. Por ello la primicia de esta investigación es el utilizar *Pseudomonas sp*, la cual fue aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos, ^(9, 10, 11) y provocar un estrés energético en el metabolismo celular, mediante el uso de quinonas y simultáneamente la imposición de un potencial *redox*, para obtener mayor velocidad de consumo de un sustrato prueba (glucosa)

4. ESTABLECIMIENTO DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ✓ Existe una relación energética entre los diferentes sustituyentes de la antraquinona en su potencial *redox*.
- ✓ La imposición de un potencial de oxidación por medio de un electrodo en solución, permite una rápida regeneración de los mediadores.
- ✓ La adición de antraquinonas acelerará la velocidad de consumo de glucosa en el microorganismo *Pseudomonas sp.*
- ✓ Los sustituyentes en la estructura de las antraquinonas influyen en acelerar o disminuir la velocidad de consumo de glucosa en el microorganismo *Pseudomonas sp.*
- ✓ El microorganismo *Pseudomonas sp.* puede acelerar su velocidad de consumo de glucosa por la presencia de imposición de un potencial *redox* a través de un electrodo a la solución.

5. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES

5.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Desarrollar una metodología bioelectrocatalítica para evaluar el efecto de mediadores químicos naturales de tipo antraquinona mono y di sustituidas en la posición 2 y 2-6, así como la imposición de un potencial *redox* en solución a través de un electrodo, en el metabolismo celular de consumo de glucosa del microorganismo *Pseudomonas sp.*

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar el crecimiento y el consumo de glucosa en las condiciones de trabajo del microorganismo *Pseudomonas sp.*
- ✓ Caracterizar los potenciales *redox* y los mecanismos de reacción de las diferentes antraquinonas mono y di sustituidas en la posición 2 y 2-6 en el medio de cultivo.
- ✓ Estudiar y caracterizar el efecto de las antraquinonas, en el crecimiento y consumo de glucosa del microorganismo *Pseudomonas sp.*
- ✓ Estudiar el comportamiento de la imposición de un potencial *redox* en el crecimiento y consumo de glucosa de *Pseudomonas sp.*
- ✓ Caracterizar el efecto tanto de la adición de antraquinonas e imposición de un potencial en el crecimiento y consumo del sustrato por *Pseudomonas sp.*

6. METODOLOGÍA

La metodología se dividió en tres etapas:

6.1.- Etapa electroquímica

6.2.- Etapa microbiológica

6.3.- Etapa bioelectrocatalítica

6.1 ETAPA ELECTROQUÍMICA

6.1.2 Electroodos de referencia y trabajo

El electrodo de trabajo fue de carbón vítreo, por poseer una amplia ventana de óxido-reducción, con una área de $1.9635 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$, el electrodo auxiliar de grafito y el electrodo de referencia de Calomel (tanto el electrodo auxiliar como el de referencia, se colocaron en dispositivos separados un tubo de vidrio y un capilar de Luggin respectivamente, para evitar reacciones parásitas y reacción con el medio).

6.1.3 Antraquinonas

Las antraquinonas propuestas para este estudio se muestran en la Figura 12.

6.1.4 Caracterización electroquímica de los potenciales *redox* de las diferentes antraquinonas en el medio de cultivo.

Para la caracterización electroquímica del medio de cultivo y las antraquinonas, se utilizó la técnica electroquímica conocida como voltamperometría cíclica.

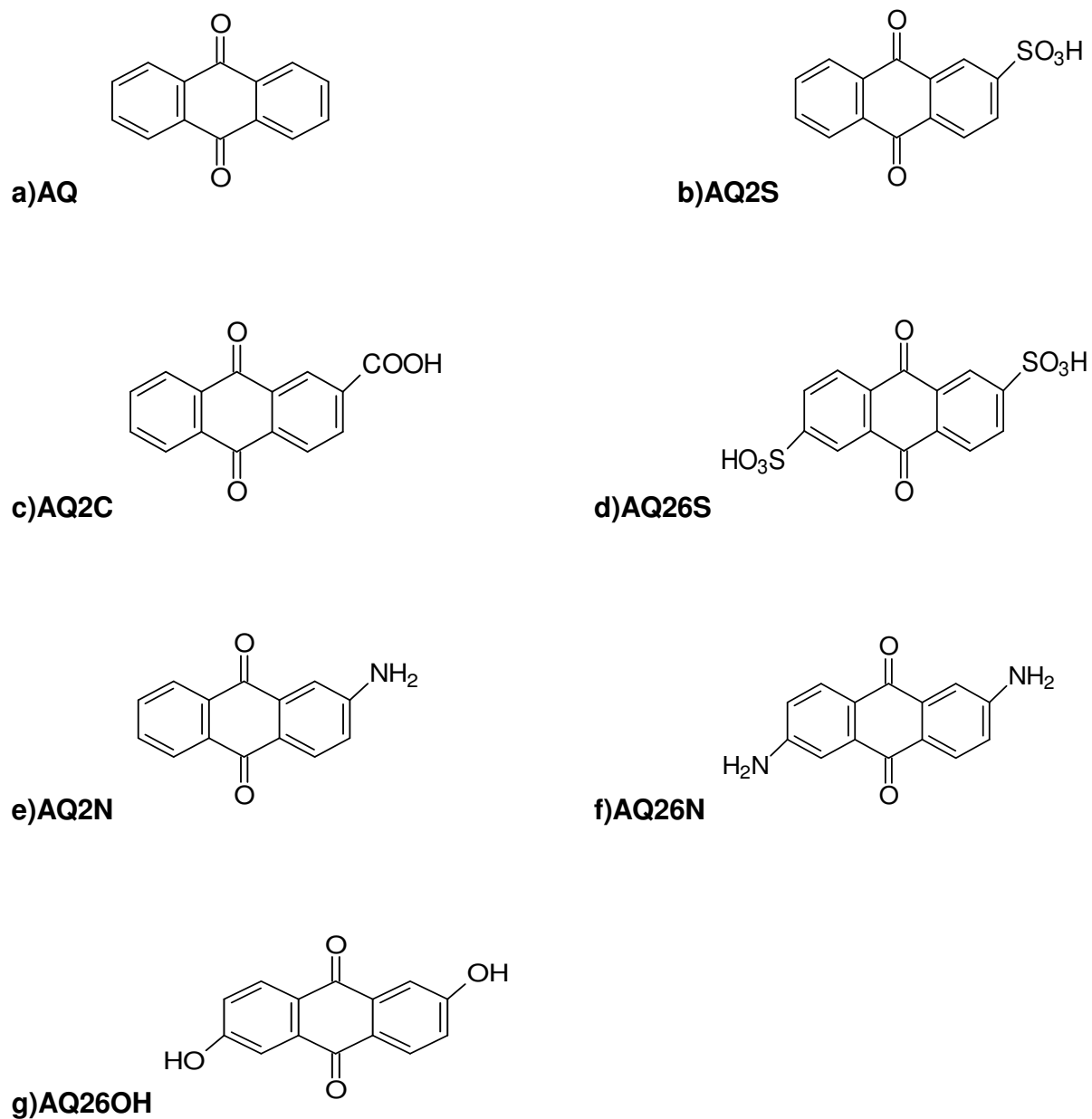


Figura 12. Estructuras químicas de antraquinonas. a) Antraquinona, b) 2 ácido sulfónico antraquinona, c) 2 carboxilato ácido antraquinona, d) 2-6 ácido disulfónico antraquinona, e) 2 amino antraquinona, f) 2-6 diamino antraquinona y g) 2-6 dihidroxi antraquinona.

6.2 ETAPA MICROBIOLÓGICA

6.2.1 Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo a emplear en este trabajo fue *Pseudomonas sp*; debido a que se aisló de un suelo contaminado por hidrocarburos ^(9, 10, 11); además estas especies son muy versátiles en la utilización de diferentes fuentes de carbono y se adaptan fácilmente a las condiciones ambientales.

El microorganismo *Pseudomonas sp*, se creció por 24 horas en un medio rico, (Medio Luria), el cual proporcionó los cofactores y nutrientes necesarios, para posteriormente pasar 10 mL del cultivo a un medio mineral desasimilativo, y llevar a cabo las cinéticas. La composición del medio Luria y medio mineral de cultivo se describe en la tabla 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Composición del medio enriquecido Luria.

Compuesto	Concentración ($g L^{-1}$)
Peptona de caseína	10
NaCl	10
Extracto de levadura	5

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de trabajo.

Compuestos	Concentración (mM)	Concentración ($g L^{-1}$)
Glucosa	5.5	1
NaCl	86	5
NH ₄ Cl	56	3
KH ₂ PO ₄	3	0.5
Na ₂ HPO ₄	0.5	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	4	1

El valor de pH y temperatura se mantuvieron constantes en 6.8 y 28°C respectivamente con una relación carbono nitrógeno de C/N = 0.5

6.2.2 Medición del crecimiento

El crecimiento de *Pseudomonas sp.* en el medio de cultivo descrito en la Tabla 2, se evaluó por los métodos siguientes:

- a) Indirecto: Este método no discrimina entre células viables y no viables, incluye ambas y se determina por cambios de absorbancia en una longitud de onda de 600 nm.
- b) Directo: Método que contabiliza células viables, conocido mejor como: conteo de colonias. Éste consiste, en hacer diluciones seriadas de la muestra que contiene las células a contar, en una solución salina al 0.9%, posteriormente se realizó una siembra en cajas Petri con 0.1 mL de una suspensión, después de dos días de incubación a 28°C se contabilizaron las colonias formadas.

Con la finalidad de hacer más ágil la cuantificación celular de *Pseudomonas sp.*, se realizó la siguiente estrategia:

A la muestra a la cual se determina la absorbancia por el método indirecto, es la misma que se determina por el método directo, para evaluar las unidades formadoras de colonia UFC ml⁻¹. De esta manera se construye una curva patrón que relaciona las UFC ml⁻¹ contra la absorbancia Figura 13.

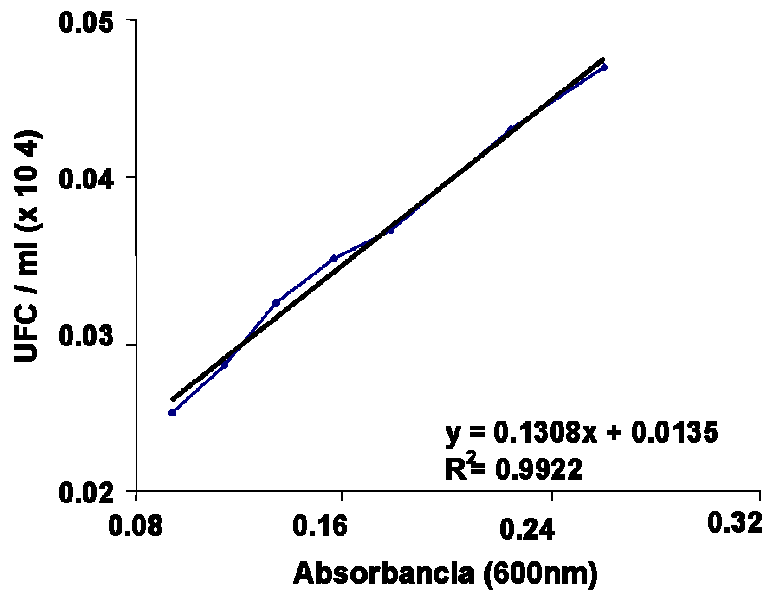


Figura 13. Curva patrón de UFC ml⁻¹ contra absorbancia.

La figura 13, muestra una relación lineal entre las primeras 10 horas de crecimiento, entre las UFC ml⁻¹ y la absorbancia medida, de esta manera la cuantificación celular de *Pseudomonas sp.* Se vuelve más ágil.

6.2.3 Cuantificación del sustrato

El sustrato se cuantificó mediante un equipo analítico amperométrico YSI 2700, para evitar interferencias por la presencia de antraquinonas en solución. Se realizó una curva patrón, que relaciona la concentración real de glucosa en (g L⁻¹) vs. concentración calculada por el equipo de glucosa en (g L⁻¹), en presencia y ausencia de antraquinona. AQ2S Figura 14.

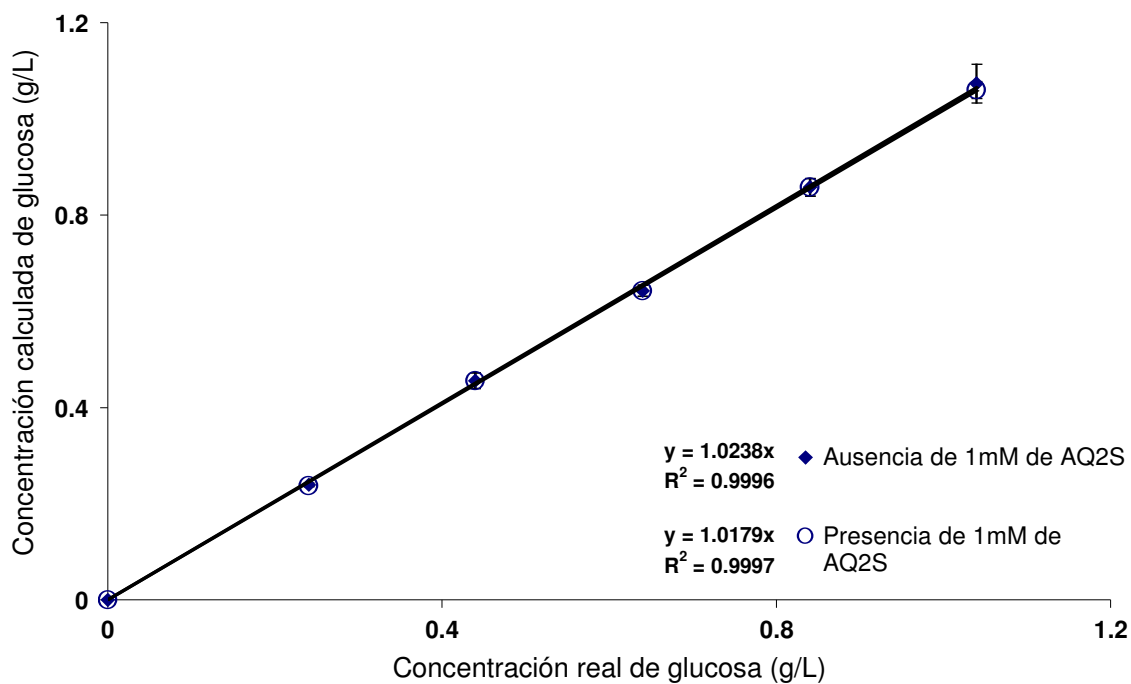


Figura 14. Curva patrón de glucosa con presencia y ausencia de AQ2S 0.5 mM.

Analizando la gráfica de la Figura 14, se encuentra que los valores de las pendientes con presencia y ausencia de antraquinona AQ2S, son similares 1.0179 y 1.0238 respectivamente, se concluye que no existe efecto de interferencia de la antraquinona en la cuantificación de glucosa.

6.2.4 Cuantificación de la adición de antraquinonas

Los parámetros de evaluación que permitieron cuantificar el efecto por adición de 0.5 mM de las diferentes antraquinonas, fueron: El crecimiento y el consumo de glucosa por *Pseudomonas sp.*

6.2.5 Medición de la imposición de un potencial redox

La medición del efecto por aplicar un potencial redox, se midió a través del crecimiento y consumo de glucosa en *Pseudomonas sp.*

6.3 ETAPA BIOELECTROCATÁLITICA

Concluidos los estudios de las dos etapas anteriores, la tarea siguiente es unir ambas para determinar el efecto de adición de antraquinonas y aplicación de un potencial redox, en el metabolismo de consumo de glucosa de *Pseudomonas sp.* Es importante mencionar que la presencia del potencial, por medio de un electrodo, ayudará en la regeneración de las especies (hidroantraquinona / antraquinona) en el medio; así como la modificación del potencial de la solución conocido como ORP. Esta modificación del ORP podría alterar la permeabilidad de protones en la membrana celular.

Las cinéticas para evaluar el efecto de adición de antraquinona y presencia de un potencial se realizaron de la siguiente forma:

6.3.1 Montaje de Cinéticas

Para todas las cinéticas se realizaron 6 experimentos utilizando una celda electroquímica de tres electrodos (Figura 15), con capacidad de 250 mL, la cual, se esterilizó con 90 mL de medio de cultivo descrito en la Tabla 3, posteriormente, se adicionó el peso en gramos de las antraquinonas a trabajar. Sin embargo esta cantidad agregada de antraquinona, aseguró que la solución en la celda se encontrará saturada a una concentración menor o igual de 0.5 mM de la especie antraquinona y por último, se incorporaron 10 mL de células de *Pseudomonas sp* obtenidas de un inóculo previo,

en el medio de cultivo rico. El pH, absorbancia y el consumo de sustrato se monitorearon durante 8 horas.

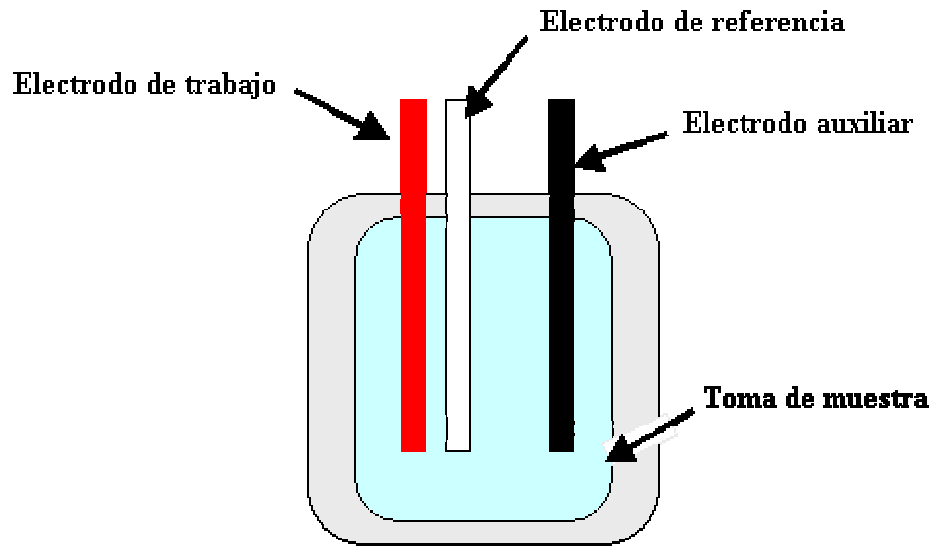


Figura 15. Diseño de la celda electroquímica de tres electrodos.

Las variables controladas en cada experimento fueron:

1. Experimento 1: (Control 1) *Pseudomonas sp*
2. Experimento 2: (Control 2) Medio de cultivo en ausencia de 0.5 mM quinona
3. Experimento 3: (Control 3) Medio de cultivo con presencia de 0.5 mM de quinona
4. Experimento 4: *Pseudomonas sp* y 0.5 mM de mediador
5. Experimento 5 *Pseudomonas sp* y un potencial de -200 mV
6. Experimento 6 *Pseudomonas sp*, 0.5 mM de mediador y un potencial de -200 mV

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se dividieron en tres los cuales son:

7.1 Resultados electroquímicos

7.2 Resultados microbiológicos

7.3 Resultados bioelectrocatalíticos

7.1 RESULTADOS ELECTROQUÍMICOS

Esta etapa consiste en la caracterización electroquímica de los potenciales *redox* de las diferentes antraquinonas así como del medio de cultivo.

En este trabajo se consideró como posibles mediadores los siguientes compuestos (Figura 12): Antraquinona (AQ), 2 amino antraquinona (AQ2N), 2-6 diamino antraquinona (AQ26N), 2 ácido sulfónico antraquinona (AQ2S), 2-6 ácido disulfónico antraquinona (AQ26S), 2 carboxilato ácido antraquinona (AQ2C) y 2-6 dihidroxi antraquinona (AQ26OH). Para su estudio se dividieron las antraquinonas en dos grupos: según las propiedades del sustituyente 1.- Grupo electroattractores (grupos que extraen carga del grupo quinoide) que corresponde a las antraquinonas (AQ2S, AQ26S y AQ2C). 2.- Grupo electrodonadores (grupos que inducen carga hacia el grupo quinoide), el cual incluye los mediadores a las antraquinonas (AQ2N, AQ26N y AQ26OH) ambos grupos fueron comparados con la AQ.

La discusión y análisis de las antraquinonas, se basaron en los resultados de la técnica de voltamperometría cíclica. Esta técnica aplica un potencial dependiente del tiempo, de forma triangular (Figura 16), midiendo la corriente que pasa a través de la celda

electroquímica como función del potencial como respuesta.

La gráfica resultante de corriente en función del potencial aplicado, se denomina voltamperograma. Figura 17.

Los parámetros más importantes de análisis de la técnica de voltamperometría cíclica son:

- ✓ El potencial de pico catódico y anódico (E_{pc} y E_{pa}).
- ✓ Corrientes de pico anódica y catódica (i_{pa} y i_{pc}).

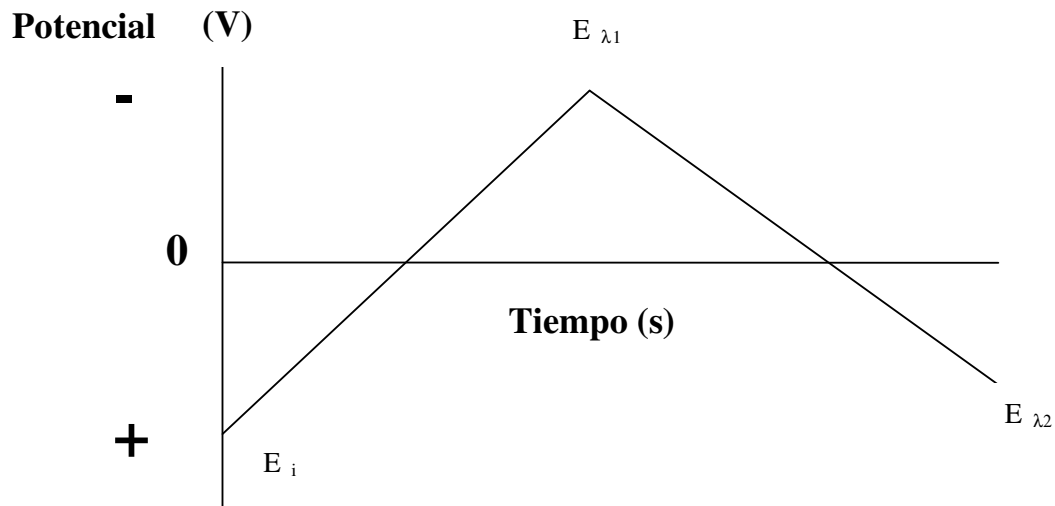


Figura 16. Grafica de perturbación en la técnica de Voltamperometría cíclica, potencial vs. Tiempo

El voltamperograma de la Figura 17, muestra los controles necesarios: a) el medio de cultivo, b) el medio de cultivo más 1 g L^{-1} de glucosa y c) voltamperograma correspondiente de 0.5 mM de AQ2S. Los parámetros experimentales fueron: Velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} , pH de 6.8, temperatura de 28°C y una cantidad de antraquinona para alcanzar idealmente una concentración de 0.5 mM , todo disuelto en el medio de cultivo descrito en la tabla 3 página 22, dentro de la celda con tres electrodos. Es importante mencionar que la solubilidad de cada antraquinona

dependerá del grupo funcional, de esta manera la concentración agregada de antraquinona asegura cuando mucho una concentración de 0.5 mM o bien una solución saturada de la especie antraquinona la cual se mencionó anteriormente dependerá del grupo sustituyente presente de la antraquinona.

Las Figuras 17 a y b que corresponde al control del medio y el control con glucosa respectivamente, no presentan ninguna reacción *redox* en los potenciales donde se oxidan y reducen las antraquinonas (-800 mV y -200 mV), observando sólo las corrientes capacitivas, que son muy pequeñas con respecto a la magnitud de las corrientes faradaicas obtenidas para las diferentes antraquinonas Figura 17 c, implicando que la única contribución en la corriente faradaica, es por la presencia de las antraquinonas en el medio.

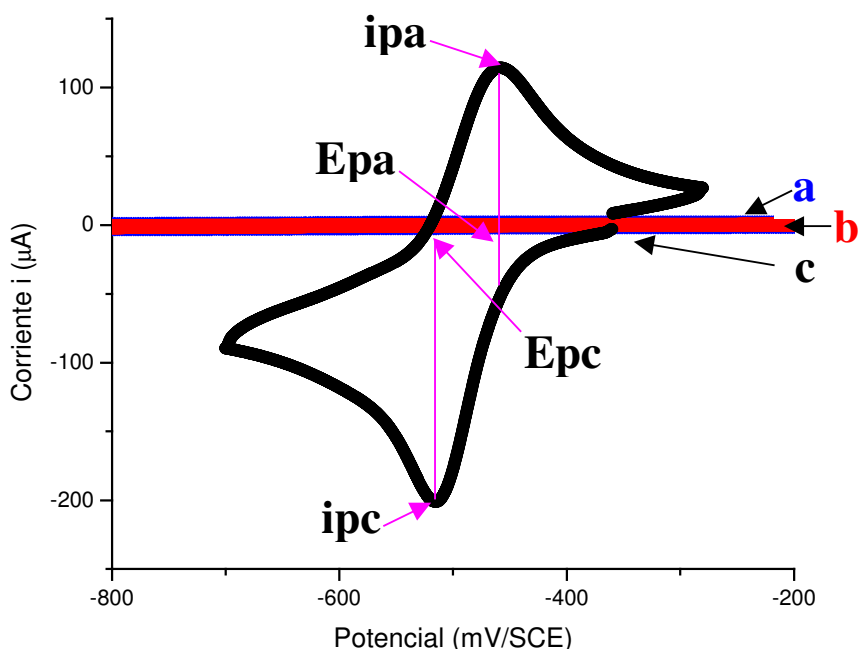


Figura 17. Voltamperograma típico. a) Control del medio, b) Control del medio con 1 g/L de glucosa y c) Voltamperograma para la AQ2S. Condiciones: $v = 100 \text{ mV/s}$, 0.5 mM, pH 6.8 y 28°C en el medio de cultivo.

Las Figuras 18 y 19 muestran los voltamperogramas para las antraquinonas electroattractoras y electrodonadoras respectivamente.

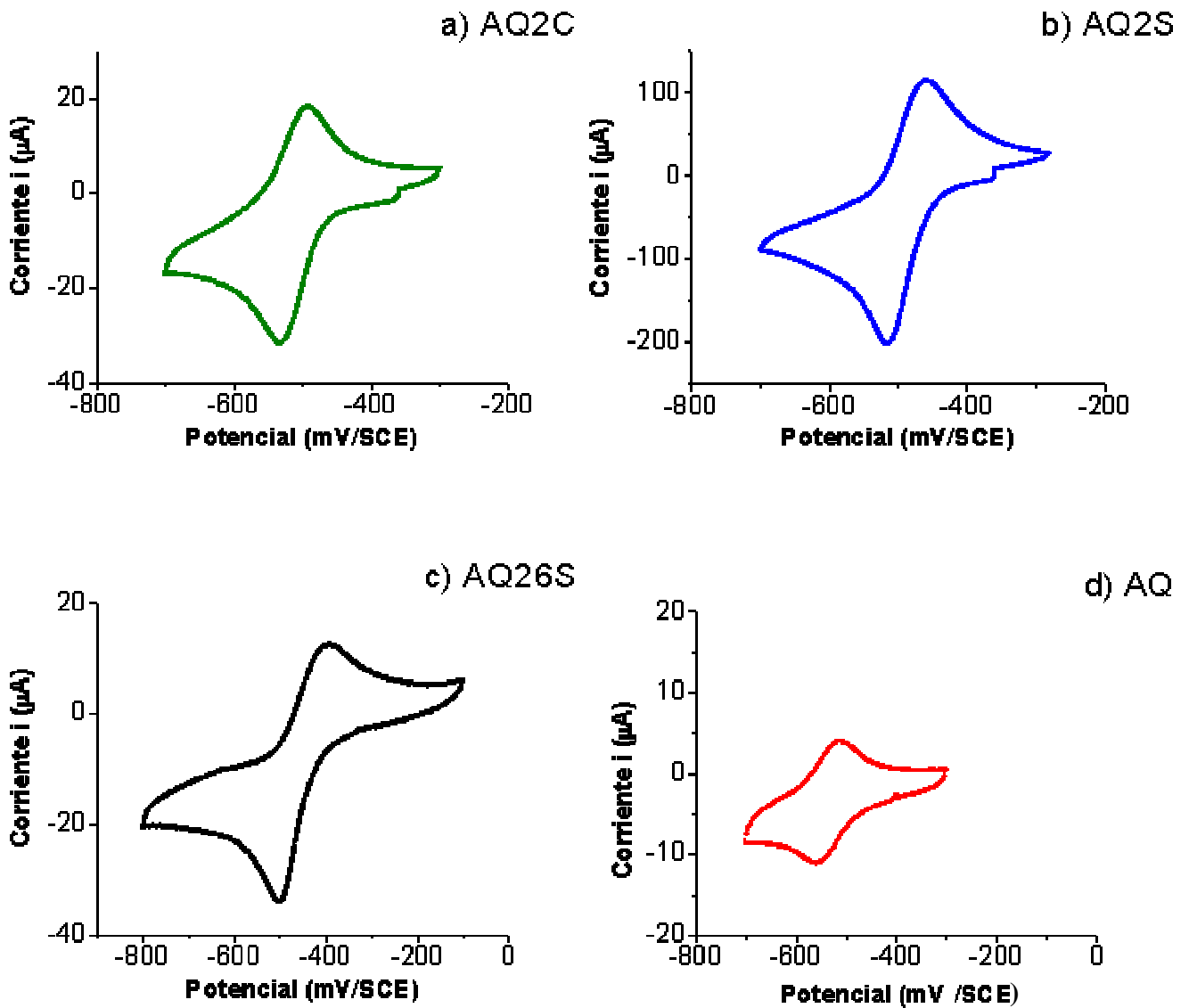


Figura 18. Voltamperogramas típicos para las antraquinonas electroattractoras. a) AQ2C, b) AQ2S, c) AQ26S y d) Control AQ. Condiciones: $v = 100 \text{ mV/s}$, 0.5 mM , $\text{pH } 6.8$ y 28°C en el medio de cultivo.

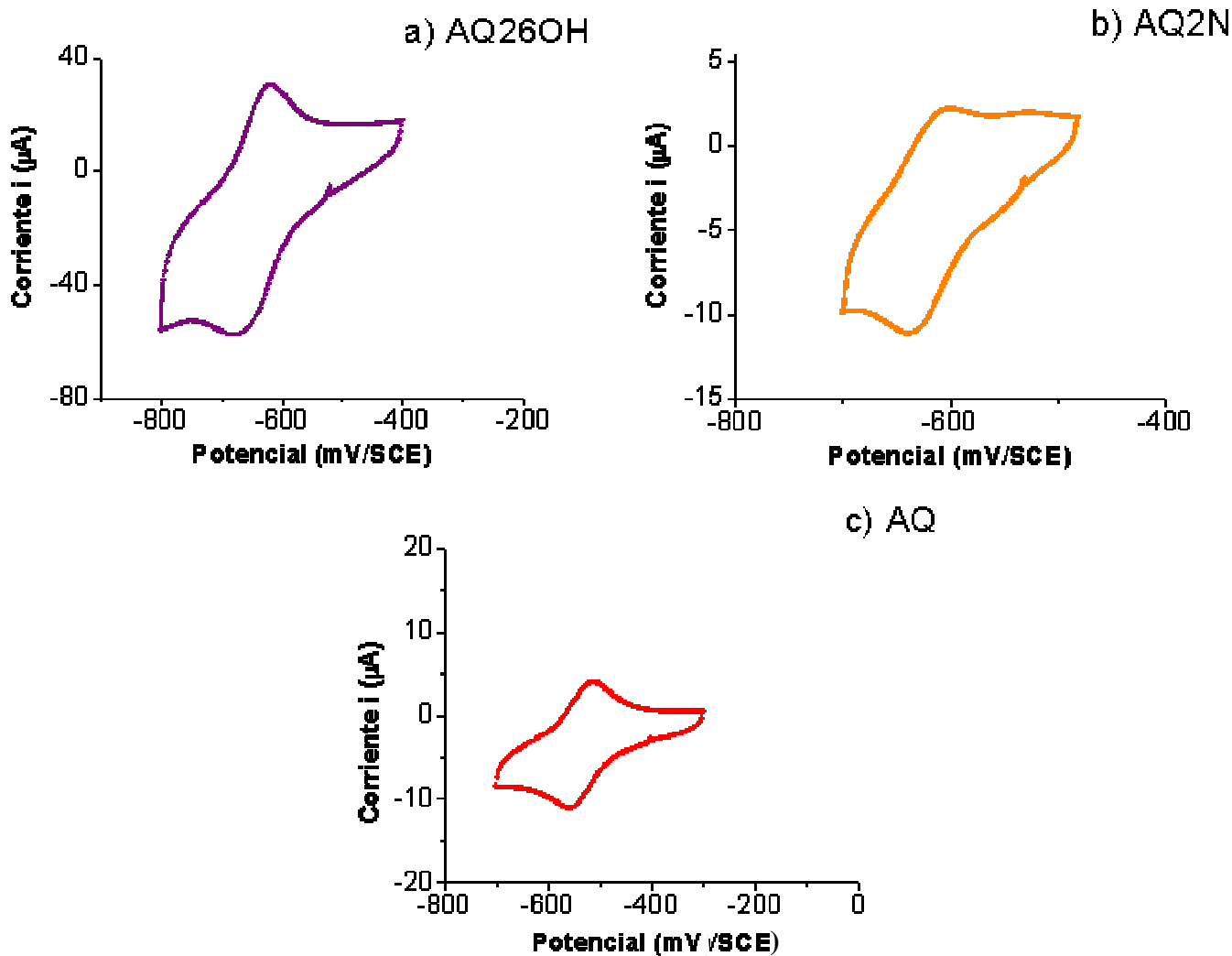


Figura 19. Voltamperogramas típicos para las antraquinonas electrodonadoras. a) AQ26OH y b) AQ2N y c) Control AQ. Condiciones: $v = 100 \text{ mV/s}$, 0.5 mM , $\text{pH } 6.8$ y 28°C en el medio de cultivo.

Los voltamperogramas obtenidos para las antraquinonas con grupo electro-atractor Figura 18, y con grupo electro-donador Figura 19, muestran que las corrientes asociadas a los voltamperogramas tienen diferente intensidad de corriente, debido a la solubilidad que las antraquinonas presentan en el medio, además cualitativamente todos los voltamperogramas son similares en forma, a excepción de la AQ26S figura 18 c, es decir se observa que son sistemas de transferencia de carga reversibles, debido a que se observa tanto el pico de reducción y de oxidación correspondiente. Para mostrar si las antraquinonas son sistemas reversibles, de una manera cuantitativa, se

realizó un estudio voltamperométrico a diferentes velocidades de barrido de 10 mV/s hasta 10,000 mV/s.

Inicialmente se analiza la gráfica de la función voltamperométrica contra el logaritmo de la velocidad para el pico de reducción de los dos grupos de antraquinona Figura 20.

La función voltamperométrica es un parámetro de análisis mediante el cual se puede determinar la existencia de reacciones químicas acopladas a la transferencia de carga, así como la cinética de transferencia, cuando la función voltamperométrica presenta variaciones, o no se presentan si la función voltamperométrica es constante, indicando de esta forma, si se trata de un sistema de transferencia de carga rápido reversible o no. La función voltamperométrica para un sistema reversible limitado por difusión se define como:

$$\frac{i_p}{v^{1/2}} = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o^* \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

i_p = Corriente de pico catódico (A)

C_{ox}^* = Concentración de la especie electroactiva en la solución (mol cm^{-3})

v = Velocidad de barrido (V s^{-1})

n = Número de electrones intercambiados

A = Área del electrodo (cm^2)

D = Coeficiente de difusión de la especie electroactiva en la solución ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

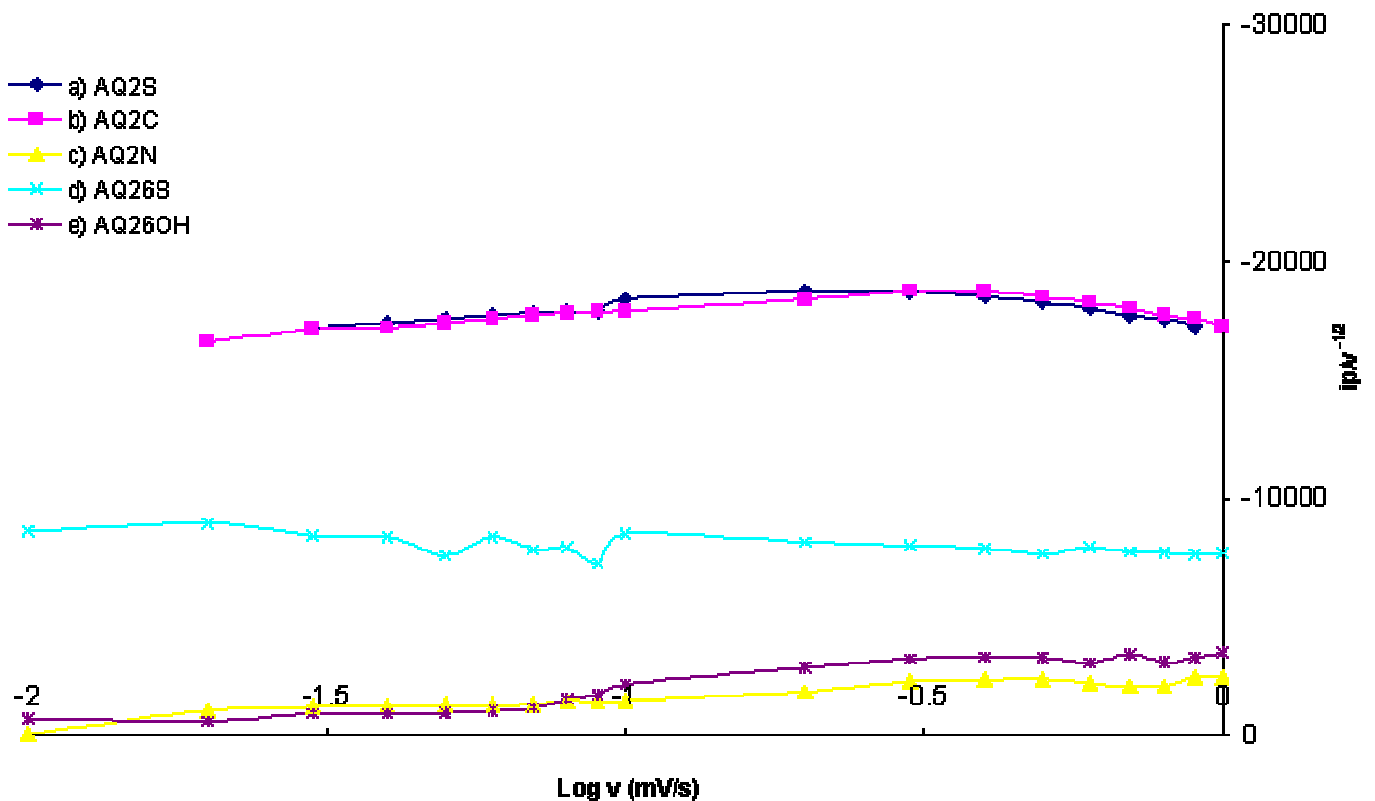


Figura 20. Función voltamperométrica vs. Log velocidad . a) AQ2S, b) AQ2C, c) AQ2N, d) AQ26S e) AQ26OH

La Figura 20 muestra que el valor de la función voltamperométrica es particularmente constante en el intervalo de velocidades de barrido de $0.01 \text{ V s}^{-1} - 1 \text{ V s}^{-1}$, (valor de logarítmico de -2 y 0 respectivamente), indicando de esta manera que la reducción de todas las antraquinonas se encuentra limitada por difusión en este intervalo de velocidades. Además, se observa que la funciones voltamperométricas evaluadas en este trabajo, como corrientes de pico de reducción por la velocidad a la un medio ($i_p v^{-1/2}$), presenta diferentes ordenadas para las diferentes antraquinonas, esto esta de acuerdo con la ecuación 1 en donde la relación ($i_p v^{-1/2}$), depende de la concentración de la especie electroactiva la antraquinona definida como C_0^*

Las ordenadas de las figuras 20 d y b que corresponden a las antraquinonas AQ2C

y AQ26S respectivamente, indicarían que tienen una solubilidad mayor al compararlas con las antraquinonas AQ26OH, AQ2N figuras 20 c y e, mientras la solución que contiene a la especie AQ2S figura 20 a, se observa que es la más soluble, debido a que es la antaquinona que posee una ordenada mayor.

La gráfica de la diferencia de potencial de picos anódico y catódico (Epa-Epc) respectivamente, contra el logaritmo de la velocidad, de los dos grupos de antraquinona se presentan en la Figura 21.

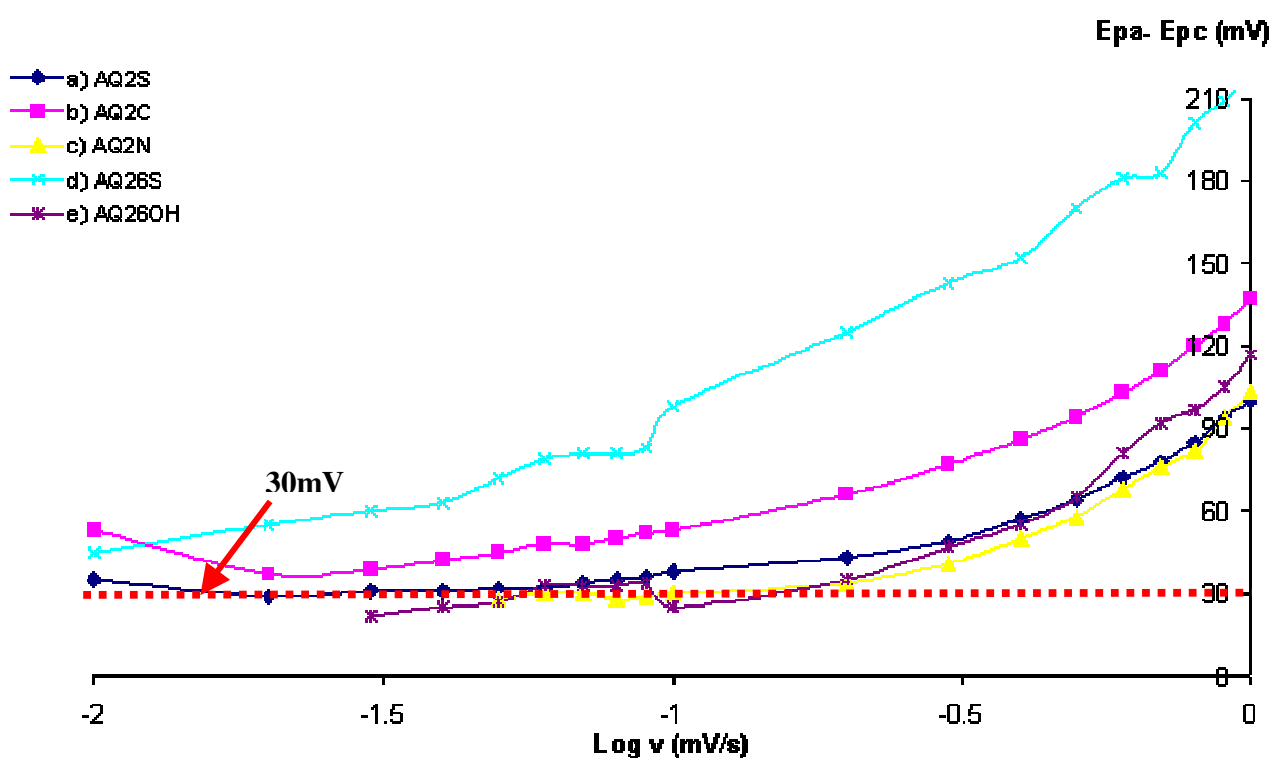


Figura 21. Diferencia de potenciales de pico vs. Log velocidad. a) AQ2S, b) AQ2C, c) AQ2N, d) AQ26S y e) AQ26OH. La línea roja muestra el valor de diferencia de potenciales de pico de 30 mV.

La diferencia de potencial de picos para ambos grupos de las antraquinonas Figura 21, es constante, a velocidades de barrido menores de 100 mV s^{-1} , (valor logarítmico -1),

mientras a velocidades superiores de 1000 mV s^{-1} , se observó una variación del E_{pc} con la velocidad. Conforme a la literatura ⁽¹⁸⁾, una reacción electroquímica reversible, ocurre si la función voltamperométrica y la diferencias de potenciales de picos anódica y catódica, son independientes de la velocidad y si se cumple la relación 60 mV n^{-1} , donde n es igual al número de electrones transferidos. En las antraquinonas estudiadas se encontró que la función voltamperométrica y la diferencia de potenciales de pico es independiente de la velocidad, para las antraquinonas AQ2C, AQ2N, AQ26OH, Figura 20 b, c y e así como Figura 21 b, c y e respectivamente, a velocidades de barrido menores de 100 mV s^{-1} , (valor logarítmico -1), y la AQ2S a velocidades menores de 50 mV s^{-1} (valor logarítmico -1.3); Figuras 20 a y 21 a. Además, las antraquinonas aquí estudiadas se oxidan y reducen en un medio acuoso implicando la transferencia de 2 electrones; por ello, se espera una relación a través de dos electrones, es decir hasta formar la hidroquinona correspondiente de $(60 \text{ mV})/2 = 30 \text{ mV}$. (ver mecanismo más adelante). Encontrándose que la reducción de todas las antraquinonas excepto la AQ26S son sistemas reversibles a velocidades de barrido menores de 100 mV s^{-1}

Finalmente para confirmar la reversibilidad de las antraquinonas AQ2S, AQ2C, AQ2N y AQ26OH se calculan las pendientes del gráfico potencial de pico de reducción contra el logaritmo de velocidad (E_{pc} vs. $\text{Log } v$), de la Figura 22. Los valores que se tomaron en cuenta, para realizar esta gráfica fueron los obtenidos en el intervalo de velocidades de barrido de 10 mV s^{-1} a 100 mV s^{-1} que corresponden a los valores logarítmicos -2 y -1 respectivamente, debido a que en estas condiciones la reducción de las antraquinonas se encuentran limitada por difusión. De esta manera las pendientes de E_{pc} vs. Log de la velocidad encontradas son: 32 mV , 25 mV , 26 mV , 42 mV y 35 mV por década,

para la AQ2S, AQ2C, AQ2N, AQ26S y AQ26OH respectivamente.

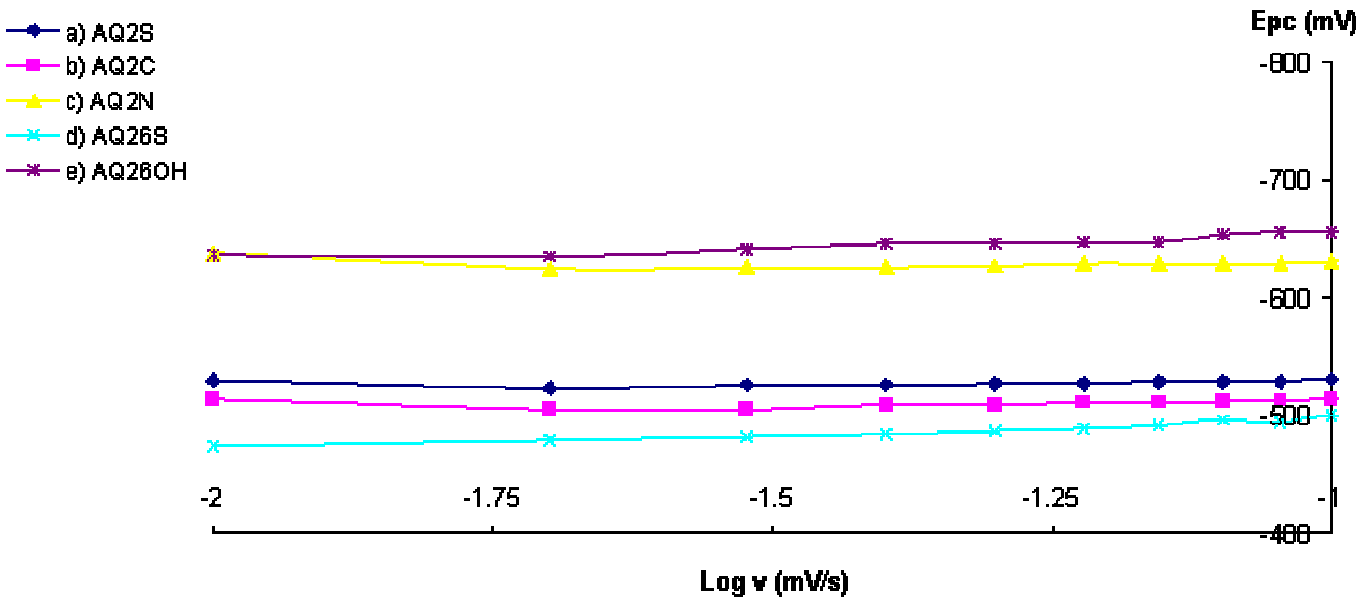
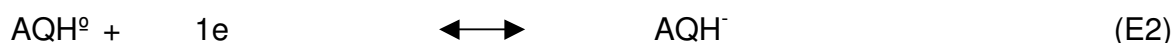


Figura 22. Potencial de reducción (E_{pc}) vs. Log de la velocidad. a) AQ2S, b) AQ2C, c) AQ2N, d) AQ26S y e) AQ26OH.

La función voltamperométrica de la figura 20 y la diferencia de potenciales de picos anódico y catódico figura 21, son independientes de la velocidad de barrido en valores menores de 1000 mV s^{-1} , (valor logarítmico -1), y además la variación del E_{pa} contra el logaritmo de la velocidad figura 22, es del orden de 30 mV, en base a estos resultados obtenidos experimentalmente al compararlos con la literatura ⁽¹⁸⁾ permiten sugerir como una primera aproximación el mecanismo que siguen las antraquinonas, que es del tipo electroquímico-químico-electroquímico (ECE) ⁽¹⁸⁾, el cual presenta la formación de especies intermediarias, que dependen de la transferencia de electrones y protonación.



Mecanismo de reacción: Electroquímico-Químico-Electroquímico (ECE)



Mecanismo de reacción: Electroquímico-Químico-Electroquímico-Químico (ECEC)

(Donde representan: AQ a cualquier antraquinona, HA al ácido que puede ser H_2PO_4^- y A^- la base conjugada del ácido)

Es importante resaltar que de acuerdo a las propiedades ácido base de las especies semiantraquinona anión radical ($\text{AQ2N}^{\circ-}$, $\text{AQ26N}^{\circ-}$, $\text{AQ2S}^{\circ-}$, $\text{AQ26S}^{\circ-}$, $\text{AQ26C}^{\circ-}$), y de la hidroantraquinona anión (AQ2NH^- , AQ26NH^- , AQ2SH^- , AQ26H^- , AQ2CH^-) el mecanismo global de transformación de la antraquinona hasta antrahidroquinona puede ser de forma ECE o bien ECEC. El estudio voltamperométrico de reducción no es capaz por sí sólo de discernir si la antraquinona se reduce hasta AQH^- y AQH_2 . En nuestro equipo de trabajo se ha propuesto de manera esquemática que el análisis del pico de oxidación correspondiente permite identificar si el proceso de reducción de quinonas produce las especies AQH^- y AQH_2 .

De esta manera se analiza la separación de los potenciales de picos de oxidación y reducción de los voltamperogramas asociados a cada antraquinona en la Figura 23 y Tabla 4.

Tabla 4. Potenciales de reducción y oxidación de las antraquinonas a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} , pH = 6.8 y 28°C .

Antraquinona	Pico de reducción Epc (mV)	Pico de oxidación Epa (mV)	Potenciales de media onda $(E_{pa}+E_{pc})/2$ (mV)	Diferencia absoluta de picos (mV)
AQ	- 550	- 500	- 525	50
AQ2N	- 630	- 600	- 616	30
AQ26N	- 650	- 580	- 615	80
AQ26OH	- 650	- 630	- 653	25
AQ2C	- 530	- 490	- 512	38
AQ2S	- 510	- 460	- 487	53
AQ26S	- 500	- 400	- 451	98

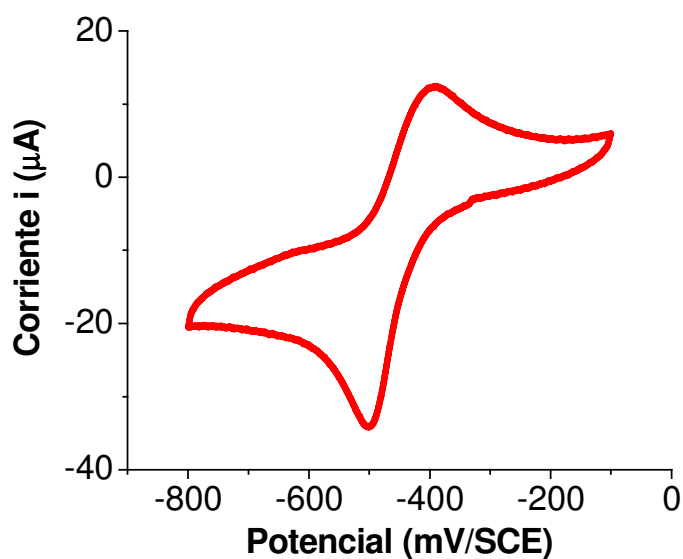


Figura 23. Voltamperograma típico. corriente vs Potencial de la AQ26S. Condiciones: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, concentración 0.5 mM, pH 6.8 y 28°C .

La Figura 23, muestra el voltamperograma típico correspondiente para la AQ26S, el cual presenta a manera gráfica, gran diferencia a la forma del voltamperograma de

la AQ2S, Figura 17 página 30, particularmente en el barrido anódico, mostrando un pico de oxidación más ancho, evidencia que indica la presencia de reacciones químicas posteriores, que conducen a un mecanismo ECEC, dando por resultado una separación de los picos de reducción y oxidación.

Analizando los resultados de la separación de picos de reducción y oxidación de la Tabla 4, se encontró que las antraquinonas AQ2N, AQ2C y AQ26OH presentan una separación de 30, 38 y 25 mV, mientras que la separación de AQ, AQ2S AQ26N y AQ26S es de 50, 53, 80 y 98 mV respectivamente. Estas separaciones indican que para el primer grupo de antraquinonas la reducción a través de dos electrones forma $AQH^{\cdot-}$, mientras que separaciones mayores de 30 mV indican que se ha formado en la reducción bioeléctrica de la antraquinona la especie AQH_2 , es decir para las antraquinonas AQ2N, AQ2S y AQ26OH el mecanismo es un ECE mientras las restantes antraquinonas siguen un mecanismo ECEC. Esta diferencia de los mecanismos se debe ciertamente a la basicidad de los intermediarios formados que dependen a su vez de los sustituyentes presentes en las antraquinonas. Para estudiar el efecto energético de los sustituyentes en la reducción de las antraquinonas se llevó a cabo un estudio tipo Hammett, la Figura 24 muestra la variación del potencial de media onda evaluados como $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ en función de los sigma de Hammett ⁽¹⁾ en posición para.

Para aplicar el modelo de Hammett-Zuman ⁽²⁾, se considera la comparación el $E_{1/2}$ onda de las antraquinonas con algún sustituyente con respecto al $E_{1/2}$ de la antraquinona que no tiene sustituyente alguno, con esto se toma el efecto de los sustituyentes en las propiedades de reducción. El efecto de los sustituyentes está titulado como σ , que para el caso constituye al sustituyente en posición para σ_p . Figura 24 y Tabla 5.

Tabla 5. Potenciales de reducción de $1/2$ pico experimental, σ_p teórico y diferencia del potencial de $1/2$ pico menos el potencial de $1/2$ de referencia de la AQ. Condiciones velocidad de barrido de 100 mV/s, pH = 6.8 y 28°C.

Antraquinona	$E_{1/2}$ mV	σ_p	$(E_{1/2} - E_{1/2} \text{ AQ})$ mV
AQ26S	-451	0.7	74
AQ2S	-487	0.35	38
AQ2C	-512	0.45	13
AQ	-525	0	0
AQ26N	-615	-1.12	-90
AQ2N	-616	-0.56	-91
AQ26OH	-653	-1.48	-128

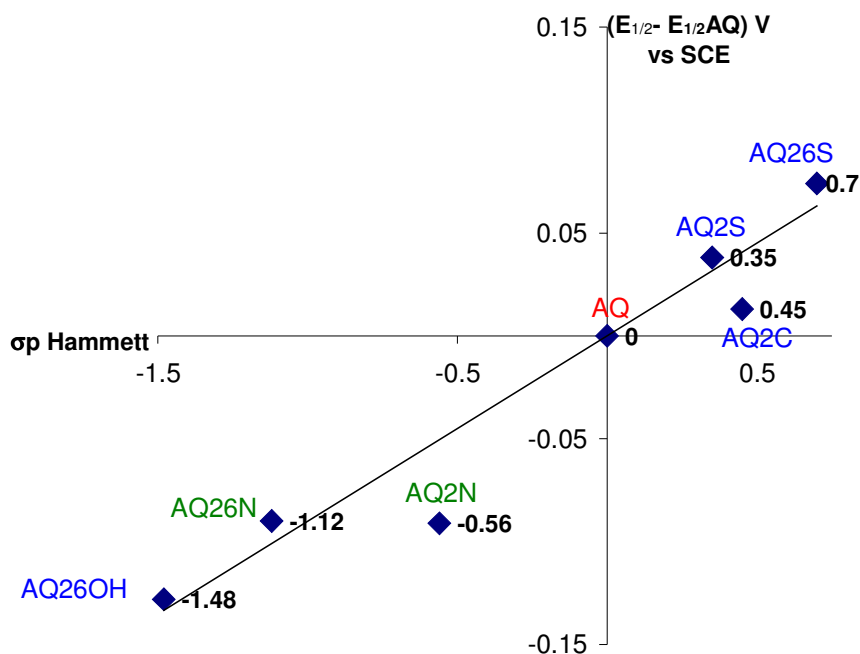


Figura 24. Potencial de medio pico $(E_{pa} + E_{pc})/2$ vs. Sigma (σ_p) de Hammett, para diferentes antraquinonas.

La Figura 24, muestra una relación lineal entre la diferencia de potenciales de media onda de las antraquinonas menos el potencial de media onda de la antraquinona como control ($E_{1/2} - E_{1/2} \text{ AQ}$) y los valores de las sigmas de Hammett, con una ecuación igual a: $Y = 0.090 X$ o ($\Delta E_{1/2} = (E_{1/2} - E_{1/2} \text{ AQ}) = 0.090 \sigma_p$), con un $R^2 = 0.93$, esta variación lineal de ($E_{1/2} - E_{1/2} \text{ AQ}$) con el σ_p de Hammett indica que el proceso de transferencia de carga está influenciado por el efecto de transmisión de carga que producen los diferentes sustituyentes en el anillo quinoide. De esta manera grupos que introducen carga al anillo quinoide, (σ_p menor que cero), provocan desplazamientos negativos del potencial de reducción con respecto al potencial de la antraquinona que no está sustituida; es decir, es necesario una energía mayor para introducir un electrón a la estructura de la antraquinona. En cambio los sustituyentes que extraen carga del anillo quinoide (σ_p mayor que cero), provocan que se requiera menor energía para reducir los grupos quinoide, esto se ve reflejado en desplazamientos positivos del potencial de reducción, además explica porque dentro del grupo electrodonador de antraquinonas (AQ2N y AQ26N) así como la AQ26OH, al compararlos con la AQ, el σ_p de Hammett es menor que cero, (Tabla 5), por poseer valores de potencial más negativos, debido a un efecto de sustituyentes donde el grupo amino actúa incrementando más la densidad de carga en el carbonilo, mientras las antraquinonas del grupo electroattractor (AQ2C, AQ2S y AQ26S), el σ_p de Hammett es mayor que cero y los potenciales aparecen a valores más positivos del potencial con respecto del grupo básico, a razón de que los grupos electroattractores participan en disminuir la densidad de carga del carbonilo.

De esta forma la basicidad de las especies intermediarias de la antraquinona AQ26N es mayor que las restantes antraquinonas haciendo que las reacciones de protonación de

la especie AQ^{9-} (C1) y AQH^{-} (C2), sea cuantitativa por lo que es de esperarse que se lleve la reducción hasta la hidroquinona AQH_2 implicando un mecanismo ECEC, mientras que las antraquinonas $AQ2S$ y $AQ2C$ las especies intermediarias su basicidad es menor, indicando que sólo la reacción C1 es cuantitativa, por lo que el mecanismo de reducción es de esperarse en ECE. Los valores de diferencia de potenciales de la Tabla 4, confirma estas aseveraciones para las antraquinonas siguientes ya que la diferencia de potenciales para la $AQ26N$ es de 80 mV mientras para la $AQ2C$ y $AQ2S$ es de 38 mV y 53 mV

Para confirmar acerca de la reversibilidad de la reducción de las antraquinonas en el medio acuoso que implica un mecanismo ECE, se evaluó el cambio de la relación entre la corriente anódica y catódica con la velocidad de barrido, en la Tabla 6, muestra el porcentaje de recuperación de la relación de corrientes anódica y catódica para dos velocidades de barrido 50 mV y 500 mV para las diferentes grupos de antraquinonas.

Tabla 6. Relación de la corriente anódica y catódica para las diferentes antraquinonas a dos diferentes velocidades de barrido 50 mV y 500 mV, pH = 6.8 y 28°C.

Mediador	(Ipa/Ipc) 50 mV/s	(Ipa/Ipc) 500 mV/s	Separación de potencial de picos (mV)
AQ2C	0.90	0.90	38
AQ2S	0.78	0.75	50
AQ26S	0.87	0.57	98
AQ26OH	0.73	0.74	25

Para las antraquinonas $AQ2C$ y $AQ2S$, el porcentaje de recuperación es alto y éste no disminuye al aumentar la velocidad de barrido, es decir poseen reversibilidad, esto se debe, a que como su bases conjugadas son débiles y el pH del medio no es suficiente ácido para protonar las especies hidroantraquinona anión ($AQ2SH^{-}$ y $AQ2CH^{-}$) impidiendo la formación de la hidroquinona ($AQ2SH_2$ y $AQ2CH_2$), involucrando un

mecanismo ECE. Por otra parte para el caso de la AQ26OH, se observa una recuperación alta independiente de la velocidad de barrido, por la naturaleza del sustituyente ($\sigma_p = -1.48$) se esperaría que los intermediarios fueran lo suficiente básicos para formar la hidroquinona AQH₂, lo que provocaría una variación en el porcentaje de recuperación con la velocidad de barrido como es el caso para la AQ26S (Tabla 6). Esta variación en la recuperación de la corriente está asociada a la competencia de la reacción C2. Pareciera que el caso de sustituyente OH existe una reacción adicional o bien la velocidad de reacción observada es mucho más alta que la velocidad de perturbación.

Por último dos variables importantes para considerar la elección de los mediadores fueron:

- 1.- Que durante el transcurso de las cinéticas las especies AQ y AQH₂⁻ estén presentes, es decir, que las antraquinonas posean reversibilidad para que el ciclo de catálisis se lleve a cabo correctamente.
- 2.- Utilizar una menor energía para poder oxidar o reducir las antraquinonas, es decir como está asociada la energética de las antraquinonas en función de los grupos sustituyentes.

Para fines de la Bioelectrocatalisis se debe fijar un potencial el cual asegure la oxidación de las diferentes antraquinonas es este trabajo en el medio. Para elegir este potencial se utilizó un diagrama de predicción de reacciones Figura 25, que muestra los valores de potencial de media onda de las diferentes antraquinonas, de esta forma se eligió el potencial de -200 mV.

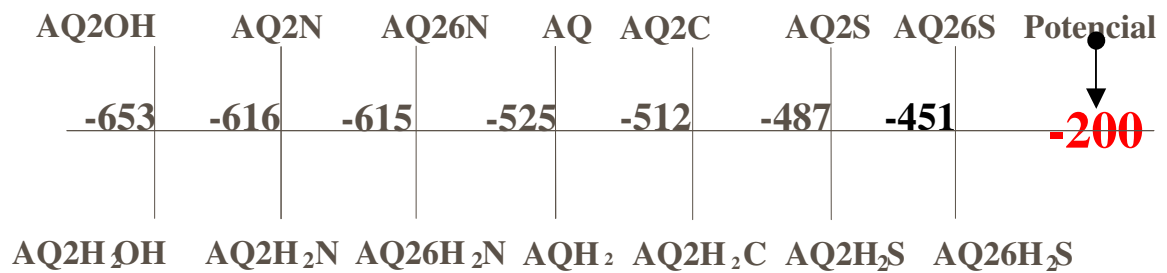


Figura 25. Diagrama de predicción de reacciones para las diferentes antraquinonas en mV.

De la figura 25, fue posible establecer que si se impone un potencial de -200 mV a las soluciones que contenga cualquiera de las antraquinonas aquí estudiadas será posible tener siempre a la antraquinona en forma reducida. De esta manera si las antraquinonas de alguna forma cual sea se reduzcan a hidroantraquinona el potencial impuesto de -200 mV aseguraría la oxidación de esta antraquinona a la quinona.

De este estudio es posible proponer que las antraquinonas AQ2S y AQ2C podrían actuar como mejores mediadores ya que poseen los potenciales de media onda menos negativos así como son procesos reversibles.

7.2 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Evaluación del Crecimiento y consumo de sustrato por *Pseudomonas sp.*

Con el fin de evaluar el efecto que tienen la presencia de antraquinonas y el potencial eléctrico sobre el metabolismo de consumo de glucosa por *Pseudomonas sp.* en esta parte del trabajo se presenta el estudio con 3 antraquinonas la AQ2S, AQ2N y la AQ, estas antraquinonas se seleccionaron de acuerdo a los potenciales de media onda que presentaron, la primera con un potencial menos negativo de -487 mV, la segunda con un potencial más negativo de -616 mV para compararlas con la AQ, antraquinona que no tiene sustituyentes con un potencial de -525 mV, para ver si existe un efecto de la estructura de la antraquinona y además estas antraquinonas presentaron reversibilidad.

La Figura 26, muestra la curva típica de crecimiento directo de *Pseudomonas sp.*; por conteo de unidades formadoras de colonias vs. Tiempo, en el medio de cultivo descrito en la Tabla 3.

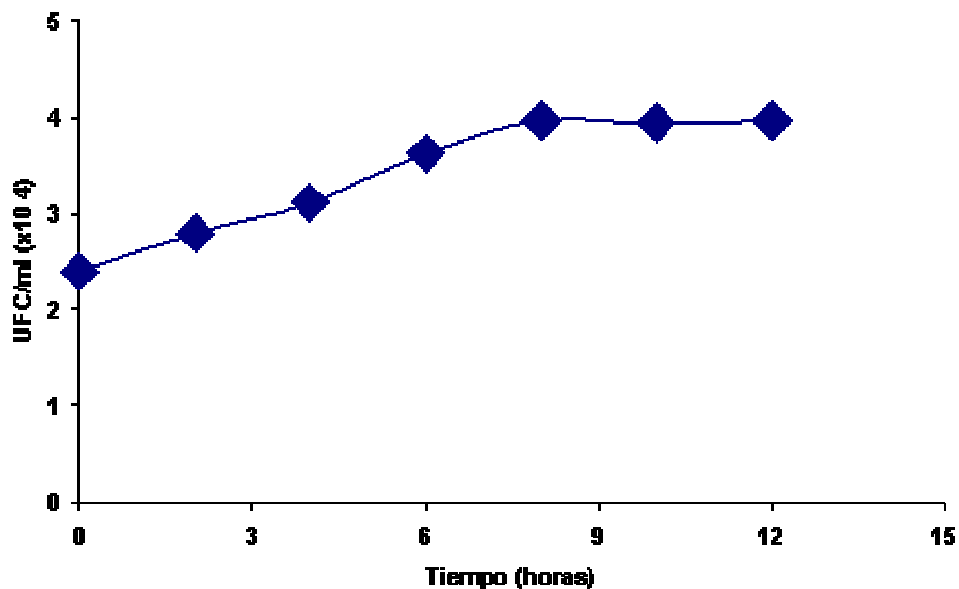


Figura 25. Unidades Formadoras de Colonias (UFC ml^{-1}). vs. Tiempo de *Pseudomonas sp.* en el medio de cultivo, 28°C y $\text{pH} = 6.8$.

El crecimiento típico de *Pseudomonas sp* bajo las condiciones experimentales, no presenta una fase de adaptación o (lag), en cambio en las primeras 8 horas se presenta un comportamiento lineal, debido a que al inicio se adicionó un inóculo en fase exponencial, el cual provino de un medio de cultivo enriquecido, ver metodología, y a partir de 8 horas de crecimiento es constante, debido a que el medio es desasimilativo se obtuvo una velocidad de crecimiento de 2×10^4 UFC mL⁻¹ h⁻¹ y una μ de 0.068 h⁻¹. La Figura 27, muestra el consumo de glucosa a través del tiempo para *Pseudomonas sp*.

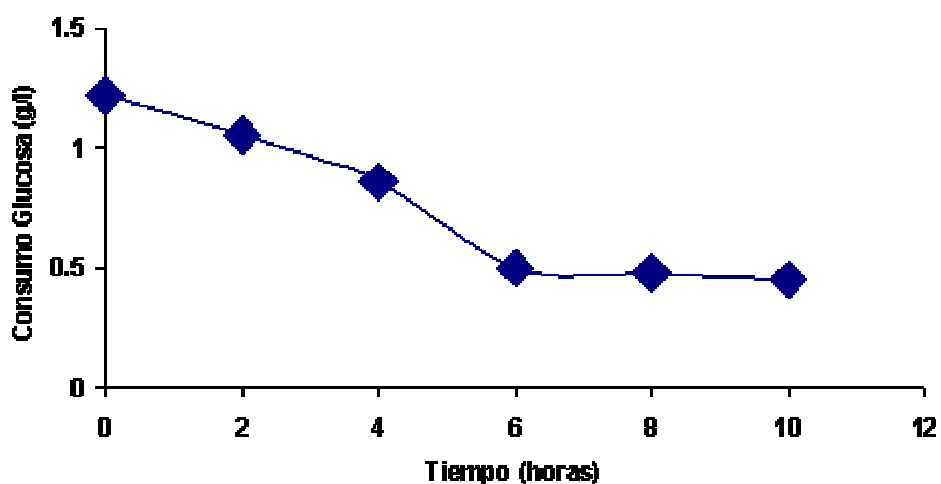


Figura 27. Consumo de glucosa de *Pseudomonas sp*. vs. tiempo.

El consumo de glucosa disminuye con una tendencia lineal hasta las 6 horas el cual está validado por el crecimiento de forma lineal en la Figura 26. Al calcular el valor de la pendiente de la parte lineal de la Figura 27, la velocidad de consumo de glucosa fue de 0.090 g glucosa h⁻¹ L⁻¹. Además después de este tiempo el consumo de glucosa es constante.

7.3 RESULTADOS BIOELECTROCATALÍTICOS

Evaluación del Crecimiento y consumo de sustrato *Pseudomonas sp.* Influenciado por mediadores y potencial.

En esta etapa se realizaron los estudios cinéticos descritos en la etapa bioelectrocatalítica, con el propósito de cuantificar los efectos de aplicación de un potencial y adición de antraquinonas sobre el crecimiento y consumo de sustrato.

En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos en el consumo de glucosa, al saturar las soluciones con las antraquinonas seleccionadas AQ, AQ2N y AQ2S, Figura 28 y el crecimiento Figura 29.

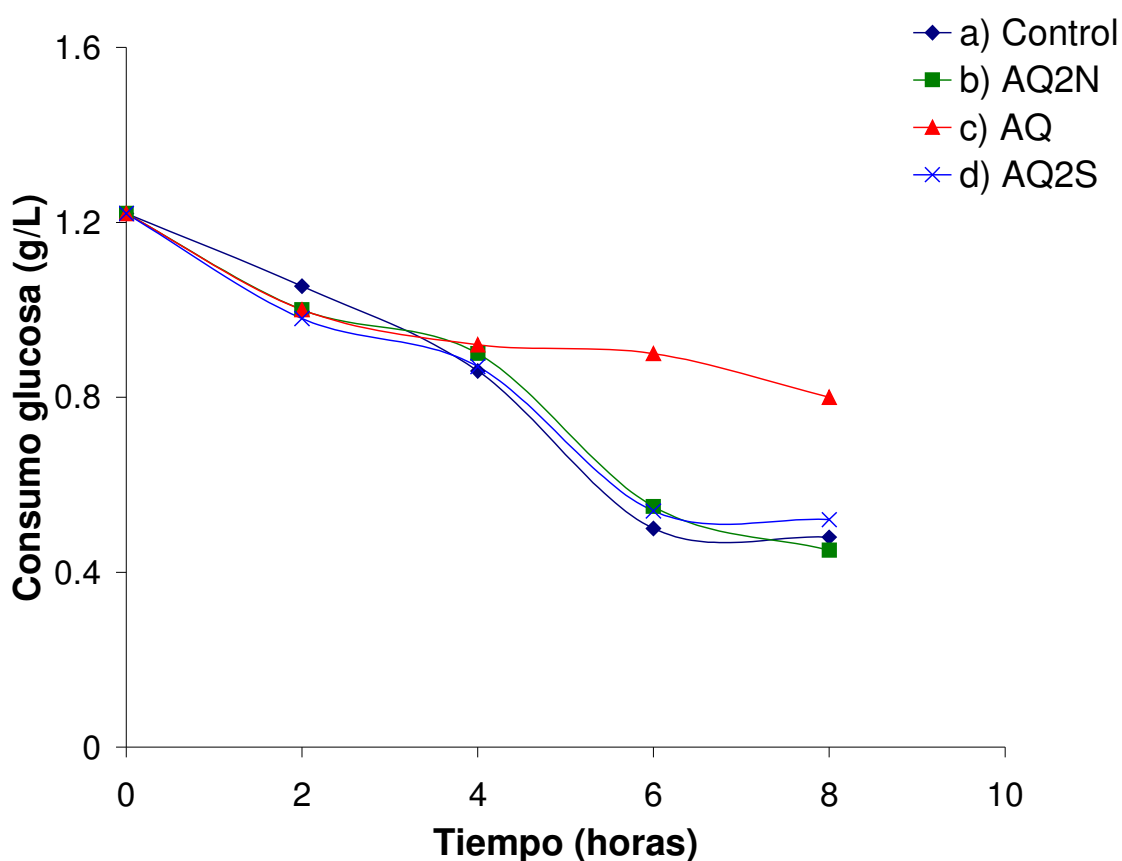


Figura 28. Efecto de la adición de 0.5 mM de las antraquinonas en el consumo de glucosa de *Pseudomonas sp.* a) Control, b) AQ2N, c) AQ y d) AQ2S .

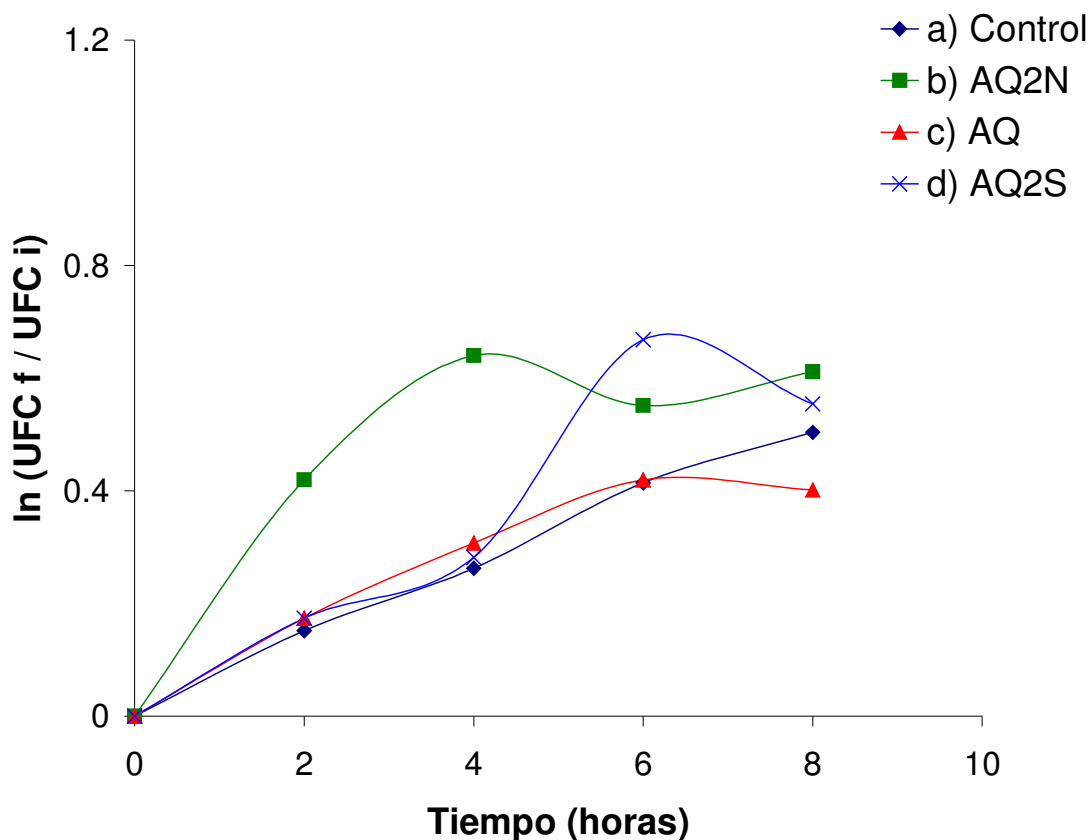


Figura 29. Efecto de la adición de 0.5 mM de las antraquinonas en el crecimiento de *Pseudomonas* sp. a) Control, b) AQ2N, c) AQ y d) AQ2S .

En la Figura 28, muestra el consumo de glucosa a través del tiempo, encontrándose que la velocidad en presencia de AQ2S (Figura 28 d) fue de $0.075 \text{ g glucosa L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y con AQ2N (Figura 28 b) de $0.080 \text{ g glucosa L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que son similares al control (Figura 28 a) de $0.090 \text{ g glucosa L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo cuando se adiciona AQ (Figura 28 c), el consumo de glucosa se inhibe a partir de 4 horas de cultivo, llegando a un valor de velocidad de $0.080 \text{ g glucosa L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Comparando estos resultados con el crecimiento Figura 29, se muestra que en las 4 primeras horas el crecimiento es lineal y termina en una fase constante, en presencia de AQ (Figura 29 c) la μ es de 0.078 h^{-1} y con AQ2N (Figura 29 b), de 0.17 h^{-1} . En cambio en presencia de AQ2S (Figura 29 d) el crecimiento permanece similar al control (Figura 29 a), con una μ de 0.068 h^{-1} , indicando la adición de AQ posiblemente inhiba el consumo de glucosa. Estos resultados muestran que la

adición de antraquinonas no aceleran el metabolismo de consumo de sustrato, contrariamente a los resultados de Field y colaboradores (2001 y 2002), donde encontraron que la adición de quinonas acelera el metabolismo de consumo de sustrato, por ejemplo: Acetato, butirato y propionato, sin embargo la adición de antraquinonas tiene un efecto en el crecimiento ya que la μ aumentó el 2.5 veces con respecto al control que es de 0.068 h^{-1} . La velocidad de consumo de glucosa (v) y velocidad específica de crecimiento (μ), se calcularon con el valor resultante de la pendiente al realizar una regresión lineal de los tres primeros datos respectivamente para el consumo y crecimiento. Los resultados de la presencia de imposición de un potencial de -200 mV sobre el consumo de glucosa y crecimiento, se detalla en las Figuras 30 y 31 respectivamente.

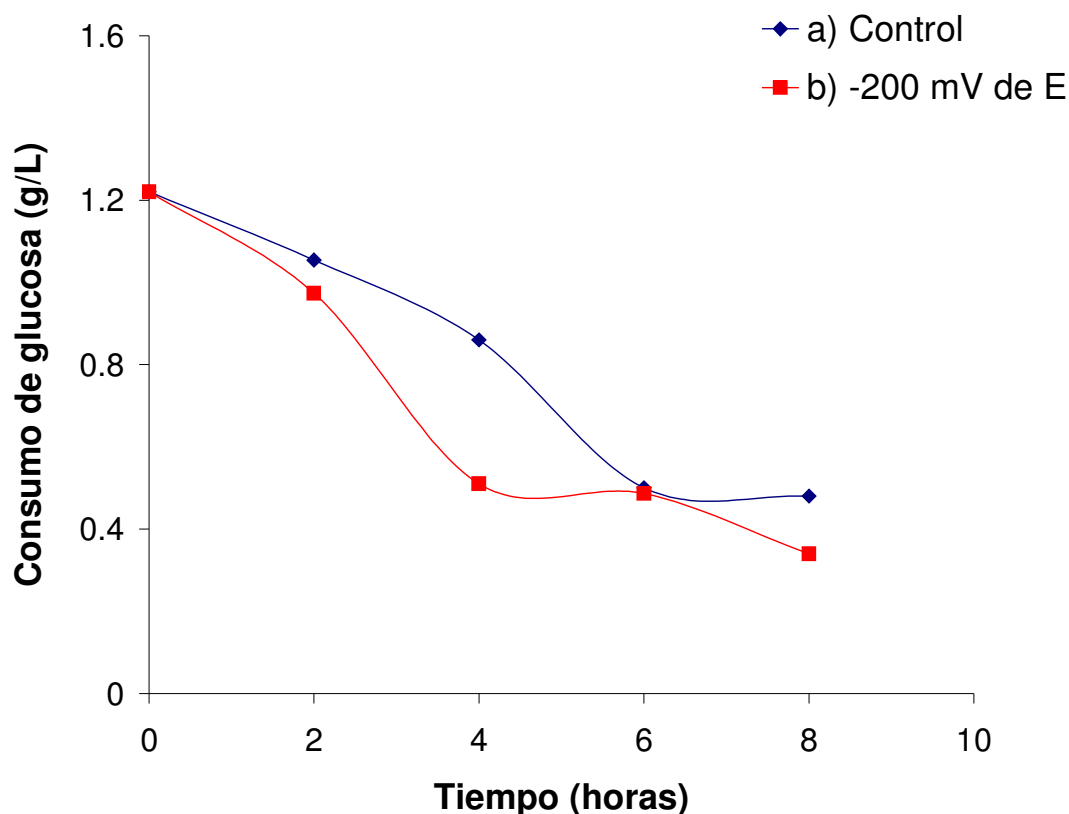


Figura 30. Efecto de la imposición de -200 mV de potencial en el consumo de glucosa en *Pseudomonas sp.* a) Control y b) -200 mV de potencial

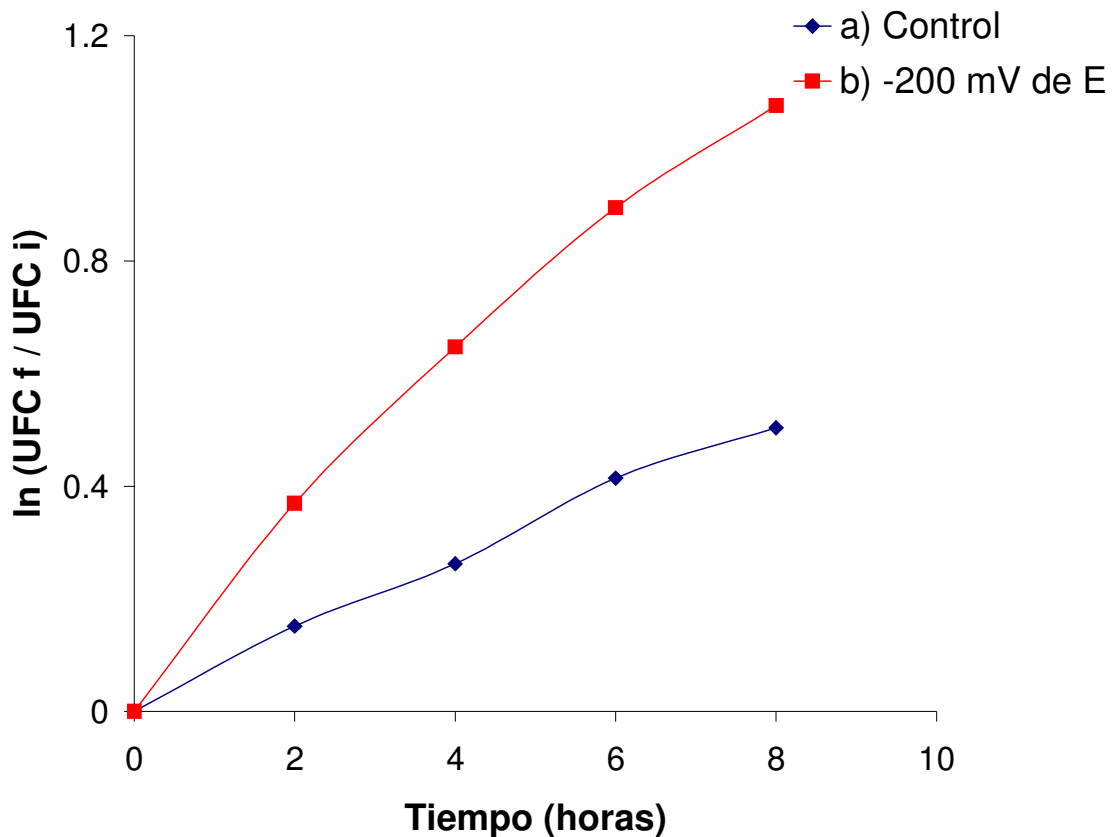


Figura 31. Efecto de la imposición de -200 mV de potencial en el crecimiento de *Pseudomonas sp.* a) Contro y b) -200 mV de potencial.

La Figura 30 b, muestra el consumo de glucosa que se ve favorecido incrementándose linealmente por la presencia de -200 mV de potencial aplicado en las primeras 4 horas, con una velocidad de 0.18 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$ al compararlo con el control (Figura 30 a), de 0.090 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$ evidenciando que la presencia de -200 mV de potencial actúa desacoplando el metabolismo celular de *Pseudomonas sp.*, acelerando el consumo de sustrato. En cambio el crecimiento (Figura 31 b), muestra un aumento en forma lineal hasta duplicarse con una μ de 0.16 h^{-1} al compararlo con el control (Figura 31 a), μ 0.068 h^{-1} . Estos resultados indicaron que el potencial ayuda acelerando el consumo de glucosa pero también favorece el crecimiento celular. Finalmente los resultados obtenidos al imponer un potencial de -200 mV y una solución saturada de las antraquinonas AQ, AQ2N y AQ2S. Se muestran en las figuras 32 y 33.

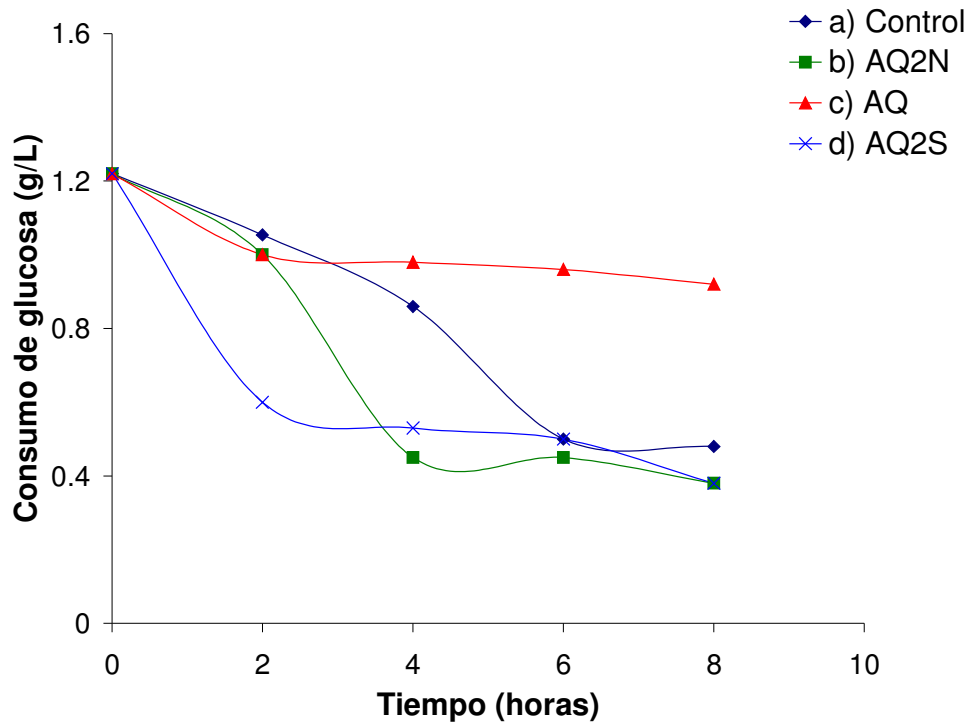


Figura 32. Efecto de la adición de 0.5 mM de las antraquinonas y -200mV de potencial en el consumo de glucosa en *Pseudomonas sp.* a) Control, b) AQ2N, c) AQ y d) AQ2S.

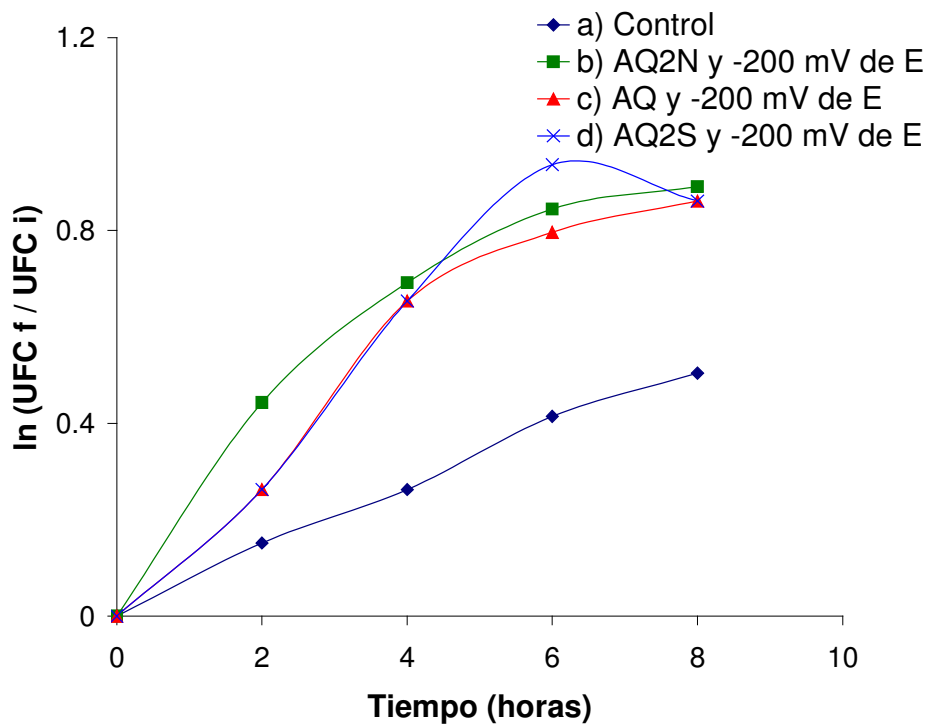


Figura 33. Efecto de la adición de 0.5 mM de las antraquinonas y -200mV de potencial en el crecimiento de *Pseudomonas sp.* a) Control, b) AQ2N, c) AQ y d) AQ2S.

El consumo de glucosa se ve favorecido acelerándose linealmente en las primeras 2 horas, con presencia de -200 mV de potencial y del mediador AQ2S (Figura 32 d), con una velocidad de 0.3 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$ y en 4 horas (Figura 32 b), con -200 mV y AQ2N la velocidad fue de 0.2 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$ al compararlo con el control (Figura 31 a), que fue de 0.1 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$. Sin embargo con la adición de AQ y con -200 mV de potencial el consumo se inhibe (Figura 32 c), alcanzando un valor máximo de 0.10 g glucosa $L^{-1} h^{-1}$ en dos horas. Estos resultados al compararlos con la adición única de antraquinonas y potencial, (Figuras 28 y 29), evidencian que la única variable significativa que actúa desacoplando el metabolismo de consumo de glucosa del microorganismo *Pseudomonas sp*, es la imposición de un potencial *redox*, el cual es de -200 mV. Este efecto puede deberse debido a que gran parte de los microorganismos incluyendo a *Pseudomonas sp*, regulan sus funciones a través de gradientes de concentración de iones metálicos (sodio y potasio), así como de protones. Y al aplicar un potencial, la relación de las concentraciones de iones en la membrana celular y en el citosol (parte interior del microorganismos donde se encuentran gran cantidad de enzimas hidrosolubles), varía promoviendo la participación o inhibición de procesos enzimáticos permitiendo un consumo y asimilación de la glucosa más rápido. ^(18, 19)

En cuanto al crecimiento se obtuvo que la μ con presencia de -200 mV de potencial y del mediador AQ2S fue igual que la observada con -200 mV y AQ de $0.15 h^{-1}$ (Figuras 33 c y d), en cambio con -200 mV y AQ2N la μ (Figura 33 b), fue de $0.18 h^{-1}$ confirmando que al estar presentes tanto la antraquinona y potencial, el consumo de glucosa se acelera manteniendo un crecimiento controlado.

Por último se resumen todos los datos de velocidades de consumo de glucosa v (g

$L^{-1} h^{-1}$) y velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) en las 4 primeras horas de cinética. Tabla 7.

Tabla 7 Valores de velocidad de consumo de glucosa y crecimiento.

Experimento	Velocidad de consumo glucosa ($g L^{-1} h^{-1}$)	μ (h^{-1})
Control	0.090	0.068
AQ2N	0.08	0.17
AQ	0.08	0.078
AQ2S	0.075	0.068
-200 mV de E	0.18	0.16
AQ2N y -200 mV	0.2	0.18
AQ y -200 mV	0.1	0.15
AQ2S y -200 mV	0.3	0.15

Estos valores confirman lo discutido anteriormente donde la adición única de antraquinonas AQ2N, AQ y AQ2S no aceleran el consumo de glucosa debido a que las velocidades de consumo obtenidas en presencia de estas antraquinonas son similares a las obtenidas con el control, mientras el crecimiento de *Pseudomonas sp*, se observó que con la presencia de la antraquinona AQ2N la cual posee un potencial de media onda más negativo -616 mV, se favorece incrementándolo.

En el caso de la imposición de un potencial de -200 mV se encontró que tanto el consumo de glucosa y crecimiento de *Pseudomonas sp* aumentaban. En cambio para el caso de la adición de antraquinonas e imposición simultánea de un potencial de -200 mV se observó que la presencia de la antraquinona AQ2S con un potencial de

media onda menos negativo -487 mV acelera de manera importante el consumo de glucosa al compararlo con el control.

8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de este trabajo es posible proponer una estrategia experimental que permite evaluar los potenciales de media onda de una serie de antraquinonas. Cuya estructura fue modificada por la presencia de grupos electrodonadores y electroattractores de carga en el grupo quinoide.

La relación funcional de los potenciales de media onda obtenidos experimentalmente con los σ_p de Hammett, permitieron confirmar la modificación de la reactividad de las antraquinonas con las propiedades presentes en estas moléculas. Una de las propiedades que parece tener mayor influencia importante en el comportamiento electroquímico es la basicidad de los intermediarios que aparecen en la reducción de antraquinona a la correspondiente antrahidroquinona. De esta manera fue posible relacionar la basicidad de estos intermediarios con el mecanismo de reducción asociado a las antraquinonas. La reducción de las antraquinonas con grupos electroattractores (AQ2S y AQ2C) se reducen a potenciales menos negativos y los intermediarios son menos básicos de tal manera que la transformación de la antraquinona forma la especie $AQH^{\cdot-}$. Por otra parte las antraquinonas con grupos electrodonadores de carga se reducen a potenciales más negativos que la antraquinona formando intermediarios más básicos que provocan la formación de antraquinona hasta la hidroquinona AQH_2 en un mecanismo ECEC.

La diferencia entre estos mecanismos también se asocia a la reversibilidad con la formación de hidroantraquinona formada, con el estudio electroquímico estudiado fue posible seleccionar el potencial aplicado a la solución que permite la

oxidación de cualquier antraquinona asegurando que si el microorganismo *Pseudomonas sp* reduce la antraquinona a hidroantraquinona esta regresaría a antraquinona. El potencial impuesto fue de -200 mV con respecto al potencial de circuito abierto OCP.

En los estudios catalíticos del consumo de glucosa por *Pseudomonas sp* en presencia de antraquinona con y sin potencial fue posible proponer que el potencial de reducción de la antraquinona no tiene un efecto importante en el metabolismo de *Pseudomonas sp* y aparecer es la estructura como tal que tiene efecto inhibitorio, sin embargo esta es una conclusión preliminar que requiere más experimentos para ser sustentable.

Por último la imposición de un potencial de -200 mV en el medio, en donde se lleva a cabo el consumo de glucosa de *Pseudomonas sp*, afecta de manera importante la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad del crecimiento. Esta modificación se hace más importante cuando se adicionan las diferentes antraquinonas con un potencial menos negativo presentando un efecto de aceleración en el metabolismo de glucosa y crecimiento de *Pseudomonas sp*, con respecto a las otras quinonas estudiadas en este trabajo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **A. Leo, Corwin Hansch, and R.W. Taft** A Survey of Hammett Substituent Constants and resonance and Field Parameters, *Chem. Rev.*, 1991, 91: 165-195.
2. **Bautista Martínez, González I. and Martínez Aguilar M. Thurston.** (2003), Influence of acidity level in acetonitrile on Hammett–Zuman type correlations on the reduction of α -hydroxyquinones, *Electrochimica Acta* 48, 4239-4244.
3. **Benneto H. Peter, Delaney Gerard M., and Thurston Christopher F.** (1984), Electron-transfer coupling in microbial fuel cells:1 Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates Bacteria, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B:3-12.
4. **Benneto H. Peter, Delaney Gerard M., and Thurston Christopher F.** (1984), Electron-transfer coupling in microbial fuel cells:2 Performance of fuel cells containing selected Microorganism –mediator – substrate combinations, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34B: 13-27.
5. **Bechtold T., Burtscher E. and Turcanu A.** (1999), Anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dispersed organic dyestuffs. *Journal of Electrochemical Chemistry*, 465:80-87.
6. **Cadena Ramírez Arturo.** Efecto de las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica recalcitrante por un lodo desnitrificante, Tesis de Maestría UAM-I.
7. **Cervantes-Carrillo Francisco J.** (2002), Quinones as Electron Acceptors and Redox Mediators for the Anaerobic Biotransformation of Priority Pollutants. Doctoral Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
8. **Cervantes F.J., and van Lier J.B.** (2003), Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 942-951.
9. **González P.T.** (1997), Capacidad de degradación de hidrocarburos de la cepa *Pseudomonas* sp. MGP-1 Tesis, IPN-ENCB. México D.F.
10. **González Neria I.** (2002), Búsqueda del gen *alkB* y su ubicación en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 degradadora de *n*-alcanos de alto peso molecular. Tesis de Maestría IPN México D.F.
11. **Grimaldo, J. C.** (1997), *Pseudomonas* sp. MGP-1 como posible agente de recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Maestría, IPN-ENCB. México D.F.
12. **Hernández M. E. and Newman D. K.** (2001), Extracellular electron transfer, *Cell. Mol. Life Sc.* 58:1562-1271.
13. **Hyung Joo Kim and Hyung Park** (2002), A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:145-152
14. **Lovley D.R., Fraga Coates J. D. and Blunt-Harris E.L.** (1999), Humics as an electron donor for anaerobic respiration *Environ. Microbiol.* 1: 89-98.

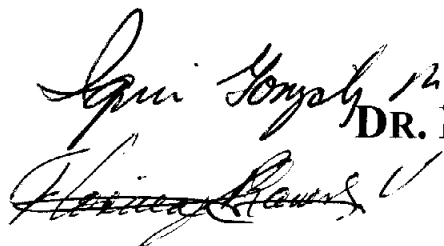
15. **Lovley D.R., Fraga Coates J. D. and Blunt-Harris E.L.** (1996), Humics substances as electron acceptors for microbial respiration *Nature*. 382:445-448.
16. **Madigan T. M., Martinko M. J., Parker Broca J.** (2000), Biología de los microorganismos, 8ª edición, editorial Prentice Hall, México.
17. **Morton R. A.** (1965), Biochemistry of quinones, editorial Academic press. London and New York.
18. **Nicholson Richard S. and Shain Irving.** (1964), Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems, *Analytical Chemistry* Vol. 36 No. 4
19. **Prince, M.** (1993), Bioremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. *Environ. Progress*. 1: 5-11.
20. **Riondet Christophe, Rémy Cachon and Charles Diviès.** (1999), Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential, *Eur. J. Biochem.* 262: 595-599.
21. **Riondet Christophe, Rémy Cachon and Charles Diviès.** (2000), Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*. 182: 620-626.
22. **Stolz Andreas, Keck Andreas, and Mattes Ralf** (2001), Reduction of azo dyes by redox originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas sp.* strain BN6, *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3684-3690.
23. **Stolz Andreas, and Rau Jorg** (2002), Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria, *Environ. Sci. Technol.* 36: 1497-1504.
24. **Van der Zee Frank P., Jim A. Field and Gatze Lettinga** (2000), The role of (auto) catalysis in the mechanism of anaerobic azo reduction. *Water Sci Technol.* 42:301-308.
25. **Van der Zee Frank P., Jim A. Field and Gatze Lettinga** (2001), Application of redox mediators to accelerate the transformation of reactive azo dyes in anaerobic bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 75: 691-701.
26. **Van der Zee Frank P., and Gatze Lettinga** (2002), Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes, *Biotechnol. Bioeng.* 75: 691-701.
27. **Vasu, R.** (1997), n-alkane oxidation enzymes of a *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 4: 881-884.
28. **Wuley, J.** (2000), Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biothechnol.and Bioeng.* 69: 385-400.
29. **Yasuhiro Ogino, Kazuyoshi Takagi, Kenji Kano and Tokuji Ikeda.** Reactions between diaphorase and quinone compounds in bioelectrocatalytic redox reactions of NADH and NAD⁺, *Journal of Electrochemical Chemistry*, 396: 517-524.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
POSGRADO EN QUÍMICA**

**INFLUENCIA DE MEDIADORES QUÍMICOS
Y POTENCIAL SOBRE EL METABOLISMO
DE *Pseudomonas sp.***

**TESIS QUE PRESENTA EL
I.B.I. JUAN CARLOS MAYA CASTELLANOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN QUÍMICA**

The image shows two handwritten signatures in black ink. The top signature is 'Ignacio González Martínez' and the bottom signature is 'Florina Ramírez Vives'. Both signatures are written in a cursive, flowing style.

ASESORES:

DR. IGNACIO GONZÁLEZ MARTÍNEZ

DRA. FLORINA RAMÍREZ VIVES

MÉXICO, D.F. JULIO DE 2006