

## Efecto de las membranas con Cu(II) sobre el proceso de filtración y capacidad de biocida contra *Escherichia coli*

*Effect of Cu(II) membranes on the filtration process and biocide capacity against Escherichia coli*

Edward M.A. Guerrero-Gutiérrez<sup>1\*</sup> , María Abad<sup>2</sup>, Isabel Gaitán<sup>2</sup>, Keila Guerrero<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería y <sup>2</sup> Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [edward.guerrero@upr.edu](mailto:edward.guerrero@upr.edu)

Recibido: 16 de febrero 2021 / Revisión: 16 de marzo 2022 / Aceptado: 17 de junio 2022

### Resumen

Esta investigación estudió la preparación de membranas compuestas de celulosa y quitosano entrecruzadas con Cu(II) para determinar su efecto biocida y eficiencia en la remoción de *Escherichia coli*. Las membranas de quitosano se obtuvieron por medio de la técnica de evaporación del solvente. Propiedades de absorción de agua, degradación térmica y mecánicas de las membranas fueron evaluadas con el propósito de modificar la estructura química, la superficie y estudiar su impacto como agente biocida. Los resultados muestran que el Cu(II) interactúa con los grupos iónicos de las membranas que inducen un cambio estructural produciendo un aumento de 190% en el módulo G\*. Además, el catión provee estabilidad térmica a temperaturas menores de 200 °C y produce cambios superficiales a la membrana, especialmente a la membrana de celulosa. Adicionalmente, la membrana de celulosa-Cu(II) aumentó su efecto biocida contra *E. coli* hasta un 96%. El proceso de remoción por medio de la filtración aumentó 41% con la incorporación del catión. Esta investigación muestra el efecto de la interacción del catión con grupos iónicos en la membrana que mejoran las propiedades de filtración y efecto biocida contra esta enterobacteria que puede llegar a ser patógena para el ser humano.

Palabras claves: Unidades Formadoras de Colonias, fenómeno de transporte, degradación térmica, morfología

### Abstract

This research studied the membrane preparation of Cu(II) crosslinked membranes composed of cellulose and chitosan to determine its biocidal effect and efficiency to remove *Escherichia coli*. Water absorption, thermal degradation, and G\* modulus evaluated the Cu(II) impact on the equilibrium, thermal and mechanical properties. These results showed that Cu(II) incorporation interacts with the ionic groups, inducing a structural change increasing the G\* modulus by 190%. Moreover, the cation provides thermal stability at temperatures below 200 °C and produced surface changes to the membrane, especially to the cellulose membrane. Additionally, the cellulose-Cu(II) membranes increased 96% their biocidal effect against *E. coli*. Enterobacter filtration process increased 41% with the cation incorporation into the cellulose membrane. Therefore, this research showed the cation effect on the ionic groups in the membrane that improve the filtration properties and biocidal effect against harmful enterobacteria to humans.

Keywords: Colony-forming units, transport phenomena, thermal degradation, morphology

## Introducción

El agua es crítica para la supervivencia del ser humano; lamentablemente aún en este tiempo de avances tecnológicos, muchas de las personas todavía no poseen acceso a agua potable (Cabral, 2010). Esto predispone que las personas puedan adquirir infecciones patógenas por medio del consumo del agua, el cual le puede llegar a provocar hasta la muerte. En América Latina, un alto grado de su población posee infecciones causadas por patógenos resistentes a medicamentos, en comparación a otras regiones del mundo. Estos patógenos son fácilmente transmitidos entre los individuos de una comunidad por medio del agua y de los alimentos (Salles et al., 2013). Las enterobacterias tales como *E. coli* son algunos de los patógenos que se encuentran como contaminantes del agua (Cabral, 2010). La enterobacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET) ocasiona diarrea y son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños, después de la neumonía según lo indica un estudio en la población guatemalteca (Schneider, 2005). Asimismo, EPEC también ha sido aislada en casos de diarrea aguda en Santa Rosa, Guatemala (Jarquín et al., 2022). Además, se ha determinado que los menores de cinco años se encuentran en riesgo de adquirir alguna enfermedad por causa de bacterias o virus contenidos en el agua o un alimento consumido (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, 2022). Debido a los continuos avances en el desarrollo de la tecnología de membranas, se han conseguido membranas con mejores propiedades térmicas, mecánicas y de resistencia a agentes químicos (Fane et al., 2015) que puedan utilizarse para la eliminación de enterobacterias en el agua (Fane et al., 2015; Qi et al., 2018; Szekeres et al., 2018). Comparado con otros tipos de membranas, las membranas poliméricas lideran los procesos de separación en la industria porque son económicas y prácticas para su uso; sin embargo, aspectos químicos, mecánicos y térmicos restringe su aplicación (Madaeni et al., 2015). Se ha determinado que las membranas poliméricas obtenidas por medio de la técnica de evaporación de solvente favorecen el transporte a través de ella debido a la nanoestructura específica obtenida luego de su proceso de formación (Avilés-Barreto & Suleiman, 2013; Guerrero-Gutiérrez et al., 2015). Membranas poliméricas elaboradas a partir de celulosa nano fibrilada y partículas de cobre

metálico se han utilizado como filtros de agua para la retención de virus; en donde modificaciones en su estructura polimérica mejoraron sus propiedades de retención contra los virus (Szekeres et al., 2018). Otros estudios han utilizado membranas de celulosa con partículas de plata que han demostrado capacidad antibacteriana durante el proceso de filtrado de agua (Praveena et al., 2016); sin embargo, no han evaluado el efecto biocida superficial con otros agentes como cobre. El quitosano también se ha utilizado para la formación de membranas para el tratamiento de agua. Este material es un amino polisacárido que posee una estructura química conformada por cadenas lineales de polimerización con una alta densidad de carga; además, posee grupos hidroxilo y amino que poseen alta reactividad (Islam et al., 2017). Este material se produce por medio de la desacetilación de la quitina extraída del exoesqueleto de crustáceos el cual es un material de desecho de la industria pesquera (Keshvardoostchokami et al., 2021). Se espera que el tamaño del mercado mundial de quitosano incremente de USD  $1.205 \times 10^9$  a USD  $2.55 \times 10^9$  para el 2022 siendo la región de Asia Pacífico la que lidera el mercado de quitosano especialmente en China, Japón, India y Tailandia (Huq et al., 2022). Membranas de quitosano y policaprolactona han mostrado alta efectividad para reducir a *Staphylococcus aureus* presente en el agua (Cooper et al., 2013). La incorporación de biocidas (por ejemplo, cobre) en la superficie de la membrana provee una estrategia efectiva en la modificación superficial de la membrana que a su vez provee alta efectividad en contra enterobacterias (Qi et al., 2018). Estudios han demostrado que el cobre actúa como un agente antibacteriano (Das & Patra, 2017) y antifúngico (Quaranta et al., 2011).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la incorporación de Cu(II) sobre la superficie de membranas de celulosa y quitosano sobre el proceso de filtración y su capacidad biocida contra *E. coli*. Las membranas se caracterizaron por medio de propiedades de absorción de agua, degradación térmica, propiedades mecánicas y su composición química. El impacto de esta investigación consistió en desarrollar una membrana polimérica que contenga en su superficie un agente biocida que tenga la capacidad de poder eliminar del agua la enterobacteria *E. coli* y que dicha membrana cuente con el potencial de ser utilizada en comunidades con limitado acceso a agua potable en Guatemala.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Las membranas de acetato celulosa/nitro celulosa (celulosa) se adquirieron de Merck Chemicals® (MF-Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  MCE Membrane), sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma Chemical CO, 99%), agar tripticasa soya (TS) (Merck Chemicals), ácido acético glacial (Merck Chemicals, 100%), fenolftaleína en polvo (Kosmos Hassler), ácido clorhídrico (Aldrich Chemical, 37%), solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH:  $7.3 \pm 0.2$  (Inmuno Concepts), glicerina (Sigma Chemical), cloruro de sodio (Merck, JT Baker), quitosano (Bio Basic Canada Inc), hidróxido de sodio en pellets (EMPLURA® Merck Chemicals, pureza  $\geq 97.0\%$ ). Todos los productos químicos se utilizaron tal como fueron recibidos y se almacenaron en un área libre de polvo en recipientes color ámbar para protegerlos de la luz

### Métodos

#### Preparación de la membrana

##### *Elaboración de la membrana de quitosano*

La preparación de la membrana de quitosano consistió en disolver 5 g de quitosano en 400 g de una solución acuosa de 25%p/p de ácido acético glacial (Geng et al., 2005). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 24 h. Finalizado este proceso, se agregó 25%p/p glicerina y se agitó durante 30 min. Luego se colocó la solución en cajas de Petri y se dejó evaporar el solvente durante 3 semanas a temperatura ambiente.

#### Entrecruzamiento de membranas con Cu(II)

Las membranas se sumergieron en 10 mL de una solución 1 M ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a temperatura ambiente durante 24 h. Terminado este periodo se eliminó el exceso de la solución por medio de lavados con agua desmineralizada hasta que el pH del agua de lavado fuera 7. Luego se procedió a secarlas a 50 °C durante 24 h (Shen et al., 2017).

### Caracterización de la membrana

#### *Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)*

Una celda de reflectancia total atenuada (ATR) con el FT-IR (ATR Nicolet™ IS™ 10) se utilizó para analizar la posición e intensidades de los grupos químicos característicos de cada una de las membranas antes y luego de ser entrecruzadas con Cu(II). Las membranas se colocaron sobre un ATR de diamante, luego el espectro infrarrojo se colectó utilizando 132 escaneos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  a una velocidad óptica de 0.4747 en un rango de 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### *Absorción de agua*

La absorción de agua se midió sumergiendo una muestra 1 cm x 1 cm (secada previamente a 60 °C durante 24 h en un horno) en 10 mL de agua desmineralizada a temperatura ambiente. Se registró el peso de la membrana después de su inmersión en agua a diferentes intervalos de tiempo: 10, 20 y 40 minutos (Guerrero-Gutiérrez et al., 2015). Cada resultado representa el promedio de diez repeticiones, el porcentaje de absorción de agua fue calculado mediante la siguiente ecuación (1):

$$A = \frac{(W_1 - W_2)}{W_2} * 100 \% \quad (1)$$

Donde A es el porcentaje de agua absorbida durante un intervalo de tiempo,  $W_1$  es el peso de la muestra durante un intervalo de tiempo y  $W_2$  es el peso de la muestra seca.

#### *Análisis termogravimétrico (TGA)*

La degradación térmica y el contenido de ceniza en cada membrana se determinó utilizando un analizador termogravimétrico Mettler Toledo TGA/DSC 3+. En cada experimento se utilizó una muestra con un peso de 5-10 mg. Las temperaturas de degradación fueron determinadas luego de calentar la muestra de temperatura ambiente hasta 600 °C a 10 °C/min bajo una atmósfera de inerte de nitrógeno. El contenido de ceniza se determinó calentando la muestra de 600 °C hasta 800 °C a 10 °C/min bajo una atmósfera de aire.

### *Análisis mecánico dinámico (DMA)*

El análisis dinámico mecánico se utilizó para determinar las propiedades mecánicas de las membranas de celulosa con Cu(II). El módulo dinámico en tensión ( $E^*$ ) fue determinado de 25 a 100 °C a 2 °C/min y una frecuencia de 1 Hz. Adicionalmente, se determinó el módulo dinámico del esfuerzo cortante de 25 a 100 °C a 3 °C/min y una frecuencia de 1 Hz utilizando un DMA1 de Mettler Toledo.

### *Análisis óptico*

La superficie de las membranas se observó por medio de un microscopio digital marca Keyence modelo VHX-5000 Digital (Keyence Corporation, Japan) con una magnificación de 500X y 3000X utilizando el lente VHZ500R/W/T. Esta última magnificación solamente se empleó con las membranas de celulosa.

### **Preparación de solución madre de *E. coli* ATCC 8739**

La solución madre se realizó incubando la bacteria *E. coli* ATCC 8739 en un caldo nutritivo de TS a 37 °C durante 24 h. La concentración de la solución madre se estableció mediante la comparación con el Estándar de MacFarland No. 1 que contiene  $3 \times 10^8$  UFC/mL aproximadamente. Esta solución madre se diluyó sucesivamente hasta obtener una cantidad de 25 a 250 UFC (Maturin & Peeler, 2020).

### **Proceso de filtración de *E. coli* contenido en el agua**

El proceso de filtración de *E. coli* contenido en el agua se realizó por medio de un equipo de filtración (MF75™, NALGENE®) y una bomba de vacío (VWR Scientific LR39793). Inicialmente las membranas se esterilizaron bajo luz UV durante 22 min de cada lado. Seguidamente se colocó la membrana en el equipo de filtración, luego el agua con *E. coli* y se inició el proceso de filtrado. Al finalizar este proceso se retiró cuidadosamente la membrana y se colocó sobre una placa con agar TS. Para determinar la eficiencia de la membrana se sembraron 100 µL de la solución madre en agar TS antes y luego de la filtración. Todos los agares se incubaron a 37 °C por 24 h (Standard Methods, 2018).

La eficiencia se obtuvo por medio del recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) contenidas en el agua antes y luego del proceso de filtrado. Los resultados representan el promedio de diez repeticiones.

### **Capacidad biocida de las membranas**

La capacidad biocida de las membranas se determinó por medio de la siembra de la solución madre sobre la superficie de la muestra. Para ello, las membranas se cortaron en forma circular con un diámetro de 14 mm esterilizándose bajo luz UV durante 22 minutos de cada lado. Luego, se agregaron 50 µL de la solución madre sobre la superficie de cada muestra incubándose a 37 °C durante 4 h. Finalizado este periodo, las membranas se sumergieron en 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH  $7.3 \pm 0.2$  colocándose sobre un agitador (IUCHI, AC100V50/60Hz) a 92 rpm durante 10 min. Finalizado este tiempo, se extrajeron 50 µL de la solución de PBS y se sembraron en agar TS incubándose a 37 °C por 24 h. Por último, se procedió a realizar el recuento de UFC. Adicionalmente, se realizó un control bajo las mismas condiciones con la diferencia que se eliminó el uso de membrana y se realizó una siembra directa de 50 µL de la solución madre (Zhuang et al., 2020). Los resultados representan el promedio de diez repeticiones.

### **Procesamiento y análisis de la información**

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor por separado para las siguientes variables respuesta: absorción de agua, el proceso de filtración y la capacidad biocida, siendo el factor analizado el tipo de membrana. Adicionalmente, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar las medias del factor analizado. Las muestras se corrieron en orden aleatorio y las hipótesis fueron evaluadas con un nivel de confiabilidad del 95%. Las hipótesis nulas se rechazaron si el valor de  $p$  asociado al resultado observado es igual o menor que el nivel de significación ( $p \leq .05$ ).

## **Resultados**

Las membranas poliméricas han sido utilizadas para eliminar bacterias del agua debido a su estructura porosa, facilidad de fabricación y permeabilidad

selectiva, esperándose que posea un flujo de filtración con la adecuada capacidad de retención (Mukherjee & De, 2018). La Organización Mundial de la Salud (OMS) fija en cero (0) unidades formadoras de colonias de *E. coli* por 100 mL de agua (0 UFC/100 mL) como valor máximo permitido en agua para consumo humano (Otekpó, 2020). Otros parámetros importantes en las membranas utilizadas para el tratamiento de agua son la estabilidad térmica a temperaturas mayores de 90 °C (Mänttari et al., 2002), poseer buenas propiedades mecánicas (Bassyouni et al., 2019) y presentar estabilidad química durante su operación (Ricci et al., 2017).

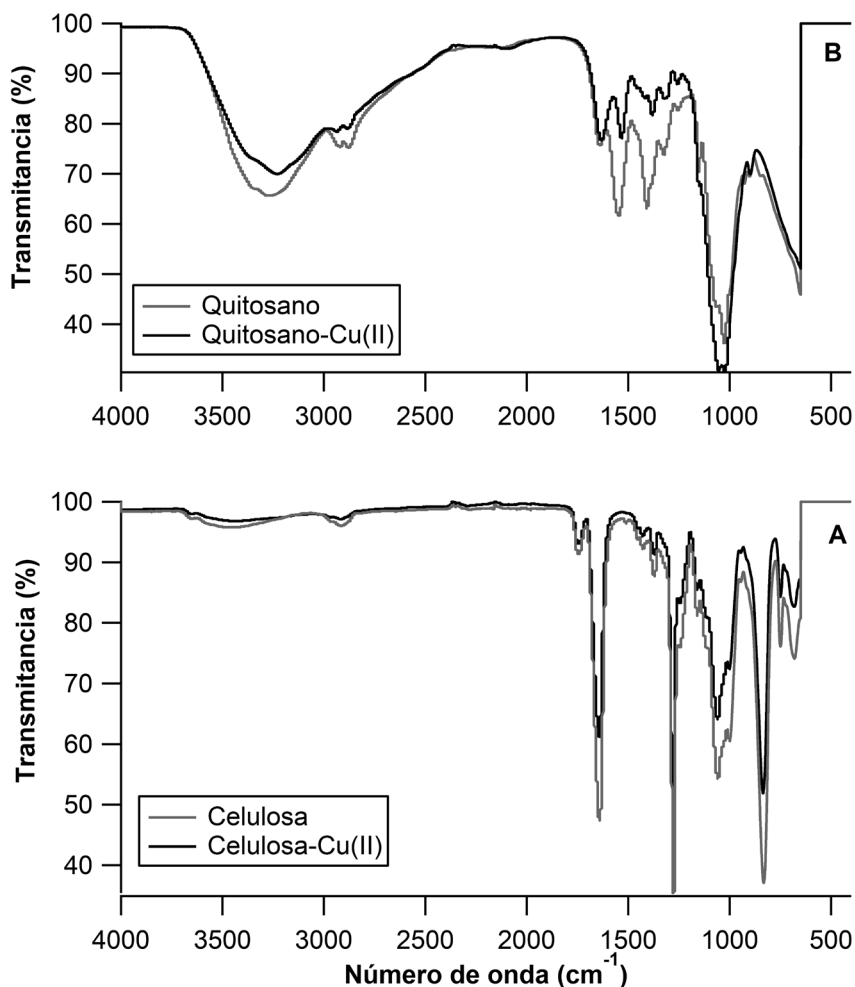
## Caracterización de la membrana

### Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

El espectro en infrarrojo fue obtenido para todas las muestras con el objetivo de evaluar el efecto de la incorporación de Cu(II) en la estructura química de las membranas. La Figura 1A exhibe el espectro de la membrana de celulosa, el cual presenta las bandas características asociadas a este biopolímero. El agua

**Figura 1**

*FTIR de las membranas*



*Nota.* A representa a las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II). B representa las membranas de quitosano y quitosano-Cu(II).

contenida en la membrana se observa a  $3470\text{ cm}^{-1}$  inducido por el grupo O-H. Adicionalmente, se encuentran los picos característicos al grupo C=O y C-H a  $1740$ ,  $2920\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Finalmente, se encuentran los picos característicos que corresponden a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos C-O y C-O-C a  $1151-897\text{ cm}^{-1}$ . La membrana de celulosa-Cu(II) exhibe los mismos picos que la membrana de celulosa; sin embargo, presenta algunas diferencias, específicamente en la intensidad y forma de los picos a  $2994$  y el rango  $1151-897\text{ cm}^{-1}$ . La Figura 1B muestra el espectro para las membranas quitosano y quitosano-Cu(II). Esta membrana muestra seis picos característicos del quitosano; el primero es un pico ancho que corresponde al grupo O-H a  $3260\text{ cm}^{-1}$  que se sobrepone sobre al pico correspondiente al grupo N-H a  $3328\text{ cm}^{-1}$ . Seguidamente, se encuentran el pico correspondiente al grupo C-H a  $2872\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente, existen tres grupos amida que se identificaron a  $1644\text{ cm}^{-1}$ ,  $1569\text{ cm}^{-1}$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del grupo C=O (amida I), a la flexión del grupo N-H (amida II) y al estiramiento del grupo C-N, respectivamente. Finalmente, se encuentran los picos característicos que corresponden a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los grupos C-O y C-O-C a  $1151-897\text{ cm}^{-1}$ . La adición de Cu(II) cambia el espectro de la membrana de quitosano. Este catión modifica el número de onda de los picos característicos de la flexión del grupo N-H (amida II) y al estiramiento del grupo C-N (amida III) ( $1569\text{ cm}^{-1}$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$ ). Además, aparece un pico adicio-

nal en la región  $1151-897\text{ cm}^{-1}$  (grupos C-O y C-O-C). La Tabla 1 muestra los cambios en las bandas características de las membranas.

### Propiedades de equilibrio: absorción de agua

La Figura 2A muestra el porcentaje de absorción de agua en función del tiempo. Estos resultados muestran que las membranas alcanzan el equilibrio luego de sumergirlas 20 minutos en agua. Las membranas de quitosano, celulosa y celulosa-Cu(II) no mostraron una diferencia significativa en la cantidad absorbida de agua, alcanzando un máximo de absorción de 620%. La membrana de quitosano-Cu(II) exhibió la mayor reducción en la cantidad absorbida de agua a los 40 min (Figura 2B). La incorporación del catión a la membrana de quitosano redujo un 91% su capacidad de absorber agua.

### Proceso de degradación

El proceso de degradación de las membranas se obtuvo por medio de un análisis termogravimétrico. La Figura 3 muestra el proceso de degradación de las membranas de antes y después de entrecruzarse con cobre. Estos resultados muestran que la membrana de celulosa posee tres etapas de degradación (Figura 3A). La primera ocurrió a los  $200\text{ °C}$  con una pérdida en peso de 84%. La segunda etapa de degradación se presentó en el rango de temperatura de  $200-400\text{ °C}$  con

**Tabla 1**

*Número de onda de los grupos funcionales en las membranas*

Membrana	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) por grupo funcional						Efecto en intensidad
	O-H	C-H	C=O	C-O / C-O-C	N-H (II)	C-N	
Celulosa	3470	2920	1740	1151-897	Abs	Abs	N/A
Celulosa-Cu(II)	3410	2920	1740	1151-897	Abs	Abs	Reducción
Quitosano	3260	2872	1644	1151-897	1569	1400	N/A
Quitosano-Cu(II)	3220	2872	1630	1151-897** 1060*	1520	1370	Reducción

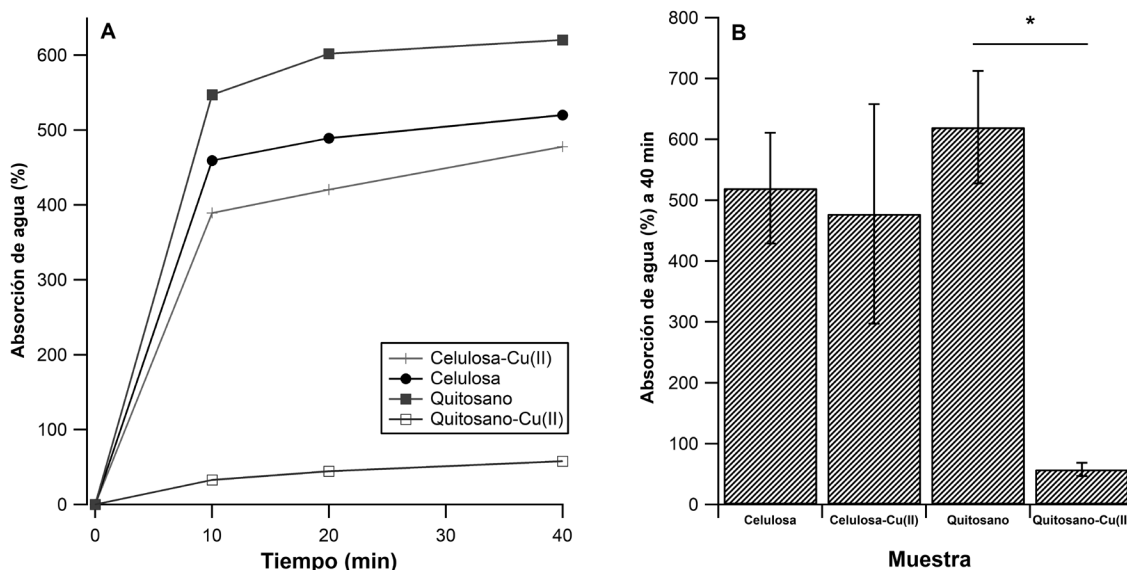
*Nota.* Abs significa la ausencia del grupo funcional en la membrana. Reducción se refiere a la reducción de la intensidad respecto a la membrana sin Cu(II). \*Pico adicional en la región de  $1151-897$ . \*\*La región de  $1151-897$  mostró un aumento de intensidad respecto a la membrana sin Cu(II).

una pérdida de peso adicional del 8%. La última etapa de degradación ocurrió 400-550 °C con una pérdida de peso adicional del 3% siendo el 5% el contenido de ceniza de la membrana. La incorporación del catión a la membrana modificó el patrón de degradación: presentó dos etapas degradación y aumentó la cantidad de ceniza. La membrana de celulosa-Cu(II) presentó su primera etapa de degradación a los 200 °C; sin embargo, la pérdida por peso se redujo un 8.6% en comparación con la membrana de celulosa. La segunda etapa de degradación se produjo en el rango de temperatura de 200-600 °C con una pérdida de peso adicional del 14%. El contenido de ceniza aumentó de 5% a un 12% respecto a la membrana sin cobre. La Figura 3B muestra el comportamiento la absorción de calor de la muestra en función de la temperatura. A 200 °C se presenta un pico exotérmico para ambas membranas. La membrana de celulosa presenta un pico adicional a los 515 °C, el cual confirma la temperatura a la cual se produce la mayor rapidez de degradación en 400-550 °C. Sin embargo, la membrana de celulosa-Cu(II) presentó dicha transición a un rango de temperatura menor (350-425 °C), lo cual confirma la segunda etapa de degradación para esta membrana.

La Figura 3C muestra el proceso de degradación de las membranas de quitosano posee tres etapas de degradación. La degradación inicial ocurrió alrededor de 30-130 °C con una pérdida de peso del 10%. La segunda degradación ocurrió en el rango de 130-230 °C donde la máxima degradación fue observada a 175 °C con una pérdida en peso adicional de 11%. La tercera degradación ocurrió en el rango de 240-400 °C, etapa en la que se obtuvo la máxima degradación a los 288 °C con una pérdida en peso de 30%. La muestra se calentó hasta los 600 °C donde obtuvo una pérdida en peso adicional de 13%. El residuo obtenido a partir de esta temperatura fue de 21% el cual se oxidó calentándose bajo una atmósfera de aire donde la cantidad de ceniza obtenida fue del 14.6%. La membrana de quitosano-Cu(II) exhibió un comportamiento diferente a la membrana de quitosano en donde solamente la primera etapa de degradación permaneció en el mismo rango de temperatura (Figura 3C). La segunda etapa de degradación empezó a los 130 °C; sin embargo, al aumentar la temperatura a 200 °C hubo un cambio abrupto en la pérdida en peso de 26%. La tercera etapa se presentó en el rango de 250-400 °C donde la máxima degradación ocurrió a 275 °C con un 18% en pérdida

**Figura 2**

*Absorción de agua en función del tiempo y porcentaje de agua absorbida de las membranas*



*Nota.* El \* representa diferencia significativa entre las muestras ( $p \leq .05$ ). A representa la absorción de agua en función del tiempo y B el agua absorbida a los 40 min.

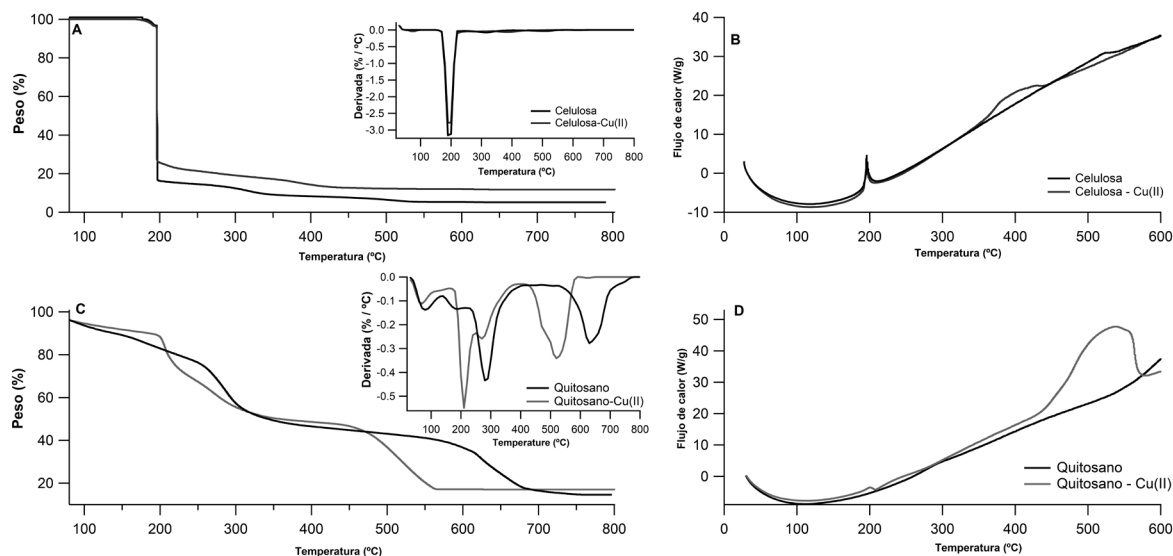
en peso. La adición del catión indujo una cuarta etapa en la degradación de quitosano-Cu(II) que ocurrió en el rango 400-600 °C. Además, la máxima degradación ocurrió a los 515 °C y esta etapa presentó el mayor porcentaje en pérdida de peso (31.5%) en esta membrana. Adicionalmente, el contenido de ceniza incrementó a 16.44% en comparación con la membrana sin cobre. La Figura 3D muestra el flujo de calor de las membranas quitosano en función de la temperatura. La muestra de quitosano presenta solamente el pico exotérmico del proceso de oxidación con aire a los 650 °C; sin embargo, la membrana con cobre muestra la transición térmica a los 515 °C que confirma la presencia de la cuarta etapa de degradación de esta membrana. La primera derivada del proceso de degradación se encuentra en la Figura 3A y 3C para las membranas de celulosa y quitosano, respectivamente. Estas gráficas confirman las temperaturas en donde se producen las etapas de degradación mencionadas anteriormente.

## Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de la membrana se obtuvieron por medio del DMA en modo de tensión y de esfuerzo cortante. El módulo complejo ( $E^*$ ) en modo tensión de la membrana de celulosa a 30 °C fue de  $39.74 \pm 1.90$  MPa; sin embargo, la incorporación de Cu(II) a la membrana indujo un incremento en el módulo de 190% ( $115.28 \pm 66.33$ ). Adicionalmente, se determinó el módulo  $E^*$  en modo de esfuerzo cortante en función de la temperatura (Figura 4). Estos resultados muestran que el módulo  $E^*$  decrece linealmente en función de la temperatura para ambas muestras. Sin embargo, el módulo de la membrana celulosa-Cu(II) fue 33.60% mayor que la membrana de celulosa (1.22 MPa) a 30 °C. A temperaturas mayores de 90 °C ambas membranas presentaron valores similares en el módulo en modo de esfuerzo cortante.

**Figura 3**

*Proceso de degradación térmica y flujo de calor de las membranas*

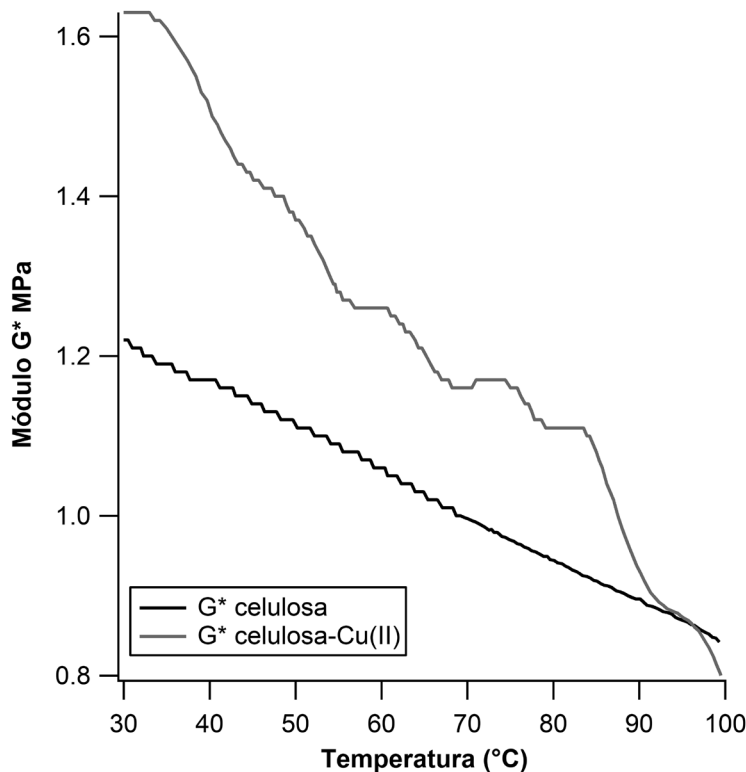


*Nota.* A representa el proceso de degradación y B el flujo de calor de la membrana de celulosa y celulosa-Cu(II). C representa el proceso de degradación y D el flujo de calor de la membrana de quitosano y quitosano-Cu(II)



**Figura 4**

*Propiedades mecánicas de las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II)*



### Análisis superficial

Los cambios en la superficie de la membrana inducidos por la incorporación de Cu(II) en la superficie se observaron por medio de un microscopio óptico Keyence VHX-5000. La Figura 5A y 5B muestra a 500X la superficie de la membrana de celulosa y celulosa-Cu(II), respectivamente. La superficie de la membrana de celulosa presenta una superficie lisa sin una porosidad apreciable; sin embargo, la incorporación del catión a la membrana modificó su superficie. Al incrementar la magnificación del lente a 3000X (Figura 5C) se observó que esta superficie presentaba cambios en su porosidad. Adicionalmente, esta figura muestra posibles cambios en la rugosidad debido a los cambios superficiales visualizados. Estudios adicionales deben realizarse para confirmar estos cambios relacionados a la rugosidad en la muestra. La Figura 6A y 6B muestra la superficie de la membrana de quitosano y quitosano-Cu(II) a 500X, respectivamente. Esta imagen indica que la

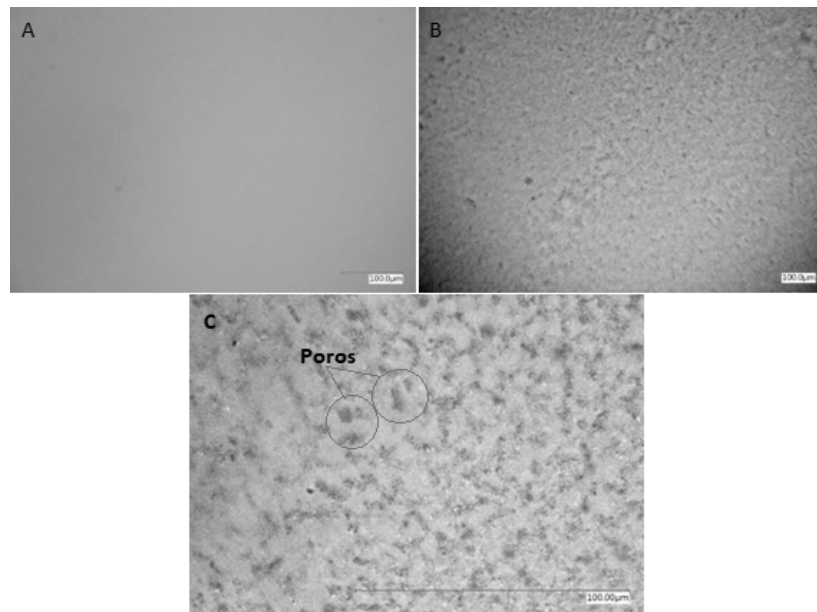
membrana de quitosano presenta una superficie lisa sin una porosidad aparente. La membrana de quitosano-Cu(II) presenta una superficie similar, solamente cambió el color. Un estudio utilizando SAXS podría confirmar el cambio del tamaño del poro inducido por la incorporación del cobre en las membranas. Estudios han utilizado esta técnica para determinar este parámetro en las membranas (Guerrero-Gutiérrez et al., 2017; Pérez-Pérez & Suleiman, 2015; Syed et al., 2018).

### Proceso de filtración de *E. coli* y efecto biocida

La Figura 7A muestra el efecto de las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II) en el proceso de filtración de *E. coli*. Estos resultados presentan la cantidad de UFC en 100 µL de solución madre y en 100 µL del agua filtrada. La membrana celulosa-Cu(II) obtuvo mayor capacidad de filtración de *E. coli* que la

### Figura 5

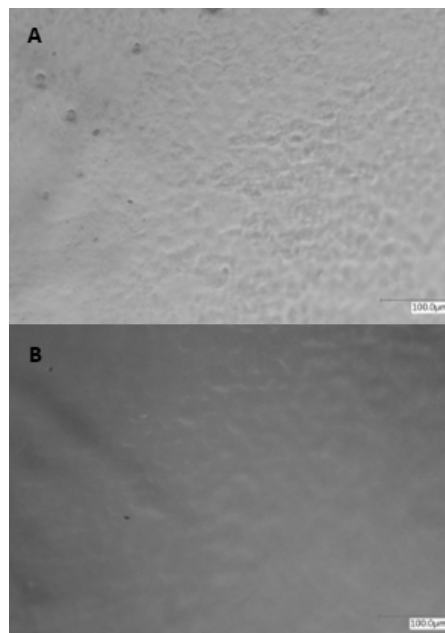
*Imagen de la superficie de las membranas de celulosa*



*Nota.* A representa a la membrana de celulosa a 500X, B a la membrana celulosa-Cu(II) a 500X. C representa la magnificación de la membrana celulosa- Cu(II) a 3000X.

### Figura 6

*Imagen de la superficie de las membranas de quitosano*



*Nota.* A representa la membrana de quitosano a 500 X y B la membrana quitosano-Cu(II) 500X.

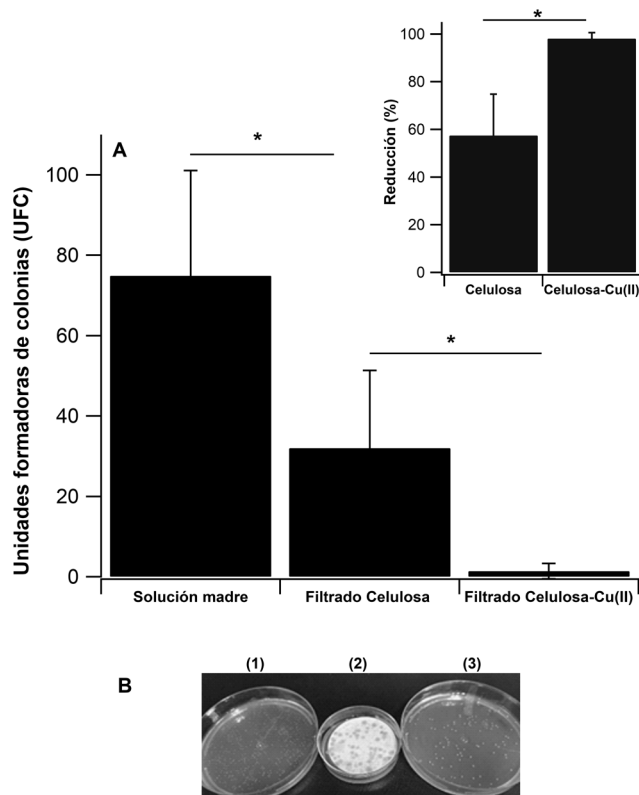
membrana de celulosa. La primera redujo en 98% la cantidad de *E. coli* contenida en el agua, en cambio la membrana de celulosa solo la redujo 57%. Luego del proceso de filtrado, la membrana presentó un recuento de muy numeroso para contar (MNPC) (Figura 7B), lo que indica la presencia de las enterobacterias removidas en ambas membranas.

Los resultados de la capacidad biocida de las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II) se encuentran en la Figura 8. Estos resultados muestran que la membrana de celulosa tiene un efecto biocida al reducir 60% la cantidad de UFC. Sin embargo, la membrana de celulosa-Cu(II) posee un efecto biocida aún mayor al reducir 96% la presencia de UFC de *E. coli*. Estos resultados se compararon sembrando directamente la solución madre sin la membrana, obteniendo como resultado un crecimiento mayor de 574 UFC lo que confirma la capacidad bactericida de ambas membranas de celulosa.

Los resultados del efecto biocida de las membranas de quitosano y quitosano-Cu(II) se encuentran en la Figura 9. Estos resultados muestran que la membrana de quitosano posee un efecto biocida al reducir 80% la cantidad de UFC en el agua. Sin embargo, la membrana de quitosano-Cu(II) posee un efecto biocida aún mayor al reducir 90% la presencia de UFC. Cabe mencionar que el proceso de filtración no se llevó a cabo con las membranas de quitosano ya que al tener la capacidad de absorber 600% de su peso, se rompen al ser colocadas en el dispositivo de filtración. La membrana de quitosano-Cu(II) exhibió un fenómeno interesante ya que no permitió pasar el agua a través de ella utilizando el proceso implementado de filtración al vacío. Se dejó por 24 h en contacto con la solución acuosa con enterobacterias y no hubo filtración. Estudios adicionales podrían analizar diferentes tipos de procesos de filtración para verificar la eficacia en la remoción de la enterobacteria.

**Figura 7**

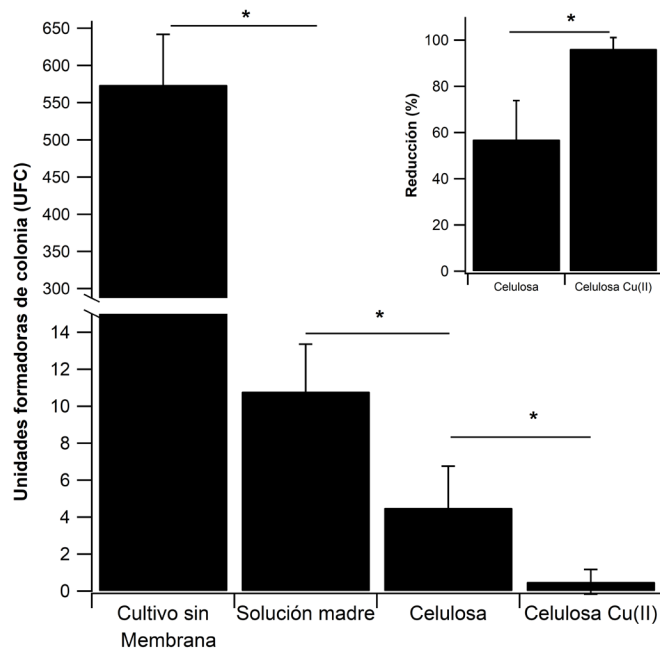
*Efecto de la me membranas de celulosa y celulosa-Cu(II) en el proceso de filtración de E. coli*



*Nota.* El \* representa diferencia significativa entre las muestras ( $p < .05$ ). A representa el efecto de las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II) en el proceso de filtración de *E. coli* y B representa el cultivo de la solución madre (1), membrana (2) y filtrado (3) de la membrana de celulosa.

**Figura 8**

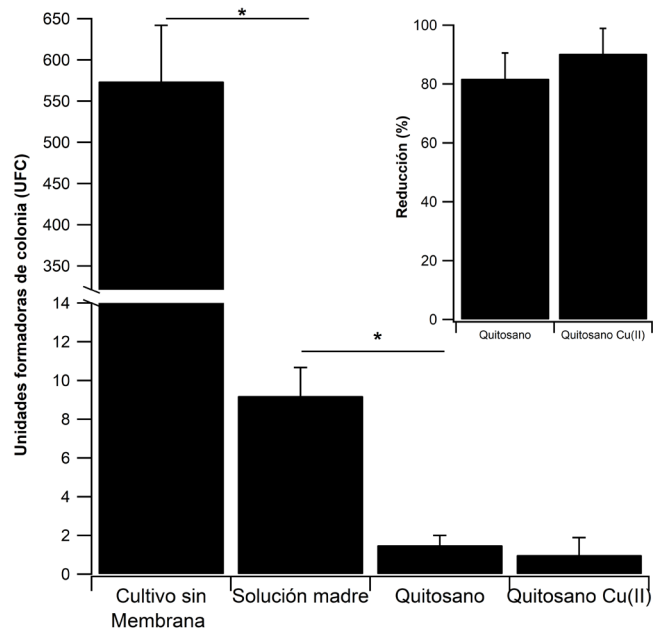
Capacidad biocida de las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II)



Nota. El \* representa diferencia significativa entre las muestras ( $p < .05$ )

**Figura 9**

Capacidad biocida de las membranas de quitosano y quitosano-Cu(II)



Nota. El \* representa diferencia significativa entre las muestras ( $p < .05$ )

## Discusión

Una tendencia emergente en la tecnología de membranas es desarrollar membranas a partir de polímeros naturales/biodegradables que sean sostenibles y al mismo tiempo logre una alta eficiencia de flujo y separación (Castro-Muñoz & González-Valdez, 2019). Las membranas a base de celulosa son ecológicas, de bajo costo y ahorran energía, lo que ofrece el potencial para reemplazar los materiales de membrana tradicionales a base de petroquímicos (Li et al., 2022). Quitosano también es un biopolímero biodegradable de bajo costo, no tóxico, con propiedades antibacterianas y antioxidantes, razones por las cuales se utiliza para el tratamiento de agua (Spoiälă et al., 2021). Las membranas para el tratamiento de agua deben poseer un tamaño de poro de 0.1-10  $\mu\text{m}$  para retener a las bacterias (Wang et al., 2013) ser estables a temperaturas mayores a 90 °C (Mänttäre et al., 2002) y poseer buenas propiedades mecánicas (Bassyouni et al., 2019) con estabilidad química en condiciones extremas de pH (Bargeman, 2021).

### Propiedades químicas, térmicas, mecánicas y ópticas

Se obtuvieron membranas de celulosa y quitosano con cobre para determinar su efecto biocida y su efectividad en eliminar *E. coli* del agua. Además, los resultados se correlacionaron con las propiedades químicas, térmicas y de equilibrio de la membrana. Las propiedades químicas de las membranas de celulosa y quitosano se determinaron por medio de un ATR-FTIR. La membrana de celulosa presentó los picos característicos correspondientes a acetato de celulosa a 3500, 2994, 1744 y en el rango de 1151-897  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los grupos O-H, C-H, C=O y los grupos C-O y C-O-C, respectivamente (Oh et al., 2005; Song et al., 2012). La membrana de quitosano también presentó los grupos característicos a 1644, 1569 y en el rango de 1151-897  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al grupo C=O en la amida, al grupo N-H y a los grupos C-O y C-O-C, respectivamente (Gedam & Dongre, 2015). La incorporación de Cu(II) en la membrana de celulosa modificó la intensidad de la absorbancia y la forma de los picos mencionados anteriormente. En la membrana de quitosano modificó el número de onda de los picos característicos de la flexión del grupo N-H (amida II) y al estiramiento del grupo C-N (amida III) (1569  $\text{cm}^{-1}$

y 1400  $\text{cm}^{-1}$ ). Además, aparece un pico adicional en la región 1151-897  $\text{cm}^{-1}$  (grupos C-O y C-O-C). Esto se debe a que el catión modifica la cantidad absorbida requerida para producir las bandas características de los grupos funcionales (específicamente de los grupos iónicos), lo cual indica cambios en su estructura química y morfología (Pérez-Pérez & Suleiman, 2015). Estos cambios indican que el Cu(II) está ubicado en los grupos funcionales donde la intensidad disminuye o existe un cambio en la posición del número de onda (Gedam & Dongre, 2015).

Las propiedades térmicas de la membrana fueron obtenidas por medio de un análisis termogravimétrico. La membrana de celulosa es una mezcla de acetato de celulosa y nitrocelulosa, donde la primera degradación es atribuida a la degradación de nitrocelulosa (Lin et al., 2010). La segunda y tercera etapa de degradación (200-400 °C y 400-550 °C) corresponde a la degradación del acetato de celulosa (Hong et al., 2020). La incorporación del catión a la membrana modificó su patrón de degradación: solamente presentó dos etapas de degradación y obtuvo un aumento en la cantidad de ceniza. La membrana de quitosano exhibió tres etapas de degradación. La primera ocurrió alrededor de 30-100 °C con una pérdida de peso del 10% que corresponde al agua absorbida en la membrana (Gedam & Dongre, 2015). La segunda degradación (140-240 °C) corresponde a la degradación de la glicerina (Hong et al., 2020). Finalmente, la tercera degradación corresponde a la cadena polimérica del quitosano (Gedam & Dongre, 2015). La incorporación de cobre produjo estabilidad térmica a la membrana a temperaturas menores de 200 °C; sin embargo, hubo mayor degradación de la cadena polimérica del quitosano a una temperatura menor. La Tabla 2 presenta las temperaturas de degradación de las membranas. La adición de cationes provee estabilidad a los grupos iónicos debido al entrecruzamiento con el catión (Avilés-Barreto & Suleiman, 2013; Guerrero-Gutiérrez & Suleiman, 2013), y modifican los patrones de degradación de las cadenas poliméricas (Pérez-Pérez & Suleiman, 2015). Las curvas de flujo de calor se obtuvieron en un TGA/DSC. A pesar de la baja sensibilidad de este equipo para obtener la curva de flujo de calor en comparación con la señal de un equipo específico de DSC, se puede utilizar para identificar efectos térmicos en el proceso de descomposición térmica y termo oxidativa de las muestras (Lebedeva et al., 2021; Schindler et al., 2017). Es por ello, que solamente se empleó esta curva para determinar los puntos en los cuales se produjo una degradación en la muestra. Sin embargo, un estudio adicional utilizando

**Tabla 2***Temperaturas de degradación de las membranas*

Membrana	1. <sup>a</sup> Deg. (°C)	PP (%)	2. <sup>a</sup> Deg. (°C)	PP (%)	3. <sup>a</sup> Deg. (°C)	PP (%)	4. <sup>a</sup> Deg. (°C)	PP (%)	Ceniza (%)
Celulosa	200	84	200-400	8	400-500	3	Aus.	Aus.	5
Celulosa-Cu(II)	200	74	200-600	14	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	12
Quitosano	30-130	10	130-230	11	230-600	43(*)	Aus.	Aus.	14.6
Quitosano-Cu(II)	30-130	8	130-250	26	250-400	18	400-600	31.5	16.4

*Nota.* Deg.: etapa de degradación, PP: pérdida de peso, Aus.: ausente, (\*) al finalizar esta etapa presentó un residuo de 21%

un DSC y DMA podría confirmar las temperaturas en las cuales se produce un cambio en la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la muestra y asociarlo con la estabilidad térmica de la membrana. Los resultados obtenidos con el TGA confirman la interacción del catión con los grupos funcionales identificados con el FTIR y además la interacción de Cu(II) con la glicerina en la membrana de quitosano.

Las propiedades mecánicas fueron determinadas por medio de un medidor dinámico mecánico. El módulo  $E^*$  aumentó con la incorporación del Cu(II) debido a que el catión se entrecruza con grupos iónicos, produciendo un rearrreglo estructural que induce los cambios en sus propiedades mecánicas (Suleiman et al., 2014). Membranas de celulosa han presentado un  $T_g$  cerca de los 200 °C, marcado por un máximo del tan delta en una medición con un DMA (De Freitas et al., 2017; Gutiérrez et al., 2014). Esta investigación solamente determinó las propiedades mecánicas hasta los 100 °C por lo que un estudio adicional, combinado un DSC y DMA a temperaturas cercanas al  $T_g$ , podrían confirmar este parámetro térmico. Finalmente, las propiedades de equilibrio se obtuvieron por medio de la cantidad absorbida de agua. Las membranas de celulosa y celulosa-Cu(II) no mostraron una diferencia significativa en la cantidad absorbida de agua. En cambio las membranas de quitosano sí mostraron diferencia significativa con una reducción del 91% en la cantidad absorbida con la incorporación de Cu(II). Esta propiedad podría estar influenciadas por el arreglo en la morfología debido a la sustitución del catión. Otros estudios muestran comportamientos similares con la incorporación de Cu(II) y otros cationes de diferente número de valencia y radio atómico (Avilés-Barreto

& Suleiman, 2013; Guerrero-Gutiérrez & Suleiman, 2013; Pérez-Pérez & Suleiman, 2015). Además, el entrecruzamiento del catión con los grupos iónicos induce una reducción en la cantidad de agua absorbida (Nakayama et al., 2020). Estos resultados se relacionan con la interacción del catión con los grupos funcionales mostrados con el ATR-FTIR que inducen cambios en el patrón de degradación en las membranas. También se producen cambios en la estructura molecular, en sus propiedades mecánicas y la superficie de la membrana.

### Proceso de filtración y capacidad biocida de las membranas

Las membranas de celulosa entrecruzadas con Cu(II) presentaron un mayor porcentaje de reducción de *E. coli* en el agua. Esto se puede deber a que los grupos funcionales carboxilo e hidroxilo disponibles en la celulosa se entrecruzan con los iones Cu(II) que produce un cambio morfológico induciendo la formación de una red más densa, lo cual provoca un aumento en la capacidad de retención de esta enterobacteria (Emam et al., 2012). Adicionalmente, el Cu(II) presenta actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias (Prado et al., 2012). Aún no está totalmente dilucidado el mecanismo de su acción biocida, pero se postulan tres posibles mecanismos; como son la formación de radicales libres que incrementan el estrés oxidativo y el envejecimiento prematuro, acelerando la muerte celular, la despolarización de la membrana que disminuye su selectividad y por tanto su desequilibrio hídrico-electrolítico y la interacción del cobre con el ADN (Borkow & Gabbay, 2005).

Las membranas de quitosano disminuyeron la cantidad de UFC respecto a la solución madre debido a su actividad antibacteriana y antifúngica (Fei-Liu et al., 2001). El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del quitosano y sus derivados aún se desconoce, pero se ha postulado que las moléculas de quitosano cargadas positivamente interactúan con las membranas celulares microbianas cargadas negativamente, produciendo la fuga de componentes proteicos y otros componentes intracelulares causando una alteración en la permeabilidad celular (Rabea et al., 2003). La membrana de quitosano con cobre incrementó su capacidad biocida lo que puede ser atribuido a los factores descritos anteriormente con la membrana de celulosa-Cu(II).

Se obtuvieron membranas de acetato de celulosa/nitrocelulosa o quitosano que contienen Cu(II) en su superficie. Este catión interactúa con los grupos iónicos de la membrana modificando su estructura química lo que induce cambios en la capacidad de absorción de agua, el patrón de degradación y en sus propiedades mecánicas. Además, el catión modificó la superficie de la membrana observándose un cambio en su superficie, especialmente en la membrana de celulosa. Asimismo, la capacidad de retención y el efecto biocida de las membranas de celulosa aumentó 41% y 36%, respectivamente con la incorporación del catión. La membrana de quitosano aumentó 10% su capacidad biocida luego de la incorporación del cobre. El impacto de este proyecto fue desarrollar una membrana con alta capacidad biocida contra *E. coli*. Además, se desarrollaron membranas que sean utilizadas en procesos convencionales de filtración al vacío y puedan remover enterobacterias dañinas para el ser humano, con el potencial de ser utilizada en comunidades con limitado acceso a agua potable.

### Agradecimientos

Esta investigación fue cofinanciada por DIGI-USAC (2020), proyecto AP8-2020. Adicionalmente, los autores agradecen el apoyo del Material Characterization Center, Edwards Lifesciences, Puerto Rico donde se realizaron las pruebas de FTIR, TGA, DMA y el análisis óptico.

### Contribución de los autores

Coordinación, elaboración y revisión del Documento: E M A Guerrero-Gutiérrez, I Gaitán, K Guerrero.  
Diseño de la recolección de datos o del trabajo en campo: todos los autores.

Recolección o contribución de datos o realización del trabajo de campo: E M A Guerrero-Gutiérrez, I Gaitán.

Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: E M A Guerrero-Gutiérrez.

Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: E M A Guerrero-Gutiérrez, M Abad, K Guerrero.

### Materiales suplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

### Referencias

- Avilés-Barreto, S. L., & Suleiman, D. (2013). Transport properties of sulfonated poly (styrene-isobutylene-styrene) membranes with counter-ion substitution. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(4), 2294-2304. <https://doi.org/10.1002/app.38952>
- Bargeman, G. (2021). Recent developments in the preparation of improved nanofiltration membranes for extreme pH conditions. *Separation and Purification Technology*, 279, Artículo 119725. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119725>
- Bassyouni, M., Abdel-Aziz, M. H., Zoromba, M. S., Abdel-Hamid, S. M. S., & Drioli, E. (2019). A review of polymeric nanocomposite membranes for water purification. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 73, 19-46. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.01.045>
- Borkow, G., & Gabbay, J. (2005). Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*, 12(18), 2163-2175. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101497/>
- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657-3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Castro-Muñoz, R., & González-Valdez, J. (2019). New trends in biopolymer-based membranes for pervaporation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(19), 3584. <https://doi.org/10.3390/molecules24193584>

- Cooper, A., Oldinski, R., Ma, H., Bryers, J. D., & Zhang, M. (2013). Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.114>
- Das, B., & Patra, S. (2017). Antimicrobials: Meeting the challenges of antibiotic resistance through nanotechnology. En *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* (pp. 1-22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00001-9>
- De Freitas, R. R. M., Senna, A. M., & Botaro, V. R. (2017). Influence of degree of substitution on thermal dynamic mechanical and physicochemical properties of cellulose acetate. *Industrial Crops and Products*, 109, 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.062>
- Emam, H. E., Manian, A. P., Široká, B., & Bechtold, T. (2012). Copper inclusion in cellulose using sodium d-gluconate complexes. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1345-1352. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.003>
- Fane, A. G., Wang, R., & Hu, M. X. (2015). Synthetic membranes for water purification: Status and future. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(11), 3368-3386. <https://doi.org/10.1002/anie.201409783>
- Fei-Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z., & De Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324-1335. [https://doi.org/10.1002/10974628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/10974628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)
- Gedam, A. H., & Dongre, R. S. (2015). Adsorption characterization of Pb(ii) ions onto iodate doped chitosan composite: equilibrium and kinetic studies. *RSC Advances*, 5(67), 54188-54201. <https://doi.org/10.1039/C5RA09899H>
- Geng, X., Kwon, O. H., & Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26(27), 5427-5432. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.066>
- Guerrero-Gutiérrez, E. M. A., Pérez-Pérez, M., Newbloom, G. M., Pozzo, L. D., & Suleiman, D. (2017). Effect of block composition on the morphology and transport properties of sulfonated fluoroblock copolymer blend membranes. *Polymer Engineering & Science*, 57(11), 1262-1272. <https://doi.org/10.1002/pen.24508>
- Guerrero-Gutiérrez, E. M. A., Pérez-Pérez, M., & Suleiman, D. (2015). Synthesis and characterization of sulfonated fluorinated block copolymer membranes with different esterified initiators for DMFC applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23), Artículo 42046. <https://doi.org/10.1002/app.42046>
- Guerrero-Gutiérrez, E. M. A., & Suleiman, D. (2013). Supercritical fluid CO<sub>2</sub> processing and counter ion substitution of nafion® membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(1), 73-85. <https://doi.org/10.1002/app.38689>
- Gutiérrez, M. C., De Paoli, M.-A., & Felisberti, M. I. (2014). Cellulose acetate and short curauá fibers biocomposites prepared by large scale processing: Reinforcing and thermal insulating properties. *Industrial Crops and Products*, 52, 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.054>
- Hong, S. H., Cho, Y., & Kang, S. W. (2020). Highly porous and thermally stable cellulose acetate to utilize hydrated glycerin. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 91, 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.07.019>
- Huq, T., Khan, A., Brown, D., Dhayagude, N., He, Z., & Ni, Y. (2022). Sources, production and commercial applications of fungal chitosan: A review. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 7(2), 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.01.002>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and chitosan: Structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 854-866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
- Jarquín, C., Morales, O., McCracken, J. P., Lopez, M. R., Lopez, B., Reyes, L., Gómez, G. A., Bryan, J. P., Peruski, L. F., Parsons, M. B., & Pattabiraman, V. (2022). Burden of Diarrhoeagenic Escherichia coli in Santa Rosa, Guatemala in active health-services surveillance during 2008–2009 and 2014–2015. *Tropical Medicine & International Health*, 27(4), 408-417. <https://doi.org/10.1111/tmi.13735>



- Keshvardoostchokami, M., Majidi, M., Zamani, A., & Liu, B. (2021). A review on the use of chitosan and chitosan derivatives as the bio-adsorbents for the water treatment: Removal of nitrogen-containing pollutants. *Carbohydrate Polymers*, 273, Artículo 118625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118625>
- Lebedeva, N. S., Yurina, E. S., Guseinov, S. S., Gubarev, Y. A., & V'yugin, A. I. (2021). Destruction of chitosan and its complexes with cobalt(II) and copper(II) Tetrasulphophthalocyanines. *Polymers*, 13, Artículo 2781. <https://doi.org/10.3390/polym13162781>
- Li, S., Wang, X., Guo, Y., Hu, J., Lin, S., Tu, Y., Chen, L., Ni, Y., & Huang, L. (2022). Recent advances on cellulose-based nanofiltration membranes and their applications in drinking water purification: A review. *Journal of Cleaner Production*, 333, Artículo 130171. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130171>
- Lin, C.-P., Chang, Y.-M., Gupta, J. P., & Shu, C.-M. (2010). Comparisons of TGA and DSC approaches to evaluate nitrocellulose thermal degradation energy and stabilizer efficiencies. *Process Safety and Environmental Protection*, 88(6), 413-419. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.07.004>
- Madaeni, S. S., Ghaemi, N., & Rajabi, H. (2015). Advances in polymeric membranes for water treatment. En A. Basile, A. Cassano & N. K. Rastogi (Eds.), *Advances in Membrane Technologies for Water Treatment* (pp. 3-41). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-121-4.00001-0>
- Mänttari, M., Pihlajamäki, A., Kaipainen, E., & Nyström, M. (2002). Effect of temperature and membrane pre-treatment by pressure on the filtration properties of nanofiltration membranes. *Desalination*, 145(1), 81-86. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00390-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00390-9)
- Maturin, L., & Peeler, J. T. (2020). BAM Chapter 3: Aerobic Plate Count | FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, Departamento de Epidemiología. (2022). Semana Epidemiológica 12, 2022.
- Mukherjee, M., & De, S. (2018). Antibacterial polymeric membranes: a short review. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4(8), 1078-1104. <https://doi.org/10.1039/C8EW00206A>
- Nakayama, R., Katsumata, K., Niwa, Y., & Namibio, N. (2020). Dependence of water-permeable chitosan membranes on chitosan molecular weight and alkali treatment. In *Membranes* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/membranes10110351>
- Oh, S. Y., Yoo, D. Il, Shin, Y., & Seo, G. (2005). FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, 340(3), 417-428. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.11.027>
- Oteko, L. A. (2020). Demonstration of total coliforms and Escherichia coli in drinking water in the borough of the Plateau, city of Savè in Benin. *World Water Policy*, 6(1), 38-51. <https://doi.org/10.1002/wwp2.12020>
- Pérez-Pérez, M., & Suleiman, D. (2015). Transport properties of sulfonated poly(ether ether ketone) membranes with counter-ion substitution. *Journal of Membrane Science*, 493, 414-427. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.06.017>
- Praveena, S. M., Han, L. S., Than, L. T. L., & Aris, A. Z. (2016). Preparation and characterisation of silver nanoparticle coated on cellulose paper: evaluation of their potential as antibacterial water filter. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(17), 1307-1319. <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1209790>
- Qi, L., Liu, Z., Wang, N., & Hu, Y. (2018). Facile and efficient in situ synthesis of silver nanoparticles on diverse filtration membrane surfaces for antimicrobial performance. *Applied Surface Science*, 456, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.06.066>
- Quaranta, D., Krans, T., Santo, C. E., Elowsky, C. G., Domaille, D. W., Chang, C. J., & Grass, G. (2011). Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 416-426. <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01704-10>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode

- of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Ricci, B. C., Ferreira, C. D., Marques, L. S., Martins, S. S., Reis, B. G., & Amaral, M. C. S. (2017). Assessment of the chemical stability of nanofiltration and reverse osmosis membranes employed in treatment of acid gold mining effluent. *Separation and Purification Technology*, 174, 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.11.007>
- Salles, M. J. C., Zurita, J., Mejía, C., Villegas, M. V., Alvarez, C., Bavestrello, L., Zurita, J. (2013). Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2459-2472. <https://doi.org/10.1017/S095026881300191X>
- Schindler, A., Doedt, M., Gezgin, Ş., Menzel, J., & Schmölzer, S. (2017). Identification of polymers by means of DSC, TG, STA and computer-assisted database search. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 129(2), 833-842. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6208-5>
- Schneider, S. (2005). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala*. <http://www.fao.org/3/i0480s/i0480s04.pdf>
- Shen, S. S., Yang, J. J., Liu, C. X., & Bai, R. B. (2017). Immobilization of copper ions on chitosan/cellulose acetate blend hollow fiber membrane for protein adsorption. *RSC Advances*, 7(17), 10424-10431. <https://doi.org/10.1039/C7RA00148G>
- Song, J., Birbach, N. L., & Hinestroza, J. P. (2012). Deposition of silver nanoparticles on cellulosic fibers via stabilization of carboxymethyl groups. *Cellulose*, 19(2), 411-424. <https://doi.org/10.1007/s10570-011-9647-3>
- Spoială, A., Ilie, C.-I., Ficai, D., Ficai, A., & Andronescu, E. (2021). Chitosan-Based Nanocomposite Polymeric Membranes for Water Purification-A Review. *Materials*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/ma14092091>
- Standard Methods. (2018). 9222 membrane filter technique for members of the coliform group. In *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association. <https://doi.org/doi:10.2105/SMWW.2882.193>
- Suleiman, D., Padovani, A. M., Negrón, A. A., Sloan, J. M., Napadensky, E., & Crawford, D. M. (2014). Mechanical and chemical properties of poly(styrene-isobutylene-styrene) block copolymers: Effect of sulfonation and counter ion substitution. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(11). <https://doi.org/10.1002/app.40344>
- Syed, R., Sen, D., Mani Krishna, K. V., & Ghosh, S. K. (2018). Fabrication of highly ordered nanoporous alumina membranes: Probing microstructures by SAXS, FESEM and AFM. *Microporous and Mesoporous Materials*, 264, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.12.034>
- Szekeres, G. P., Nemeth, Z., Schrantz, K., Nemeth, K., Schabikowski, M., Traber, J., Graule, T. (2018). Copper-Coated cellulose-based water filters for virus retention. *ACS Omega*, 3(1), 446-454. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01496>
- Prado, J. V., Vidal, A. R., & Durán, T. C. (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Revista Médica de Chile*, 140(10), 1325-1332. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872012001000014>
- Wang, R., Guan, S., Sato, A., Wang, X., Wang, Z., Yang, R., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2013). Nanofibrous microfiltration membranes capable of removing bacteria, viruses and heavy metal ions. *Journal of Membrane Science*, 446, 376-382. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.06.020>
- Zhuang, L., Zhi, X., Du, B., & Yuan, S. (2020). Preparation of Elastic and Antibacterial Chitosan-Citric Membranes with High Oxygen Barrier Ability by in Situ Cross-Linking. *ACS Omega*, 5(2), 1086-1097. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03206>