CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
EN ELECTROQUIMICA

# “DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROQUÍMICO *IN OPERANDO* PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO INDUCIDAS POR DAÑO BACTERIANO”

TESIS PRESENTADA POR:

**M.C.I.M. María José Martín Martínez**

DIRIGIDA POR:

**Dra. Beatriz Liliana España Sánchez**

**Dr. Walter Noé Velázquez Arjona**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORADO EN ELECTROQUÍMICA**

**Septiembre , 2025**

# Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica


REALIZADO POR:

M.C.I.M. María José Martín Martínez

DIRIGIDA POR:

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez

CO-DIRIGIDA POR:

Dr. Walter Noé Velázquez Arjona (CIMAV)

# SINODALES

Dr.Gabriel Trejo Córdoba

**Presidente** Firma

Dra.Erika Bustos Bustos

**Secretario** Firma

Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno

**Vocal** Firma

Dra. Martha Cruz Soto

**Vocal** Firma

Dra. Fabiola Hernández Rosas

**Vocal** Firma

## R E S U M E N

El desarrollo de materiales avanzados con propiedades antimicrobianas, como nanomateriales con estructuras metal-orgánicas (MOFs/ZIFs), representa una necesidad crítica frente al creciente problema de la resistencia bacteriana, ya que ofrecen mecanismos de acción alternativos. En el presente trabajo se propone un enfoque innovador basado en la detección electroquímica *in operando* de especies reactivas de oxígeno (ROS), específicamente peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), como marcador del daño inducido en bacterias por materiales derivados de zeolitas imidazólicas (ZIFs). El objetivo central fue establecer un método sensible, selectivo y de monitoreo continuo que permitiera evaluar en tiempo real el estrés oxidativo generado en bacterias durante su interacción con materiales con potencial bactericida. La investigación se estructuró en tres etapas: (1) la síntesis y caracterización de ZIFs, así como su validación como agentes antimicrobianos frente a *E. coli* y *S. aureus* mediante ensayos microbiológicos, fluorescencia, microscopía y RAPD-PCR; (2) la obtención de materiales electrocatalíticos derivados de ZIF-67 calcinado a diferentes temperaturas (500, 600 y 700 °C) y su aplicación como sensores de $H_2O_2$; y (3) el diseño de un sistema electroquímico *in operando* con electrodos modificados con Co–N–C(°T)/N-NTCG (Cobalto-nitrógeno-carbón soportados sobre Nanotubos de Carbono dopados con nitrógeno y grafeno) para monitorear la liberación de $H_2O_2$ , asociado al estrés oxidativo, durante la interacción bacteria-material. Los resultados demostraron que los materiales basados en Co–N–C presentan una alta capacidad electrocatalítica para la reducción de $H_2O_2$, con respuesta estable y reproducible en medios biológicos. La señal electroquímica mostró una evolución coherente con la progresión del daño celular, validada mediante conteo de colonias, análisis de fluorescencia y pérdida de viabilidad. La respuesta fue específica, incluso en presencia de interferentes como bacterias viables sin $H_2O_2$ añadido, lo que refuerza la selectividad del sistema.

Esta tesis establece así una plataforma electroquímica capaz de reflejar el estado fisiológico bacteriano en tiempo real, lo cual no solo contribuye al entendimiento de los mecanismos de acción antimicrobianos, sino que también tiene potencial de aplicación en la evaluación de nuevos materiales, monitoreo ambiental y diagnóstico clínico. El método desarrollado representa un avance significativo en la integración de la electroquímica como herramienta para el estudio dinámico de interacciones biológicas complejas.

## A B S T R A C T

The development of new materials with antimicrobial properties is a critical need in the face of the growing problem of bacterial resistance. In the present work, an innovative approach based on *in operando* electrochemical detection of reactive oxygen species (ROS), specifically hydrogen peroxide ($H_2O_2$), as a marker of bacterial damage induced by materials derived from zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs). The central objective was to establish a sensitive, selective, and continuous monitoring method to evaluate, in real time, the oxidative stress generated in bacteria during their interaction with materials with potential bactericidal activity. The research was structured into three stages: (1) the synthesis and characterization of ZIFs, as well as their validation as antimicrobial agents against *E. coli* and *S. aureus* through microbiological assays, fluorescence analysis, microscopy, and RAPD-PCR; (2) the preparation of electrocatalytic materials derived from ZIF-67 calcined at different temperatures (500, 600, and 700 °C) and their application as $H_2O_2$ sensors; and (3) the design of an *in operando* electrochemical system with electrodes modified with Co–N–C(°T)/N-NTCG (Cobalt-Nitrogen-Carbon supported on Nitrogen-dopped carbon nanotubes and graphene) for monitoring $H_2O_2$ release, associated with oxidative stress, during the bacteria-material interaction. The results demonstrated that Co–N–C-based materials exhibit high electrocatalytic activity for $H_2O_2$ reduction, with a stable and reproducible response in biological media. The electrochemical signal evolved consistently with the progression of cellular damage, as validated by colony counting, fluorescence analysis, and loss of bacterial viability. The response was specific even in the presence of interfering agents such as viable bacteria without added $H_2O_2$, reinforcing the selectivity of the system.

This thesis thus establishes an electrochemical platform capable of reflecting the bacterial physiological state in real time. This not only contributes to a deeper understanding of antimicrobial mechanisms of action but also holds potential applications in the evaluation of new materials, environmental monitoring, and clinical diagnostics. The developed method represents a significant advancement in integrating electrochemistry as a tool for the dynamic study of complex biological interactions.

**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección de la Dra. Beatriz Liliana España Sánchez y la codirección del Dr. Walter Noé Velázquez Arjona a través del proyecto PRONAII-2024-90.**

## IMPACTO SOCIAL DEL PROYECTO DE TESIS

El desarrollo de un sistema electroquímico *in operando* para detectar en tiempo real el estrés oxidativo inducido por materiales tipo ZIFs en bacterias como *Escherichia coli* tiene un impacto social relevante, al ofrecer una herramienta rápida, sensible y de bajo costo para evaluar de manera temprana la eficacia de nuevos agentes antimicrobianos aplicables en superficies. Este proyecto contribuye a la generación de plataformas innovadoras que facilitan el diseño y optimización de nuevos materiales antimicrobianos, con potencial de uso en recubrimientos y dispositivos médicos, fortaleciendo estrategias de prevención de infecciones en hospitales y entornos comunitarios. Al enfocarse en soluciones que permitan reducir la propagación de microorganismos, incluyendo cepas con resistencia bacteriana, el proyecto promueve la implementación de tecnologías sostenibles que vinculan ciencia, salud y bienestar social de manera efectiva.

**AGRADECIMIENTOS**

Quiero comenzar agradeciendo profundamente a mi esposo, Alex, por ser mi compañero en cada paso y en cada nueva aventura. Gracias por tu amor, por tu paciencia infinita y por recordarme siempre de lo que soy capaz, incluso en los momentos en los que yo misma lo dudaba. Gracias por impulsarme a crecer, por sostenerme en los días difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Este camino ha sido más llevadero y más bonito gracias a ti.

A mis padres y a mi hermana, por estar siempre presentes, por confiar en mí sin titubeos y por enseñarme con su ejemplo que la constancia y el cariño abren todas las puertas. Gracias por celebrar conmigo cada triunfo, por apoyarme en cada nueva aventura, decisión e incluso en mis locuras, siempre con paciencia, amor y una sonrisa. Su apoyo incondicional ha sido mi refugio y mi motor, y sin ustedes este camino no tendría el mismo sentido ni la misma alegría.

A mis asesores: al Dr. Walter, por enseñarme que la ciencia y una buena platica pueden ir de la mano, y recordarme que siempre podía contar con él para compartir ambos, por su apoyo constante y su confianza en mí; y a la Dra. Liliana, por mostrarme que en la biología molecular no basta con el conocimiento, sino que también se requieren fe y paciencia.

Al grupo de trabajo NanomatLab, por sus consejos, apoyo y compañerismo durante toda mi formación.

A los amigos que me regaló el doctorado: Karen, Adrián, Elena, Moy, Rebe y Víctor, por acompañarme en este camino, compartiendo consejos, risas y apoyo en cada altibajo.

A mis sinodales y comité evaluador (Dra. Erika, Dr. Gabriel, Dr. Pérez Bueno), quienes me acompañaron a lo largo de estos tres años y medio, por su tiempo, orientación y valiosos consejos. También a quienes se sumaron más adelante (Dr. Jannu, Dra. Martha y Dra. Fabiola), gracias por brindarme su apoyo y por compartir su experiencia en este proceso.

A CIDETEQ, por ser mi casa académica durante estos años, dándome el espacio y las herramientas para crecer en lo profesional y en lo personal. Al SECIHTI por el apoyo otorgado durante mi carrera.

A todos, gracias de corazón por ser parte de este camino.

## Índice de Contenido


*1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN, GENERALIDADES Y FUNDAMENTOS* ____ *19*

**1.1 Introducción** ____ **19**

**1.2 Marco teórico y antecedentes** ____ **21**

**1.2.1 Bacterias y mecanismos de resistencia antimicrobiana** ____ **21**

**1.2.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS) y su papel en el daño bacteriano** ____ **23**

**1.2.3 Materiales tipo ZIF: estructura, propiedades y aplicaciones** ____ **25**

**1.2.4 Técnicas para la evaluación de actividad antimicrobiana** ____ **30**

**1.2.5 Métodos de detección de $H_2O_2$ y otras ROS** ____ **33**

**1.2.6 Aplicación de la electroquímica en la detección de ROS** ____ **35**

**1.2.7 Importancia del análisis *in operando* en sistemas biológicos** ____ **39**

**1.3 Justificación** ____ **41**

**1.4 Hipótesis** ____ **41**

**1.5 Objetivos** ____ **42**

**1.5.1 Objetivo general** ____ **42**

**1.5.2 Objetivos específicos** ____ **42**

*2. CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN* ____ *45*

*2.1 Síntesis de materiales ZIFs* ____ *45*

*2.2 Obtención de materiales Co-N-C derivados del ZIF-67* ____ *47*

*2.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales* ____ *47*

*2.4 Evaluación de la actividad bactericida de los materiales* ____ *49*

*2.4.1 Ensayos de actividad antibacteriana (AA)* ____ *49*

*2.4.2 Espectroscopía y microscopía de fluorescencia* ____ *50*

*2.4.3 Análisis genético por RAPD-PCR* ____ *50*

*2.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)* ____ *52*

*2.5 Evaluación electroquímica* ____ *52*

*2.5.1 Caracterización electroquímica de los electrocatalizadores* ____ *53*

*2.5.2 Análisis electroquímico in operando del estrés oxidativo* ____ *55*

*3. CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS MATERIALES TIPO ZIFs* ____ *59*

*3.1 Caracterización fisicoquímica de los ZIFs* ____ *59*

*3.1.1 Difracción de rayos X (XRD)* ____ *59*

*3.1.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)* ____ *62*

*3.2 Caracterización morfológica de ZIFs* 66
*3.2.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM)* 66
*3.2.2 Área superficial específica mediante BET* 71
*3.2.3 Análisis de composición química mediente espectroscopía Raman* 75
*3.2.4 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)* 76
*3.3 Evaluacion de la actividad antibacteriana* 79
*3.3.1 Ensayos de dilución seriada en agar* 80
*3.3.1.1 E. coli* 80
*3.3.1.2 S. aureus* 84
*3.3.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)* 89
*3.3.3 Evaluación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante fluorescencia.* 90
*3.3.4 Análisis genético por RAPDS PCR* 94
*3.3.5 Validación morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM)* 98
*3.4 Evaluación electroquímica de ZIFs/N-NTCG para detección de $H_2O_2$* 100
*3.4.1 Voltamperometría cíclica (VC)* 100
*3.4.2 Voltamperometria de pulso diferencial (DPV)* 103
*4. CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN Y DESEMPEÑO DE LOS MATERALES Co-N-C* 107
*4.1 Caracterización fisicoquímica* 107
*4.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)* 107
*4.1.2 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)* 110
*4.1.3 Espectroscopía Raman* 113
*4.1.4 Área superficial específica (BET)* 114
*4.2 Evaluación electroquímica para la detección de $H_2O_2$ como marcador de estrés oxidativo* 116
*4.2.1 Comparación de Co–N–C/N-NTCG calcinados (500 - 700°C) en la detección de $H_2O_2$* 117
*4.2.1.1 Voltamperometría cíclica (VC)* 117
*4.2.1.2 Voltamperometría de pulso diferencial (DPV)* 120
*4.2.1.3 Voltamperometría líneal (VL) y cronoamperometría (CA)* 122
*4.2.2 Comparación entre sensores basados en ZIF-67/N-NTCG y en Co–N–C/N-NTCG* 124
*4.2.3 Evaluación de selectividad frente a interferentes* 126
*4.2.3.1 Interferencia por oxígeno molecular ($O_2$)* 126
*4.2.4 Evaluación de la interferencia por presencia bacteriana (E. coli y S. aureus)* 129
*4.2.5 Análisis de la densidad parcial de estados (PDOS).* 131

*5 CAPÍTULO 5. ANÁLISIS IN OPERANDO DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ZIF-67 Y DETECTADO CON Co-N-C(700)/N-NTCG* _____ *135*

*5.1 Validación del sistema: electroquímica, fluorescencia y microbiología*_____ *135*

*6 CAPÍTULO 6. PROPUESTA DEL MECANISMO DE DAÑO BACTERIANO INDUCIDO POR ZIFs.* ____ *140*

*7 CAPITULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS* _____ *144*

*8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*_____ *147*

*ANEXOS* _____ *155*

*Anexo I. Producción cientifica* _____ *155*

*Anexo II. Premios y participación en congresos*_____ *156*

## Índice de Figuras

*Figura 1. Estructura de la pared celular de bacteria Gram negativa, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.* 21
*Figura 2. Representación del estrés oxidativo de E. coli [115].* 23
*Figura 3. Diferentes esquemas propuestos de daño a bacterias por ZIFs empleados como agentes antibacterianos a) interacción de la plata a nanoescala con las células bacterianas [116], b) generación de ROS en ZIF-8 dopado con Cu como agente antibacteriano [117], c) Co-ZIFs generación de daño [17] y d) ZIF-8 daña la membrana bacteriana y aumenta ROS que afectan ADN y proteínas .* 24
*Figura 4. Estructura ZIF-8 a) ángulo de enlace, b) unidad de construcción secundaria compuesta por átomos de Zn coordinados en forma tetraédrica con nitrógeno y los ligandos MeIm como puentes entre átomos de Zn, c) cavidad interna del ZIF-8 (esfera amarilla, 12 Å) y abertura del poro (esfera naranja, 3.4 Å), considerando los radios de van der Waals de los átomos del marco y d) Red tipo sodalita formada por jaulas β cuboctaédricas conectadas, representada mediante líneas topológicas entre átomos de Zn [118] .* 26
*Figura 5. Estructuras de los a) ZIF-67, b) ZIF-8, c) ZIF-9, d) ZIF-7 y e) ZIF-L [119], [120], [121].* 27
*Figura 6. Métodos tradicionales para la evaluación de la actividad antibacteriana [122].* 31
*Figura 7. Métodos de biología molecular de evaluación de actividad antibacteriana a) PCR [123], b) Fluorescencia imagen tomada de BioRender y c) SEM.* 32
*Figura 8. Métodos de detección de $H_2O_2$, a) colorimetría[124], b) fluorescencia [60], c) quimioluminiscencia y d) electroquímica[125].* 34
*Figura 9. Diferentes tipos de materiales estudiados en la detección electroquímica de $H_2O_2$, NPs:nanopartículas, MIPs: polimeros de impresión molecular, PANI:polianilina, PEDOT:PSS: Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) y PPy:polipirrol, imagen creada a partir de BioRender.* 36
*Figura 10. Esquema de un análisis in operando electroquímico, elaboración propia de una plantilla de BioRender.* 40
*Figura 11. Esquema del proceso de extracción de ADN, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.* 51
*Figura 12. Esquema de proceso in operando de la detección de estrés oxidativo a partir de la reducción de $H_2O_2$, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.* 56
*Figura 13. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-8 y ZIF-67* 60
*Figura 14. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-9 y ZIF-7.* 61
*Figura 15. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-L y ZIF-L-Co.* 62
*Figura 16. Espectros FT-IR de ZIF-67 y ZIF-8.* 63
*Figura 17. Espectroscopía de FT-IR de ZIF-7 y ZIF-9.* 64
*Figura 18. Espectroscopía FT-IR del ZIF-L y ZIF-L-Co.* 65
*Figura 19. Micrografía del a)ZIF-67 y b)ZIF-8.* 68
*Figura 20. Micrografía SEM a) ZIF-9 y b)ZIF-7.* 70
*Figura 21. Micrografía SEM del a)ZIF-L-Co y b)ZIF-L* 71
*Figura 22. Isotérmas de adsorción de $N_2$ del a)ZIF-67, ZIF-L-Co, ZIF-9 y b)ZIF-L-Zn, ZIF-7 y ZIF-8.* 72
*Figura 23. Espectro Raman de los ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co.* 76
*Figura 24. Espectro XPS de los materiales ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co.* 78
*Figura 25. Porcentaje de actividad antibacteriana de a)2MIm y b)BIm frente a E. coli a 3 y 24 h, mostrando la media ± desviación estándar.* 80

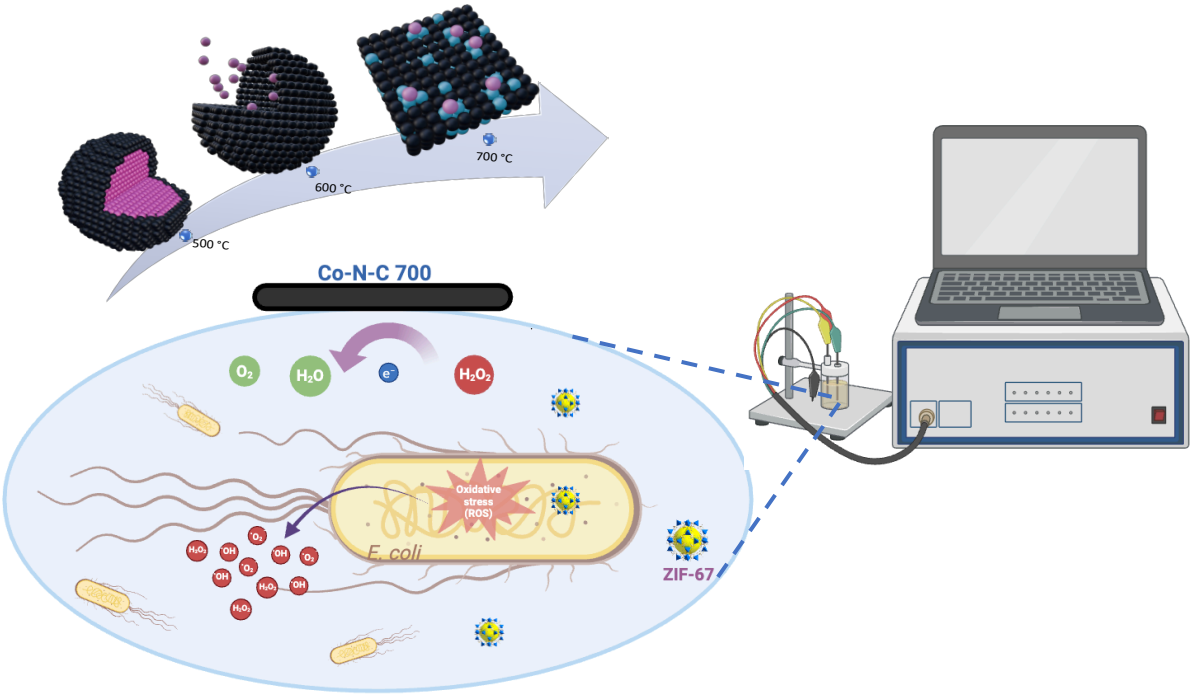
*Figura 26. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Zn-ZIFs: a) ZIF-8, b)ZIF-7 y c)ZIF-L frente a E. coli a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.* _____ *81*
*Figura 27. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Co-ZIFs: a)ZIF-67, b)ZIF-9 y c)ZIF-L-Co frente a E. coli a 3 y 24 h, mostrando la media ± desviación estándar.*_____ *82*
*Figura 28. Procentaje de actividad antibacteriana de a)2MIm y b)BIm frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.* _____ *84*
*Figura 29. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Zn-ZIFs: a)ZIF-8, b)ZIF-7 y ZIF-L frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.* _____ *85*
*Figura 30. Porcentaje de actividad antibacteriana de Co-ZIFs de a)ZIF-67, b)ZIF-9 y c)ZIF-L-Co frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.* _____ *87*
*Figura 31. Espectroscopía de fluorescencia de a)ZIF-9(0.125 mg/mL) b)ZIF-9(0.25 mg/mL), c) ZIF-67 (0.25 mg/mL) y microscopía de fluorescencia d)ZIF-9(0.25 mg/mL), e)ZIF-67(0.25 mg/mL), f) ZIF-9 (0.125 mg/mL) y g)ZIF-67 (0.125 mg/mL).* _____ *92*
*Figura 32. Imagen con la cámara UV del gel de agarosa con las muestras a) E. coli control, b)E. coli/ZIF-67, c) E. coli/ZIF-9 y d) E. coli/ZIF-L-Co. a 1h de exposición* _____ *95*
*Figura 33. Micrografía de a) S. aureus control, b)ZIF-67 + S.aureus, c) ZIF-9 + S.aureus y d) ZIF-L-Co + S. aureus durante 1h..* _____ *99*
*Figura 34. Voltamperometría cíclic, con adiciones de 20-100 ppm de $H_2O_2$, a) ZIF-67, b) ZIF-8, c) ZIF-9, d) ZIF-7, e) ZIF-L-Co y f) ZIF-L con N-NTCG.*_____ *101*
*Figura 35. Voltamperogramas obtenidos por DPV para ZIF-67/N-NTCG y ZIF-8/N-NTCG con incrementos en la concentración de $H_2O_2$.* _____ *104*
*Figura 36. Ánalisis TEM de los materiales derivados del ZIF-67 obtenidos por calcinación a) 500, b) 600 y c) 700 °C a diferentes aumentos. El análisis de perfil en profundidad y las imágenes FFT se generaron a partir de las regiones seleccionadas de cada material* _____ *109*
*Figura 37. Esquema representativo del cambio de forma inducido por el incremente de temperatura de calcinación de 500 a 700 °C.*_____ *110*
*Figura 38. Espectros XPS de alta resolución de los materiales calcinados a 500 °C, 600 °C y 700 °C para los niveles electrónicos: a) Co 2p, b) O 1s y c) N 1s. d) Relación $Co^{2+}/Co^{3+}$ y contenido de vacantes de oxígeno (Ov).* _____ *112*
*Figura 39. Espectros Raman de los materiales derivados de ZIF-67 calcinados a: a) 500, b) 600 y c) 700 °C. d) Tabla con las relaciones $I_D/I_G$, asi como de $n_D$ (densidad de defectos por área).*_____ *114*
*Figura 40. a) Isotermas BET de los materiales derivados del ZIF-67, junto con una b) tabla de área superficial, volumen de poro y tamaño de poro calculados.* _____ *116*
*Figura 41. Voltamperometría cíclica con adiciones de 20–100 ppm de $H_2O_2$: a) Co-N-C (500), b) Co-N-C (600), c) Co-N-C (700) y d) prueba de repetibilidad de Co-N-C (700) con 40 ppm de $H_2O_2$ (± desviación estándar)*_____ *119*
*Figura 42. DPV de los materiales a) Co-N-C(500)/N-NTCG, b) Co-N-C(600)/N-NTCG y c)Co-N-C (700)/N-NTCG con adiciones de 20-100 ppm de $H_2O_2$.* _____ *121*
*Figura 43. a) Voltamperometría lineal con adiciones de $H_2O_2$ con el material Co-N-C (700)/N-NTCG y b)cronoamperometría del Co-N-C (700)/N-NTCG con adiciones de5 µM a 20 mM $H_2O_2$, con tiempo de respuesta.* _____ *123*
*Figura 44. Voltamperometría cíclica de a) Co-N-C(500)/N-NTCG, b)Co-N-C(600)/N-NTCG y c)Co-N-C(700)/N-NTCG con adiciones de $H_2O_2$ y $O_2$.*_____ *128*
*Figura 45. Voltamperometría lineal con adiciones de $H_2O_2$ para el material Co-N-C(700)/N-NTCG con a) S. aureus y b) E. coli.*_____ *130*

*Figura 46. Análisis de la Densidad Parcial de Estados (PDOS) de OOH quimisorbido en las superficies a) Co-4N y b) Co(111),c) energías de enlace calculadas de OOH en superficies catalíticas y estructuras atómicas optimizadas de la especie –OOH adsorbida en diferentes superficies: d) grafito prístino, e) grafito dopado con piridina, f) átomo único de Co–4N y g) superficie Co (111). _____ 132*
*Figura 47. a) Voltamperometría cíclica con E. coli y la medición a tiempo 0, 1.5 h, 2 h y 3 h. b) espectro de fluorescencia para detectar ROS, c) cajas petri con alícuotas en los tiempos determinados y d)comparación de los métodos._____ 137*
*Figura 48. Esquema representativo de la actividad antibacteriana de los ZIFs con cobalto frente a E. coli, donde se muestra la acumulación de iones metálicos, inhibición síntesis de proteínas, estrés oxidativo, daño a la membrana y fragmentación del ADN_____ 142*

## Índice de Tablas

*Tabla 1. Estado del arte de los diferentes ZIFs reportados en la literaura. ..... 29*
*Tabla 2. Estado del arte de los materiales Co-N-C y su detección de $H_2O_2$. ..... 38*
*Tabla 3. Nomenclatura, ligando órganico y métodos de síntesis. ..... 46*
*Tabla 4. Nomenclatura materiales calcinados basados en ZIF-67. ..... 47*
*Tabla 5. Los primers OPA09, OPS11, OPT14, OPS13, OPA11 y OPQ14 [86]y OPE02 [87] corresponden a secuencias RAPD utilizadas para amplificación arbitraria. ..... 52*
*Tabla 6. Área superficial específica BET de los materiales. ..... 74*
*Tabla 7. Concentración minima inhibitoria (CMI) y Concentración mínina bactericida (CMB) de los materiales ZIFs y de los ligandos orgánicos. ..... 90*
*Tabla 8. Distribución de bandas generada por los 7 oligonucleótidos y su respectivo peso molecular. .... 97*
*Tabla 9. Tabla comparativa de los diferentes materiales con las diferentes técnicas. ..... 125*

## RESUMEN GRAFICO



# 1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN, GENERALIDADES Y FUNDAMENTOS

## 1.1 Introducción

La propagación de bacterias multirresistentes ha emergido como una de las amenazas sanitarias más importantes del siglo XXI. Este fenómeno, impulsado por el uso indiscriminado de antibióticos y la rápida capacidad adaptativa de los microorganismos, ha generado una crisis en el tratamiento de infecciones comunes, reduciendo la eficacia terapéutica y elevando los costos clínicos y sociales. En respuesta, la comunidad científica ha intensificado la búsqueda de nuevas estrategias para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, entre las que destacan los nanomateriales con capacidad de inducir daño irreversible a la estructura bacteriana, particularmente el estrés oxidativo bacteriano mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

El mecanismo basado en la producción de ROS, como el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), el radical superóxido ($O_2\bullet^-$) y el radical hidroxilo (•OH), ha demostrado ser efectivo en la inactivación de microorganismos, al dañar componentes esenciales como membranas, proteínas y ADN. Estas especies reactivas provocan un estrés oxidativo intracelular cuando su producción excede la capacidad antioxidante de defensa de las bacterias, la cual depende de enzimas como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Esta sobrecarga de ROS conlleva a la peroxidación de lípidos en la membrana citoplasmática, la oxidación de proteínas estructurales y enzimáticas, así como a rupturas en el ADN bacteriano. Como consecuencia, se interrumpe el transporte de nutrientes, la síntesis de proteínas y la replicación del material genético, comprometiendo la viabilidad celular y conduciendo finalmente a la muerte bacteriana.

No obstante, la evaluación precisa de este tipo de mecanismos requiere herramientas analíticas capaces de monitorear, en tiempo real y en condiciones fisiológicamente relevantes y la generación de ROS en presencia de materiales antimicrobianos. Las técnicas convencionales, como los ensayos colorimétricos o de fluorescencia, aunque útiles, suelen depender de marcadores externos, carecen de especificidad química y no permiten una evaluación dinámica del proceso bactericida.

Ante esta necesidad, surge el desarrollo de métodos electroquímicos como una alternativa potente y versátil para la detección directa y selectiva de ROS, facilitando el

análisis de la actividad antimicrobiana de nuevos materiales en condiciones de relevancia biológica. En particular, la detección de $H_2O_2$ mediante sensores electroquímicos ha cobrado relevancia como estrategia para estudiar el estrés oxidativo inducido en bacterias. Sin embargo, su implementación en medios biológicos complejos, como fluidos corporales o medios de cultivo bacteriano, presenta retos relacionados con la sensibilidad, estabilidad, selectividad y compatibilidad de los materiales empleados como electrocatalizadores.

Con base en estos desafíos, el presente trabajo propone el desarrollo de un método electroquímico *in operando* para la detección de $H_2O_2$ como marcador del estrés oxidativo en *Escherichia coli (E. coli),* en contacto con nanomateriales con capacidad antimicrobiana. El diseño del método se fundamenta en la modificación de electrodos con materiales tipo Co-N-C/ N-NTCG, obtenidos a partir de la calcinación controlada del ZIF-67. Estos materiales se caracterizan por poseer una arquitectura porosa, alta conductividad electrónica, sitios activos bien distribuidos, y propiedades electrocatalíticas que los hacen adecuados para la reducción y oxidación selectiva de $H_2O_2$ a potenciales bajos. El desarrollo del método se complementa con la aplicación de ZIFs como plataformas modelo, con el fin de comparar su capacidad para inducir estrés oxidativo en *E. coli.* Se sintetizaron seis tipos de ZIFs con diferentes ligandos orgánicos (2-metilimidazol y benzimidazol) y se caracterizó su actividad antimicrobiana mediante ensayos de susceptibilidad convencionales (dilución seriada), microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de fluorescencia y análisis moleculares (RAPDs-PCR). La interacción entre estos materiales y las bacterias se monitoreó electroquímicamente mediante la cuantificación directa de $H_2O_2$ en tiempos cortos de contacto, con el objetivo de identificar qué ZIF promueve mayor generación de ROS.

Este enfoque representa un avance metodológico al integrar materiales electrocatalíticos de nueva generación con técnicas analíticas *in situ*, permitiendo evaluar de manera rápida, sensible y sin etiquetas la eficacia de nanomateriales como agentes inductores de estrés oxidativo. A diferencia de los métodos tradicionales, esta estrategia ofrece una visión en tiempo real del mecanismo de acción de los materiales sobre bacterias vivas, aportando información relevante para el diseño racional de nuevos agentes antimicrobianos.

El presente trabajo describe el desarrollo y validación de un sistema electroquímico *in operando* para la detección de estrés oxidativo, utilizando estructuras ZIFs como modelos antimicrobianos experimentales, con el objetivo de probar la sensibilidad y aplicabilidad del método. El uso de materiales derivados de ZIF-67 calcinados y soportados en N-NTCG como plataforma electroquímica, junto con la medición directa de $H_2O_2$ como biomarcador, sienta las bases para una herramienta innovadora en el estudio de nuevos materiales antimicrobianos de próxima generación.

## 1.2 Marco teórico y antecedentes

### 1.2.1 Bacterias y mecanismos de resistencia antimicrobiana

Las bacterias, organismos procariotas ampliamente distribuidos en la naturaleza, han desarrollado mecanismos sofisticados de adaptación a condiciones adversas, incluyendo la exposición a agentes antimicrobianos. Desde el descubrimiento de los antibióticos, su uso excesivo y muchas veces inapropiado ha generado una presión evolutiva que ha favorecido la aparición y propagación de cepas resistentes, lo que hoy en día representa una gran amenaza para la salud pública mundial.

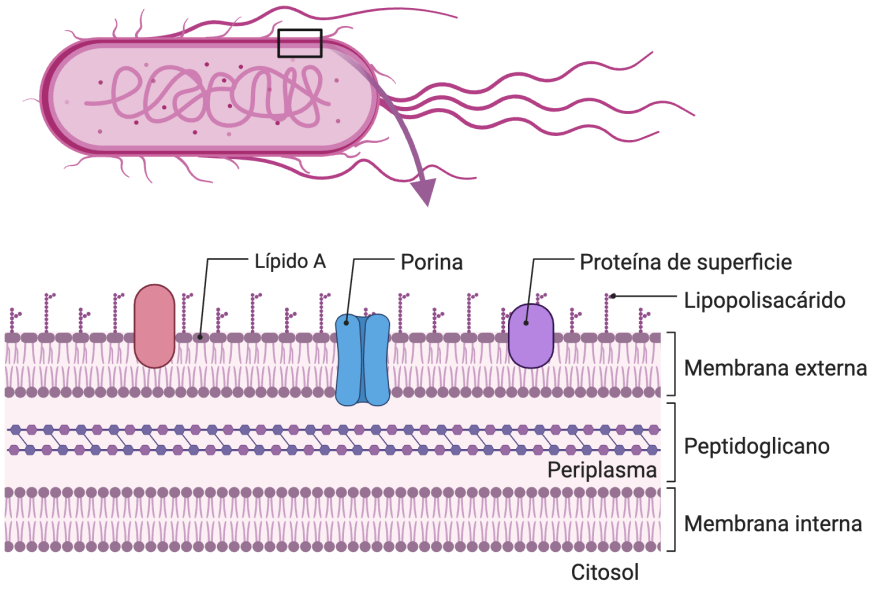



*Figura 1. Estructura de la pared celular de bacteria Gram negativa, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.*

En particular, bacterias Gram negativas como *E. coli* poseen una doble membrana lipídica que actúa como barrera física, además de un sistema de defensa bioquímico altamente eficiente. Esta especie ha sido empleada como modelo en numerosos estudios microbiológicos debido a la caracterización completa de su genoma[1], su facilidad de cultivo y su rápida capacidad de adaptación genética. *E. coli* puede presentar resistencia mediante mecanismos diversos, que incluyen:

- Producción de enzimas inactivadoras, como las β-lactamasas, que degradan antibióticos β-lactámicos antes de que alcancen su blanco [2].
- Modificación del blanco molecular, que impide la unión del antibiótico, como ocurre en mutaciones de las girasas en resistencia a quinolonas [3].
- Alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, reduciendo la entrada de compuestos antimicrobianos mediante la disminución de porinas [4].
- Expulsión activa de antibióticos mediante bombas de flujo como AcrAB-TolC, que contribuyen a la resistencia multidroga [5].
- Formación de biopelículas, que actúan como una barrera física y química que limita la difusión de antibióticos y protege a las bacterias dentro de una matriz polimérica [6].

Además de estos mecanismos específicos, muchas bacterias pueden adquirir genes de resistencia por transferencia horizontal, a través de transformación, transducción o conjugación, lo que acelera la propagación de resistencia entre especies y comunidades microbianas [7]. Ante esta notable capacidad adaptativa, han cobrado relevancia estrategias terapéuticas que no se basen en un blanco molecular único, sino que comprometan múltiples estructuras celulares esenciales de la célula bacteriana de manera simultanéa, de tal forma que los microorganismos no generen capacidad adaptativa. Una de estas estrategias es el uso de materiales capaces de inducir estrés oxidativo, a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales hidroxilos ($^{\bullet}OH$), superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) (Figura 2). Estas especies causan daños estructurales y funcionales a lípidos de membrana, proteínas y ADN, lo cual puede resultar letal incluso para cepas multirresistentes [8], [9].

La susceptibilidad de las bacterias a las ROS depende de su capacidad antioxidante, la cual se basa en sistemas enzimáticos como catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y peroxirredoxinas. Sin embargo, cuando el balance redox intracelular se ve sobrepasado,

se desencadenan procesos como peroxidación lipídica, oxidación de grupos sulfhidrilo en proteínas y ruptura del ADN, eventos que conllevan a la pérdida de viabilidad celular [10], [11].

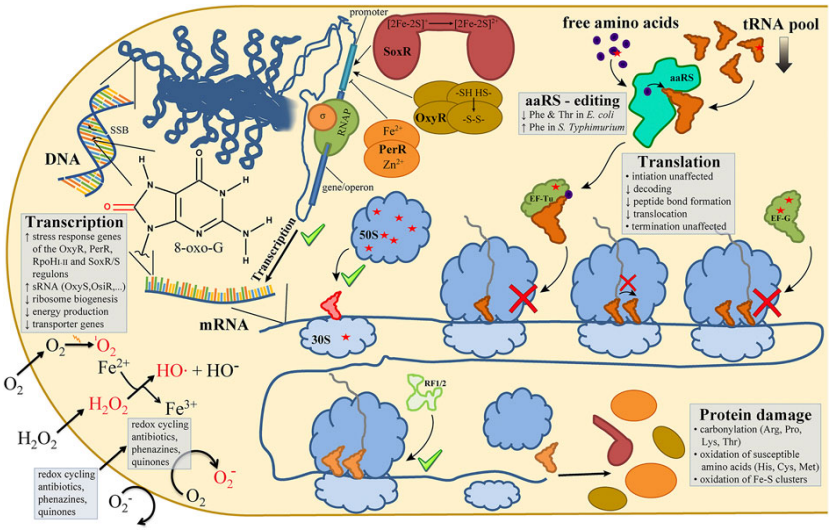



*Figura 2. Representación del estrés oxidativo de E. coli [115].*

En este contexto, materiales que promuevan la generación controlada de ROS, ya sea mediante catálisis redox o liberación de iones metálicos que catalicen reacciones tipo Fenton, se perfilan como alternativas prometedoras para combatir infecciones bacterianas sin inducir resistencia [9]. El estudio de estos mecanismos requiere herramientas complementarias a los métodos microbiológicos clásicos, capaces de cuantificar y caracterizar la generación de ROS y su impacto estructural, bioquímico y electroquímico en la célula bacteriana.

### 1.2.2 Especies reactivas de oxígeno (ROS) y su papel en el daño bacteriano

Las ROS son especies químicamente reactivas derivadas del oxígeno molecular, como el anión superóxido ($O_2$•$^-$), el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) y el radical hidroxilo (•OH). Estas especies participan en procesos fisiológicos como la señalización celular y la respuesta inmunológica, pero cuando su concentración sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, generan un fenómeno conocido como estrés oxidativo. En bacterias, este estrés provoca daños severos en biomoléculas como: peroxidación

lipídica en membranas, oxidación de proteínas y fragmentación del ADN, lo que puede llevar a la pérdida de viabilidad celular y eventualmente a la muerte bacteriana [12], [13].

Diversos estudios han mostrado que materiales basados en metales de transición, como los ZIFs (Zeolitic Imidazolate Frameworks), pueden actuar como generadores de ROS a través de reacciones redox que involucran tanto la superficie del material como la liberación de iones metálicos, como se muestra en la Figura 3. En particular, ZIFs con cobalto ($Co^{2+}$), como ZIF-67 o ZIF-L-Co, inducen de manera eficiente la generación de $H_2O_2$ y otras ROS mediante mecanismos similares a la reacción de Fenton, donde el metal transiciona entre diferentes estados de oxidación y cataliza la descomposición de peróxidos [14], [15].

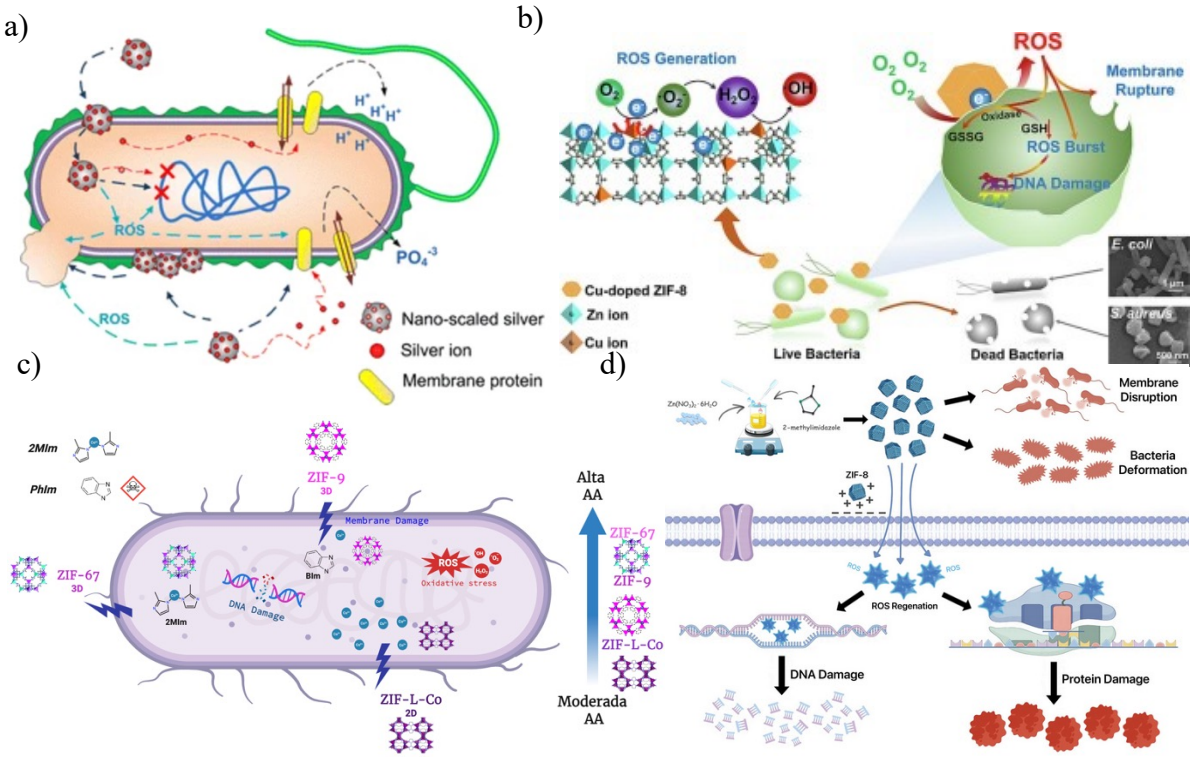



*Figura 3. Diferentes esquemas propuestos de daño a bacterias por ZIFs empleados como agentes antibacterianos a) interacción de la plata a nanoescala con las células bacterianas [116], b) generación de ROS en ZIF-8 dopado con Cu como agente antibacteriano [117], c) Co-ZIFs generación de daño [17] y d) ZIF-8 daña la membrana bacteriana y aumenta ROS que afectan ADN y proteínas .*

Este efecto se ha correlacionado con la capacidad bactericida de los materiales. Por ejemplo, se ha demostrado que la exposición de *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* a ZIFs con $Co^{2+}$ genera un aumento significativo en la producción intracelular

de ROS, lo que conlleva a un daño acumulativo sobre estructuras celulares críticas. Además, la sinergia entre la estructura porosa del ZIF, la exposición superficial del metal y la elección del ligando orgánico puede modular tanto la cinética como la localización de la generación de ROS, potenciando su efecto antimicrobiano [16].

Dada la creciente resistencia a antibióticos convencionales, la generación dirigida de ROS representa una estrategia no convencional, efectiva y difícil de evadir por mutación, lo que convierte a los ZIFs en plataformas prometedoras para el diseño de materiales antimicrobianos de nueva generación. La posibilidad de monitorear electroquímicamente la generación de ROS en tiempo real también permite estudiar el modo de acción de estos materiales y validar su eficacia de manera directa.

El daño inducido por ROS ha sido ampliamente asociado con la eficacia antimicrobiana de diversos materiales, incluidos los ZIFs basados en cobalto. Sin embargo, para validar este mecanismo de acción y establecer su efectividad frente a diferentes cepas bacterianas, es necesario aplicar técnicas experimentales que permitan cuantificar tanto el efecto biológico sobre las bacterias como la generación y acción de las ROS.

Las metodologías empleadas deben ser capaces de diferenciar entre mecanismos bacteriostáticos y bactericidas, así como de relacionar parámetros estructurales y fisicoquímicos del material con su actividad antimicrobiana. En este contexto, el diseño experimental requiere una integración de ensayos microbiológicos clásicos con técnicas avanzadas que permitan evaluar directamente la respuesta celular, el estrés oxidativo y la integridad estructural bacteriana. Esto permite establecer correlaciones entre la presencia de ROS, el daño celular y la eficacia antimicrobiana, proporcionando un entendimiento más profundo del modo de acción de los materiales tipo ZIF.

### 1.2.3 Materiales tipo ZIF: estructura, propiedades y aplicaciones

El incremento de bacterias multirresistentes ha motivado la búsqueda de alternativas terapéuticas que superen las limitaciones de los antibióticos convencionales. En este contexto, los materiales basados en ZIFs han emergido como una alternativa prometedora gracias a su capacidad para liberar iones metálicos con actividad antimicrobiana y generar ROS dentro del microambiente bacteriano [17]. La interacción entre estos materiales y las células bacterianas no solo compromete la integridad

estructural de la membrana celular, sino que también induce procesos oxidativos intracelulares que pueden desencadenar daño irreversible al ADN y a otras macromoléculas esenciales [18]. De esta forma, la eficacia bactericida de los ZIFs está estrechamente relacionada con los mecanismos moleculares de resistencia bacteriana previamente descritos, lo que subraya la importancia de comprender tanto la biología del microorganismo como las propiedades fisicoquímicas del material para diseñar estrategias antimicrobianas más efectivas [19].

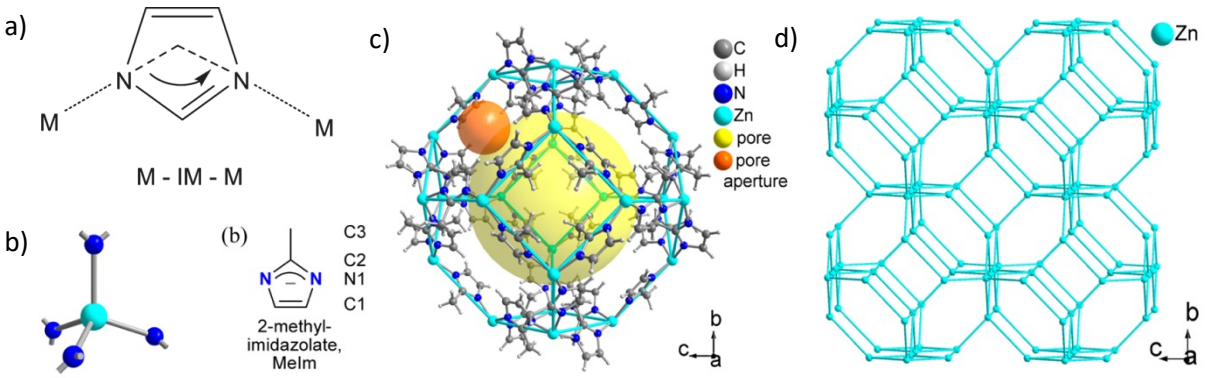



*Figura 4. Estructura ZIF-8 a) ángulo de enlace, b) unidad de construcción secundaria compuesta por átomos de Zn coordinados en forma tetraédrica con nitrógeno y los ligandos MeIm como puentes entre átomos de Zn, c) cavidad interna del ZIF-8 (esfera amarilla, 12 Å) y abertura del poro (esfera naranja, 3.4 Å), considerando los radios de van der Waals de los átomos del marco y d) Red tipo sodalita formada por jaulas β cuboctaédricas conectadas, representada mediante líneas topológicas entre átomos de Zn [118] .*

Los ZIFs constituyen una subclase de los marcos metal-orgánicos (MOFs) que han despertado un creciente interés en diversas áreas científicas debido a su notable estabilidad química y térmica, así como a su versatilidad estructural [20], [21], [22]. Estructuralmente, los ZIFs son polímeros de coordinación que consisten en iones metálicos (como $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$ o $Cu^{2+}$) [14] enlazados mediante ligandos derivados del imidazolato, formando unidades tetraédricas del tipo $MN_4$. Esta disposición confiere a los ZIFs una topología comparable a la de las zeolitas tradicionales, con la ventaja de que su composición puede ser ajustada finamente a través de la elección del metal y del ligando orgánico.

La estructura general de los ZIFs se puede describir como $M(Im)_2$, donde M representa un ion metálico coordinado tetraédricamente y Im corresponde a un anión imidazolato o alguno de sus derivados (Figura 4). Esta red tridimensional genera poros uniformes y

accesibles, lo que les confiere propiedades de materiales cristalinos porosos con un área superficial específica elevada, alta cristalinidad y gran estabilidad térmica, química e hidrotérmica. Estas características han posicionado a los ZIFs como materiales altamente atractivos para aplicaciones en almacenamiento de gases, catálisis, separación de compuestos, sensores químicos, ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos y terapias antimicrobianas [23], [24], [25].

Desde la perspectiva de la biomedicina, los ZIFs han mostrado un potencial considerable como materiales antimicrobianos debido a la presencia de iones metálicos con actividad bactericida, los cuales pueden liberarse controladamente desde la estructura del material. Esta liberación puede inducir deformación y daño en la membrana celular, aumentar la permeabilidad celular, generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y causar la disfunción de componentes intracelulares críticos como el ADN, lo cual culmina en la muerte bacteriana [26], [27].

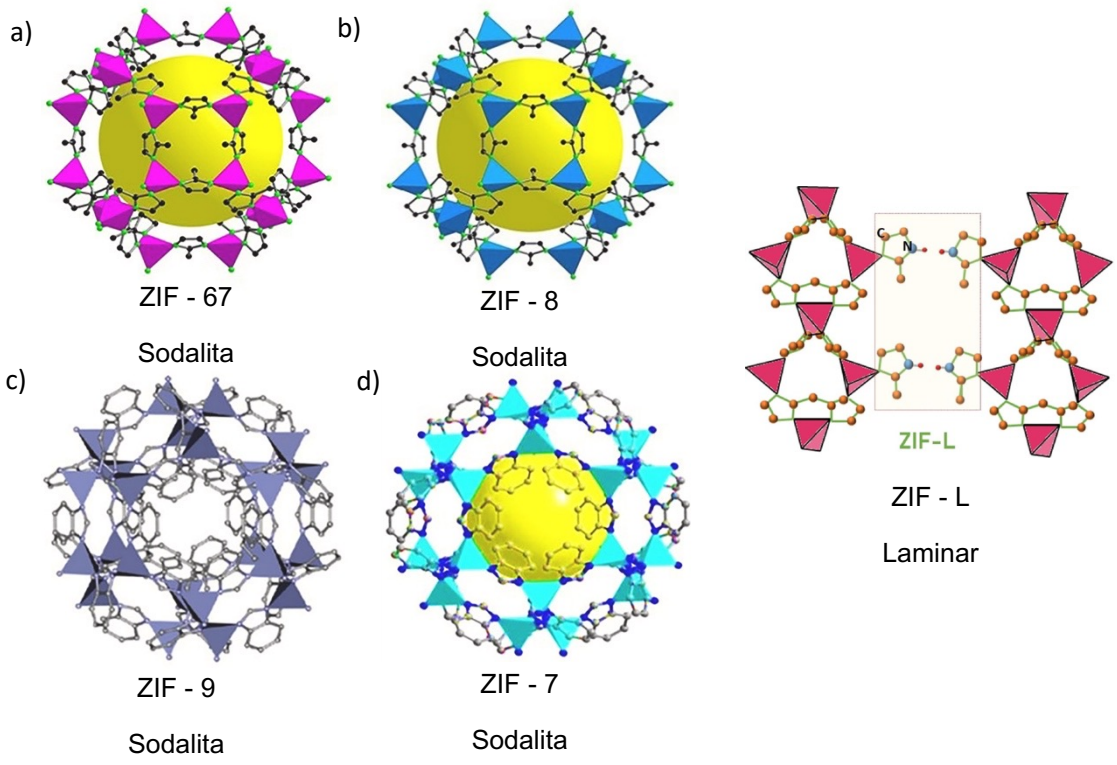



*Figura 5. Estructuras de los a) ZIF-67, b) ZIF-8, c) ZIF-9, d) ZIF-7 y e) ZIF-L [119], [120], [121].*

En particular, los ZIFs basados en cobalto (ZIF-Co) han demostrado una eficacia notable contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, destacando el ZIF-67, sintetizado a partir de 2-metilimidazol (2MIm). Según Demirci et al., estos compuestos presentan un rendimiento antimicrobiano superior atribuido a su área superficial incrementada y a la configuración electrónica del ion $Co^{2+}$ (dos electrones de valencia), lo que favorece el desequilibrio iónico en la célula bacteriana y potencia la generación de ROS[14]. Esta acción bactericida es más marcada frente a bacterias Gram positivas, debido a diferencias estructurales en la pared celular [28], [29].

Además de los ZIFs tradicionales como ZIF-8 (Zn-2MIm) o ZIF-67 (Co-2MIm), se han desarrollado estructuras con diferentes ligandos, como el benzimidazol (BIm), el cual contiene grupos funcionales amino que podrían facilitar interacciones adicionales con componentes celulares. En este contexto, el ZIF-9 (Co-BIm) [30] representa una variante prometedora cuya posible mejora en la eficacia antimicrobiana aún no ha sido explorada en profundidad (Figura 5). La incorporación de estos grupos funcionales podría potenciar la liberación iónica o favorecer la interacción directa con biomoléculas, lo que justificaría su estudio como material antimicrobiano alternativo.

Aunque las nanopartículas de cobalto metálico han demostrado actividad bactericida relacionada con su morfología, tamaño y concentración (por ejemplo, 100 µg/mL frente a patógenos multirresistentes) [31], se conoce relativamente poco acerca del comportamiento antimicrobiano de ZIFs con $Co^{2+}$ como centro metálico cuando se encuentra protegido por diferentes ligandos orgánicos. Este aspecto es particularmente relevante, ya que se ha planteado que la combinación de metales e imidazolatos en una sola arquitectura supramolecular podría generar un efecto sinérgico que supere la actividad de sus componentes por separado [28], además de controlar su velocidad de liberación.

En suma, la capacidad de los ZIFs para modular sus propiedades estructurales y funcionales los consolida como una plataforma estratégica y altamente prometedora en el diseño de nuevas soluciones antibacterianas. La tabla 1 resume las principales estructuras de ZIFs reportadas, las cuales son consideradas por su potencial antimicrobiano.

*Tabla 1. Estado del arte de los diferentes ZIFs reportados en la literaura.*

| Material | Bacteria | Prueba experimental | Actividad antibacteriana | Adicional | | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **ZIF-67** | *A. baumnannii*<br>*S. aureus*<br>*P. aeruginosa* | Método de difusión en disco | 10 y 50 mg/mL Halos visibles de inhibición<br>700 µg/mL 65% | Nula o baja citotoxicidad en células de mamífero | - | [32] |
| **ZIF-Co(II)** | *1 × 10⁸ CFU/mL*<br>*P. aeruginosa*<br>*S. aureus*<br>*C. albicans* | Micro-dilución y método de difusión en disco | - | CMI:<br>0.125 mg/mL<br>0.25 mg/mL<br>1.0 mg/mL | CMB:<br>0.25 mg/mL<br>1.0 mg/mL<br>5.0 mg/mL | [14] |
| **ZIF-67@SA** | *E. coli*<br>*3x10⁵ CFU/mL* | Método de difusión en disco | 0.05 wt% → 99.5% | Estabilidad de la funcionalidad antibacteriana después de cinco ciclos de lavado. | - | [33] |
| **PTA@ZIF-67**<br><br>**PMA@ZIF-67** | *E. coli*<br>*S. aureus*<br>*E. coli*<br>*S. aureus* | Método de difusión en disco<br>1 mg/mL | 84.6%<br>98.8%<br>69.2%<br>97.8% | - | - | [29] |
| **BBH@ZIF-8@ZIF-67**<br>**ZIF-8**<br>**ZIF-67**<br>**ZIF-8@ZIF-67** | *S. aureus*<br>*1x10⁵ CFU/mL* | Método de conteo de colonias<br>12 µg/mL<br>8h | 99%<br>67%<br>73%<br>79% | Liberación de fármaco<br>Biocompatibilidad in vitro | - | [18] |
| **ZIF-67,**<br>**Co-SIM-1**<br>**AgTAZ** | *P. putida*<br>*E. coli.* | Método de difusión en disco<br>5 mg/L<br>10 mg/L | 70% | - | - | [25] |
| **ZIF-4**<br>**ZIF-7**<br>**ZIF-8** | *S. aureus*<br>*E. coli* | Método de difusión en disco<br>20000 mg/mL | 16 mm<br>15 mm<br>20 mm | - | - | [20] |
| **NCDs@ZIF-L**<br><br>**2D ZIF-L** | *E. coli*<br>*S. aureus*<br>*E. coli* | 0.25 mg/mL | 95%<br>85% | CMI: 10 mg/mL<br><br>2.5 mg/mL | - | [34] |
| **Cu@ZIF-L@Cotton** | *E. coli*<br>*S. aureus* | Método de difusión en disco, *1x10⁵ CFU/mL* | 99%<br>99% | - | - | [35] |
| **ZIF-L**<br><br><br>**ZIF-L/epoxy** | *E. coli*<br>*B. subtilis*<br>*1X10³ CFU/mL y 1X10⁴ CFU/mL* | Método de difusión en disco<br>Método de conteo de colonias | 26.96% (0.5 h), 50.40% (1 h), 86.14% (2 h) and 100% (4 h)<br>90.2% | CMI: 0.5 mg/mL | - | [36] |
| **ZIF-67**<br>**ZIF-L-Co**<br>**ZIF-9** | *E. coli*<br>*S. aureus*<br>*1x10⁸ CFU/mL* | Método de conteo de colonias<br>250 µg/mL<br>3 h | *E.coli* *S. aureus*<br>99%. 99%<br>99%. 99%<br>96%. 94% | CMI: (*E. coli*)<br>125 µg/mL<br>125 µg/m<br>250 µg/mL | CMB:(*E. coli*)<br>500 µg/mL<br>125. µg/mL<br>250 µg/mL | Este trabajo |

La estructura única y la composición química de los ZIFs no solo les otorgan propiedades estructurales excepcionales, como alta porosidad y estabilidad, sino que también influyen directamente en su funcionalidad biológica, particularmente en su capacidad para

generar ROS. La presencia de metales de transición como el $Co^{2+}$ dentro de la red cristalina permite interacciones redox que pueden facilitar la formación de ROS en condiciones biológicas, especialmente en medios acuosos o ligeramente ácidos. Este fenómeno convierte a los ZIFs en plataformas atractivas para aplicaciones antimicrobianas, ya que el estrés oxidativo inducido por ROS se ha identificado como uno de los mecanismos fundamentales en la inactivación bacteriana. Así, comprender la relación entre la estructura de los ZIFs, su composición metálica y su capacidad para inducir especies reactivas resulta esencial para optimizar su desempeño como agentes antimicrobianos avanzados.

### 1.2.4 Técnicas para la evaluación de actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana es esencial para determinar la eficacia de nuevos materiales, como los ZIFs, en la inhibición del crecimiento bacteriano. Estos estudios permiten correlacionar propiedades estructurales y químicas con la capacidad de los materiales para inducir daño celular, lo que resulta especialmente relevante en el contexto de estrategias que involucran mecanismos de estrés oxidativo.

Las técnicas tradicionales empleadas para evaluar la actividad antimicrobiana incluyen métodos de difusión en agar, como el método de Kirby-Bauer, y métodos de dilución en caldo o agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) [37]. Estos ensayos cuantifican el efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, pero no necesariamente distinguen entre mecanismos bacteriostáticos y bactericidas, como se muestra en la Figura 6.

El análisis del crecimiento bacteriano en presencia de los materiales mediante curvas de crecimiento (medición de absorbancia a 600 nm) proporciona información cinética sobre el efecto del agente en distintas fases del crecimiento microbiano, permitiendo inferencias más detalladas sobre su modo de acción [38]. Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido (SEM) permite observar directamente los efectos morfológicos que los materiales ejercen sobre la célula bacteriana, como la ruptura de membrana, deformación o colapso estructural, proporcionando evidencia visual del daño celular inducido [39].

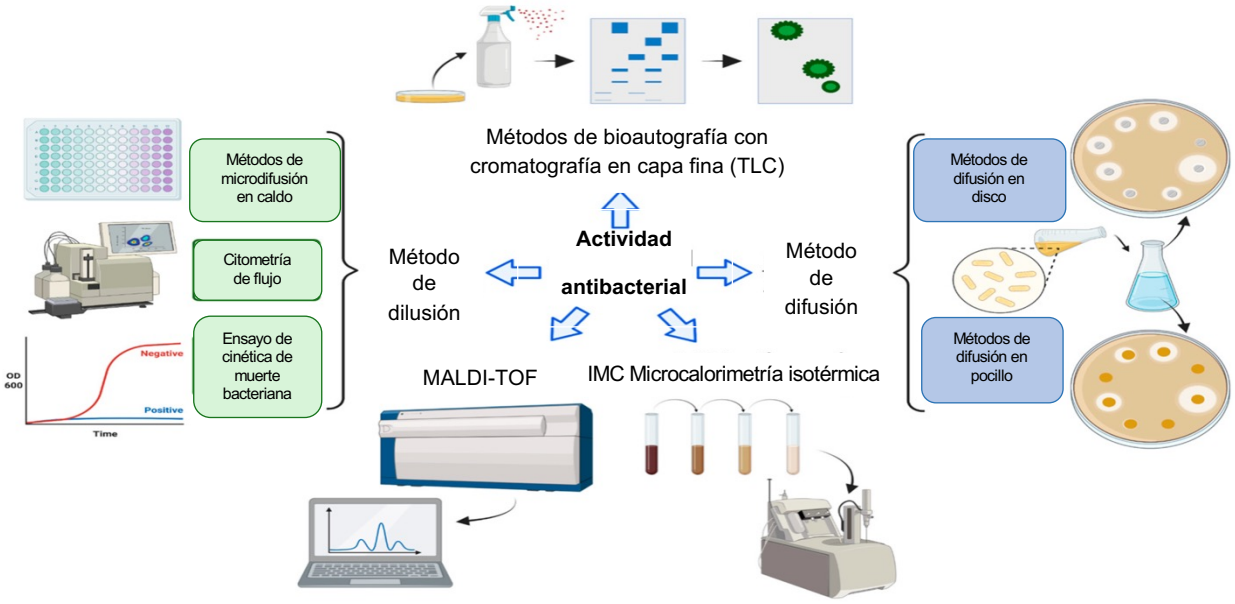



*Figura 6. Métodos tradicionales para la evaluación de la actividad antibacteriana [122].*

Para estudios más específicos relacionados con la evaluación de alteraciones en el ADN genómico de bacterias expuestas a materiales generadores de ROS, se han utilizado técnicas como la PCR-RAPDs (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar). Aunque esta técnica no permite identificar mutaciones puntuales específicas, resulta útil para detectar cambios en los patrones de amplificación del ADN que pueden estar asociados a daños o modificaciones en el material genético inducidos por el estrés oxidativo [40]. De este modo, la PCR-RAPDs se emplea como herramienta complementaria para establecer correlaciones entre la exposición bacteriana a materiales generadores de estrés oxidativo y la presencia de alteraciones en la integridad genómica.

Asimismo, la tinción diferencial con colorantes fluorescentes (como el verde de SYTO 9 y el ioduro de propidio) en combinación con microscopía de fluorescencia permite diferenciar entre células vivas e inactivadas, lo que contribuye a confirmar la viabilidad bacteriana tras el tratamiento, Figura 7 [41].

Finalmente, la evaluación cuantitativa de ROS intracelular generada por los materiales puede realizarse mediante sondas fluorescentes como el DCFH-DA (2′,7′-diclorodihidrofluoresceína diacetato), que al ser oxidado por ROS emite fluorescencia, lo que permite estimar niveles relativos de estrés oxidativo generado por el tratamiento [42].

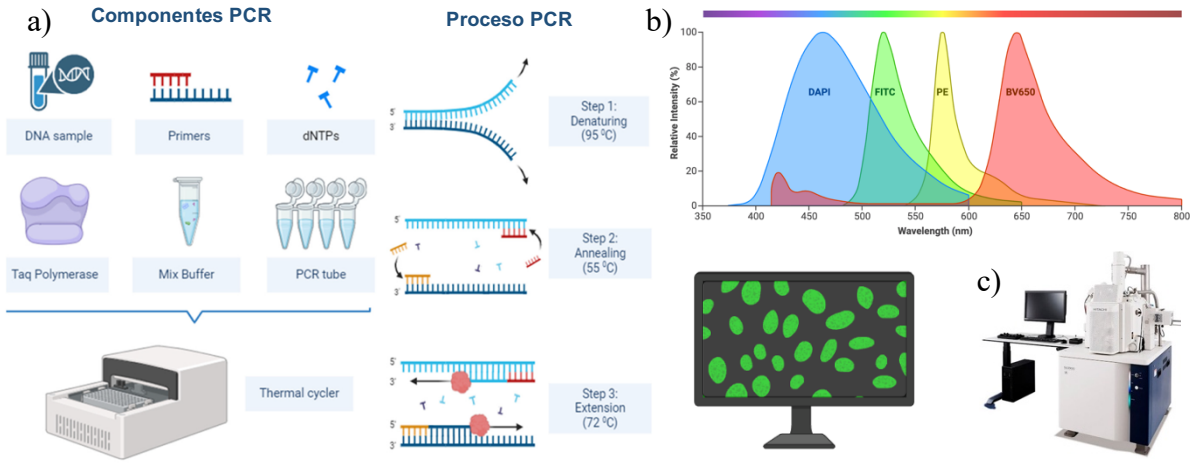



*Figura 7. Métodos de biología molecular de evaluación de actividad antibacteriana a) PCR [123], b) Fluorescencia imagen tomada de BioRender y c) SEM.*

Estas técnicas, empleadas de forma complementaria, permiten no solo evaluar la eficacia antibacteriana de los ZIFs, sino también esclarecer los mecanismos implicados, en especial aquellos vinculados con el daño oxidativo [43]. Mediante ensayos de fluorescencia, se observa la generación intracelular de ROS y su acumulación en las bacterias expuestas, indicando un desbalance en la homeostasis oxidativa [44]. Las imágenes obtenidas por SEM evidencian alteraciones en la morfología bacteriana, como arrugas en la membrana y colapso de la estructura celular, asociadas a la peroxidación lipídica inducida por ROS [45]. Por su parte, los análisis mediante PCR-RAPDs permiten identificar patrones de amplificación modificados, sugerentes de daño o alteraciones en la integridad del ADN bacteriano como consecuencia del estrés oxidativo [46]. En conjunto, esta información es fundamental para desarrollar materiales que actúen mediante mecanismos múltiples, dirigidos al daño de membranas, proteínas y material genético, contribuyendo así a reducir la probabilidad de generación de resistencia bacteriana.

Además de evaluar la eficacia antimicrobiana de los materiales por métodos microbiológicos y morfológicos, resulta fundamental profundizar en la comprensión del mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su acción. En particular, cuando el daño bacteriano está relacionado con la generación de ROS, es necesario emplear técnicas que permitan no solo confirmar su presencia, sino también cuantificarla y

caracterizarla. En este contexto, el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), como una de las ROS más estables y representativas, se convierte en un marcador determinante del estrés oxidativo inducido por materiales como los ZIFs. El estudio detallado de su generación en medios biológicos y su detección a través de métodos sensibles y específicos ofrece información crucial sobre la cinética del proceso, su intensidad y su relación directa con la eficacia antimicrobiana observada.

### 1.2.5 Métodos de detección de $H_2O_2$ y otras ROS

Como se discutió en el apartado anterior, el estrés oxidativo inducido por materiales antimicrobianos puede evaluarse indirectamente mediante la detección de ROS intracelulares. Entre estas, el $H_2O_2$ representa una especie determinante por su relativa estabilidad y su papel como marcador del estado redox celular. Diversos métodos analíticos han sido desarrollados para cuantificar estas especies, cada uno con ventajas y limitaciones en términos de sensibilidad, especificidad, facilidad de uso y aplicabilidad en medios biológicos.

Uno de los enfoques más comunes es el método colorimétrico, el cual utiliza sustratos cromogénicos como TMB (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine), ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) u OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) que, en presencia de $H_2O_2$ y peroxidasas (enzimáticas o nanoenzimas), generan productos coloreados cuya absorbancia puede medirse espectrofotométricamente. Este método es económico y sencillo, pero presenta limitaciones en cuanto a sensibilidad y posibles interferencias ópticas, especialmente en muestras turbias o con componentes absorbentes [47], [48].

Por otro lado, los métodos fluorimétricos emplean sondas específicas como DCFH-DA, Amplex Red o dihidroetidio, las cuales emiten fluorescencia al reaccionar con ROS. Estos métodos son altamente sensibles y permiten una detección intracelular precisa, aunque pueden estar influenciados por la autofluorescencia celular, el pH del medio y otros factores ambientales [41], [49], [50].

La quimioluminiscencia, como la basada en luminol o lucigenina, ofrece una sensibilidad aún mayor, generando luz en presencia de ROS sin necesidad de fuente de excitación

externa. Sin embargo, requiere condiciones estrictas de pH, temperatura y cofactores, lo que puede limitar su aplicación directa en muestras biológicas complejas [51], [52].

En contraste, los métodos electroquímicos han cobrado gran relevancia en los últimos años por su alta sensibilidad, capacidad de miniaturización y posibilidad de análisis en tiempo real. Además, estos métodos pueden adaptarse a sistemas portátiles o configurarse bajo esquemas *in operando*, es decir, realizar mediciones de manera continua mientras ocurre el proceso de interacción entre el agente antibacteriano y las bacterias, permitiendo un monitoreo dinámico y en condiciones que simulan ambientes fisiológicos relevantes. En particular, el uso de electrodos modificados con materiales derivados de ZIFs calcinados, como los basados en Co-N-C, ha demostrado un excelente desempeño en la detección de $H_2O_2$, al facilitar la transferencia electrónica y mejorar la selectividad catalítica [50], [53], [54], [55], [56], [57], [58]. Además, su compatibilidad con sistemas vivos los hace especialmente atractivos para evaluar procesos de estrés oxidativo inducido por materiales antimicrobianos, Figura 8.

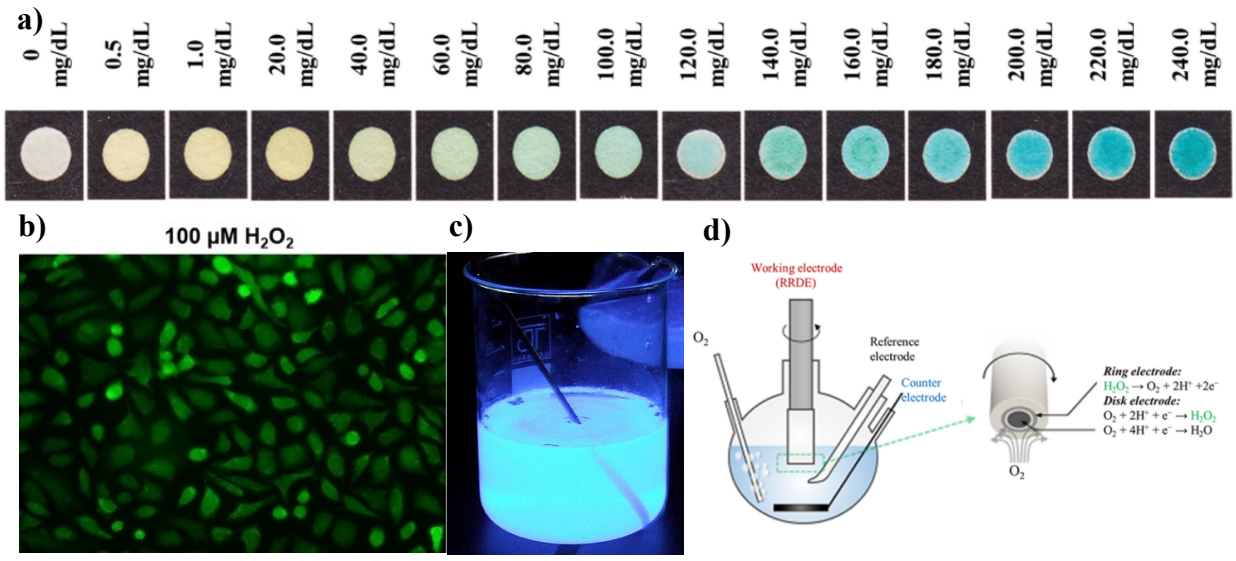



*Figura 8. Métodos de detección de $H_2O_2$,* a*) colorimetría[124], b) fluorescencia [60], c) quimioluminiscencia y d) electroquímica[125].*

Cada uno de estos métodos puede adaptarse según el tipo de muestra, el entorno experimental y el nivel de precisión requerido. La selección adecuada del método de detección es crucial para obtener resultados confiables y reproducibles, particularmente en estudios que buscan correlacionar la generación de ROS con efectos bactericidas o fisiológicos. Esta capacidad será abordada con mayor detalle en el siguiente apartado,

enfocado específicamente en la aplicación de métodos electroquímicos para la detección de especies reactivas de oxígeno generadas durante procesos antimicrobianos.

### 1.2.6 Aplicación de la electroquímica en la detección de ROS

Como se mencionó previamente, la detección electroquímica de ROS, constituye una herramienta poderosa para el monitoreo de estrés oxidativo bacteriano inducido por materiales antimicrobianos. Esta técnica destaca por su alta sensibilidad, bajo límite de detección, capacidad de análisis en tiempo real y su potencial para integrarse en plataformas portátiles y miniaturizadas, facilitando estudios bajo condiciones fisiológicamente relevantes.

En este contexto, diversas ROS pueden utilizarse como indicadores del estrés oxidativo bacteriano al ser detectables electroquímicamente, entre las que destacan:

- **Peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$)**: se puede oxidar ($H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$; E° = +0.68 V vs. NHE) o reducir ($H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O$; E° = +1.77 V vs. NHE) en superficies de electrodos, siendo el marcador más empleado por su estabilidad y abundancia durante procesos oxidativos [59], [60].
- **Radical superóxido ($O_2\bullet^-$)**: generado por la reducción de oxígeno ($O_2 + e^- \rightarrow O_2\bullet^-$; E° = -0.33 V vs. NHE), desempeña un papel importante en la inducción de estrés oxidativo y puede detectarse mediante materiales catalíticos que faciliten su conversión [61].
- **Radical hidroxilo (•OH)**: altamente reactivo, formado por reacciones de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) o procesos de Haber-Weiss, induce peroxidación lipídica y ruptura del ADN, aunque su vida media es corta, su detección indirecta es viable mediante sondas oxidable [62].
- **Radicales peroxilo (ROO•) y hidroperoxilo ($HO_2\bullet$)**: generados durante la oxidación lipídica en membranas bacterianas, detectables de forma indirecta mediante la cuantificación de productos de peroxidación lipídica como el malondialdehído usando sensores electroquímicos [63].
- **Oxígeno singlete ($^1O_2$)**: formado en procesos fotoactivados, también contribuye al daño oxidativo y puede ser detectado indirectamente mediante estrategias fotoelectroquímicas [64].

- **Peroxinitrito ($ONOO^-$)**: generado por la reacción de radical superóxido y óxido nítrico(NO•), es una especie reactiva de nitrógeno que induce estrés nitrosativo y puede monitorearse electroquímicamente ($ONOO^- + 2H^+ + e^- \rightarrow NO_2 + H_2O$; $E° \approx +1.4$ V vs. NHE) [65], [66].

El uso de estas diversas ROS en la detección electroquímica amplía las posibilidades de evaluar de forma integral el estrés oxidativo en bacterias, contribuyendo al entendimiento de los mecanismos bactericidas de materiales avanzados y fortaleciendo las estrategias analíticas con alta sensibilidad y especificidad para estudios de interacción bacteria-material.

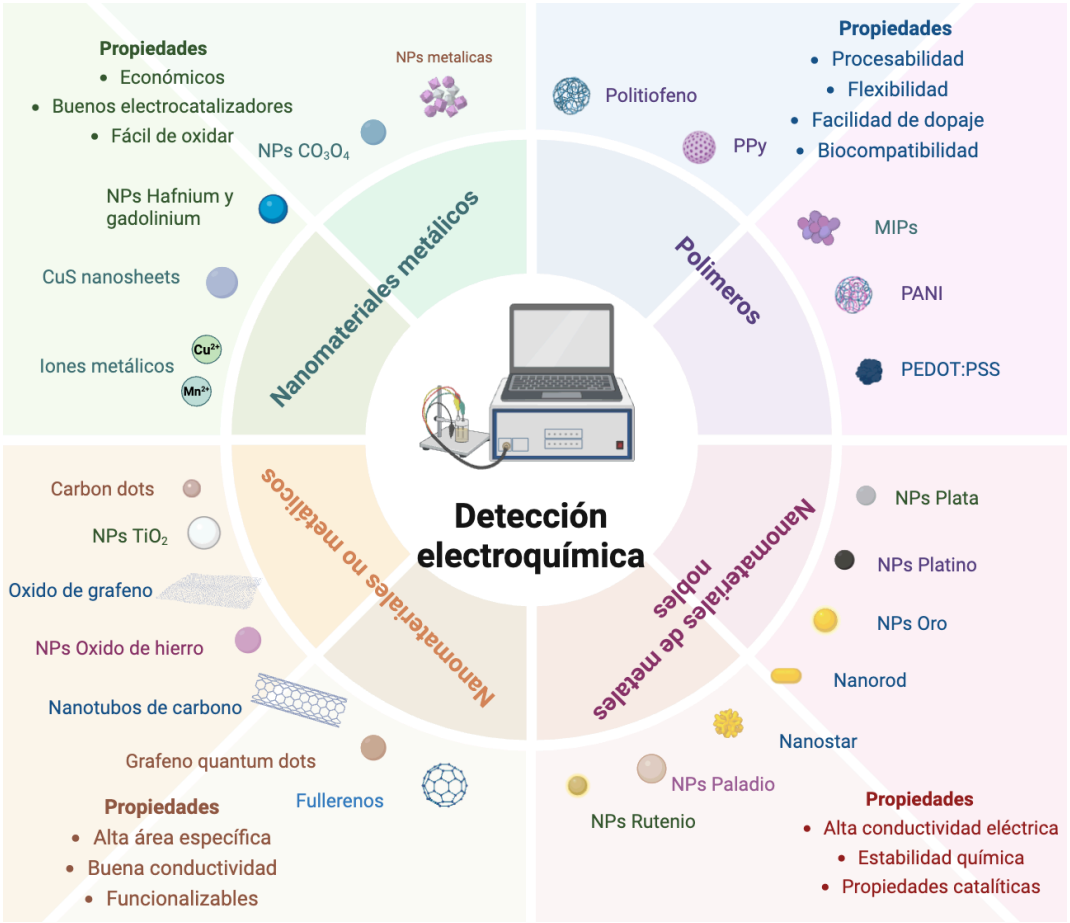



*Figura 9. Diferentes tipos de materiales estudiados en la detección electroquímica de $H_2O_2$, NPs:nanopartículas, MIPs: polimeros de impresión molecular, PANI:polianilina, PEDOT:PSS: Poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) y PPy:polipirrol, imagen creada a partir de BioRender.*

El fundamento básico de la detección electroquímica de ROS se basa en la oxidación o reducción electroactiva de estas especies en la superficie de un electrodo. Por ello, el

$H_2O_2$ es uno de los marcadores más utilizados debido a su estabilidad y alta concentración durante los procesos oxidativos. En sistemas convencionales, este proceso puede ser limitado por la lenta cinética de reacción sobre electrodos desnudos, como el de carbono vítreo. Por ello, se ha desarrollado una amplia variedad de electrodos modificados que incorporan materiales electrocatalíticos, tales como nanopartículas metálicas, óxidos, grafeno dopado o materiales derivados de estructuras metal-orgánicas.

La Figura 9 resume los materiales utilizados en la modificación de electrodos para la detección electroquímica de ROS, destacando las ventajas de cada tipo: nanomateriales metálicos (por su alta conductividad eléctrica y estabilidad), polímeros (flexibilidad y biocompatibilidad) y nanomateriales no metálicos (gran área superficial y buena conductividad). Entre estos, los derivados de ZIFs calcinados como Co–N–C/N–NTCG han mostrado gran eficacia en la detección de $H_2O_2$, actuando como nanoenzimas miméticas de peroxidasa que facilitan su reducción directa a potenciales bajos, minimizando interferencias con otras especies redox presentes en medios bacterianos [67], [68].

El $H_2O_2$, por ejemplo, puede oxidarse en un electrodo a potenciales superiores a +0.4 V (vs. Ag/AgCl), o reducirse entre 0 y -0.6 V dependiendo del material del electrodo y del pH del medio. Para mejorar la selectividad y la cinética del proceso, se han empleado materiales catalíticos como metales nobles, enzimas (por ejemplo, peroxidasas) y recientemente, materiales derivados de MOFs, como los nanoestructurados Co-N-C provenientes de la calcinación de ZIFs [21], [69], [70], [71], [72], [73], [74], como se muestra en la tabla 2.

Entre estos últimos, los materiales tipo ZIFs y en particular el ZIF-67 calcinado, han mostrado gran promesa. Su transformación térmica genera materiales compuestos de carbono dopado con nitrógeno (N-doped carbon, N-C) y especies metálicas en sitios tipo $M–N_x$ (como $Co–N_4$), los cuales exhiben alta actividad electrocatalítica hacia reacciones redox de oxígeno y peróxido. Estos materiales han sido empleados como fases activas en sensores electroquímicos no enzimáticos, permitiendo una detección rápida, estable y reproducible de $H_2O_2$. Estos materiales actúan como nanoenzimas miméticas de peroxidasa, facilitando la reducción directa del peróxido a potenciales más bajos, lo que

disminuye la interferencia con otras especies redox activas presentes en medios biológicos [72]. Además, su porosidad inherente y gran área superficial mejoran la adsorción de analitos y la accesibilidad de los sitios activos.

*Tabla 2. Estado del arte de los materiales Co-N-C y su detección de $H_2O_2$.*

| Material | Síntesis | Ténica EQ | Rangos | Sensibilidad | Límite de detección | Selectividad, Repetibilidad Reproducibilidad | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Co-NC RDCs** | 600 °C 5 h $N_2$ | VC CA | 0.001–30 mM | 234.913 μA/mMcm$^2$ | 0.143 μM | Repetibilidad 1.78% Reproducibilidad 4% Estabilidad 92.7 % | [71] |
| | AT-Co-NC 10% HF 24 h | | 0.001–16 mM | 208.112 μA/mMcm$^2$ | 0.235 μM | | |
| **$Co_3O_4$/NCNTs** | $H_2$/Ar 350 °C 1.5 h 700 °C 2 h | VC CA | 5.00 - 11.00 mmol/L | 87.40 mA/mmol/Lcm$^2$ | 1 mmol/L | | [72] |
| **$Co_3O_4$/rGO** | 350 °C 3 h Air | VC CA | 10-6010 μM | 381.02 mA/mMcm$^2$ | 7.87 nM | | [74] |
| **Co-NPs/NCs** | 500 °C 5 h $N_2$ | VC CA | 10–2080 μM 2080–11,800 μM | 203.88 μA /mMcm$^2$ | 0.12 μM | Selectividad 252.43 μA /mMcm$^2$ | [69] |
| **$Co_3O_4$-NWs/CF** | Ar 300°C 5 min 400°C 5 min 700°C 1 h Ácido nítrico 2.5 M 120°C | VC CA EIS | 0.01–1.4 mM | 230 nA/mMcm$^2$ | 1.4 μM | | [73] |
| **C-ZIF-67** | Hidrotermal | VC CA | 2.5–212.5 μM 212.5–1662.5 1662.5–6662.5 | 12 μM 5.3 μM 2.4 μM | 0.7 μM | | [70] |
| **ZIF-67** | Hidrotermal | VC CA | 2.5 μM - 1.08 mM | | 2.5 μM | Repetibilidad 3.9% Reproducibilidad 4.7% | [75] |
| **ZIF-67/rGO** | Hidrotermal | VC CA | 100-22900 | 0.2314 mA/mMcm$^2$ | 1920 μM | | [74] |

Así, la electroquímica no solo permite cuantificar directamente la generación de $H_2O_2$, sino que también se convierte en una herramienta fundamental para comprender los mecanismos de acción de materiales innovadores como los ZIFs. En el presente trabajo, se propone utilizar esta estrategia para desarrollar un método de evaluación temprana del estrés oxidativo en bacterias en contacto con materiales tipo ZIF-67, empleando sensores basados en Co–N–C y electrodos modificados con nanotubos de carbono grafíticos (N-NTCG), como se detallará en los capítulos siguientes.

Técnicas como la voltamperometría cíclica (CV), la amperometría a potencial fijo cronoamperometría (CA), la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) y la

espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) han sido aplicadas con éxito en sensores para ROS. En particular, la amperometría a potencial constante permite un monitoreo en tiempo real de la generación o consumo de $H_2O_2$, lo cual es especialmente útil en estudios *in operando* que buscan correlacionar la generación de ROS con el contacto bacteriano con superficies funcionalizadas [76], [77], [78], [79].

El desarrollo de plataformas electroquímicas basadas en materiales ZIFs también permite avanzar hacia sistemas de análisis más complejos, como dispositivos portátiles, sensores implantables y configuraciones *in situ* que pueden operar en condiciones fisiológicas. En este sentido, la electroquímica no sólo se posiciona como una técnica analítica, sino también como una herramienta diagnóstica capaz de proporcionar información en tiempo real sobre los mecanismos bioquímicos involucrados en procesos como la muerte bacteriana inducida por materiales generadores de ROS.

### 1.2.7 Importancia del análisis *in operando* en sistemas biológicos

El análisis *in operando* se refiere a la evaluación de procesos en tiempo real bajo condiciones experimentales que simulan o replican fielmente el entorno en el que se espera que opere un sistema funcional, figura 10. A diferencia de los estudios *ex situ* o *post mortem*, donde las muestras son extraídas del sistema y analizadas posteriormente, la estrategia *in operando* permite obtener información dinámica sobre los mecanismos fisicoquímicos que ocurren durante la interacción entre materiales funcionales y sistemas biológicos vivos [79].

En el contexto del desarrollo de materiales antimicrobianos, como los marcos metal-orgánicos tipo ZIF y sus derivados calcinados (ej. Co–N–C), el análisis *in operando* se presenta como una herramienta crucial para estudiar en tiempo real la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante su interacción con microorganismos vivos. Dado que las especies ROS, como el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), el anión superóxido ($O_2•^-$) y el radical hidroxilo (•OH), son altamente reactivas y transitorias, su detección posterior al evento biológico puede subestimar su rol en los mecanismos de acción antimicrobiana [80].

El uso de técnicas electroquímicas bajo condiciones *in operando* permite superar esta limitación, al posibilitar la detección directa y continua de $H_2O_2$ durante la interacción

entre bacterias como *E. coli* y materiales tipo ZIF-67 o sus derivados carbonáceos. De esta forma, se obtiene evidencia cuantitativa y en tiempo real del estrés oxidativo inducido, vinculando directamente la actividad antimicrobiana con la producción localizada de ROS [81]. Este enfoque permite distinguir entre mecanismos bactericidas pasivos (por contacto) y aquellos mediados por procesos oxidativos, ofreciendo una ventaja significativa en la validación de nuevos materiales antibacterianos.

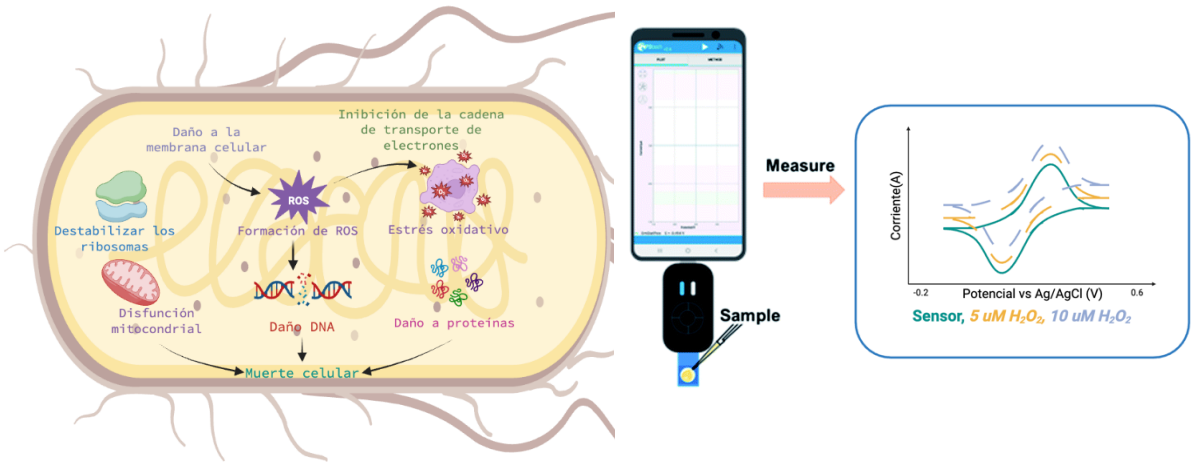



*Figura 10. Esquema de un análisis in operando electroquímico, elaboración propia de una plantilla de BioRender.*

Además, el análisis *in operando* puede combinarse con otras técnicas en tiempo real, como la microscopía fluorescente para la visualización de ROS intracelulares, o sensores ópticos para la detección simultánea de biomarcadores, permitiendo una evaluación multifactorial del sistema biológico bajo estudio [82]. Esta estrategia es especialmente relevante para el desarrollo de plataformas diagnósticas y terapéuticas avanzadas, como biosensores implantables, sistemas de liberación controlada de fármacos y terapias fotodinámicas activadas por ROS.

En resumen, la implementación del análisis *in operando* no sólo mejora la comprensión de los mecanismos involucrados en la actividad antimicrobiana de materiales emergentes, sino que también impulsa el diseño racional de nuevas estrategias de detección y control de infecciones bacterianas resistentes, ofreciendo un puente entre la investigación fundamental y su aplicación clínica o ambiental.

## 1.3 Justificación

La resistencia bacteriana a los tratamientos antimicrobianos constituye una de las principales amenazas emergentes para la salud pública global, agravada por el uso indiscriminado de antibióticos y la aparición de cepas multirresistentes. En este contexto, se vuelve imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias que permitan no sólo eliminar eficazmente a los patógenos, sino también entender los mecanismos de acción a nivel molecular, *E. coli* se emplea como modelo representativo por su relevancia clínica y su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples fármacos. Frente a este desafío, los marcos metal-orgánicos tipo ZIFs han surgido como materiales versátiles con propiedades antimicrobianas prometedoras, atribuibles en gran parte a su capacidad para generar ROS, desencadenando estrés oxidativo en células bacterianas.

Este proyecto se enfoca en la síntesis, caracterización y evaluación del efecto antibacteriano de distintos ZIFs, con variaciones en el ligando orgánico y el tratamiento térmico, lo que impacta directamente en su capacidad de inducir daño oxidativo. Asimismo, se exploran los derivados carbonosos dopados con cobalto obtenidos por calcinación (Co-N-C) como electrocatalizadores para la detección electroquímica de ROS, particularmente $H_2O_2$, una especie relevante en el mecanismo de acción de estos materiales. En este sentido, el desarrollo y aplicación de técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica y la cronoamperometría permiten cuantificar de forma sensible y en tiempo real la producción de $H_2O_2$, sirviendo como herramienta directa para evaluar el estrés oxidativo inducido por los materiales en la bacteria.

## 1.4 Hipótesis

La calcinación controlada del material ZIF seleccionado a partir de su desempeño electroquímico, a diferentes temperaturas, permitirá obtener electrocatalizadores Co–N–C/N–NTCG con sitios activos heteroatómicos capaces de favorecer la detección electroquímica sensible de peróxido de hidrógeno, generado como indicador de especies reactivas de oxígeno durante el estrés oxidativo inducido en bacterias.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Objetivo general

Desarrollar un método electroquímico *in operando* para la detección de ROS en bacterias, empleando electrocatalizadores derivados de la calcinación controlada del material ZIF seleccionado (Co–N–C/N–NTCG), los cuales fungen además como agentes antibacterianos de última generación.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar materiales tipo ZIFs (ZIF-67, ZIF-8, ZIF-9, ZIF-L, ZIF-7 y ZIF-L-Co) empleando cobalto y zinc como centros metálicos y diferentes ligandos orgánicos, con el propósito de determinar sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo morfología, composición elemental, estructura cristalina y área superficial específica.

- Evaluar la actividad antibacteriana de los ZIFs frente a *E. coli* mediante ensayos de dilución seriada para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Además, analizar el daño bacteriano inducido por ZIFs a nivel genético mediante RAPD-PCR, a nivel oxidativo mediante fluorescencia para detección de ROS, y a nivel estructural mediante SEM, seleccionando los ZIFs con características fisicoquímicas adecuadas para calcinación.

- Obtener materiales tipo Co-N-C mediante la calcinación controlada del ZIF seleccionado (ZIF-67) a 500, 600 y 700 °C, soportados sobre N-NTCG, realizando su caracterización estructural, morfológica y de superficie mediante técnicas como difracción de rayos X (DRX), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), espectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido y transmisión (SEM/TEM).

- Evaluar el desempeño electrocatalítico de los materiales Co-N-C/N-NTCG en la detección de $H_2O_2$ mediante técnicas voltamperometricas, determinando parámetros determinantes como sensibilidad, selectividad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y tiempo de respuesta.

- Determinar la estabilidad y la respuesta electroquímica de los electrodos modificados con materiales Co-N-C/N-NTCG en medios bacterianos, considerando interferencias potenciales como oxígeno disuelto y otras especies electroactivas presentes en medios de cultivo bacteriano.

- Integrar los materiales Co-N-C/N-NTCG en un sistema electroquímico *in operando* para permitir la detección en tiempo real de $H_2O_2$ como indicador del estrés oxidativo inducido en *E. coli* por materiales ZIFs.

- Validar el sistema electroquímico *in operando* mediante la comparación de su respuesta frente a la generación de ROS inducida por ZIFs con métodos convencionales de detección, con el objetivo de demostrar su viabilidad como herramienta analítica rápida y sensible para evaluar el daño bacteriano.

# 2. CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Este capítulo describe de manera detallada el diseño experimental y los procedimientos metodológicos empleados para investigar el efecto de la variación del ligando orgánico, el metal central y las condiciones de síntesis en la estructura de ZIFs, así como su relación con la actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*. Además, se expone el enfoque utilizado para evaluar el desempeño de los materiales calcinados tipo Co–N–C, soportados sobre nanotubos de carbono dopados con grafeno (N-NTCG), como sensores electroquímicos para la detección de peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), indicador del daño por estrés oxidativo bacteriano.

La metodología abarca desde la síntesis y caracterización estructural de los materiales, hasta su evaluación microbiológica, molecular y electroquímica. Se integran técnicas convencionales como XRD, FTIR, BET, Raman, TGA, TEM y SEM, junto con métodos de análisis molecular (extracción de ADN y RAPD-PCR), microbiológicos (ensayos de viabilidad y cultivo en placas), espectroscopía de fluorescencia para detección de ROS, y múltiples técnicas electroquímicas (voltamperometría cíclica, lineal, de pulso diferencial y cronoamperometría).

Este enfoque interdisciplinario permite correlacionar la estructura fisicoquímica de los materiales con su funcionalidad tanto como agentes antimicrobianos como en su desempeño como sensores, proporcionando una visión integral del mecanismo de daño bacteriano inducido por estrés oxidativo.

## 2.1 Síntesis de materiales ZIFs

Los materiales tipo ZIFs se sintetizaron mediante el método solvotermal, siguiendo el procedimiento reportado en la literatura [14]. Para la síntesis de ZIF-67, se disolvieron 0.58 g de nitrato de cobalto hexahidratado en 10 mL de metanol (solución A), y 0.98 g de 2-metilimidazol (2MIm) en 30 mL de metanol (solución B). Ambas soluciones se agitaron a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Posteriormente, la solución A se añadió a la B, y la mezcla resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas para permitir la reacción entre los precursores.

Transcurrido este tiempo, el precipitado formado se recuperó por centrifugación, seguido de tres lavados con agua desionizada y tres con etanol, con el fin de eliminar los reactivos no reaccionados. Finalmente, el material se secó a 80 °C durante 12 horas para eliminar el solvente residual. El mismo procedimiento se utilizó para la síntesis del ZIF-8, sustituyendo el cobalto por nitrato de zinc hexahidratado como precursor metálico.

Los materiales ZIF-7 y ZIF-9 se sintetizaron siguiendo el método descrito por [83]. Para el ZIF-7, se disolvieron 0.803 g de nitrato de zinc hexahidratado y 0.235 g de bencimidazol en 75 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). La solución obtenida se colocó en un reactor de teflón y se calentó a 130 °C durante 48 horas. Tras enfriarse a temperatura ambiente, el producto fue recuperado por centrifugación, lavado tres veces con metanol y secado a 80 °C durante 12 horas. El mismo procedimiento se utilizó para la síntesis del ZIF-9, utilizando nitrato de cobalto hexahidratado como fuente metálica.

En el caso del ZIF-L y ZIF-L-Co, la síntesis se realizó mediante el método hidrotermal, conforme al protocolo descrito [84]. Para la preparación de ZIF-L, se disolvieron 0.37 g de nitrato de zinc hexahidratado en 25 mL de agua desionizada (mezcla A), y 0.81 g de 2MIm en otros 25 mL de agua desionizada (mezcla B). Una vez disueltas, ambas soluciones se mezclaron, se agitaron brevemente y se transfirieron a un autoclave, el cual se calentó a 125 °C durante 1 hora. Luego del enfriamiento a temperatura ambiente, el precipitado se recuperó por centrifugación, se lavó tres veces con agua desionizada y se secó a 90 °C durante 12 horas. En la tabla 3 se muestra los métodos utilizados para la síntesis de los ZIFs y referencia.

*Tabla 3. Nomenclatura, ligando órganico y métodos de síntesis.*

| *ZIF* | Método | Ligando | Metal | Referencia |
|---|---|---|---|---|
| *ZIF-8* | Solvotermal | 2 Metil imidazol | Zinc | [14] |
| *ZIF-67* | Solvotermal | 2 Metil Imidazol | Cobalto | [14] |
| *ZIF-9* | Solvotermal | Benzimidazol | Cobalto | [83] |
| *ZIF-7* | Solvotermal | Benzimidazol | Zinc | [83] |
| *ZIF-L* | Hidrotermal | 2 Metil imidazol | Zinc | [84] |
| *ZIF-L Co* | Hidrotermal | 2 Metil imidazol | Cobalto | [84] |

## 2.2 Obtención de materiales Co-N-C derivados del ZIF-67

Los electrocatalizadores derivados de ZIF-67 se obtuvieron mediante tratamiento térmico a diferentes temperaturas (500, 600 y 700 °C). El proceso se llevó a cabo en un horno tubular bajo atmósfera de nitrógeno, utilizando una rampa de calentamiento de 5 °C $min^{-1}$ durante 2 horas. Los materiales resultantes se etiquetaron como Co–N–C (500), Co–N–C (600) y Co–N–C (700), para facilitar su identificación, encontrándose posteriormente diferencias morfológicas entre ellos.

Para su evaluación electroquímica, los electrocatalizadores fueron mezclados con un soporte de nanotubos de carbono dopados con nitrogeno (N-NTCG) en una proporción másica 1:4, con el objetivo de mejorar su adherencia al electrodo. Esta mezcla contiene un 80 % en peso del soporte conductor. En la tabla 4 se muestra la nomenclatura que se usará para los materiales obtenidos.

*Tabla 4. Nomenclatura materiales calcinados basados en ZIF-67.*

| ***Nomenclatura*** | Condiciones | Soporte |
|---|---|---|
| *Co-N-C (500)/N-NTCG* | 500 °C | N-NTCG |
| *Co-N-C (600)/N-NTCG* | 600 °C | N-NTCG |
| *Co-N-C(700)/N-NTCG* | 700 °C | N-NTCG |
| *ZIF-67/N-NTCG* | ZIF-67 | N-NTCG |
| *ZIF-8/ N-NTCG* | ZIF-8 | N-NTCG |
| *ZIF-9/ N-NTCG* | ZIF-9 | N-NTCG |
| *ZIF-7/ N-NTCG* | ZIF-7 | N-NTCG |
| *ZIF-L-Co/ N-NTCG* | ZIF-L-Co | N-NTCG |
| *ZIF-L/ N-NTCG* | ZIF-L | N-NTCG |

## 2.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales

Con el objetivo de garantizar la reproducibilidad en la síntesis de los materiales, se llevó a cabo una caracterización mediante técnicas analíticas, con el fin de identificar su

estructura cristalina, composición química, estabilidad térmica, morfología y propiedades superficiales. La estructura cristalina de los materiales fue evaluada mediante difracción de rayos X en polvo (XRD), utilizando un equipo Bruker D8 Advance con radiación Cu Kα (λ = 1.5406 Å), operando en un rango de 2θ de 5° a 40°. Esta técnica permitió confirmar la formación de las fases cristalinas características de los ZIFs, así como detectar posibles impurezas o modificaciones estructurales asociadas a la variación del ligando orgánico o del metal.

Las vibraciones moleculares asociadas a los grupos funcionales presentes en la estructura fueron analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), utilizando un espectrómetro PerkinElmer Spectrum Two FTIR/SP10SW. Los espectros se adquirieron en el rango de 4000 a 400 $cm^{-1}$, lo que permitió identificar enlaces específicos y posibles interacciones entre el ligando y el centro metálico.

La caracterización estructural complementaria se realizó mediante espectroscopía Raman, utilizando un espectrómetro Czerny–Turner cruzado asimétrico acoplado a una cámara CCD retroiluminada de 1024×256 píxeles, con una línea láser de excitación de 638 nm (90 mW). Esta técnica permitió identificar modos vibracionales característicos de las unidades estructurales y detectar posibles defectos o modificaciones en la estructura.

La superficie específica y la porosidad de los materiales fueron determinadas a través de isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno, utilizando el modelo BET (Brunauer–Emmett–Teller). Las mediciones se realizaron con el equipo Quantachrome® S–BET Autosorb iQ2, proporcionando información sobre la accesibilidad de los sitios activos.

Para el análisis de la composición superficial y los estados de oxidación de los elementos presentes, se empleó espectroscopía de fotoelectrones excitados por rayos X (XPS), mediante un espectrómetro Thermo Scientific Escalab 250 Xi. Los espectros obtenidos fueron corregidos utilizando como referencia el pico del carbono adventicio (C 1s = 284.8 eV).

Para determinar la estabilidad térmica de los materiales y establecer las temperaturas óptimas de calcinación del ZIF-67, se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) en atmósfera de nitrógeno, utilizando una balanza TA Instruments. El análisis se llevó a cabo con una rampa de calentamiento controlada de 5 °C/min, lo que permitió establecer los perfiles de descomposición térmica y el contenido de materia orgánica residual.

La morfología y distribución del tamaño de partícula fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), empleando un equipo JEOL JEM-2200 FS con corrector de esfericidad (CS), operando a un voltaje de aceleración de 200 kV. Esta técnica permitió obtener imágenes detalladas de la arquitectura de los ZIFs.

Finalmente, la evaluación morfológica de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* tras el contacto con los materiales se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un equipo JEOL JSM-7401F. Las imágenes obtenidas permitieron observar los efectos morfológicos asociados al daño bacteriano inducido por los ZIFs.

## 2.4 Evaluación de la actividad bactericida de los materiales

Con el fin de comprender el efecto de los materiales sobre microorganismos patógenos, se realizaron estudios microbiológicos enfocados en la evaluación del daño celular inducido por los ZIFs. Las pruebas incluyeron ensayos de viabilidad bacteriana, análisis de estrés oxidativo mediante técnicas de fluorescencia, y estudios del material genético mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR). Adicionalmente, se realizaron análisis del daño a la membrana celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Estas metodologías permitieron establecer una correlación entre la estructura del material y su capacidad para inducir estrés en las células bacterianas.

### 2.4.1 Ensayos de actividad antibacteriana (AA)

Se realizaron mediante el método de microdilución en agar en serie, de acuerdo con lo reportado en trabajos previos del grupo de investigación [17], [85] . Las cepas *S. aureus* y *E. coli* se cultivaron en 5 mL de medio Mueller Hinton (MH) a 37 °C durante 16 h. Posteriormente, la densidad óptica a 600 nm ($OD_{600}$) se ajustó para obtener una concentración final de $1\times10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Se prepararon diferentes concentraciones de ZIF (8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 µg/mL), suspendidas en un buffer de fosfato estéril (PBS) con Tween 80 al 1 % en peso como agente dispersante, con el fin de mantener la estabilidad coloidal de

las partículas. Las suspensiones ZIF/bacteria se mezclaron en proporción 1:1 (volumen final: 250 µL) y se incubaron a 37 °C durante 3 y 24 h.

Después del tiempo de interacción, se tomó una alícuota de 20 µL y se sembró sobre placas con medio MH, incubándose nuevamente a 37 °C durante 16 h. El porcentaje de supervivencia bacteriana se calculó utilizando como referencia el inóculo ajustado sin exposición a partículas, bajo las mismas condiciones experimentales.

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por triplicado en experimentos independientes.

### 2.4.2 Espectroscopía y microscopía de fluorescencia

Para el caso del análisis de estrés oxidativo intracelular se empleo el kit comercial Total ROS assay 520 nm (Invitrogen), el tinte fluorescente se disolvió en DMSO a partir de soluciones madre de 1.0 mM y se emplearon para los estudios de dependencia en concentración y tiempo de generación de $H_2O_2$. Las alícuotas (*E. coli* $1x10^8$ UCF/mL con 2 mg/mL ZIF-67) fueron analizadas a tiempos de 1, 1.5, 2 y 3 h y se registraron los espectros de fluorescencia de acuerdo con el protocolo. Para el caso de la microscopía de fluorescencia se analizaron con diferentes concentraciones de ZIFs (125 y 250 µg/mL), y posteriormente se adquirieron los espectros de fluorescencia. La intensidad de la señal de emisión se utilizó para monitorear la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior de las células bacterianas, respaldando así los hallazgos electroquímicos.

### 2.4.3 Análisis genético por RAPD-PCR

Con el objetivo de evaluar el daño inducido por los materiales en el material genético de *E. coli*, las bacterias fueron expuestas durante una hora a los compuestos ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co (0.125 mg/mL). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del ADN genómico utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, siguiendo el protocolo estándar para bacterias Gram-negativas. Este protocolo contempla etapas de lisis

celular, precipitación de proteínas y rehidratación del ADN, como se ilustra en la figura 11 (esquema del proceso de extracción de ADN).

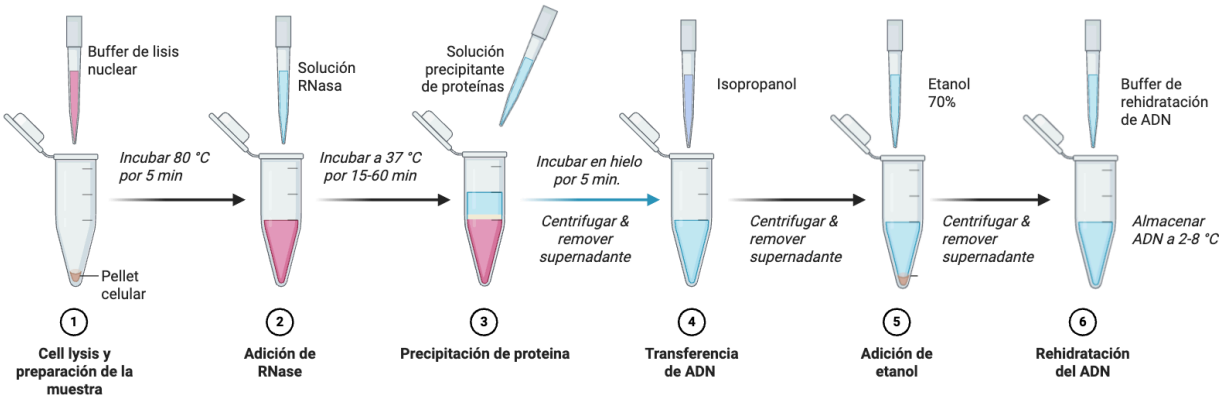



*Figura 11. Esquema del proceso de extracción de ADN, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.*

El ADN extraído fue cuantificado utilizando espectrofotometría UV-Vis, a fin de verificar su pureza (evaluando la relación A260/A280) y asegurar una concentración adecuada para los análisis posteriores.

La evaluación de posibles daños genéticos se realizó mediante la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD-PCR, *Random Amplified Polymorphic ADN*, por sus siglas en inglés), utilizando iniciadores de secuencia aleatoria. Para ello, se emplearon siete oligonucleótidos distintos en reacciones independientes, tabla 5, permitiendo detectar variaciones en los patrones de amplificación como indicativo de modificaciones o fragmentaciones en el ADN.

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y se visualizaron bajo luz UV tras tinción con bromuro de etidio. La comparación de los patrones de bandas entre las muestras tratadas y el control sin exposición permitió identificar alteraciones en la integridad del ADN asociadas a la interacción con los materiales.

*Tabla 5. Los primers OPA09, OPS11, OPT14, OPS13, OPA11 y OPQ14 [86]y OPE02 [87] corresponden a secuencias RAPD utilizadas para amplificación arbitraria.*

| Código primer | Primer secuencia (5´to 3´) |
|---|---|
| OPA-09 | GGGTAACGCC |
| OPS-11 | ACGATGAGCC |
| OPT-14 | AATGCCGCAG |
| OPS-13 | GTCGTTCGCA |
| OPA-11 | CAATCGCCGT |
| OPQ-14 | GGACGCTTCA |
| OPE-02 | GGTGCGGGAA |

### 2.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para evaluar el daño inducido por los materiales, se expuso la cepa de *E. coli* a el ZIF-67, ZIF-9, ZIF-8 y ZIF-L-Co. La preparación de las muestras para el análisis por microscopía electrónica de barrido se realizó en tres etapas principales: fijación, deshidratación y metalización.

En primer lugar, las células bacterianas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2.5 % en un buffer de fosfato durante 12 horas, seguida de múltiples lavados con el mismo buffer para eliminar el exceso de fijador. Posteriormente, se llevó a cabo la deshidratación mediante una serie creciente de concentraciones de etanol (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 90 % y etanol absoluto), incubando las muestras durante 10 minutos en cada concentración. Tras la centrifugación y eliminación del etanol, las muestras se colocaron sobre placas de cobre y se dejaron secar a 60 °C durante 2 horas.

Finalmente, se procedió a la metalización mediante recubrimiento por pulverización catódica (sputtering) con una capa de 5 nm de una aleación oro/paladio (Au/Pd). Las muestras preparadas fueron analizadas mediante SEM con el objetivo de observar los daños morfológicos generados por la exposición a los ZIFs.

## 2.5 Evaluación electroquímica

Se realizaron estudios electroquímicos para evaluar la actividad catalítica de los materiales derivados de ZIF-67 en la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS),

particularmente peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$), como indicador de estrés oxidativo. La caracterización incluyó pruebas de voltamperometría cíclica, voltamperometría lineal, voltamperometría de pulso diferencial y cronoamperometría, utilizando una celda de tres electrodos con electrodos modificados con los materiales sintetizados.

### 2.5.1 Caracterización electroquímica de los electrocatalizadores

La caracterización electroquímica se llevó a cabo utilizando una celda convencional de tres electrodos, acoplada a un potenciostato/galvanostato Gamry Reference 3000. La configuración incluyó un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata saturado con KCl (Ag/AgCl sat. KCl, E = 0.21 V vs. electrodo estándar de hidrógeno), un electrodo auxiliar de grafito y un electrodo de trabajo de carbon vítreo.

Previo a cada experimento, los electrodos fueron cuidadosamente pulidos con alúmina hasta obtener un acabado tipo espejo, con el fin de garantizar condiciones reproducibles. Los electrocatalizadores fueron depositados sobre los electrodos de carbono vítreo mediante la preparación de tintas catalíticas, empleando Nafion como aglutinante (15 $\mu L\ mg^{-1}$) e isopropanol como disolvente (100 µL/mg). La carga catalítica final sobre los electrodos fue de 1.22 $mg\ cm^{-2}$.

Los materiales derivados del ZIF-67(Co-N-C (°T)), así como los ZIFs soportado sobre N-NTCG en una proporción másica 1:4, fueron evaluados como electrocatalizadores para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$). Las pruebas iniciales se realizaron en PBS a pH 7.4, previa desoxigenación con burbujeo de $N_2$, registrando voltamperogramas cíclicos en un rango de potencial de −0.7 a 0.5 V vs. Ag/AgCl sat. KCl, con una velocidad de barrido de 20 $mV\ s^{-1}$.

Los voltamperogramas obtenidos correspondieron al primer ciclo de análisis, variando la concentración de $H_2O_2$ entre 20 y 100 ppm, posteriormente estos datos se utilizaron para obtener la sensibilidad (S) de los electrocatalizadores mediante:

$$S = \frac{\Delta I}{\Delta C} \qquad (1)$$

donde ΔI es el cambio de corriente (μA) y ΔC es el cambio de concentración (μM) de $H_2O_2$.

El límite de detección (LOD) se calculó empleando:

$$LOQ = \frac{3\times\sigma}{S} \qquad (2)$$

Y límite de cuantificación (LOQ):

$$LOQ = \frac{10\times\sigma}{S} \qquad (3)$$

Donde $\sigma$ es la desviación estándar del blanco.

La repetibilidad de la respuesta electroquímica fue evaluada utilizando el material Co-N-C (700) como referencia representativa; para ello, se analizaron tres electrodos modificados por separado, registrando su respuesta frente a una concentración de 40 ppm de $H_2O_2$. La repetibilidad (R) de la señal se determino usando:

$$R(\%) = \frac{SD}{I_m} \times 100 \qquad (4)$$

Donde SD es la desviación estándar de n medidas (n=3) e $I_m$ es la corriente media medida para una concentración de referencia de $H_2O_2$ (40 ppm).

Para profundizar en el análisis de las respuestas observadas en los voltamperogramas cíclicos, se empleó voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Las condiciones operativas fueron: tamaño de paso de 1 mV, periodo de muestreo de 0.1 s, tiempo de pulso de 0.05 s y amplitud de pulso de 0.5 mV para mejorar la resolución y el LOD de la detección.

La sensibilidad del material seleccionado se evaluó mediante cronoamperometría, utilizando un electrodo de disco rotatorio a 1600 rpm. Se aplicó un potencial de −0.2 V y se realizaron adiciones sucesivas de $H_2O_2$ en un intervalo de concentración de 5μM a 20 mM, con un intervalo de 30 segundos entre cada adición, para evaluar linealidad, sensibilidad y tiempos de respuesta.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de selectividad para evaluar la posible interferencia del oxígeno gaseoso. Los voltamperogramas cíclicos se registraron bajo las mismas condiciones previamente descritas, introduciendo burbujas de $O_2$ durante 10 segundos tras las adiciones de 20, 60 y 100 ppm de $H_2O_2$. Posteriormente, se registraron dos ciclos para evaluar la reducción del peróxido y se volvió a introducir oxígeno antes del inicio del tercer ciclo para observar su influencia sobre la señal analítica.

Para descartar interferencias del medio en las mediciones electroquímicas, se realizaron pruebas complementarias mediante la adición controlada de $H_2O_2$ a una solución de *E. coli* y *S. aureus* ($1\times10^8$ UFC/mL) en PBS, registrando los voltamperogramas correspondientes para observar las respuestas obtenidas.

### 2.5.2 Análisis electroquímico *in operando* del estrés oxidativo

Para los ensayos electroquímicos *in operando*, la cepa de *E. coli* se incubó previamente en medio Müller-Hinton (MH) durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente, la suspensión bacteriana fue ajustada a una concentración de $1\times10^8$ UFC $mL^{-1}$ en PBS. Como prueba de referencia (blanco), se realizó un voltamperograma en una celda electroquímica que contenía únicamente PBS sin presencia bacteriana.

Una vez registrado el voltamperograma blanco, los electrodos previamente fijados fueron transferidos a una segunda celda electroquímica que contenía PBS con *E. coli*. Se realizaron tres voltamperogramas cíclicos consecutivos, que fueron etiquetados como *E. coli*. Posteriormente, se añadió el agente antibacteriano ZIF-67 a una concentración de 2 mg/mL, y se realizaron tres voltamperogramas adicionales. Para fines de representación, se graficó uno de cada condición con las siguientes etiquetas: Blanco, *E.coli* y *E. coli* / ZIF-67 como se muestra en la figura 12.

La interacción entre *E. coli* y ZIF-67 se mantuvo dentro de la celda electroquímica incubando a 37 °C, y se registraron voltamperogramas adicionales a las 1.5, 2 y 3 horas de exposición. Se descartaron tiempos mayores debido a la disminución significativa de la señal de reducción observada en los voltamperogramas.

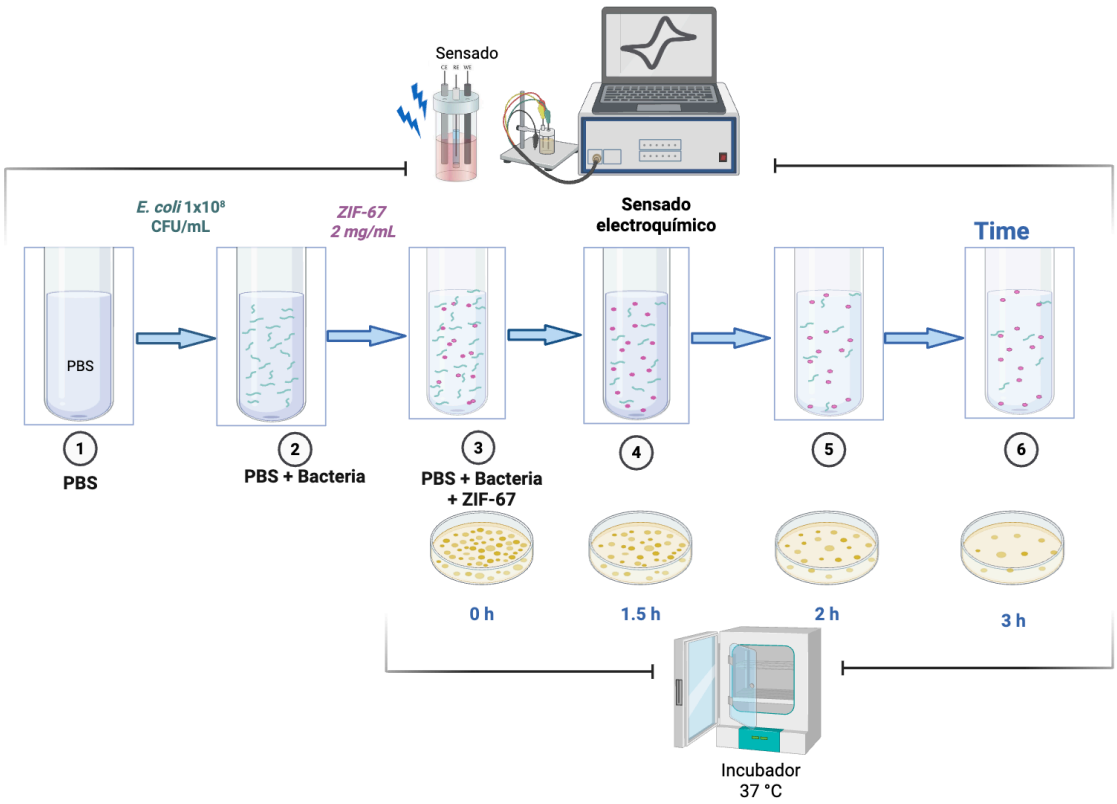



*Figura 12. Esquema de proceso in operando de la detección de estrés oxidativo a partir de la reducción de $H_2O_2$, elaboración propia a partir de plantilla de BioRender.*

# 3. CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS MATERIALES TIPO ZIFs

La caracterización fisicoquímica de los materiales sintetizados es esencial para comprender su comportamiento posterior en medios biológicos y en dispositivos electroquímicos. En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización estructural y morfológica de los ZIFs obtenidos. Estas propiedades permiten establecer relaciones entre la composición del material y su capacidad funcional.

## 3.1 Caracterización fisicoquímica de los ZIFs

### 3.1.1 Difracción de rayos X (XRD)

La caracterización estructural de los materiales obtenidos se llevó a cabo mediante difracción de rayos X en polvo, con el objetivo de confirmar la formación de la red cristalina característica de los materiales tipo ZIFs. En la figura 13 se presentan los patrones de difracción correspondientes a ZIF-67 y ZIF-8, ambos sintetizados mediante el método solvotermal. Los difractrogramas muestran picos intensos y definidos en posiciones angulares 2θ de aproximadamente 7.3°, 10.4°, 12.7°, 14.7°, 16.4°, 18°, 22.1°, 24.5° y 26.7°, los cuales se asignan a los planos cristalográficos (011), (002), (112), (022), (013), (222), (114), (233), (134), (044), (244) y (235), respectivamente [88]. Estos reflejos corresponden a una estructura cristalina cúbica centrada en el cuerpo, asociada al tipo topológico sodalita (SOD), comúnmente reportada para los materiales metal-orgánicos ZIF-8 y ZIF-67.

La similitud en las posiciones y la intensidad relativa de los picos con respecto a los patrones reportados en la literatura científica [89] confirma la obtención de materiales altamente cristalinos y estructuralmente definidos. Cabe destacar que, a pesar de que los metales centrales difieren ($Zn^{2+}$ en ZIF-8 y $Co^{2+}$ en ZIF-67), ambos comparten el mismo ligando orgánico, 2-metilimidazol (2-MIm), lo cual favorece la formación de redes isoestructurales. La presencia de estos patrones característicos en el rango de 5° a 40° respalda la correcta formación de la red cristalina tipo ZIF y constituye una prueba concluyente de la eficacia del método solvotermal empleado para la síntesis de estos materiales.

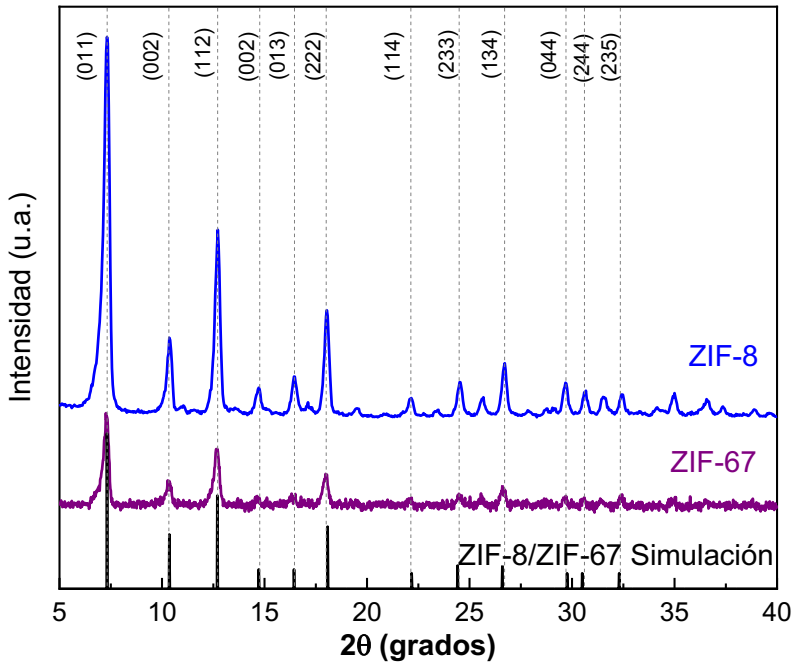



*Figura 13. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-8 y ZIF-67*

Por otro lado, la figura 14 muestra los patrones de difracción de los materiales ZIF-7 y ZIF-9, los cuales fueron sintetizados exitosamente por el método solvotermal. En ambos casos, se identifican picos bien definidos en posiciones angulares 2θ de aproximadamente 7.1°, 7.6°, 10.3°, 12.1°, 13.1°, 15.4°, 16.2°, 18.6°, 19.6°, 21.1°, 23° y 26°, en concordancia con los valores reportados en la literatura para estos materiales [90]. Estos picos se asignan a planos cristalinos específicos como (-111), (110), (220) para ZIF-7 y (101), (2-10), (110) para ZIF-9. Las diferencias en la intensidad de los picos, especialmente en el caso de ZIF-9, pueden atribuirse tanto a las propiedades inherentes del cobalto como al equipo instrumental utilizado para el análisis.

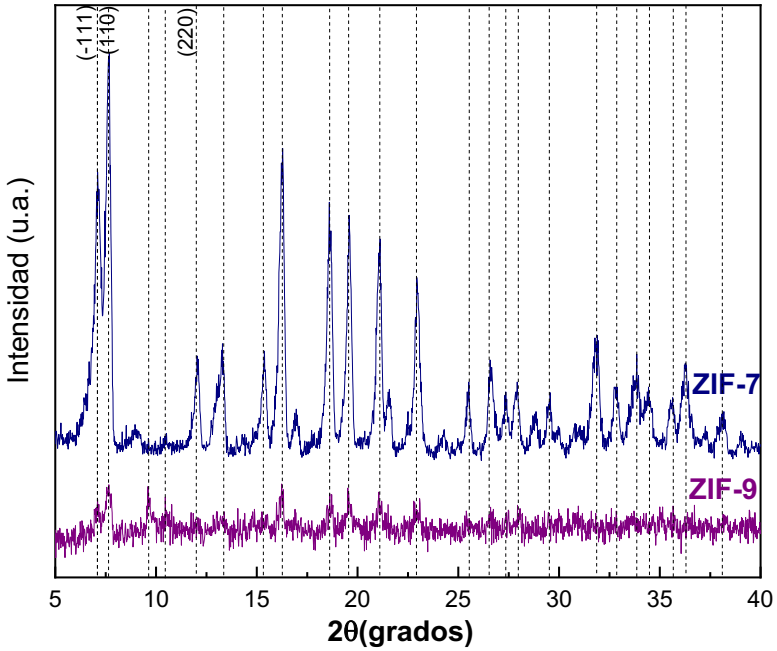



*Figura 14. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-9 y ZIF-7.*

En la figura 15 se presentan los patrones de difracción de rayos X correspondientes a los materiales ZIF-L-Zn y ZIF-L-Co, los cuales comparten el mismo ligando orgánico y metal central que ZIF-8 y ZIF-67, respectivamente. Sin embargo, en este caso, se empleó un método de síntesis distinto con el objetivo de obtener una morfología en capas bidimensionales (2D). Como resultado, se observan picos característicos adicionales en la región de 2θ entre 10° y 20°, lo que evidencia un cambio estructural consistente con lo reportado en la literatura para este tipo de redes laminares [91].

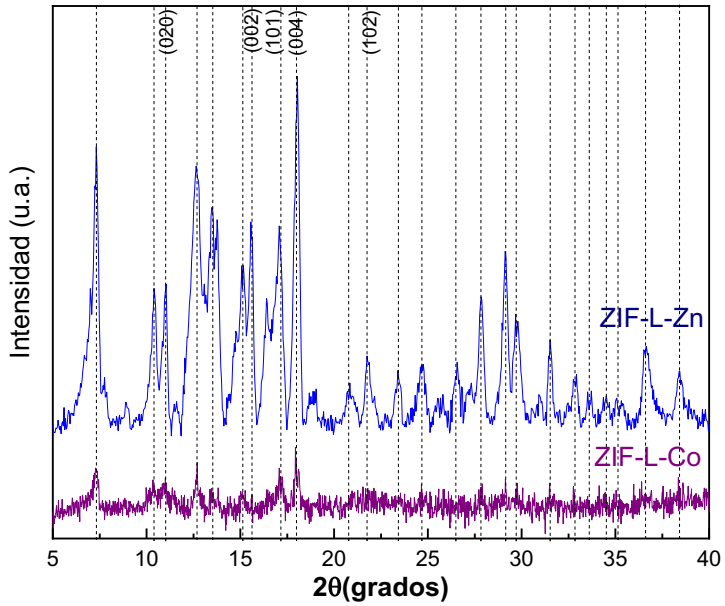



*Figura 15. Patrón de difracción de rayos X del ZIF-L y ZIF-L-Co.*

En conjunto, los difractogramas de los materiales sintetizados (ZIF-8, ZIF-67, ZIF-L-Zn, ZIF-L-Co, ZIF-7 y ZIF-9) muestran picos intensos y definidos entre 5° y 40° en 2θ, lo cual indica una alta cristalinidad y la formación exitosa de estructuras tipo sodalita (SOD), centradas en el cuerpo. Esta asignación se encuentra respaldada por la base de datos del Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC: 823083, 671074, 602541, 988184), y por simulaciones previas reportadas en la literatura especializada.

Estos resultados confirman la efectividad del método solvotermal para la obtención de ZIFs con estructuras cristalinas bien definidas, cuya composición y morfología pueden ajustarse mediante la selección del ligando y del metal. Esta versatilidad estructural es particularmente relevante para aplicaciones potenciales en el desarrollo de materiales con propiedades antimicrobianas, así como en catálisis, almacenamiento de gases y sensores electroquímicos.

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

La espectroscopía FTIR es una técnica esencial para identificar los modos vibracionales de los grupos funcionales presentes en los materiales, y para confirmar la formación de enlaces metal-ligando característicos de las estructuras tipo ZIF. En esta sección, se

analizan los espectros de los materiales obtenidos, considerando el efecto del tipo de ligando y del ion metálico sobre las bandas vibracionales.

La figura 16 muestra los espectros FTIR de los materiales ZIF-8 y ZIF-67, ambos sintetizados con el ligando 2-metilimidazol (2MIm), aunque con diferente ion metálico ($Zn^{2+}$ para ZIF-8 y $Co^{2+}$ para ZIF-67). Las bandas presentes entre 600 y 1500 $cm^{-1}$ son características del 2MIm y se atribuyen a las vibraciones del anillo imidazólico. En particular, se observaron señales a 1566, 1419 y 1305 $cm^{-1}$, correspondientes al estiramiento del enlace C=N, así como picos en 690, 754, 993 y 1142 $cm^{-1}$ asociados a las vibraciones C–H del grupo metilo y del anillo aromático [92].

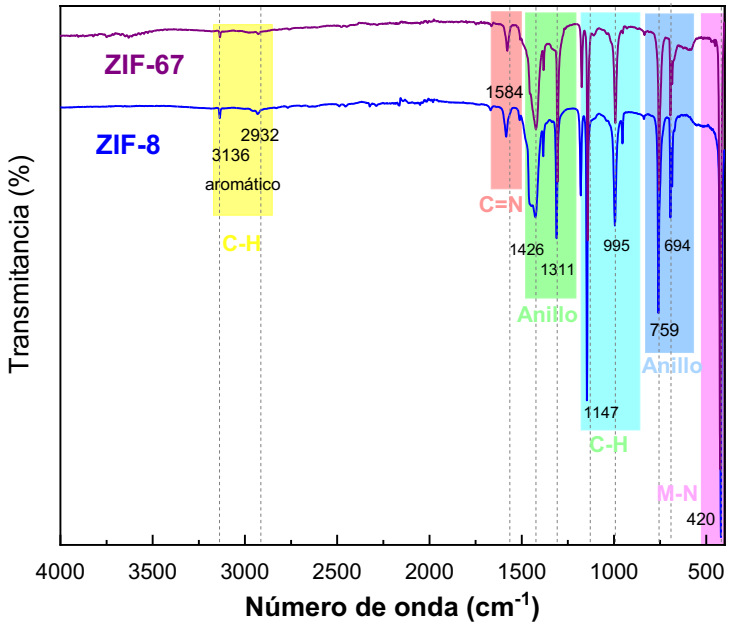



*Figura 16. Espectros FT-IR de ZIF-67 y ZIF-8.*

Una banda de particular interés se localiza entre 420 y 430 $cm^{-1}$, atribuida al estiramiento del enlace metal-nitrógeno (M–N), indicador directo de la coordinación efectiva entre el ligando y el ion metálico [93], [94]. La ausencia de la banda N–H en ~3450 $cm^{-1}$ sugiere la desprotonación del grupo imidazólico durante la formación del marco, reforzando la presencia del enlace M–N. En el caso específico de ZIF-67, se identificó una banda adicional a 3135 $cm^{-1}$, correspondiente al estiramiento simétrico del anillo (H_ring), relacionada con una disminución en la distancia H_ring···H_ring, lo que indica una conformación más compacta del material. Esta compactación puede influir directamente en la capacidad del material para liberar $Co^{2+}$ en solución acuosa, lo cual es determinante

en su desempeño bactericida [14], [19], [32]. El 2MIm presenta propiedades básicas por la presencia de átomos de nitrógeno, favoreciendo la coordinación y liberación controlada del ion metálico.

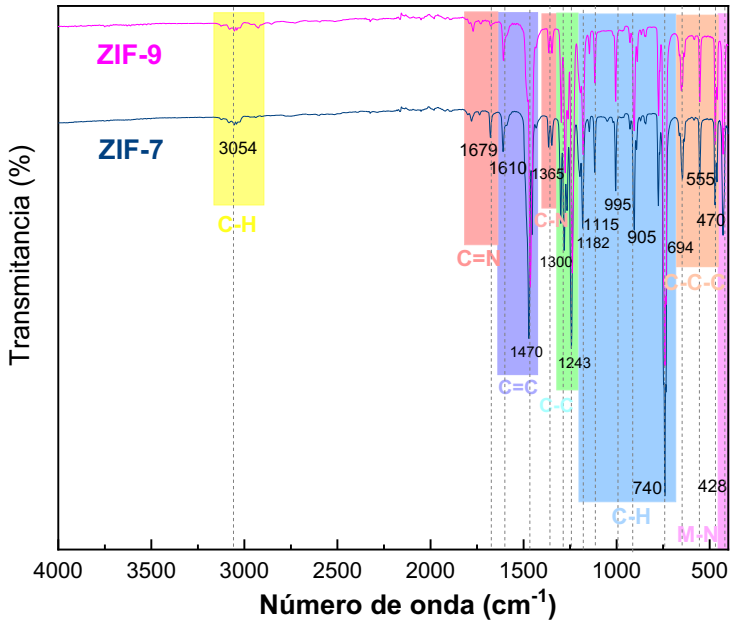



*Figura 17. Espectroscopía de FT-IR de ZIF-7 y ZIF-9.*

Los espectros FTIR de los materiales ZIF-9 y ZIF-7, mostrados en la figura 17, evidencian las similitudes estructurales debidas al uso del bencimidazol (BIm) como ligando orgánico, aunque difieren en el ion metálico ($Co^{2+}$ para ZIF-9 y $Zn^{2+}$ para ZIF-7). Nuevamente, la banda característica en la región de ~428 $cm^{-1}$ indica la presencia del enlace M–N, y la ausencia de la señal N–H en ~3450 $cm^{-1}$ confirma la coordinación del ligando.

En estos materiales, las bandas situadas entre 470 y 694 $cm^{-1}$ corresponden a vibraciones del tipo C–C–C dentro del anillo bencénico. Las señales entre 740 y 905 $cm^{-1}$ están asociadas a modos de vibración “fuera del plano” (out-of-plane) del enlace C–H, mientras que la banda a 1243 $cm^{-1}$ corresponde al estiramiento del enlace C–C. Las bandas entre 1300 y 1365 $cm^{-1}$ se relacionan con vibraciones del enlace C–N, y las comprendidas entre 1390 y 1610 $cm^{-1}$ con vibraciones “in-plane” del enlace C=C del anillo aromático. Finalmente, un pico en 1675 $cm^{-1}$ fue atribuido al estiramiento del enlace C=N, característico de la porción imidazólica del bencimidazol. Estas señales

corroboran la incorporación del ligando al marco cristalino, así como la formación del ZIF [95].

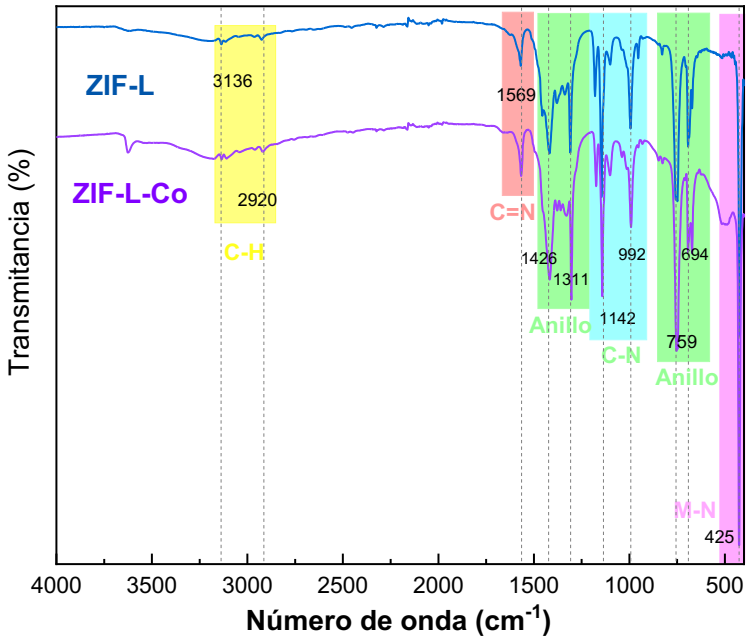



*Figura 18. Espectroscopía FT-IR del ZIF-L y ZIF-L-Co.*

La figura 18 presenta los espectros correspondientes a ZIF-L (Zn) y ZIF-L-Co, materiales que, a pesar de estar compuestos por los mismos elementos que ZIF-8 y ZIF-67, respectivamente, muestran una estructura laminar (2D) como consecuencia del control preciso de la relación molar durante la síntesis. Esta modificación estructural se refleja en la aparición de bandas vibracionales diferenciadas.

En ambos casos, se observan señales características de la vibración M–N en torno a 425 $cm^{-1}$, indicando la formación de la red metal-orgánica. La región entre 650 y 780 $cm^{-1}$ se atribuye a vibraciones “fuera del plano” del anillo imidazólico, mientras que las bandas entre 900 y 1350 $cm^{-1}$ corresponden a vibraciones “en el plano” (in-plane). El estiramiento del anillo imidazólico se manifiesta en la región entre 1350 y 1500 $cm^{-1}$, y el pico a 1569 $cm^{-1}$ se asocia al enlace C=N. Además, se detectó una banda ancha entre 2250 y 3700 $cm^{-1}$, posiblemente relacionada con interacciones tipo N–H···N, típicas de las estructuras ZIF-L [84], las cuales podrían influir en la flexibilidad del marco o su interacción con biomoléculas.

En conjunto, los espectros FTIR de los diferentes materiales ZIF permiten confirmar la formación de los enlaces metal-ligando (M–N), así como la incorporación efectiva del ligando en la red. La desaparición de la banda N–H y la aparición de señales características del anillo imidazólico o bencimidazólico en distintas regiones del espectro validan la coordinación y formación del marco metal-orgánico. Estos hallazgos, junto con los resultados de DRX, consolidan la comprensión estructural de los ZIFs obtenidos y establecen las bases para correlacionar su estructura con propiedades funcionales como la liberación controlada de iones metálicos, la interacción con sistemas biológicos o su desempeño antimicrobiano. De manera particular, la estructura química del ligando influye directamente en la conformación estructural de los ZIFs, afectando parámetros como la estabilidad, porosidad y la densidad de sitios activos, lo que a su vez puede modificar el comportamiento antibacteriano de cada material al influir en la interacción con las membranas celulares y en la generación de estrés oxidativo en las bacterias expuestas.

## 3.2 Caracterización morfológica de ZIFs

### 3.2.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM)

La caracterización estructural de materiales tipo ZIF es fundamental para comprender sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, especialmente cuando se busca diseñar nanomateriales con actividad antimicrobiana. Las micrografías obtenidas por SEM, complementadas con análisis elemental mediante EDS, permitieron evaluar el efecto del ligando orgánico, el ion metálico y las condiciones de síntesis sobre la morfología y la distribución de tamaño de partícula.

En primer lugar, los materiales ZIF-8 y ZIF-67, sintetizados con 2MIm como ligando, presentaron estructuras con alta regularidad y homogeneidad, aspecto que resulta de gran relevancia para aplicaciones en catálisis y sistemas antimicrobianos, donde el control de tamaño y morfología impacta directamente en la funcionalidad superficial y la accesibilidad de los poros activos. El ZIF-67 (Figura 19a), con $Co^{2+}$ como centro metálico, mostró cristales con geometría tipo sodalita bien definida y un tamaño promedio de ~200 nm, mientras que el ZIF-8 (Figura 19b), con $Zn^{2+}$, presentó partículas uniformes con tamaño de partícula de ~92.5 nm. Esta diferencia en el tamaño de partícula, aun

empleando idéntico ligando y condiciones de síntesis similares, indica que el tipo de metal de coordinación afecta la velocidad de nucleación y la cinética de crecimiento cristalino, posiblemente debido a diferencias en la energía de enlace metal–nitrógeno y la estabilidad de los complejos intermedios formados durante la síntesis.

El alto grado de homogeneidad observado en ambos materiales sugiere una cinética de nucleación controlada, donde el ligando 2MIm, por su bajo impedimento estérico y alta flexibilidad estructural, favorece una coordinación eficiente con los centros metálicos, permitiendo la formación de redes tridimensionales altamente ordenadas. El control en la formación de cristales con morfología hexagonal puede estar asociado con la simetría intrínseca del ligando y la facilidad con la que se acomoda en el nodo metálico, limitando defectos de crecimiento durante la cristalización.

La similitud morfológica observada entre ZIF-8 y ZIF-67, a pesar de utilizar diferentes metales, subraya que la estructura química del ligando juega un papel predominante en determinar la geometría y homogeneidad de los cristales, mientras que el tipo de ion metálico modula principalmente el tamaño final de las partículas y posiblemente la densidad de defectos presentes en la estructura. Esto es consistente con reportes que indican que la naturaleza del metal afecta el radio iónico, la fuerza de enlace con el ligando y el potencial de formación de estructuras secundarias durante el ensamblaje del marco metal-orgánico.

Desde el punto de vista funcional, la generación de cristales homogéneos y con geometría controlada es crítica para aplicaciones antimicrobianas, ya que estructuras más uniformes favorecen una liberación controlada de iones metálicos y una interacción más reproducible con las membranas bacterianas. Asimismo, el tamaño de partícula puede impactar en la eficiencia de internalización en sistemas bacterianos y en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante procesos de interacción celular, contribuyendo a la actividad bactericida de estos materiales.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante SEM y TEM para ZIF-8 y ZIF-67 confirman que la elección de un ligando pequeño y flexible como el 2MIm permite obtener materiales con morfologías definidas y homogéneas, mientras que el metal de coordinación ajusta el tamaño y propiedades electrónicas del sistema, lo que resulta

fundamental para correlacionar la estructura con el desempeño funcional de los ZIFs en aplicaciones catalíticas y como sistemas antimicrobianos avanzados.

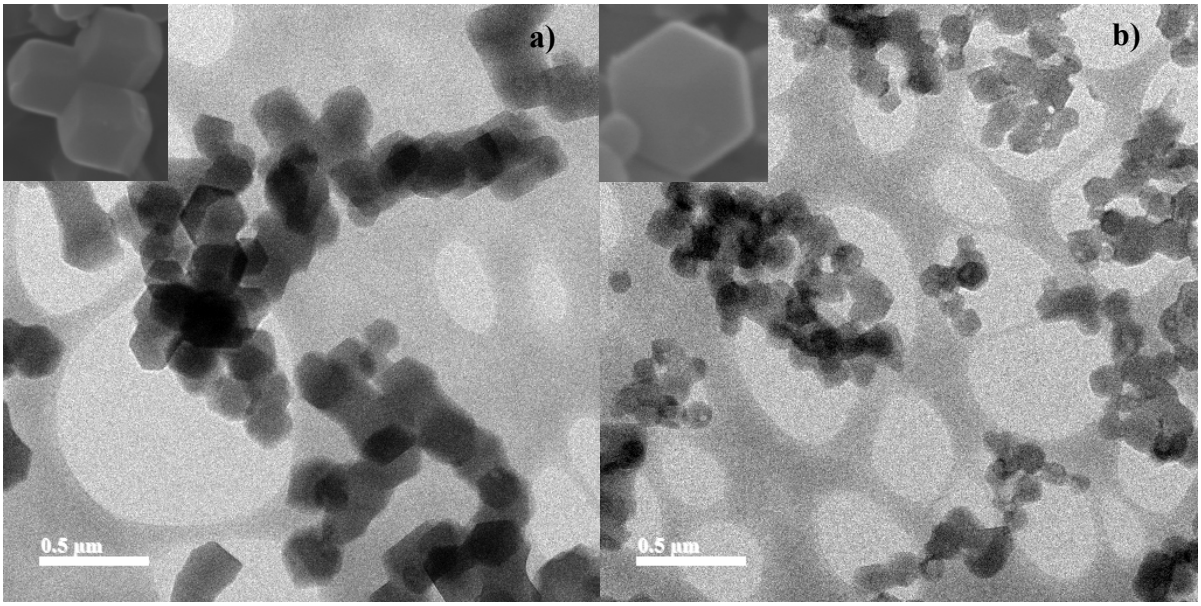



*Figura 19. Micrografía del a)ZIF-67 y b)ZIF-8.*

Por otro lado, los materiales sintetizados con BIm como ligando mostraron características morfológicas más heterogéneas, reflejando el impacto de un ligando con mayor rigidez estructural y volumen estérico en la nucleación y crecimiento cristalino de los ZIFs.

El ZIF-9 (Figura 20a), con $Co^{2+}$ como ion metálico, presentó una estructura tipo sodalita con partículas relativamente uniformes de aproximadamente 150 nm, indicando que, a pesar del mayor tamaño y rigidez del BIm en comparación con el 2MIm, se alcanza un equilibrio adecuado en la coordinación con cobalto que permite un proceso de cristalización relativamente controlado. Este comportamiento podría estar relacionado con la capacidad del $Co^{2+}$ para formar complejos intermedios estables con el BIm, favoreciendo un ensamblaje ordenado de la red metal-orgánica y limitando el crecimiento descontrolado de las partículas. En contraste, el ZIF-7 (Figura 20b), que emplea $Zn^{2+}$ como centro metálico, mostró una distribución de tamaño más amplia, entre 66 y 358 nm, con morfologías poligonales menos definidas, evidenciando una heterogeneidad significativa en comparación con su contraparte con cobalto. Estas diferencias sugieren que la naturaleza del ion metálico tiene un papel crítico en la estabilización de los complejos intermedios formados durante la síntesis. En particular, la menor fuerza de

enlace del $Zn^{2+}$ con el BIm y la posible formación de múltiples especies coordinadas durante la reacción podrían generar cinéticas de nucleación y crecimiento menos controladas, resultando en la coexistencia de partículas de distintos tamaños y formas.

Adicionalmente, el uso de BIm como ligando introduce una rigidez estructural que puede limitar la reorganización de los precursores durante la cristalización, generando estructuras más irregulares y una superficie de energía variable que favorece la formación de morfologías poligonales poco definidas. Esta heterogeneidad puede impactar de forma relevante en las propiedades funcionales del material, ya que influye en la distribución y accesibilidad de los poros, así como en la liberación de iones metálicos y la interacción con sistemas biológicos. Desde la perspectiva de aplicaciones antimicrobianas, la presencia de partículas de distintos tamaños y formas podría traducirse en un comportamiento heterogéneo frente a sistemas biológicos, afectando la interacción con las membranas bacterianas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera no uniforme. Sin embargo, esta misma heterogeneidad podría ser aprovechada para aplicaciones específicas donde se requiera una liberación gradual de iones metálicos o una interacción diferenciada con superficies biológicas. En conjunto, los resultados de SEM y TEM para ZIF-9 y ZIF-7 demuestran que el uso de ligandos rígidos como BIm induce heterogeneidad morfológica en los materiales tipo ZIF, mientras que el tipo de metal de coordinación modula de forma significativa la distribución de tamaño y la definición de la morfología de las partículas. Este análisis refuerza la importancia de considerar tanto la estructura química del ligando como la naturaleza del ion metálico al diseñar ZIFs con propiedades específicas, estableciendo un vínculo claro entre la estructura y las funciones que pueden desempeñar estos materiales en sistemas catalíticos y antimicrobianos avanzados.

Finalmente, los materiales tipo ZIF-L, obtenidos bajo condiciones de síntesis específicas con un exceso de ligando, presentaron una morfología marcadamente distinta y de gran relevancia para aplicaciones funcionales. El ZIF-L-Co (Figura 21a) mostró una estructura laminar e irregular, con partículas alargadas que forman aglomerados de hasta 1 µm, con un tamaño promedio de ~600 nm. Esta morfología elongada y su organización en láminas sugiere un crecimiento anisotrópico controlado por difusión, donde las relaciones molares metal/ligando, junto con la polaridad del medio solvente, desempeñan un papel determinante al favorecer la formación de estructuras bidimensionales durante la nucleación y el crecimiento.

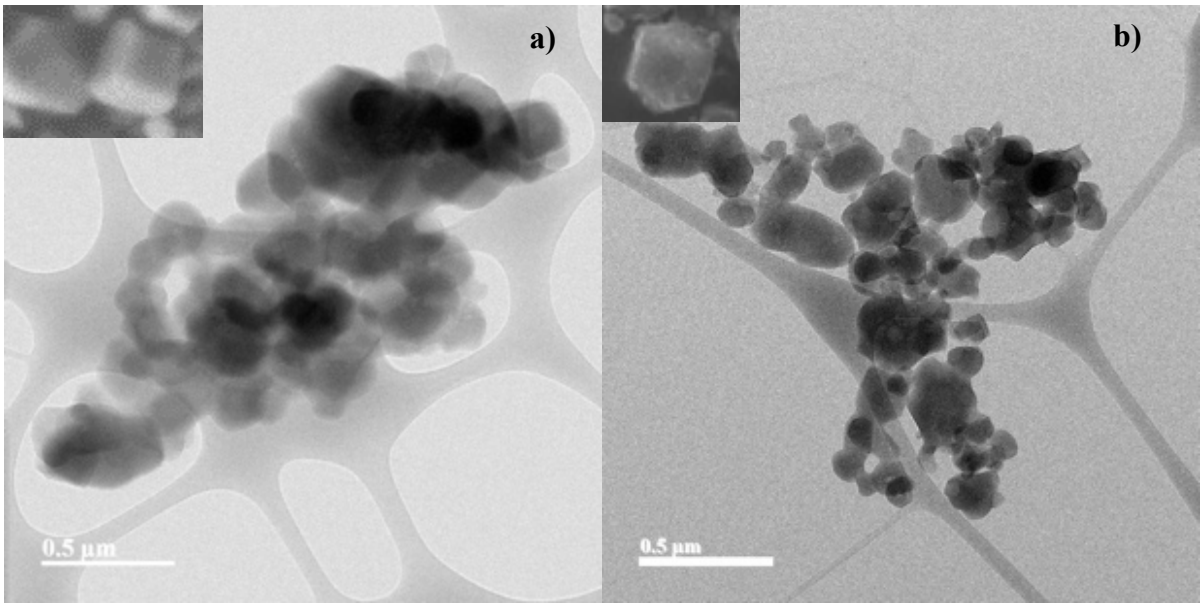



*Figura 20. Micrografía SEM a) ZIF-9 y b)ZIF-7.*

El mecanismo de formación de estas láminas puede estar relacionado con el exceso de ligando, que modifica el equilibrio de coordinación en la solución, ralentizando la nucleación inicial y permitiendo un crecimiento preferencial a lo largo de ciertas direcciones cristalinas. Este crecimiento anisotrópico genera estructuras laminares con mayor área superficial expuesta, lo que podría traducirse en una mayor accesibilidad a sitios activos, aspecto crítico en aplicaciones catalíticas y de interacción con sistemas biológicos.

Por otro lado, el ZIF-L-Zn (Figura 21b), que comparte el mismo ligando que el ZIF-8 (2MIm), pero con condiciones sintéticas ajustadas, también presentó una morfología elongada similar, confirmando que las condiciones de síntesis, como la concentración de ligando y la polaridad del solvente, tienen un impacto significativo en la morfología final del material, más allá de la identidad del ion metálico o del ligando utilizado. Esta observación resalta la sensibilidad de los sistemas ZIF-L a las variables de síntesis, permitiendo modular la arquitectura del material de acuerdo con las necesidades funcionales específicas. Desde el punto de vista de aplicaciones antimicrobianas y en sensores electroquímicos, la morfología laminar de los ZIF-L podría ofrecer ventajas considerables, como un mayor contacto superficial con las bacterias o con el medio de reacción, facilitando la transferencia de masa y aumentando la interacción con especies reactivas. Además, la estructura bidimensional puede influir en la liberación controlada

de iones metálicos y en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), potenciando la actividad antimicrobiana de estos materiales.

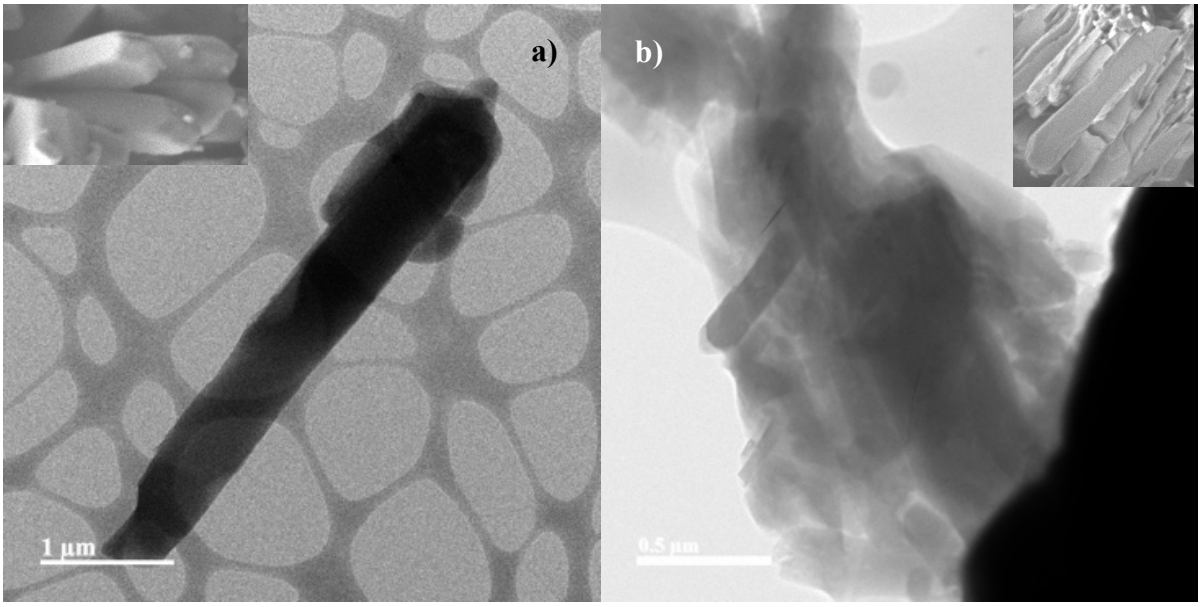



*Figura 21. Micrografía SEM del a)ZIF-L-Co y b)ZIF-L*

En conjunto, los resultados de SEM y TEM evidencian que los materiales tipo ZIF-L exhiben un control morfológico único derivado de parámetros de síntesis específicos, permitiendo la formación de estructuras laminares que podrían traducirse en ventajas funcionales significativas para aplicaciones en catálisis, sensores y sistemas antimicrobianos avanzados. Estos hallazgos refuerzan la relevancia de optimizar las condiciones de síntesis como herramienta esenciales para el diseño de materiales con propiedades estructurales y funcionales sintonizables.

### 3.2.2 Área superficial específica mediante BET

Las propiedades texturales de los materiales sintetizados fueron determinadas a partir de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a -196 °C, obtenidas mediante análisis BET. Este método permite cuantificar el área superficial específica, el volumen de poro y el tamaño medio de poro, parámetros fundamentales para comprender la estructura porosa y el comportamiento de adsorción de los marcos organometálicos zeolíticos (ZIFs).

En la figura 22 se presentan las isotermas correspondientes a ZIF-8 y ZIF-67, materiales que emplean 2-metilimidazol como ligando orgánico. Ambas isotermas se clasifican como tipo I, de acuerdo con la clasificación establecida por la IUPAC, lo cual es característico de materiales microporosos. Estas curvas muestran una rápida adsorción de nitrógeno a bajas presiones relativas ($p/p_0 < 0.001$), seguida de un plateau horizontal, lo que indica saturación de los microporos. Este comportamiento está asociado con la elevada energía de adsorción en microporos estrechos, donde el llenado ocurre prácticamente de manera inmediata a bajas presiones.

Por otro lado, tambien se muestran las isotermas correspondientes a ZIF-7 y ZIF-9, materiales que utilizan bencimidazol como ligando orgánico y que presentan una geometría más compleja. A diferencia de los materiales anteriores, estos compuestos exhiben isotermas con lazos de histéresis, sugiriendo la presencia de mesoporos. La forma general de las curvas permite clasificarlas como tipo II o III. En el caso de ZIF-7, se observa una transición gradual entre la formación de monocapa y la adsorción en multicapa, lo que sugiere una isoterma tipo II. En contraste, ZIF-9 muestra una menor interacción adsorbente-adsorbato, con un incremento moderado en la cantidad adsorbida, indicando una posible isoterma tipo III. Ambas presentan un lazo de histéresis estrecho de tipo H1 (según IUPAC), con ramas de adsorción y desorción aproximadamente paralelas, lo que sugiere una distribución de poros uniforme, probablemente derivada de aglomerados de partículas esféricas con distribución homogénea.

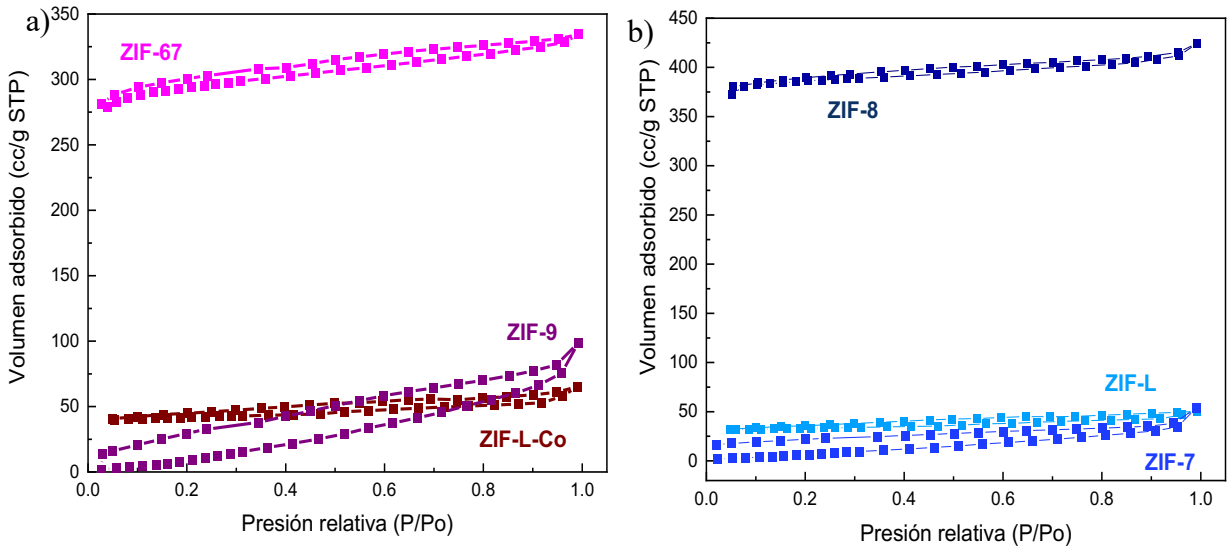



*Figura 22. Isotérmas de adsorción de $N_2$ del a)ZIF-67, ZIF-L-Co, ZIF-9 y b)ZIF-L-Zn, ZIF-7 y ZIF-8.*

Las isotermas de los materiales ZIF-L-Co y ZIF-L-Zn, también evidencian comportamiento microporoso, aunque con características distintas respecto a sus análogos ZIF-67 y ZIF-8. A pesar de compartir el mismo ligando orgánico y metal central, las diferencias en la proporción molar empleada durante la síntesis favorecen la formación de una estructura laminar (2D), lo cual se refleja en menores áreas superficiales y un ligero incremento en el tamaño de poro, particularmente en ZIF-L-Co.

En la Tabla 5 se resumen los valores obtenidos de área superficial BET, volumen de poro y tamaño medio de poro para todos los materiales sintetizados. ZIF-67 presentó la mayor área superficial (1865 $m^2/g$), seguido de ZIF-8 (1456 $m^2/g$), lo que concuerda con la formación eficiente de redes microporosas bien definidas. Este elevado valor de área superficial puede atribuirse a la coordinación eficiente del ligando 2MIm con el centro metálico, favorecida por su bajo impedimento estérico, así como a las condiciones de síntesis empleadas, que promovieron una nucleación homogénea y un crecimiento controlado, generando cristales uniformes con poros accesibles y distribuidos de manera regular en la estructura

En contraste, los materiales tipo ZIF-L y ZIF-L-Co exhibieron áreas superficiales considerablemente menores (119.9 y 152.2 $m^2/g$, respectivamente), atribuibles a su morfología laminar y al empaquetamiento denso derivado del crecimiento anisotrópico inducido por las condiciones de síntesis con exceso de ligando. Este crecimiento en forma de láminas, si bien incrementa el área superficial externa, puede bloquear o restringir parcialmente la accesibilidad a los poros internos, reduciendo la superficie disponible para interacciones con especies externas.

Por su parte, los materiales ZIF-7 y ZIF-9, sintetizados con benzimidazol (BIm) como ligando, mostraron áreas superficiales aún más reducidas (38.1 y 95.7 $m^2/g$, respectivamente). Este comportamiento se puede relacionar tanto con el mayor volumen estérico y rigidez estructural del BIm, que limita la formación de redes extensamente porosas, como con las interacciones π-π entre los anillos aromáticos del ligando, que pueden inducir un empaquetamiento más compacto y restringir la accesibilidad de los poros.

Estos resultados evidencian la influencia combinada del ion metálico y del ligando orgánico sobre las propiedades texturales de los ZIFs. En particular, los materiales basados en cobalto tienden a presentar mayores áreas superficiales y volúmenes de

poro que sus análogos con zinc, lo cual puede estar asociado a la coordinación más flexible de $Co^{2+}$ y su predisposición a formar redes extendidas y abiertas. De igual forma, el tipo de ligando tiene un impacto directo en la densidad estructural del marco: el 2MIm favorece la formación de estructuras altamente porosas, mientras que el BIm, debido a su tamaño y capacidad de interacciones adicionales, restringe la porosidad accesible.

En relación con los resultados obtenidos, el ZIF-67 se consolida como el material con mayor área superficial, un efecto directamente relacionado con el arreglo estructural inducido por las condiciones de síntesis y el uso del ligando 2MIm, que facilita la formación de una red microporosa extensa y accesible. Este parámetro es crítico al considerar aplicaciones antimicrobianas, ya que una alta área superficial y porosidad uniforme pueden incrementar la interacción con especies biológicas y favorecer la liberación controlada de iones metálicos, optimizando así la eficacia bactericida de los materiales ZIF.

*Tabla 6. Área superficial específica BET de los materiales.*

| Material | Área BET | Volumen de poro | Tamaño de poro |
|---|---|---|---|
| ZIF-8 | 1456.5 $m^2/g$ | 0.066 cc/g | 1.56 nm |
| ZIF-67 | 1865.0 $m^2/g$ | 0.067 cc/g | 1.58 nm |
| ZIF-L-Co | 152.2 $m^2/g$ | 0.042 cc/g | 2.01 nm |
| ZIF-L-Zn | 119.9 $m^2/g$ | 0.031 cc/g | 1.99 nm |
| ZIF-7 | 38.1 $m^2/g$ | 0.082 cc/g | 1.74 nm |
| ZIF-9 | 95.7 $m^2/g$ | 0.159 cc/g | 2.24 nm |

Finalmente, estos análisis texturales, en conjunto con la caracterización estructural previa, son esenciales para determinar la idoneidad de cada material en aplicaciones específicas. En este trabajo, dichas propiedades permitirán seleccionar de manera fundamentada los ZIFs más prometedores para evaluar su actividad antimicrobiana, priorizando materiales que combinen alta área superficial, poros uniformes y una estructura química controlada para potenciar su desempeño en la interacción con bacterias y en la generación de especies reactivas de oxígeno, contribuyendo al desarrollo de sistemas antimicrobianos avanzados basados en ZIFs.

### 3.2.3 Análisis de composición química mediante espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman proporciona información complementaria a la espectroscopía FTIR, siendo especialmente útil para identificar modos vibracionales activos en el cambio de polarizabilidad molecular, así como para estudiar la coordinación metal-ligando y los efectos estructurales sutiles inducidos por la naturaleza del ligando.

En la figura 23 se presentan los espectros Raman de los materiales ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co. En el caso del ZIF-9, se observa la desaparición de la banda de estiramiento N–H (~625 $cm^{-1}$) y de la banda de flexión (~1496 $cm^{-1}$), asociadas al grupo funcional N–H del bencimidazol (BIm). Esta ausencia indica que durante la síntesis se llevó a cabo la desprotonación del ligando, lo que permitió la coordinación efectiva del nitrógeno con el centro metálico. Este comportamiento es consistente con lo observado en FTIR y constituye una evidencia determinante de la formación del marco coordinado tipo ZIF.

Adicionalmente, los espectros revelan bandas características atribuibles a los modos vibracionales del enlace Co–N, con señales localizadas en torno a 687 $cm^{-1}$ (flexión) y 1200 $cm^{-1}$ (estiramiento). Estas bandas son indicativas de la interacción efectiva entre el ion $Co^{2+}$ y los átomos donadores del ligando nitrogenado, confirmando la formación de la red metal-orgánica en los materiales basados en cobalto.

Se destacan diferencias relevantes entre los espectros del ZIF-9 (con BIm) y aquellos correspondientes al ZIF-67 y ZIF-L-Co, los cuales utilizan 2-metilimidazol (2MIm) como ligando orgánico. En los materiales basados en 2MIm se identifica un pico característico en torno a 200 $cm^{-1}$, el cual está asociado a vibraciones del tipo metal-ligando (Co–N), influenciadas por el entorno químico generado por la presencia del grupo metilo en la estructura del ligando. Esta señal no se presenta en el ZIF-9, lo que resalta cómo modificaciones estructurales sutiles en el ligando (por ejemplo, la adición o ausencia de grupos funcionales) pueden alterar significativamente el entorno vibracional del material [94], [96], [97].

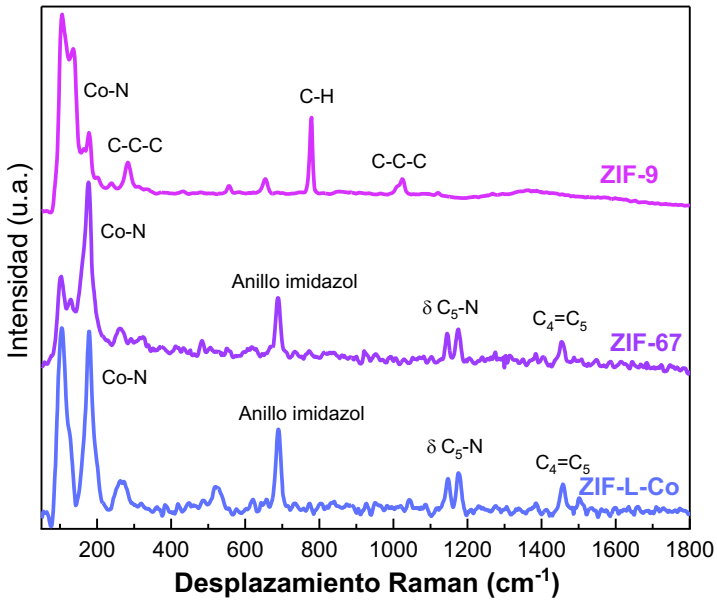



*Figura 23. Espectro Raman de los ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co.*

Estas variaciones espectrales permiten inferir que la identidad del ligando juega un papel determinante no solo en la arquitectura estructural del ZIFs, sino también en sus propiedades electrónicas locales. En este sentido, la modulación del entorno electrónico a través del diseño racional del ligando impacta directamente en propiedades determinantes como la polaridad superficial, la afinidad por especies moleculares específicas, la capacidad de generar especies reactivas, o incluso el comportamiento antibacteriano. Así, la correlación espectroscópica estructura-propiedad no solo valida la síntesis exitosa, sino que también orienta el desarrollo de materiales ZIF con aplicaciones dirigidas en catálisis, sensores, y plataformas biofuncionales.

### 3.2.4 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

El XPS se empleó para analizar la composición elemental y los estados de oxidación de los elementos presentes en la superficie de los materiales ZIF sintetizados. Esta técnica permite, además, evaluar las interacciones entre el ligando orgánico y el centro metálico de coordinación, aportando información relevante sobre la naturaleza química de la superficie, fundamental para su actividad funcional, particularmente en contextos de interacción bacteriana.

En la figura 24 se muestran los espectros de alta resolución correspondientes a los elementos más representativos de los materiales estudiados: N 1s, C 1s, O 1s, Co 2p, Zn 2p, y los picos relacionados con impurezas o componentes residuales de síntesis. A continuación, se discuten con detalle los principales hallazgos para cada región de enlace.

La región correspondiente al enlace N 1s muestra un pico principal centrado alrededor de 399.8 eV, característico del nitrógeno presente en grupos imidazol (N–C=N), confirmando la coordinación del ligando orgánico con el centro metálico. En algunos espectros se observa la presencia de un segundo componente a menor energía de enlace (~398.4 eV), atribuible al nitrógeno no coordinado o protonado, posiblemente debido a ligandos libres o defectos en la estructura.

En los materiales ZIF-67 y ZIF-8 se observa un único pico simétrico, indicando una coordinación eficiente del 2-metilimidazol con los metales $Co^{2+}$ y $Zn^{2+}$ respectivamente. En contraste, los materiales que contienen bencimidazol (ZIF-7 y ZIF-9) muestran una ligera asimetría o desplazamiento, lo cual podría atribuirse a interacciones π-π entre anillos bencénicos, así como a posibles contribuciones de enlaces H-N o N...π, propias de su estructura más rígida.

Los espectros de C 1s presentan una descomposición típica en tres componentes: ~284.6 eV: carbono tipo C–C/C–H (esqueleto alifático o aromático), ~285.6 eV: carbono en C–N o C=N, correspondiente al anillo imidazólico y ~288.5 eV: grupos C=O o carbonilos, probablemente provenientes de residuos orgánicos de síntesis (DMF, metanol) o contaminantes superficiales.

Se aprecia un claro predominio de la señal en 285.6 eV en los ZIFs con 2-metilimidazol (ZIF-67, ZIF-8), lo que indica una superficie rica en ligandos coordinados. En los casos de ZIF-L-Co y ZIF-L-Zn, la presencia de señales en 288.5 eV sugiere mayor contenido de especies oxigenadas o contaminantes atrapados durante la síntesis en condiciones suaves. Esto es consistente con sus menores áreas BET y su morfología más abierta.

La región O 1s exhibe picos principales a: ~531.2 eV: oxígeno en grupos tipo C=O o carboxílicos y ~532.5 eV: oxígeno en enlaces C–O, $H_2O$ adsorbida o grupos hidroxilo superficiales.

La presencia de oxígeno en estos materiales, que teóricamente no deberían contenerlo en su red ZIF ideal, indica residuos de disolventes de síntesis, agua adsorbida o defectos estructurales (sitios coordinativamente insaturados). Los materiales ZIF-L presentan una señal O 1s más pronunciada, lo cual respalda su mayor interacción superficial con agua y menor orden estructural.

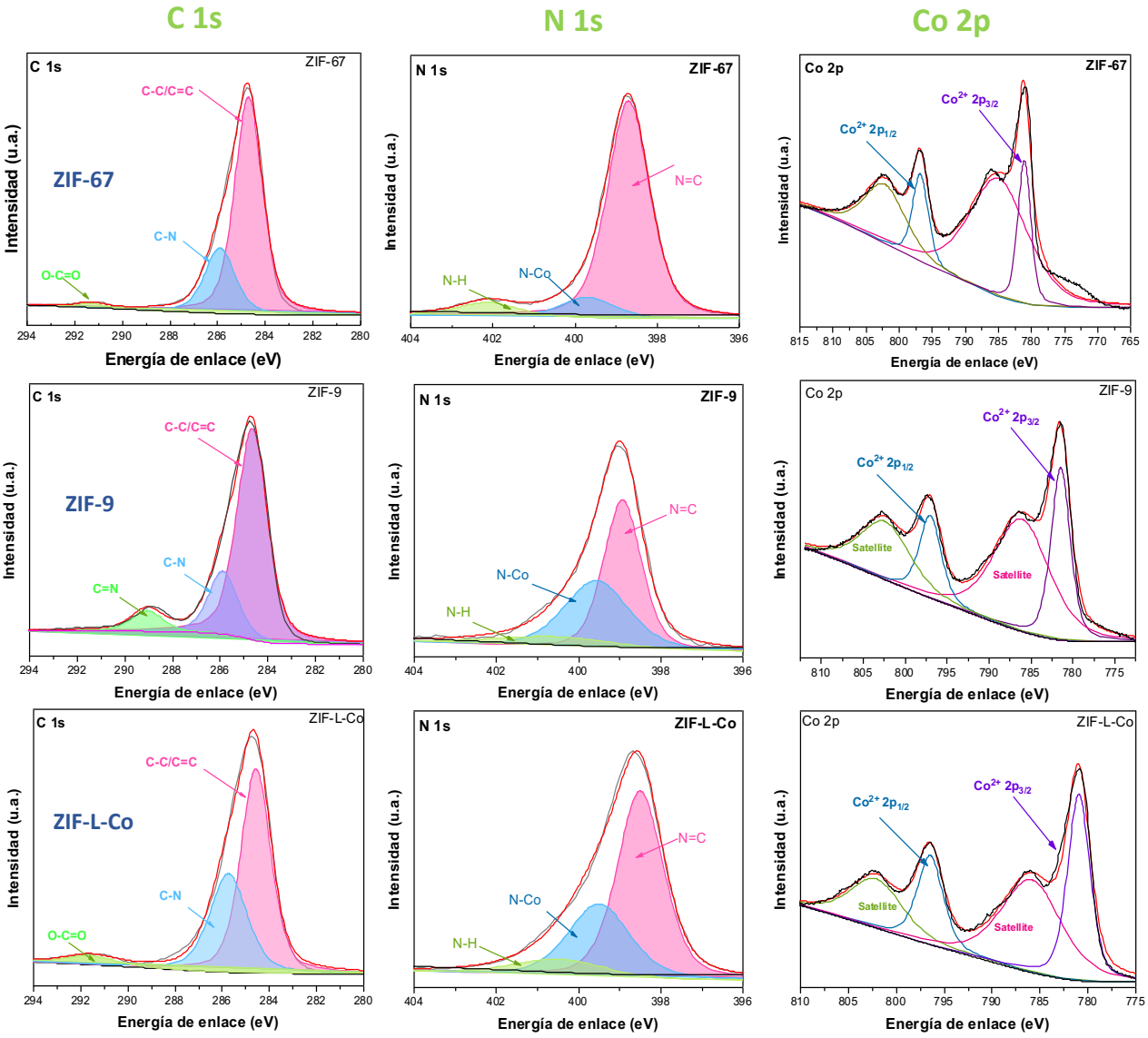



*Figura 24. Espectro XPS de los materiales ZIF-67, ZIF-9 y ZIF-L-Co.*

Los espectros muestran dos picos principales correspondientes a Co $2p_3/_2$ (~781.5 eV) y Co $2p_1/_2$ (~797.0 eV), junto con satélites bien definidos entre 785–790 eV. La posición y forma de estos picos confirman la presencia de $Co^{2+}$ en un entorno octaédrico o pseudotetraédrico, típicamente observado en ZIF-67. La presencia de satélites indica la

naturaleza paramagnética del $Co^{2+}$ de alto espín. En ZIF-L-Co, se observa un ligero corrimiento a menor energía, lo cual sugiere una menor coordinación del Co o la presencia de especies parcialmente oxidadas o defectos superficiales.

El análisis XPS confirma la presencia de los elementos constitutivos esperados en las estructuras ZIF, así como su correcta coordinación. Se evidencia que tanto el metal central como el ligando orgánico influyen directamente en la composición y química superficial de los materiales.

La presencia de oxígeno sugiere una superficie activa, potencialmente favorable para la interacción con especies reactivas, lo cual puede correlacionarse con su actividad antimicrobiana. Este análisis es fundamental para entender las diferencias entre los ZIFs sintetizados y su relación con el comportamiento observado en estudios posteriores, particularmente en aplicaciones donde la química superficial y la coordinación juegan un papel determinante en la reactividad del material.

Los materiales con $Co^{2+}$ presentan señales satelitales características de especies de alta espín, así como mayores señales de especies oxigenadas superficiales. Las muestras con $Zn^{2+}$ muestran una mayor homogeneidad superficial y un entorno tetraédrico más definido. El tipo de ligando (2-metilimidazol vs. bencimidazol) afecta tanto la simetría del N 1s como la riqueza de señales carbonadas, revelando diferencias en la densidad electrónica y la coordinación.

## 3.3 Evaluacion de la actividad antibacteriana

Los materiales ZIFs poseen propiedades intrínsecas que los hacen potencialmente efectivos como agentes antimicrobianos. Este capítulo evalúa su actividad bactericida frente a *E. coli y S. aureus*, mediante ensayos microbiológicos, fluorescencia para detección de ROS, daño genético por PCR, y observación morfológica por microscopía electrónica. Se comparan las distintas formulaciones para identificar los factores estructurales que influyen en el mecanismo de daño.

### 3.3.1 Ensayos de dilución seriada en agar

#### 3.3.1.1 *E. coli*

Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los materiales, se utilizó el método de dilución seriada, siguiendo las normas establecidas (ISO 20776-1:2019). Este proceso consistió en diluir una concentración inicial del material en un medio de cultivo inoculado con *E. coli*, y posteriormente cuantificar su efecto tras 3 y 24 horas mediante plaqueo, permitiendo determinar el porcentaje de inhibición bacteriana. Esta evaluación permitió calcular la eficiencia de cada material, identificando aquellos con mayor potencial bactericida.

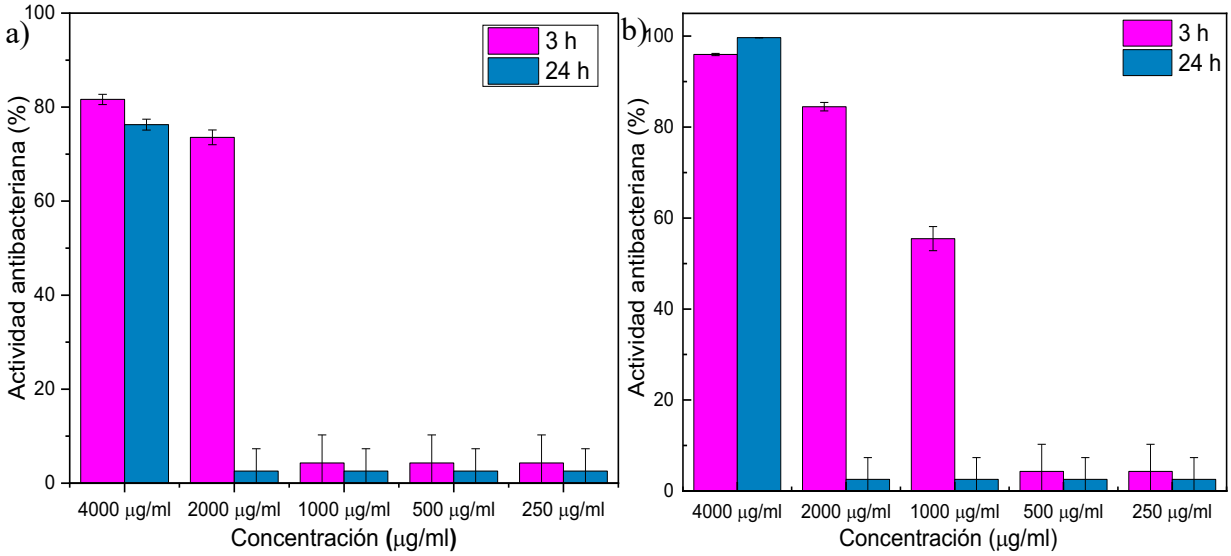



*Figura 25. Porcentaje de actividad antibacteriana de a)2MIm y b)BIm frente a E. coli a 3 y 24 h, mostrando la media ± desviación estándar.*

Inicialmente, se evaluó la contribución de los ligandos orgánicos por separado: 2-metilimidazol (2MIm) y benzimidazol (BIm), como se muestra en la Figura 25. Ambos compuestos presentaron una actividad antibacteriana limitada. En el caso del 2MIm, para alcanzar un 80% de inhibición a las 3 horas se requirieron concentraciones cercanas a 2000 µg/mL; sin embargo, dicha actividad prácticamente desapareció a las 24 horas. Por su parte, el BIm alcanzó una inhibición del 58% a las 3 horas a partir de 1000 µg/mL, aunque esta eficiencia no se mantuvo a las 24 horas. Solo a concentraciones más elevadas se observó cierta actividad residual. Estos resultados indican que los ligandos, por sí solos, no son eficaces como agentes antimicrobianos sostenidos en el tiempo.

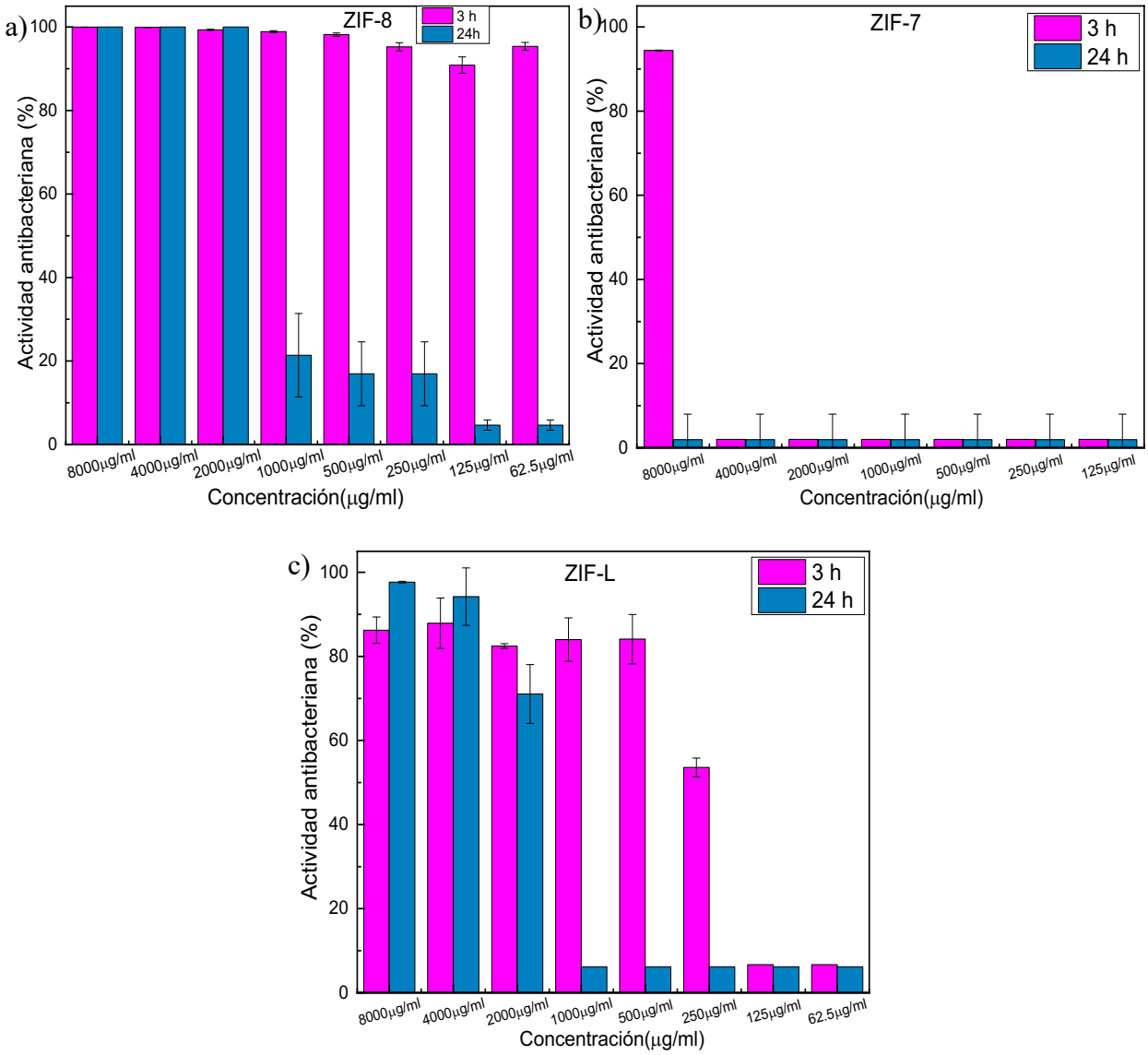



*Figura 26. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Zn-ZIFs: a) ZIF-8, b)ZIF-7 y c)ZIF-L frente a E. coli a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.*

En la figura 26 se muestra la eficiencia de los materiales que contienen Zn. El ZIF-8, conformado por Zn y 2MIm, presentó una alta eficiencia de actividad actibacteriana desde bajas concentraciones. A partir de 62.5 μg/mL y hasta concentraciones mas elevadas alcanzó un 95% de inhibición a las 3 horas, incrementando su eficiencia de manera progresiva con la concentración. A partir de 2000 μg/mL se observó una inhibición cercana al 100% tanto a las 3 como a las 24 horas, lo que sugiere una liberación sostenida de iones $Zn^{2+}$ y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En contraste, el ZIF-7 (Zn y BIm) mostró una actividad prácticamente nula, requiriendo una concentración muy elevada (8000 µg/mL) para observar un efecto antibacteriano significativo, únicamente a las 3 horas. Esta actividad desapareció a las 24 horas, por lo que se descartó como material viable contra *E. coli*.

El ZIF-L-Zn, con la misma composición química que ZIF-8 pero distinta morfología (laminar), presentó actividad antibacterial a las 3 horas en concentraciones de 250 µg/mL. Sin embargo, esta eficacia no se sostuvo en el tiempo, disminuyendo significativamente a las 24 horas, lo cual indica una liberación limitada o no sostenida de $Zn^{2+}$.

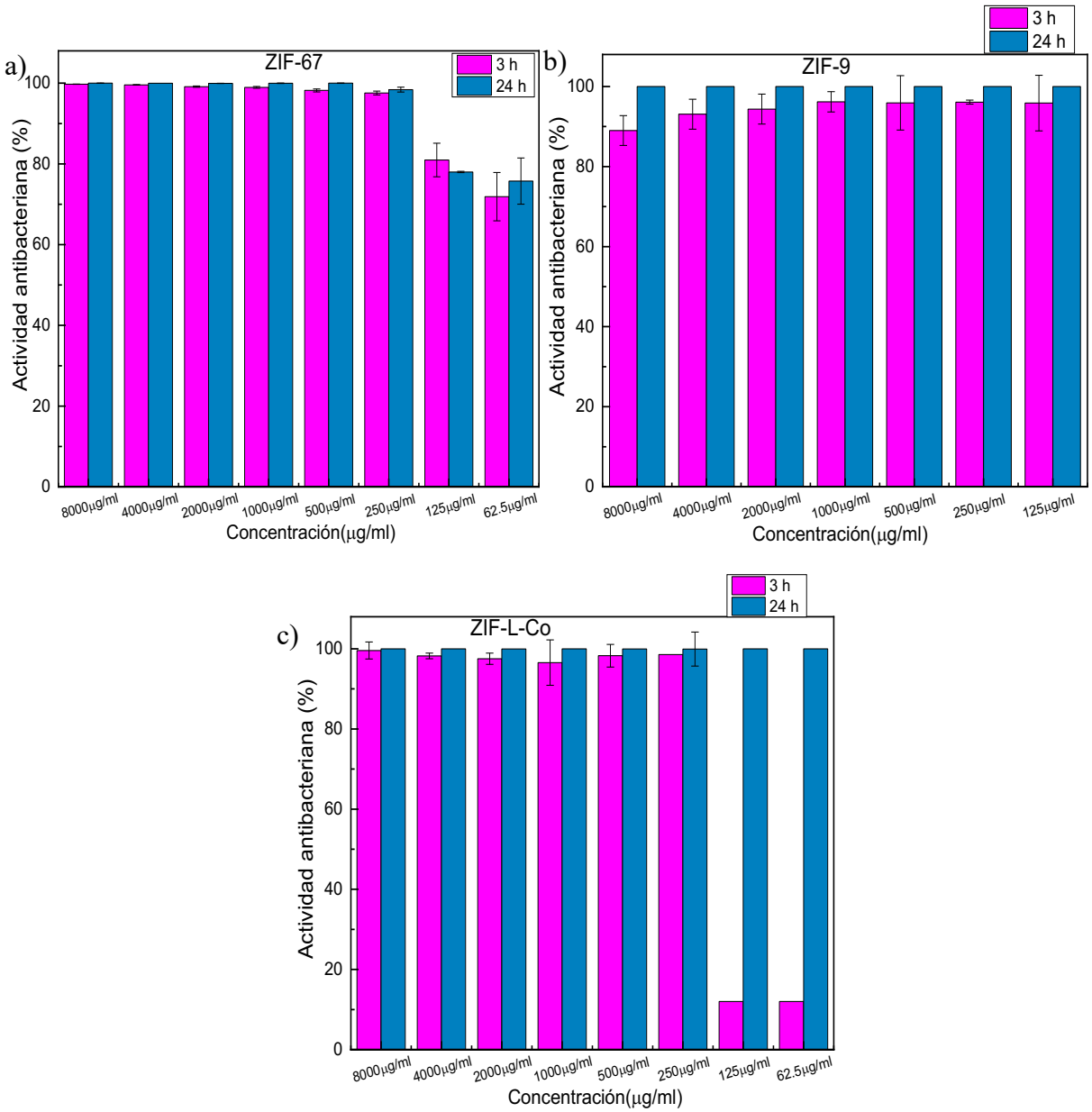



*Figura 27. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Co-ZIFs: a)ZIF-67, b)ZIF-9 y c)ZIF-L-Co frente a E. coli a 3 y 24 h, mostrando la media ± desviación estándar.*

En la Figura 27, se observa que los materiales basados en Co mostraron un desempeño notablemente superior. ZIF-67 (Co y 2MIm) presentó actividad significativa desde 62.5 µg/mL, manteniendo eficiencias altas (80–100%) tanto a las 3 como a las 24 horas. Esta respuesta se asocia con la mayor capacidad de los materiales con Co para generar ROS, además de una liberación más eficaz y sostenida de iones metálicos.

ZIF-9 (Co y BIm) también presentó una actividad destacada. A pesar de contener un ligando menos eficaz (BIm), el material logró una inhibición superior al 95% desde las concentraciones mínimas, tanto a las 3 como a las 24 horas. Este comportamiento resalta el papel del metal en la eficacia antibacteriana, incluso por encima del efecto del ligando.

ZIF-L-Co, con morfología laminar y compuesto por Co y 2MIm, exhibió una eficiencia del 100% a 24 horas desde 62.5 µg/mL. Aunque su eficacia inicial (3 horas) a concentraciones mínimas fue más baja, se incrementó significativamente con el tiempo, lo que indica una liberación controlada de $Co^{2+}$.

De forma general, los materiales que contienen Co mostraron una mayor eficacia antibacteriana sostenida en el tiempo, en comparación con sus equivalentes con Zn. La sinergia entre el tipo de metal, el ligando y la morfología del material afecta directamente la actividad bactericida.

Los resultados del análisis cinético in vitro muestran que solo los ZIFs con Co (ZIF-67, ZIF-9, ZIF-L-Co) lograron mantener una actividad cercana al 100% después de 24 horas, lo cual se atribuye a su estabilidad coloidal, su morfología favorable y su capacidad para liberar $Co^{2+}$ de manera controlada, favoreciendo un ambiente oxidativo en el medio de cultivo.

En conclusión, los ZIFs síntetizados basados en Co son prometedores agentes antimicrobianos contra *E. coli*, con una respuesta efectiva a corto y largo plazo. La selección del ligando, el metal y la morfología permite optimizar las propiedades antibacterianas, abriendo la posibilidad de desarrollar nanomateriales más eficientes para aplicaciones biomédicas o ambientales.

### *3.3.1.2 S. aureus*

De acuerdo con la literatura, la evaluación de materiales con potencial antibacteriano debe considerar tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas, debido a sus diferencias estructurales. Por tal motivo, se evaluó la actividad de los materiales sintetizados frente a *S. aureus*, una bacteria Gram positiva que representa un modelo escencial en estudios antimicrobianos.

Al igual que en el caso de *E. coli*, inicialmente se estudiaron los ligandos utilizados en la síntesis de los ZIFs, 2MIm y BIm, con el objetivo de identificar si presentaban actividad antibacteriana por sí solos. El ligando 2MIm no mostró actividad antibacteriana a ninguna concentración, ni a corto (3 h) ni a largo plazo (24 h), lo cual lo descarta como agente antimicrobiano independiente. En contraste, el ligando BIm presentó actividad a concentraciones elevadas (≥2000 µg/mL), logrando una eficiencia del 80-100% a las 3 horas, y manteniendo esta eficacia a 24 horas sólo a concentraciones aún mayores.

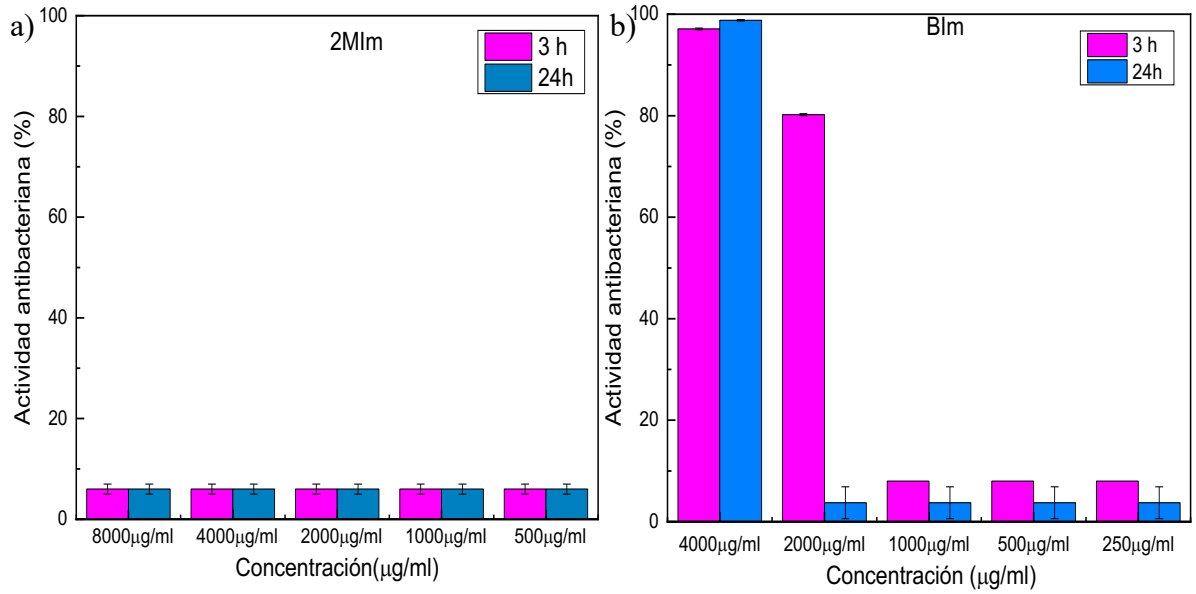



*Figura 28. Procentaje de actividad antibacteriana de a)2MIm y b)BIm frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.*

En la Figura 29 se observa que el ZIF-8 (2MIm y Zn) presentó una actividad antibacteriana moderada a corto plazo, alcanzando eficiencias cercanas al 50% a las 3 horas desde concentraciones de 250 µg/mL. Sin embargo, dicha eficiencia disminuyó significativamente a las 24 horas, requiriéndose al menos 2000 µg/mL para mantener

una actividad aceptable (68%), incrementándose progresivamente con la concentración. Este comportamiento sugiere que la liberación inicial de iones $Zn^{2+}$ es suficiente para inducir daño bacteriano, pero no se mantiene de manera sostenida en el tiempo.

El ZIF-7 (BIm y Zn) mostró una eficiencia del 100% contra *S. aureus* a las 3 horas desde concentraciones de 125 µg/mL. No obstante, esta actividad no se mantuvo a 24 horas, lo que limita su efectividad como bactericida prolongado. Este comportamiento puede deberse a la baja solubilidad o a la limitada liberación iónica en medios acuosos.

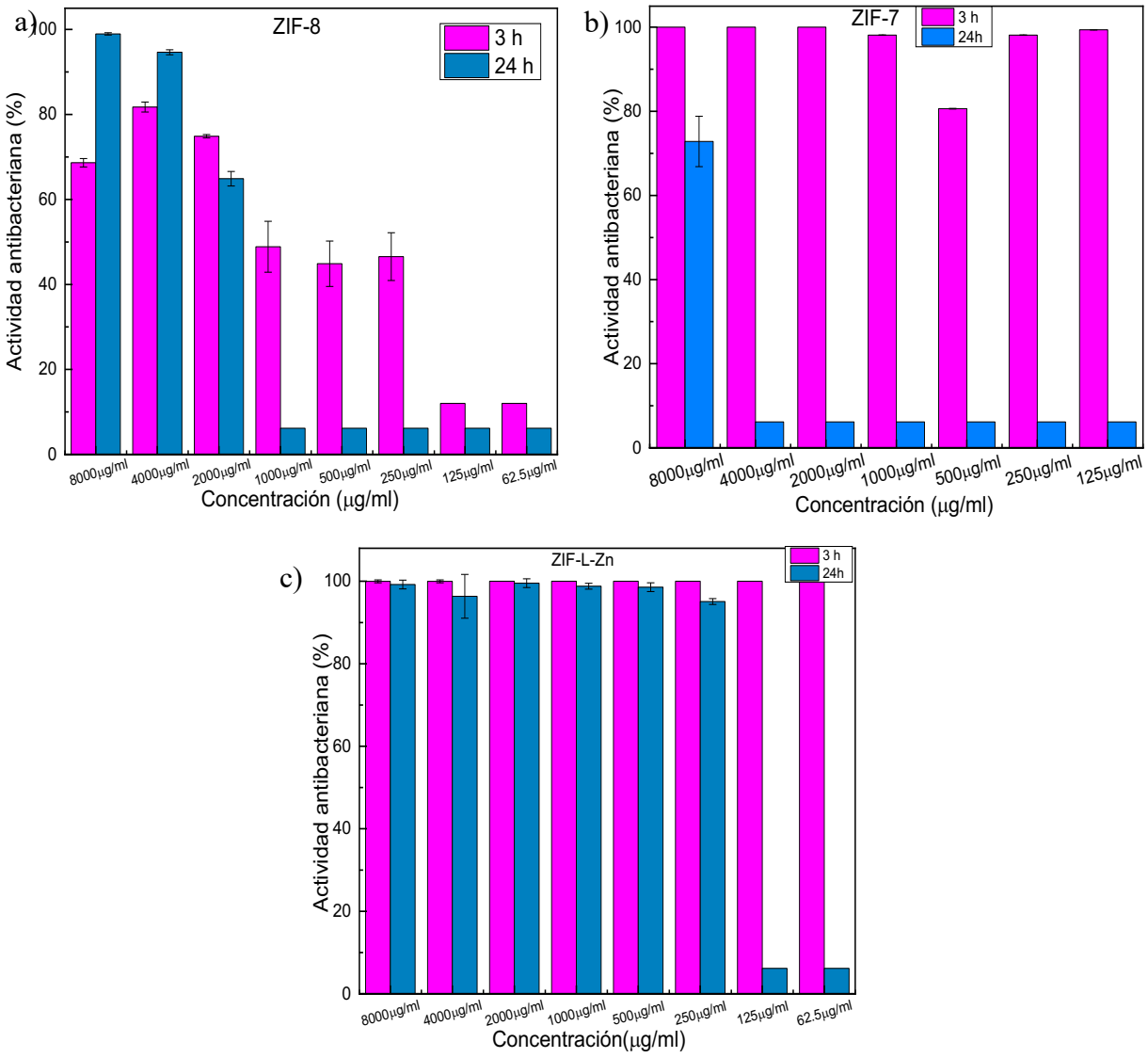



*Figura 29. Porcentaje de actividad antibacteriana de materiales Zn-ZIFs: a)ZIF-8, b)ZIF-7 y ZIF-L frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.*

El ZIF-L-Zn, con la misma composición química que el ZIF-8 pero distinta morfología, mostró una eficiencia del 100% a 3 horas con tan solo 62.5 µg/mL, y logró mantener su eficacia a 24 horas desde los 250 µg/mL. Este resultado sugiere que la morfología laminar favorece una mejor interacción con la bacteria, permitiendo una liberación más constante de iones $Zn^{2+}$ o un mayor contacto superficial.

Por otra parte, en la figura 30 se observan las gráficas correspondientes al ZIF-67 (2MIm y Co), este también presentó una actividad inicial elevada a bajas concentraciones (100% a las 3 horas). Sin embargo, a las 24 horas la eficiencia disminuyó drásticamente, alcanzando apenas un 60% incluso a concentraciones altas (4000 mg/mL). Esta pérdida de actividad puede deberse a la rápida saturación del medio con iones $Co^{2+}$ o a un colapso estructural del material.

En cambio, el ZIF-9 (BIm y Co) fue el material que mostró el mejor desempeño frente a *S. aureus*. Desde bajas concentraciones, presentó una eficiencia del 100% tanto a corto como a largo plazo, lo que lo posiciona como el candidato más prometedor. La combinación del ligando BIm con el metal Co, junto con su estructura porosa, podría favorecer una liberación sostenida de $Co^{2+}$ y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo a su alto poder bactericida.

El ZIF-L-Co, con morfología laminar, mostró un comportamiento similar al ZIF-L-Zn. A las 3 horas, alcanzó una eficiencia del 100% desde 62.5 µg/mL, pero a las 24 horas, la eficiencia disminuyó hasta un 50% a 125 µg/mL, manteniéndose únicamente a concentraciones mayores. Esta variabilidad sugiere una liberación inicial rápida de $Co^{2+}$, seguida de una reducción en su efectividad a medida que disminuye la disponibilidad de especies activas.

Los resultados obtenidos confirman que la actividad bactericida de los materiales tipo ZIF está determinada por una interacción sinérgica entre el tipo de ligando orgánico, el ion metálico de coordinación y la morfología estructural del material.

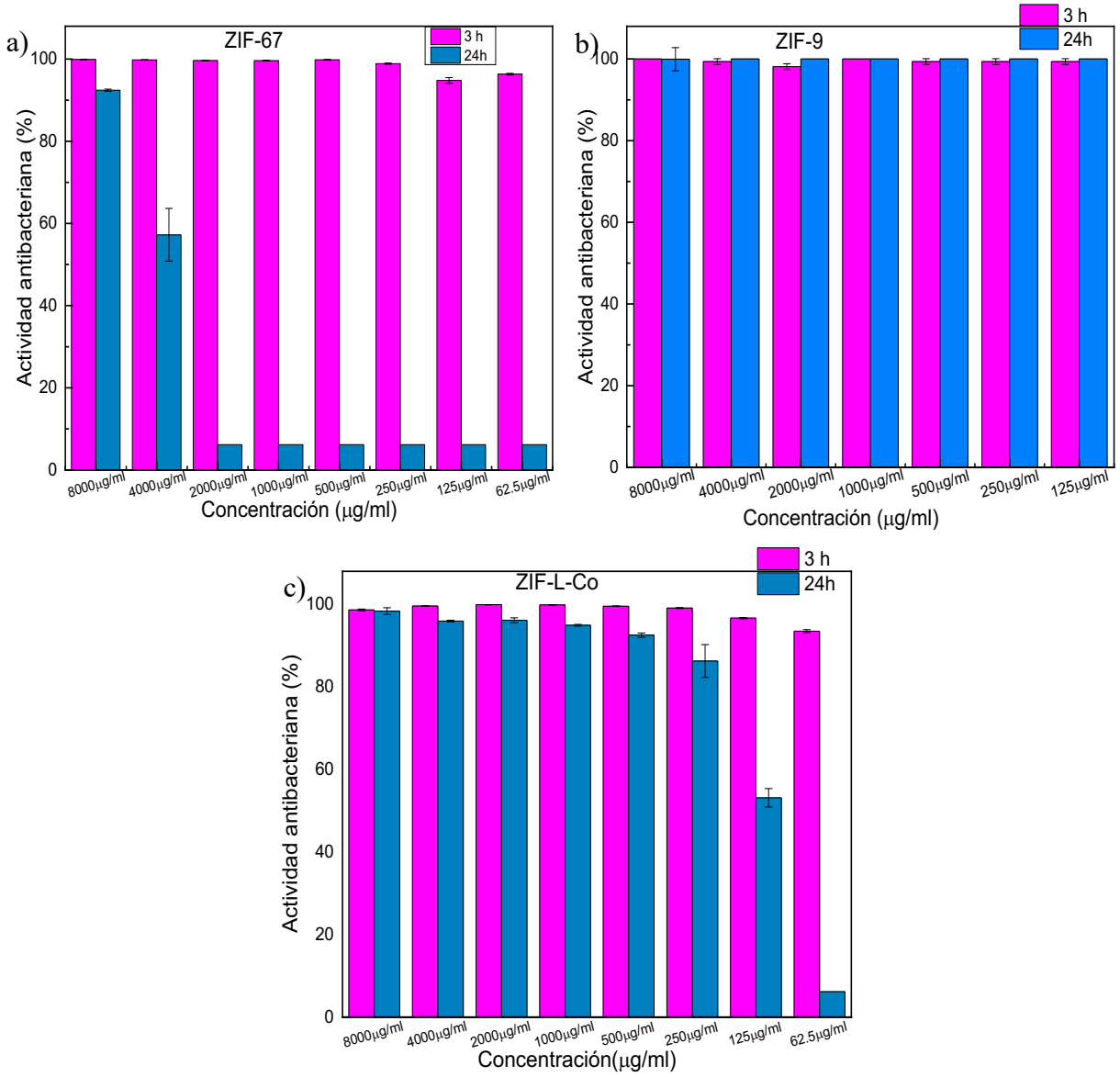



*Figura 30. Porcentaje de actividad antibacteriana de Co-ZIFs de a)ZIF-67, b)ZIF-9 y c)ZIF-L-Co frente a S. aureus a 3 y 24h, mostrando la media ± desviación estándar.*

Los materiales basados en Zn (ZIF-8 y ZIF-L-Zn) mostraron eficacia principalmente a corto plazo, con una disminución de su actividad tras 24 horas, lo que sugiere una liberación inicial de $Zn^{2+}$ que no se mantiene de forma sostenida. La comparación entre el ZIF-8 y el ZIF-L-Zn revela que la morfología laminar favorece una liberación más constante de iones metálicos o un mayor contacto con la superficie bacteriana, prolongando moderadamente su actividad bactericida, en línea con lo reportado en estudios previos sobre el papel de la morfología en la funcionalidad de los ZIFs.

Por otro lado, los materiales con Co como centro metálico (ZIF-67, ZIF-9, ZIF-L-Co) demostraron mayor eficacia antimicrobiana sostenida en el tiempo. Este comportamiento se ha reportado previamente en la literatura, destacándose que los ZIFs basados en Co exhiben mayor efectividad bactericida frente a diversas cepas debido a su capacidad de liberar $Co^{2+}$ de forma controlada y generar un ambiente oxidante, resultados que se confirman en este estudio.

La combinación BIm–Co y una estructura microporosa, demostró el mejor desempeño frente a ambas bacterias, superando incluso al ZIF-67 y ZIF-L-Co, lo que se alinea con reportes en la literatura que atribuyen a estos sistemas la capacidad de mantener ambientes oxidativos prolongados mediante liberación sostenida de $Co^{2+}$ y generación de ROS, maximizando la actividad antimicrobiana, incluso a bajas concentraciones.

Estos hallazgos confirman la sinergia existente entre el tipo de ligando, la naturaleza del ion metálico y la morfología estructural del material en la modulación de su actividad bactericida. Específicamente, la combinación BIm–Co y las morfologías laminares resultaron ser estrategias efectivas para prolongar la actividad antimicrobiana, en concordancia con los mecanismos de acción descritos en la literatura [98], donde los materiales con alta área superficial y poros accesibles facilitan la interacción con las bacterias y potencian la liberación controlada de iones metálicos.

En este contexto, los materiales tipo ZIF basados en cobalto, con una adecuada selección del ligando orgánico y control morfológico, surgen como candidatos altamente prometedores, capaces de mantener una eficacia prolongada y sostenida frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas para el desarrollo de sistemas antimicrobianos avanzados con aplicaciones biomédicas y ambientales, siendo de particular interés evaluar su desempeño en sistemas electroquímicos en operando, para correlacionar la liberación de especies iónicas y la generación de ROS con la actividad bactericida observada, fortaleciendo su potencial en estrategias de control de infecciones y desinfección sostenible.

### *3.3.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)*

El estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) permitió cuantificar de forma precisa la eficacia antimicrobiana de los distintos materiales ZIF frente a dos bacterias modelo: *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva). Los resultados mostraron que tanto ZIF-67 como ZIF-L-Co poseen una actividad antimicrobiana significativamente superior en comparación con sus ligandos individuales, lo cual sugiere un papel relevante del ensamblaje metal-ligando en la funcionalidad biológica de los ZIFs.

ZIF-67 y ZIF-L-Co presentaron los valores más bajos de CMI frente a *E. coli*, con tan solo 62.5 µg/mL, mientras que ZIF-9 mostró una actividad moderada con un CMI de 125 µg/mL. Estos valores contrastan marcadamente con los requeridos para los ligandos por separado, 2MIm y BIm, que exhibieron CMI superiores a 4000 µg/mL, reflejando que el ensamblaje ZIF potencia la actividad biológica mediante una sinergia entre el centro metálico ($Co^{2+}$ o $Zn^{2+}$) y el entorno orgánico poroso.

Respecto a la actividad frente a *S. aureus*, se observó un comportamiento diferencial. ZIF-9 y ZIF-L-Co mostraron CMI de 0.125 mg/mL, lo que indica una eficiencia elevada incluso frente a bacterias Gram positivas, tradicionalmente más resistentes a materiales antimicrobianos. Por el contrario, ZIF-8 y ZIF-L-Zn fueron más efectivos frente a *S. aureus* que frente a *E. coli*, lo cual sugiere un posible mecanismo selectivo en función de la pared celular bacteriana.

El análisis comparativo entre CMI y CMB también es revelador. Para ZIF-L-Co, se observó una relación CMI/CMB cercana a 1 en ambas bacterias, lo que indica un efecto bactericida directo sin necesidad de concentraciones significativamente más altas. Esto refuerza la hipótesis de que este material no solo inhibe el crecimiento, sino que induce daño irreversible a la estructura celular bacteriana, posiblemente por generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), liberación de iones metálicos o interacción directa con la membrana celular.

*Tabla 7. Concentración minima inhibitoria (CMI) y Concentración mínina bactericida (CMB) de los materiales ZIFs y de los ligandos orgánicos.*

| Bacteria/ | *E. coli* | | *S. aureus* | |
|---|---|---|---|---|
| Material | CMI (mg/mL) | CMB (mg/mL) | CMI (mg/mL) | CMB (mg/mL) |
| ZIF-8 | 2 | 4 | 1 | 2 |
| ZIF-67 | 0.0625 | 0.25 | 4 | 8 |
| ZIF-L-Zn | 2 | 4 | 0.25 | 0.25 |
| ZIF-L-Co | 0.0625 | 0.0625 | 0.125 | 0.25 |
| ZIF-7 | - | - | 8 | 8 |
| ZIF-9 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| 2MIm | 4 | 4 | - | - |
| BIm | 4 | 4 | 4 | 4 |

Además, ZIF-67 mostró un mayor rango de eficacia frente a *E. coli* (CMI de 62.5 µg/mL y CMB de 250 µg/mL), lo que podría deberse a la interacción diferencial del $Co^{2+}$ con la membrana bacteriana externa, favoreciendo la penetración del material o la catálisis de reacciones redox generadoras de estrés oxidativo.

Finalmente, cabe destacar que ZIF-7 no mostró actividad frente a *E. coli* y presentó actividad limitada frente a *S. aureus*, lo que puede explicarse por su diferente estructura cristalina y porosidad, o por la naturaleza del metal (Zn) y ligando (BIm), que podrían reducir su biodisponibilidad o reactividad en medios biológicos, tabla 7.

### 3.3.3 Evaluación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante fluorescencia.

La generación de ROS en *E. coli* inducida por los materiales ZIF se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el Total ROS Assay Kit 520 nm (Invitrogen), el cual permite la detección global de ROS intracelulares como radicales superóxidos, peróxidos y radicales hidroxilos. Este kit se basa en una sonda fluorescente sensible a ROS que es inicialmente no fluorescente, pero que al reaccionar con las especies reactivas generadas dentro de las bacterias se oxida, emitiendo fluorescencia con un máximo de emisión alrededor de 520 nm (verde) cuando se excita a 488 nm. Este principio permite cuantificar y visualizar de forma directa la generación de ROS en células

vivas, siendo una herramienta eficaz para correlacionar la actividad bactericida de los materiales con el estrés oxidativo inducido.

Para el ensayo, las bacterias fueron incubadas con los ZIFs seleccionados durante 3 horas a las concentraciones previamente establecidas. Tras la incubación, las muestras se tiñeron con el reactivo del kit siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, permitiendo que la sonda se internalizara y reaccionara con los ROS generados.

La cuantificación de la señal fluorescente se realizó utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia, midiendo la intensidad de fluorescencia a 520 nm, lo que permitió establecer de forma comparativa los niveles de ROS generados en presencia de cada material. Finalmente, las muestras se observaron mediante microscopía de fluorescencia, permitiendo visualizar de manera directa la presencia y distribución de ROS en las bacterias tratadas. Esta metodología permitió confirmar si la actividad bactericida observada en los ensayos previos correlaciona con la generación de estrés oxidativo intracelular inducido por los ZIFs, proporcionando una base para comprender mejor los mecanismos de acción antimicrobiana de estos materiales y su potencial en aplicaciones de control bacteriano avanzado.

En la figura 31 se presentan los espectros de fluorescencia de *E. coli* después del tratamiento con ZIF-67 y ZIF-9 a diferentes concentraciones, incluyendo las micrografías correspondientes a la detección de ROS.

Los resultados muestran que el ZIF-9 a una concentración de 0.125 mg/mL generó una señal fluorescente intensa, indicativa de una elevada producción de ROS intracelulares. Sin embargo, al incrementar la concentración a 0.25 mg/mL, la intensidad de fluorescencia disminuyó de manera notable, lo que sugiere una reducción en la generación de ROS en la bacteria (Figura 31a,b). Este comportamiento indica que, a concentraciones elevadas, el ZIF-9 podría inducir un ambiente fuertemente prooxidante que contribuye de manera determinante a su efecto bactericida, mientras que a concentraciones menores el efecto se limita a la inducción de estrés oxidativo

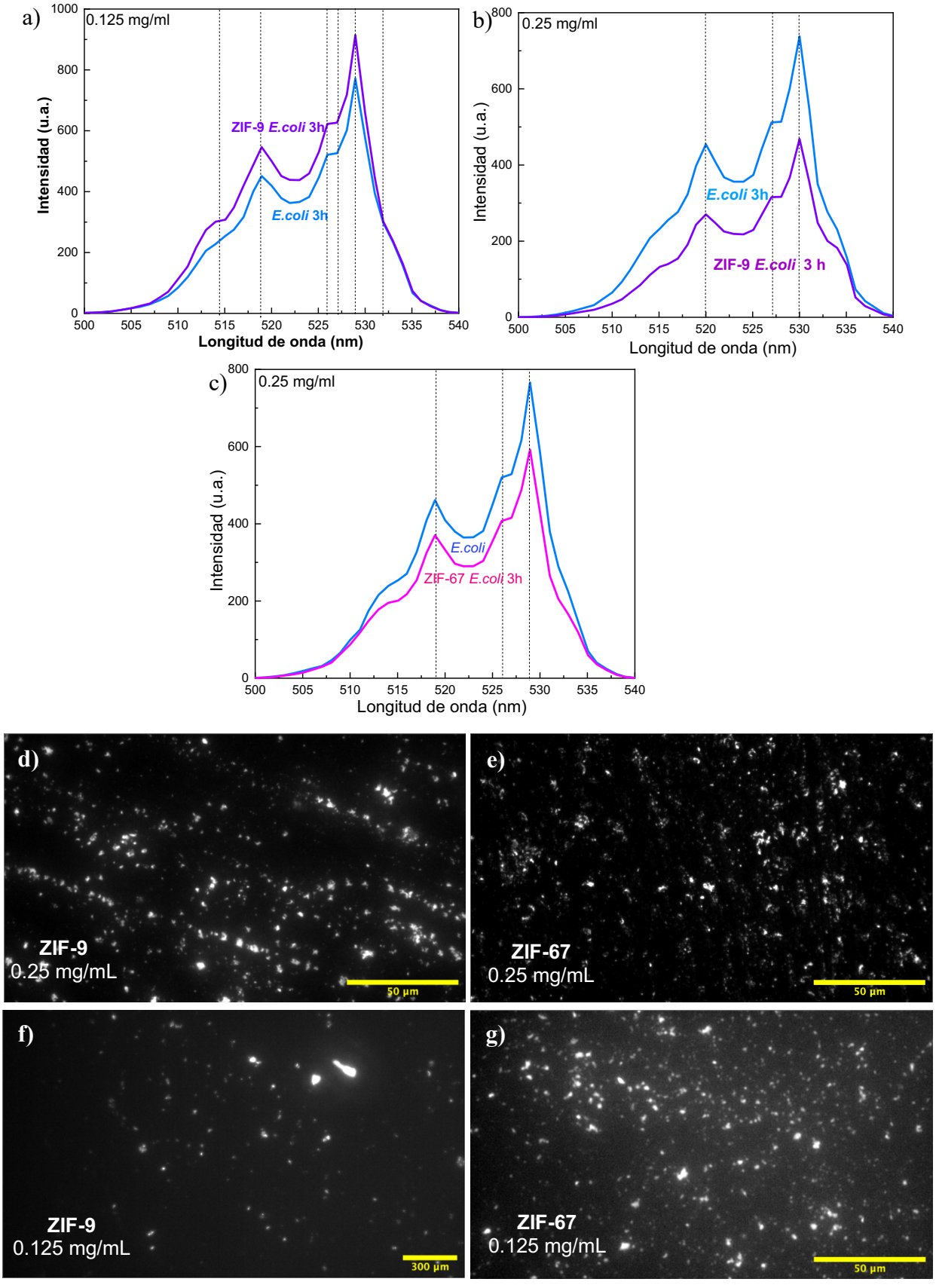



*Figura 31. Espectroscopía de fluorescencia de a)ZIF-9(0.125 mg/mL) b)ZIF-9(0.25 mg/mL), c) ZIF-67 (0.25 mg/mL) y microscopía de fluorescencia d)ZIF-9(0.25 mg/mL), e)ZIF-67(0.25 mg/mL), f) ZIF-9 (0.125 mg/mL) y g)ZIF-67 (0.125 mg/mL).*

Por otro lado, el ZIF-67 a 0.25 mg/mL mostró una mayor intensidad de fluorescencia (Figura 31c) en comparación con el ZIF-9 a la misma concentración, donde la señal se redujo. Esta disminución de fluorescencia en el caso del ZIF-9 sugiere que su acción bactericida es más rápida, reduciendo la viabilidad de *E. coli* antes de que se acumule una cantidad significativa de ROS detectable, lo que limita la fluorescencia observada en las células muertas.

Las micrografías de fluorescencia (Figura 31d–g) complementan estos resultados al mostrar la generación de ROS intracelulares tras 1 h de exposición. En el caso del ZIF-9 a 0.125 mg/mL (Figura 31f), se observa una distribución fluorescente que indica acumulación de ROS; sin embargo, esta micrografía se obtuvo con una amplificación distinta, por lo que su intensidad no es directamente comparable con las demás. Aun así, los resultados sugieren que a bajas concentraciones el ZIF-9 induce un estrés oxidativo en bacterias viables, sin provocar una pérdida inmediata de viabilidad.

En contraste, al incrementar la concentración de ZIF-9 a 0.25 mg/mL (Figura 31d), la fluorescencia aparece menos intensa y más dispersa, lo que puede atribuirse a un efecto bactericida rápido que limita la acumulación de ROS en células inviables.

El comportamiento del ZIF-67 difirió de manera clara. A 0.125 mg/mL (Figura 31g), la fluorescencia fue intermedia respecto al ZIF-9 en la misma concentración, lo que sugiere inducción de ROS pero acompañada de un efecto citotóxico más acelerado. Este patrón se acentuó a 0.25 mg/mL (Figura 31e), donde la señal fluorescente fue mínima, indicando que el ZIF-67 ejerce un efecto bactericida directo, posiblemente asociado con la liberación de iones $Co^{2+}$ y daño estructural en membranas, más que con acumulación intracelular de ROS.

En conjunto, estos resultados evidencian la existencia de una ventana óptima de concentración en la cual la generación de ROS es máxima antes de que la acción bactericida reduzca la viabilidad celular y, por ende, la fluorescencia detectable. Asimismo, se confirma que la generación de ROS no sigue una relación lineal con la concentración del material, sino que responde a una interacción compleja entre concentración, tiempo de exposición y viabilidad bacteriana.

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el mecanismo bactericida de los ZIFs está estrechamente vinculado con la inducción de ROS, contribuyendo al daño oxidativo de

ADN, lípidos y proteínas, y comprometiendo así la viabilidad bacteriana. Además, reafirman que la combinación de ligando orgánico, composición metálica y concentración modulan de manera decisiva la generación de ROS y el efecto bactericida. Este comportamiento concuerda con reportes previos [18], [19], [32], que destacan a los materiales basados en cobalto como generadores más eficientes de ROS y con una mayor actividad antimicrobiana sostenida.

[redacted]

[redacted]

[redacted]

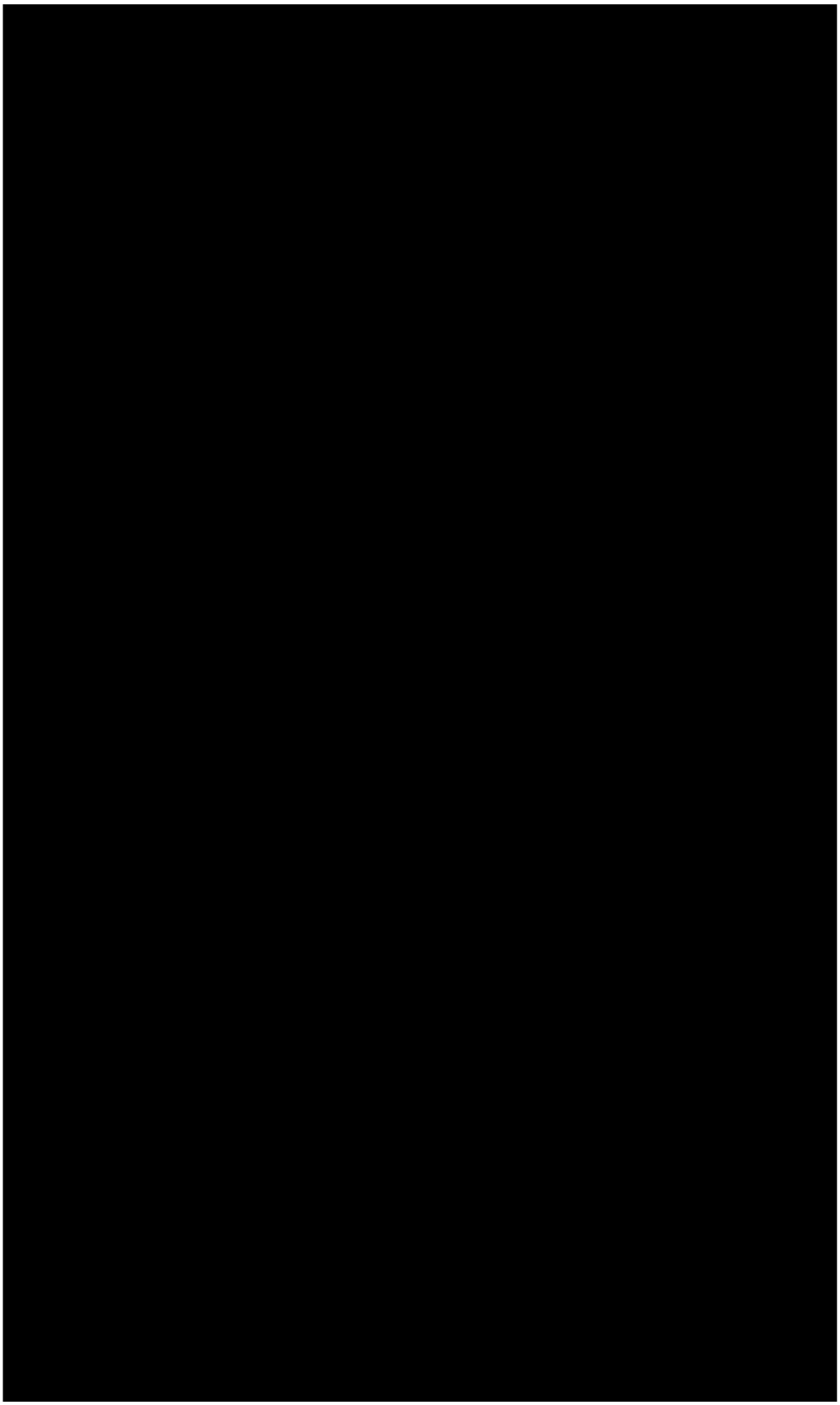
[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

*Tabla 8. Distribución de bandas generada por los 7 oligonucleótidos y su respectivo peso molecular.*



[redacted]

*Figura 33. Micrografía de a) S. aureus control, b)ZIF-67 + S.aureus, c) ZIF-9 + S.aureus y d) ZIF-L-Co + S. aureus durante 1h..*

## 3.4 Evaluación electroquímica de ZIFs/N-NTCG para detección de $H_2O_2$

Para avanzar en la comprensión de la relación entre la actividad antimicrobiana de los ZIFs y su capacidad para inducir y detectar ROS, se llevó a cabo la evaluación electroquímica de seis estructuras tipo ZIF soportadas en N-NTCG. Este análisis se realizó con el objetivo de identificar la capacidad de estos materiales para detectar $H_2O_2$ como un marcador indirecto del estrés oxidativo que inducen en bacterias. Asimismo, la evaluación electroquímica permitió discernir cuál de los ZIFs presentaba un desempeño catalítico superior, con alta área superficial y accesibilidad de sitios activos, características necesarias para ser sometido a calcinación controlada con el fin de potenciar sus propiedades electrocatalíticas. Esta estrategia no sólo integra la síntesis y el diseño de materiales avanzados con aplicaciones analíticas, sino que también permite establecer una relación directa entre la estructura, la actividad antimicrobiana y el comportamiento electroquímico de los ZIFs.

### 3.4.1 Voltamperometría cíclica (VC)

Los voltamogramas cíclicos (VC) obtenidos para las diferentes estructuras ZIFs soportadas sobre N-NTCG revelaron diferencias marcadas en la respuesta electroquímica frente a $H_2O_2$, reflejando la influencia de su composición metálica, estructura cristalina y accesibilidad de los sitios activos sobre el proceso redox.

ZIF-67/N-NTCG presentó las corrientes de reducción más intensas y una clara dependencia con la concentración de $H_2O_2$, indicando una alta actividad electrocatalítica. Este comportamiento se atribuye a la presencia de cobalto como centro metálico, que participa en procesos de reducción de $H_2O_2$, facilitando la transferencia de electrones en el rango de potencial evaluado (–0.7 a 0.5 V vs Ag/AgCl).

La estructura sodalita (SOD) del ZIF-67, con alta área superficial y poros accesibles, favorece el transporte de $H_2O_2$ hacia los sitios activos. Además, la combinación con N-NTCG mejora la conductividad eléctrica, favoreciendo la transferencia de carga en la interfase electrodo/electrolito.

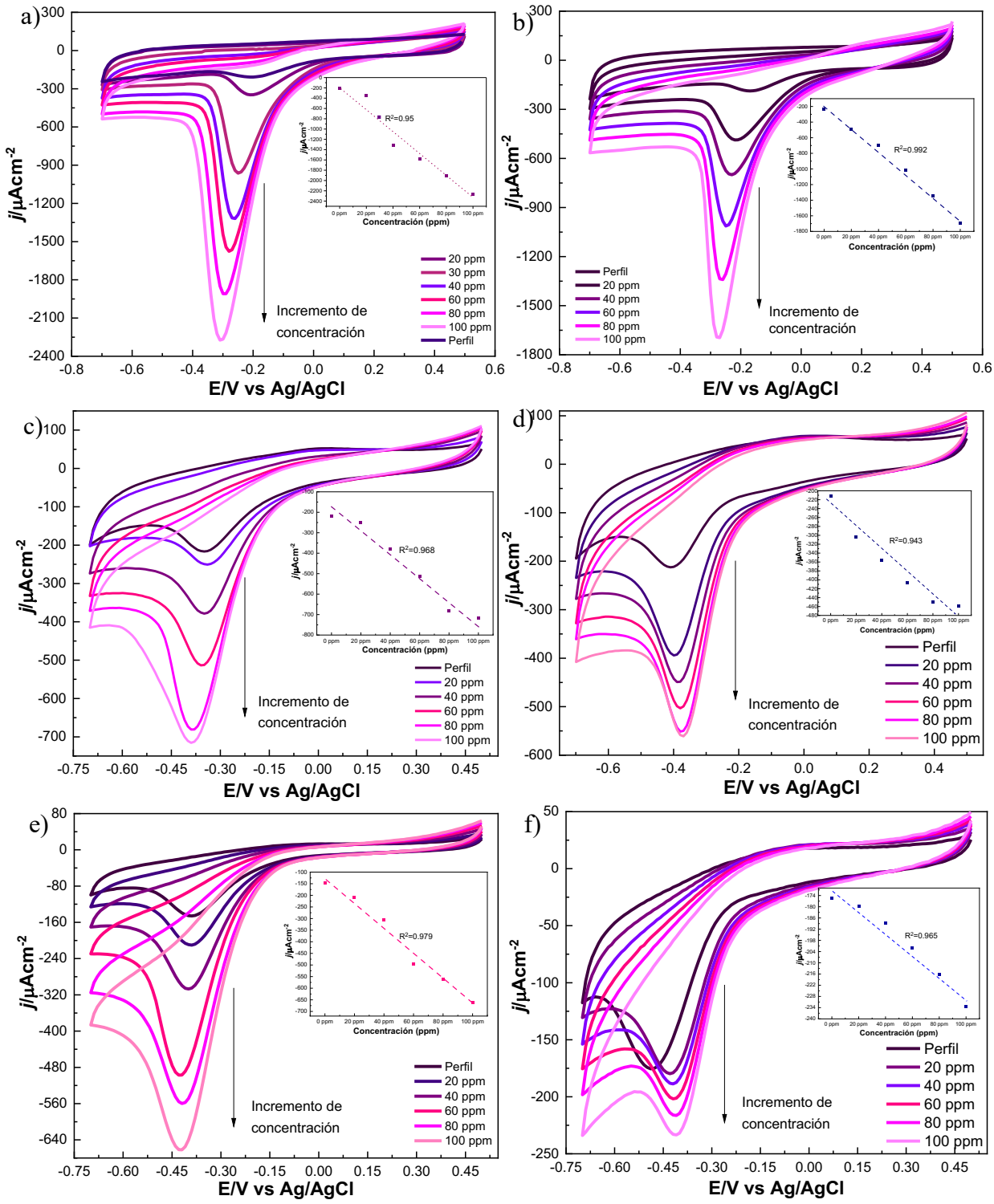



*Figura 34. Voltamperometría cíclic, con adiciones de 20-100 ppm de $H_2O_2$, a) ZIF-67, b) ZIF-8, c) ZIF-9, d) ZIF-7, e) ZIF-L-Co y f) ZIF-L con N-NTCG.*

ZIF-8/N-NTCG, en contraste, mostró corrientes de reducción significativamente más bajas, incluso a concentraciones elevadas de $H_2O_2$.

ZIF-L-Co/N-NTCG, aunque contiene cobalto, presentó una respuesta electroquímica inferior a ZIF-67/N-NTCG. Este comportamiento se relaciona con su morfología laminar, que limita la difusión del analito hacia los sitios activos metálicos, y con una menor exposición superficial del cobalto, reduciendo así la densidad de sitios catalíticos accesibles.

En el caso de ZIF-9/N-NTCG, ZIF-7/N-NTCG y ZIF-L/N-NTCG, se observaron las corrientes de reducción más bajas entre todos los materiales evaluados, con escasa dependencia de la concentración de $H_2O_2$. Este comportamiento se asocia con limitaciones estructurales derivadas de su menor área superficial accesible, distribución desfavorable de los sitios activos y posible bloqueo por productos de reacción o especies adsorbidas durante la reducción de $H_2O_2$. La irreversibilidad observada en los voltamogramas sugiere la formación de productos intermedios fuertemente adsorbidos, como radicales hidroxilo, que pueden bloquear los sitios catalíticos y limitar el ciclo redox.

Todos los materiales presentaron un comportamiento característico de reducción irreversible, sin picos anódicos de retorno definidos, lo que indica un mecanismo de reducción de $H_2O_2$ sin reversión electroquímica, como el siguiente:

1. $H_2O_2 + e^- \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^-$
2. ${}^{\bullet}OH + e^- \rightarrow OH^-$
3. $OH^-_{(ads)} + H^+(\text{libre}) \rightarrow H_2O\ (\text{libre}) + \text{sitio libre}$

Este comportamiento coincide con lo reportado en materiales de tipo Co-N-C y ZIFs [21], [71], [74], donde la reducción de $H_2O_2$ ocurre sobre sitios activos de cobalto o defectos dopados con nitrógeno en la estructura carbonosa, gracias a la versatilidad del $Co^{2+}$ en procesos redox y la alta conductividad del material cuando se combina con nanotubos de carbono dopados.

La interpretación de las corrientes observadas también permite inferir la eficiencia catalítica de cada material, donde la pendiente de la corriente pico frente a la concentración de $H_2O_2$ se puede asociar a la sensibilidad del sistema. ZIF-67/N-NTCG mostró pendientes altas y lineales, indicando alta sensibilidad y eficiencia en la transferencia de electrones, mientras que en ZIF-8/N-NTCG y otros materiales, la pendiente fue baja y poco lineal, reflejando baja actividad y una cinética limitada.

Este análisis respalda la selección de ZIF-67/N-NTCG como candidato prioritario para calcinación controlada y transformación en Co-N-C/N-NTCG, con el fin de potenciar su actividad electrocatalítica hacia $H_2O_2$, integrando su actividad antimicrobiana previa con su funcionalidad analítica en sistemas *in operando* para la detección de ROS en bacterias.

En conclusión, los resultados obtenidos mediante voltametría cíclica no solo evidencian diferencias en la actividad electrocatalítica de cada material, sino que proporcionan información valiosa sobre el mecanismo de interacción con $H_2O_2$, la accesibilidad de sitios activos y el impacto de la estructura y morfología en la respuesta analítica, aspectos fundamentales para el diseño racional de electrocatalizadores derivados de ZIFs con aplicaciones en el monitoreo electroquímico del estrés oxidativo bacteriano.

### 3.4.2 Voltamperometria de pulso diferencial (DPV)

Los análisis mediante DPV permitieron una evaluación más sensible y precisa de la respuesta faradaica de los materiales frente a $H_2O_2$, especialmente útil en sistemas con señales bajas o cercanas al ruido, como es el caso de algunos ZIFs con baja actividad catalítica.

En la figura 35 se presentan los voltamperogramas obtenidos para ZIF-67 y ZIF-8 soportados en N-NTCG ante incrementos progresivos en la concentración de $H_2O_2$. Se observa que ambos materiales presentan un aumento notable en la corriente pico con el incremento de la concentración, siendo más marcado en el caso de ZIF-67, lo que confirma su mayor actividad electrocatalítica frente a la reducción de $H_2O_2$.

Previo al aumento en la corriente reductiva, se aprecia un pequeño incremento en la línea base, el cual puede atribuirse a un proceso de adsorción del $H_2O_2$ sobre la superficie activa del material. Esta etapa de preadsorción indica que existe una interacción específica entre el analito y los sitios catalíticos del ZIF, posiblemente mediante coordinación con los centros metálicos o atrapamiento en la estructura porosa.

Asimismo, se detectó un desplazamiento en el potencial pico de reducción conforme aumenta la concentración de $H_2O_2$, lo que sugiere que el sistema no sólo responde en magnitud de corriente, sino también en términos de cinética y termodinámica del proceso

redox. Este comportamiento indica la participación de reacciones redox más complejas, posiblemente asociadas con la transferencia de más de un electrón o con la formación de especies intermedias como radicales hidroxilo (•OH) o peróxido adsorbido. Estos resultados revelan que tanto la composición como la estructura de los materiales ZIF afectan significativamente la cinética de la electroreducción del $H_2O_2$, influyendo en la intensidad de la señal y en la posición del potencial redox.

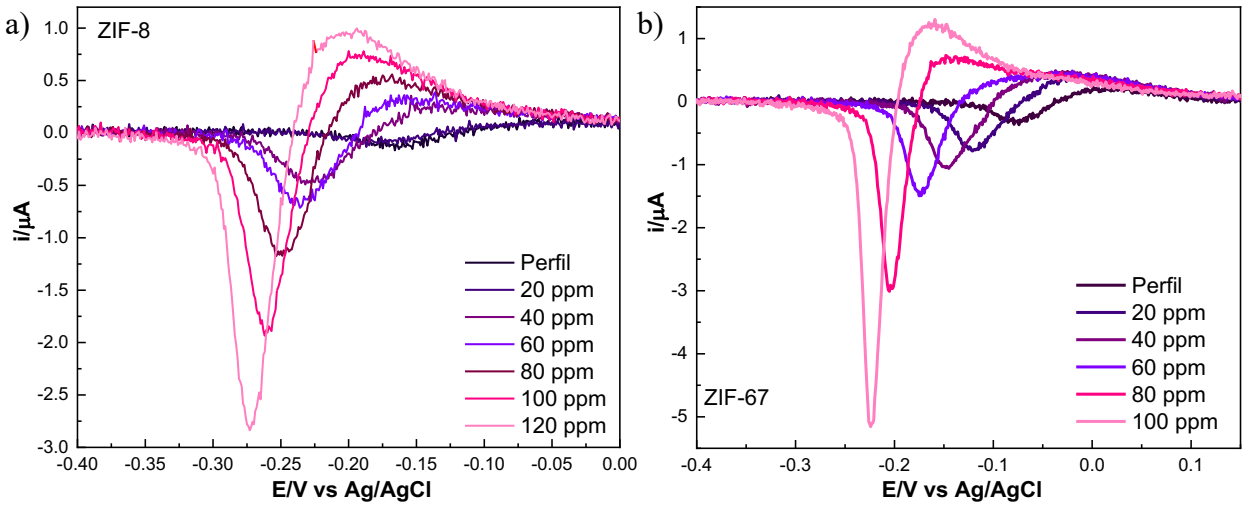



*Figura 35. Voltamperogramas obtenidos por DPV para ZIF-67/N-NTCG y ZIF-8/N-NTCG con incrementos en la concentración de $H_2O_2$.*

Consistentemente con los resultados de CV, ZIF-67/N–NTCG presentó la mayor respuesta amperométrica en DPV, mostrando un incremento definido y proporcional en la corriente de reducción conforme aumentó la concentración de $H_2O_2$. La alta resolución de esta técnica permitió distinguir de forma más clara las diferencias en la actividad catalítica entre materiales con estructuras similares. Esta sensibilidad también permitió confirmar la eficiencia de ZIF-67/N–NTCG en la reducción directa del peróxido, fortaleciendo su perfil como candidato óptimo para aplicaciones de detección electroquímica de ROS.

ZIF-8/N–NTCG mostró picos de corriente más bajos, con una tendencia menos lineal al incremento de la concentración. No obstante, en comparación con CV, DPV permitió detectar pequeñas variaciones de señal que en CV eran menos evidentes, lo que indica que, aunque su actividad es limitada, estos materiales aún presentan cierta interacción catalítica con el $H_2O_2$.

# 4. CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN Y DESEMPEÑO DE LOS MATERALES Co-N-C

Tras la identificación de ZIF-67/N–NTCG como el material más prometedor para la detección electroquímica de $H_2O_2$, se procedió a su transformación mediante tratamiento térmico controlado con el objetivo de obtener materiales tipo Co–N–C, conocidos por su alta actividad electrocatalítica en procesos redox. En este capítulo se presenta la caracterización fisicoquímica de estos materiales obtenidos por pirólisis a diferentes temperaturas, así como su evaluación electroquímica frente a la reducción de peróxido de hidrógeno. Esta etapa es crucial para establecer la correlación entre la estructura, composición y morfología del material carbonoso y su desempeño como sensor de especies reactivas de oxígeno (ROS) en condiciones simuladas de estrés bacteriano.

## 4.1 Caracterización fisicoquímica

### 4.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Previo al tratamiento térmico, el material ZIF-67 fue caracterizado estructuralmente con el objetivo de confirmar la formación de la topología tipo sodalita, lo cual se evidencia en la figura 19a. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis detallado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los materiales carbonosos obtenidos tras la calcinación del ZIF-67, cuyas micrografías representativas se muestran en la figura 36.

La calcinación a 500 °C condujo predominantemente a la formación de estructuras tipo core@shell (núcleo@coraza), aunque también se observaron algunas cavidades internas que sugieren la presencia de morfologías huecas (ver figura 36a). El análisis estructural de alta resolución (figura 36a1) reveló una notable cristalinidad tanto en el núcleo como en la coraza, lo cual sugiere una preservación parcial del orden estructural tras la carbonización. A partir de esta imagen se seleccionaron dos regiones de interés para su análisis: una correspondiente a la interfaz núcleo-coraza (figura 36a2) y otra enfocada en el núcleo metálico (figura 36a3).

En la interfaz se identificó una transición sólido-sólido bien definida, evidenciando un cambio de fase entre el núcleo metálico y la matriz carbonosa circundante. El análisis de perfil en profundidad en esta región mostró que la coraza está constituida por un material

predominantemente grafítico. Se observaron distancias interplanares de 3.32 y 3.41 Å, asociadas al plano (002) del grafito con estructura hexagonal 2H (valor de referencia: 3.39 Å, COD #96-101-1061). Asimismo, se detectaron distancias de 3.91 y 3.99 Å, las cuales pueden explicarse por una expansión del plano (002) inducida por la incorporación de grupos oxigenados en la matriz carbonosa, fenómeno previamente reportado por Y. Peng [102]. Adicionalmente, se identificó una distancia de 3.03 Å, atribuida a una contracción de red, posiblemente originada por defectos estructurales como vacancias o dopantes sustitucionales, lo que sugiere un entorno químicamente activo y defectuoso en la matriz carbonosa.

Por otro lado, el núcleo presentó características consistentes con cobalto metálico en estructura cúbica (COD #96-901-2928), evidenciado por la presencia de planos (111) y (200) con distancias interplanares de 2.06 y 1.78 Å, respectivamente. Estos resultados fueron corroborados mediante análisis de transformada rápida de Fourier (FFT) en regiones seleccionadas del núcleo (Figura 36a1), donde se detectaron distancias adicionales de 1.9, 1.4 y 0.9 Å, correspondientes a los planos (111), (202) y (400) del Co, respectivamente (Figura 36a3). Esta información confirma la preservación parcial de la fase metálica durante la calcinación.

El incremento de la temperatura de calcinación a 600 °C provocó una transformación morfológica sustancial. Las estructuras tipo core@shell dieron paso a una mezcla de estructuras huecas y partículas metálicas discretas con tamaños promedio de aproximadamente 100 nm (Figura 36b). El análisis de franjas de red en estas estructuras (figura 36b1) confirmó nuevamente la presencia de grafito con estructura 2H, con distancias interplanares consistentes con el plano (002) (3.39 Å, COD #96-101-1061), lo que indica que la carbonización progresiva mantiene, e incluso favorece, la formación de dominios grafíticos. Este cambio morfológico se resume esquemáticamente en la figura 37.

A 700 °C, se observó un comportamiento característico del fenómeno de maduración de Ostwald (Ostwald ripening), evidenciado por el crecimiento de partículas metálicas superiores a 100 nm (Figura 36c). A pesar de ello, se conservaron algunas estructuras huecas, aunque estas adquirieron una morfología laminar, como se aprecia en el recuadro de la figura 36c. Este resultado sugiere que, además del crecimiento de las

nanopartículas de Co, ocurrió un desdoblamiento o colapso parcial de las estructuras huecas, conduciendo a la formación de materiales carbonosos bidimensionales.

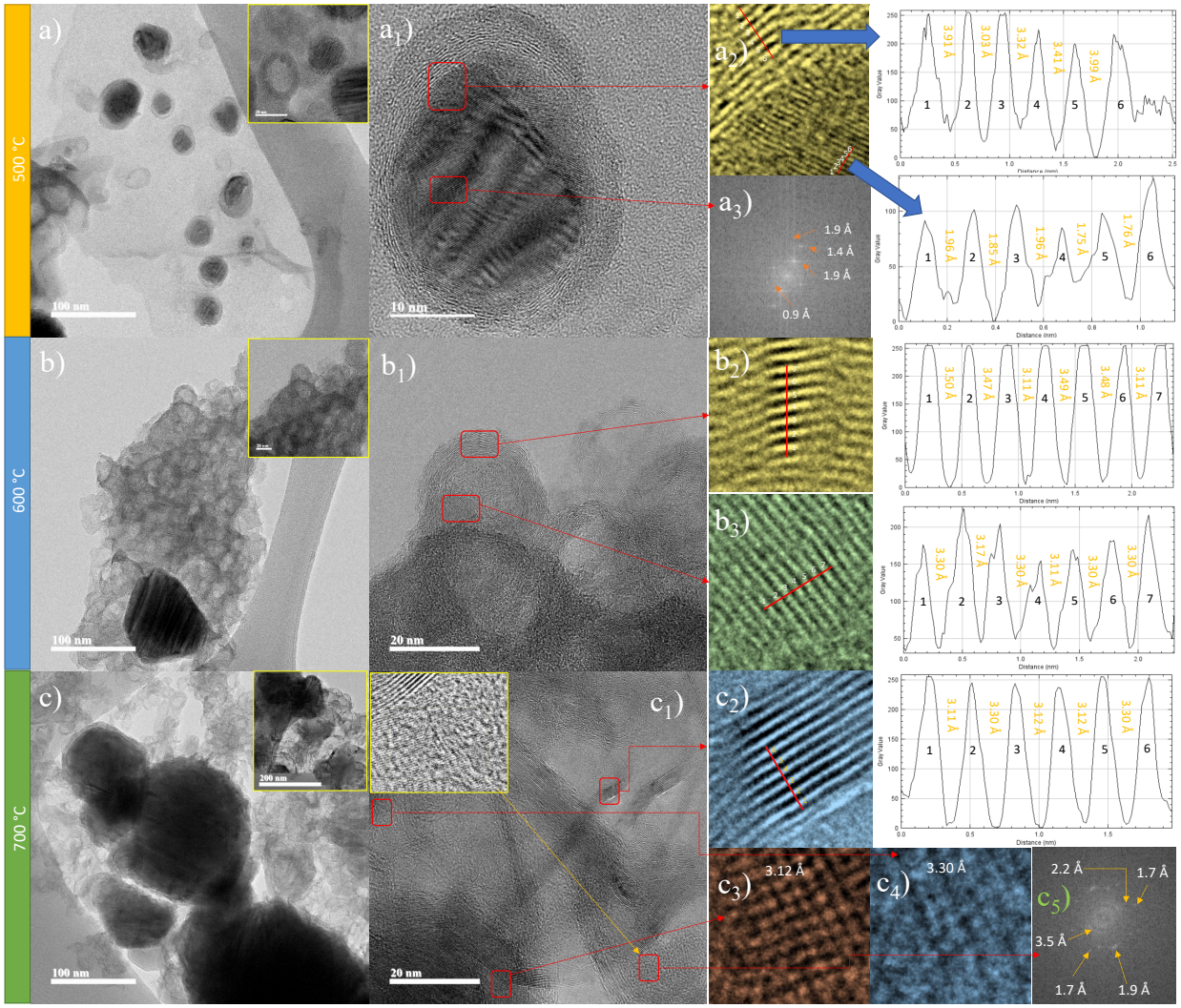



*Figura 36. Análisis TEM de los materiales derivados del ZIF-67 obtenidos por calcinación a) 500, b) 600 y c) 700 °C a diferentes aumentos. El análisis de perfil en profundidad y las imágenes FFT se generaron a partir de las regiones seleccionadas de cada material*

Las láminas generadas mostraron franjas de red con distintas distancias interplanares (figura 36c1), y el análisis de regiones seleccionadas de los bordes (figuras 36c2, 36c3 y 36c4) confirmó la presencia de dominios grafíticos. No obstante, el análisis del interior de estas láminas evidenció la persistencia de cobalto, con distancias de 2.2, 1.9 y 1.7 Å correspondientes a los planos (111) y (200) del Co en estructura cúbica (COD #96-901-2928). La distribución localizada de estos planos sugiere la formación de un sistema

altamente disperso, compatible con la generación de un material con dispersión atómica (atomically dispersed material, ADM) [103], [104], [105].

La presencia de estos átomos aislados en el entramado grafítico es indicativa de la formación de sitios catalíticamente activos del tipo Co–N–C, ampliamente reportados en la literatura como centros efectivos para reacciones redox en medios acuosos, especialmente en procesos relacionados con la reducción de oxígeno (ORR). Este hallazgo es particularmente relevante, ya que apunta a la posible dualidad funcional del material como sistema catalítico y plataforma electroactiva para aplicaciones en sensores.

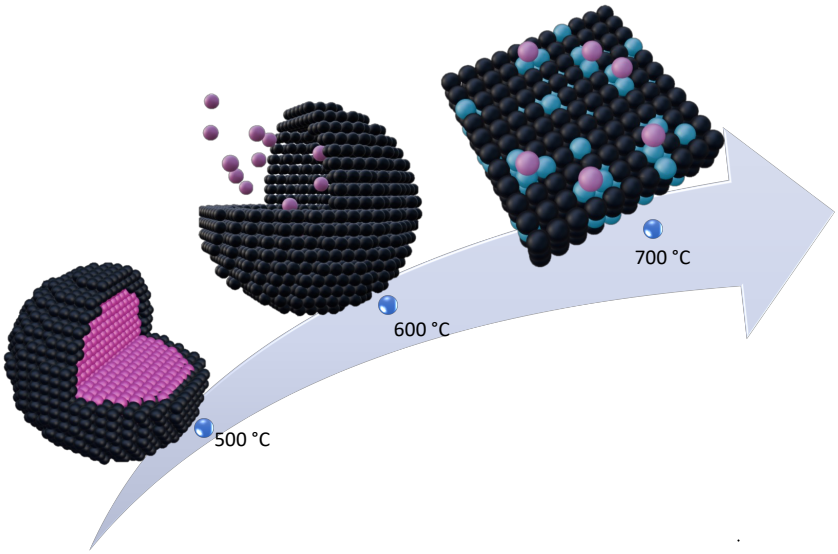



*Figura 37. Esquema representativo del cambio de forma inducido por el incremente de temperatura de calcinación de 500 a 700 °C.*

### 4.1.2 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) fue utilizada para investigar la evolución química superficial de los materiales derivados del ZIF-67 tras el tratamiento térmico. La deconvolución de los espectros correspondientes a Co 2p (figura 38a) permitió identificar dos picos principales atribuibles a Co $2p_3/_2$ (780.56 ± 0.29 eV) y Co $2p_1/_2$ (795.97 ± 0.37 eV), con una separación de energía de enlace (binding energy, BE) de 15.14 ± 0.12 eV, valor consistente con la presencia de cobalto en distintos estados de oxidación. Se observó un desplazamiento sistemático hacia menores energías de enlace al aumentar la temperatura de calcinación, lo cual puede interpretarse como

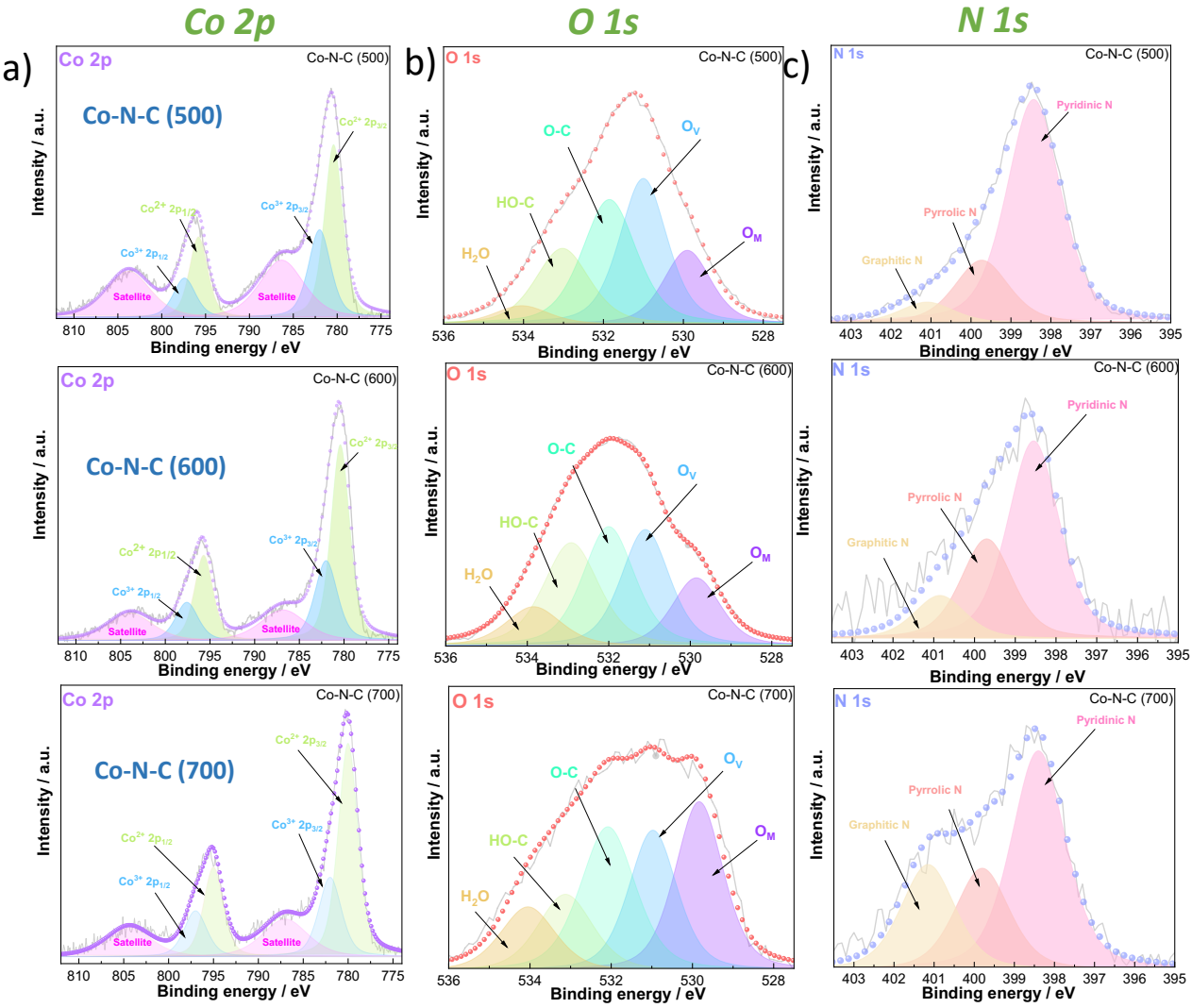
indicativo de una mayor estabilización de especies $Co^{2+}$ y la consecuente formación de fases termodinámicamente más favorables.

El ajuste fino de los espectros de Co 2p reveló seis componentes bien definidas, correspondientes a $Co^{2+}$ (780.25 eV y 795.83 eV), $Co^{3+}$ (782.0 eV y 797.4 eV), así como dos picos satélite característicos (786.4 eV y 803.7 eV). Estas señales estuvieron presentes en los tres materiales calcinados, en concordancia con reportes previos [21], [96], [106], [107]. En contraste, el precursor ZIF-67 sin tratamiento térmico (figura 24) no presentó evidencias de especies $Co^{3+}$, cuya aparición posterior se atribuye a la oxidación inducida por la descomposición térmica de los ligandos orgánicos (por ejemplo, imidazolatos) y la liberación de compuestos volátiles.

En cuanto al análisis de la región O 1s (figura 38b), la deconvolución reveló cinco contribuciones principales: enlaces metal–oxígeno (Co–O) a 529.9 eV, vacancias de oxígeno (Ov) a 531.1 eV, enlaces C–O a 532.1 eV, grupos hidroxilo (HO–C) a 532.9 eV, y agua químicamente adsorbida a 533.9 eV. Estas señales reflejan los productos de la pirólisis de los ligandos orgánicos, donde la descomposición incompleta promueve la retención de grupos oxigenados y defectos superficiales como las vacancias de oxígeno. La disminución progresiva de la intensidad correspondiente a Ov con el aumento de la temperatura sugiere una disminución en la densidad de defectos, lo que podría estar relacionado con una mayor reorganización estructural y la estabilización de enlaces Co–O.

El contenido de nitrógeno superficial se analizó a partir de los espectros de N 1s (figura 38c), donde se identificaron tres especies principales: nitrógeno piridínico (N–H, 398.4 eV), nitrógeno pirrólico (N=C, 399.8 eV) y nitrógeno grafítico (N–C=C, 401.2 eV). Entre ellas, el nitrógeno piridínico fue dominante, lo cual es relevante debido a su capacidad para coordinarse con iones metálicos y formar sitios activos tipo Co–Nx, que son catalíticamente relevantes. Se observó un incremento relativo en la proporción de nitrógeno grafítico con el aumento de temperatura, lo que puede atribuirse a una reestructuración térmica de la matriz carbonosa y la pérdida de especies más lábiles. Esta evolución está en concordancia con estudios que reportan una tendencia en la reactividad catalítica según el tipo de dopante nitrogenado: N-piridínico > N-pirrólico > N-grafítico > C sin dopar [108]. Cabe señalar que los sitios N-pirrólicos también han sido asociados con una mayor eficiencia en la producción de $H_2O_2$ en reacciones de

reducción de oxígeno [109], [110], lo que sugiere un posible efecto sinérgico entre las distintas especies de nitrógeno.




d)

| Material | $Co^{2+}/Co^{3+}$ | Ovac |
|---|---|---|
| Co-N-C (500)/ N-NTCG | 1.64 | 31.02 % |
| Co-N-C (600)/ N-NTCG | 2.09 | 24.5% |
| Co-N-C (700)/ N-NTCG | 2.33 | 21.13% |

*Figura 38. Espectros XPS de alta resolución de los materiales calcinados a 500 °C, 600 °C y 700 °C para los niveles electrónicos: a) Co 2p, b) O 1s y c) N 1s. d) Relación $Co^{2+}/Co^{3+}$ y contenido de vacantes de oxígeno (Ov).*

El análisis cuantitativo de la relación $Co^{2+}/Co^{3+}$ (figura 38d) mostró una tendencia creciente con el incremento de la temperatura de calcinación, particularmente en el rango de 500 a 700 °C. Este comportamiento sugiere que la eliminación de ligandos oxigenados residuales favorece la estabilización de especies $Co^{2+}$, permitiendo la formación de fases

más estables como Co–O o Co–C. De forma paralela, la disminución en la fracción de vacancias de oxígeno indica una mejora en el orden estructural superficial del material, reduciendo defectos y promoviendo la generación de centros activos bien definidos. Esta evolución química y estructural es fundamental para la optimización del desempeño catalítico de los materiales tipo Co–N–C, al favorecer la presencia de sitios activos con alta reactividad y estabilidad.

### 4.1.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se empleó para analizar la estructura carbonosa de los materiales obtenidos a partir del ZIF-67 tras el tratamiento térmico (figura 39a–d). En todos los casos se identificaron dos bandas características de los materiales carbonosos: la banda D, localizada en 1350 $cm^{-1}$, asociada a defectos en la red cristalina del carbono, tales como vacancias, bordes o átomos no hibridados; y la banda G, situada en 1590 $cm^{-1}$, que corresponde al modo $E_2g$ del grafito y se relaciona con las vibraciones de enlace C–C en estructuras ordenadas de carbono $sp^2$.

La deconvolución de los espectros permitió identificar, además, tres señales adicionales: la banda $D_4$ (1200 $cm^{-1}$), la banda $D_3$ (1490 $cm^{-1}$) y la banda $D_2$ (1610 $cm^{-1}$). Según reportes recientes [111], estas bandas pueden atribuirse a una combinación de distintos modos de vibración: la $D_4$ se ha relacionado con modos de oscilación tipo C–H y estructuras tipo $sp^3$ desordenadas; la $D_3$ con carbono amorfo o cadenas C=C con bajo orden estructural; y la $D_2$ con vibraciones localizadas en bordes de capas grafénicas y defectos en carbono $sp^2$.

Un análisis comparativo entre los materiales calcinados a diferentes temperaturas evidenció una disminución progresiva en la intensidad relativa de las bandas $D_2$, $D_3$ y $D_4$ conforme aumentó la temperatura de calcinación. En particular, la banda $D_3$ mostró la reducción más significativa, seguida por $D_2$ y $D_4$, lo cual sugiere una disminución del contenido de carbono amorfo y de defectos superficiales en la matriz carbonosa, favoreciendo la formación de dominios grafíticos más ordenados.

La relación entre las intensidades de las bandas D y G ($I_D/I_G$) se empleó como indicador del grado de desorden estructural. Para el material calcinado a 700 °C, dicha relación

alcanzó un valor de 1.34, lo cual sugiere una estructura parcialmente desordenada con una notable presencia de defectos. Este comportamiento puede ser atribuido a la naturaleza del precursor ZIF-67 y a las condiciones de pirólisis, que generan simultáneamente regiones grafíticas y defectuosas en la red de carbono. La coexistencia de estas regiones es relevante para aplicaciones catalíticas, ya que los defectos estructurales pueden actuar como sitios activos o facilitar la incorporación de especies dopantes, como nitrógeno o cobalto.

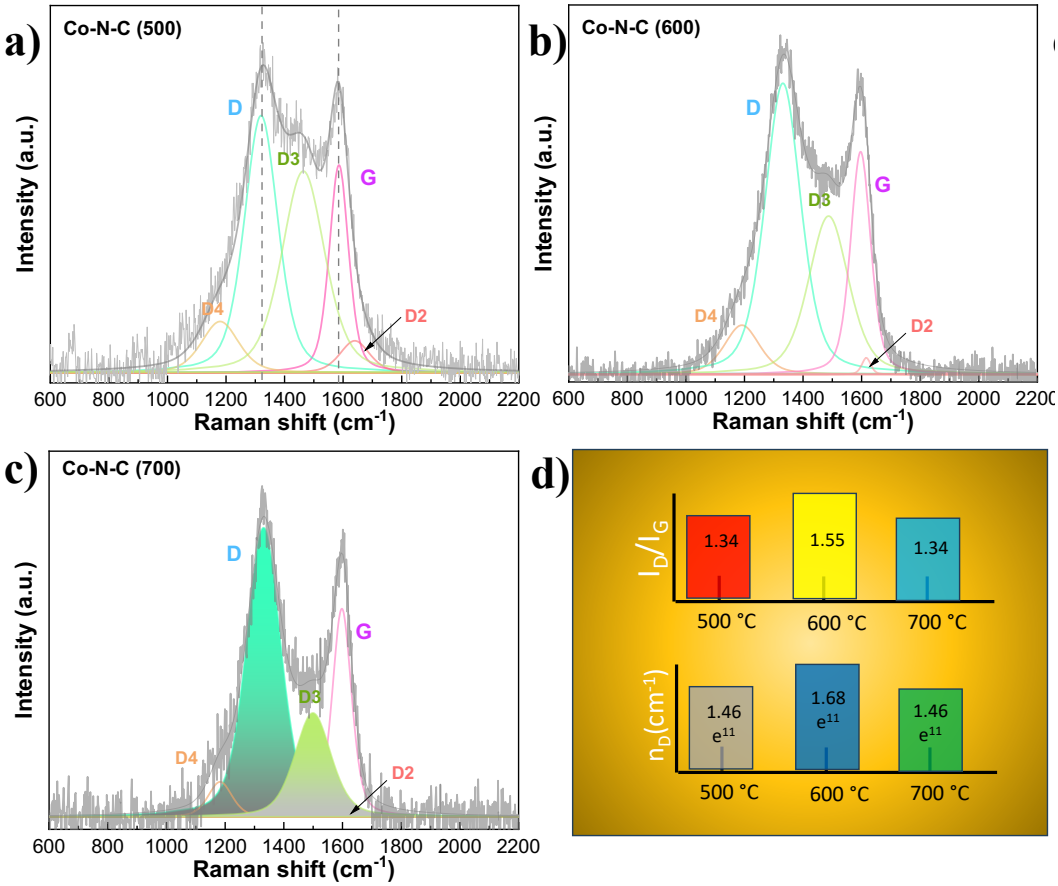



*Figura 39. Espectros Raman de los materiales derivados de ZIF-67 calcinados a: a) 500, b) 600 y c) 700 °C. d) Tabla con las relaciones $I_D/I_G$, así como de $n_D$ (densidad de defectos por área).*

### 4.1.4 Área superficial específica (BET)

La caracterización textural de los materiales derivados del ZIF-67 se llevó a cabo mediante análisis de isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno, con el objetivo de evaluar los cambios en el área superficial, el volumen poroso y la distribución de tamaño de poro inducidos por los tratamientos térmicos. Esta técnica es ampliamente utilizada para estudiar la evolución de la porosidad en materiales carbonosos, ya que permite

establecer correlaciones entre la morfología observada por microscopía electrónica y la accesibilidad de los poros, factores determinantes para el desempeño catalítico, adsorptivo y electroquímico de los materiales tipo Co–N–C.

En la figura 40a se muestran las isotermas de adsorción/desorción de $N_2$, así como el tamaño de poro, el volumen poroso total y el área superficial específica obtenida mediante el método BET para sus derivados calcinados. El precursor no calcinado presentó una isoterma tipo I, Figura 22, típicamente asociada con materiales microporosos, en concordancia con su estructura altamente ordenada y rica en enlaces metal-ligando.

Tras la calcinación, los materiales derivados del ZIF-67 mostraron isotermas tipo IV, características de estructuras mesoporosas con presencia adicional de microporos, indicando una transición estructural hacia una red jerárquicamente porosa. Esta transformación se atribuye a la carbonización de los ligandos orgánicos y a la reorganización de la matriz carbonosa durante el tratamiento térmico.

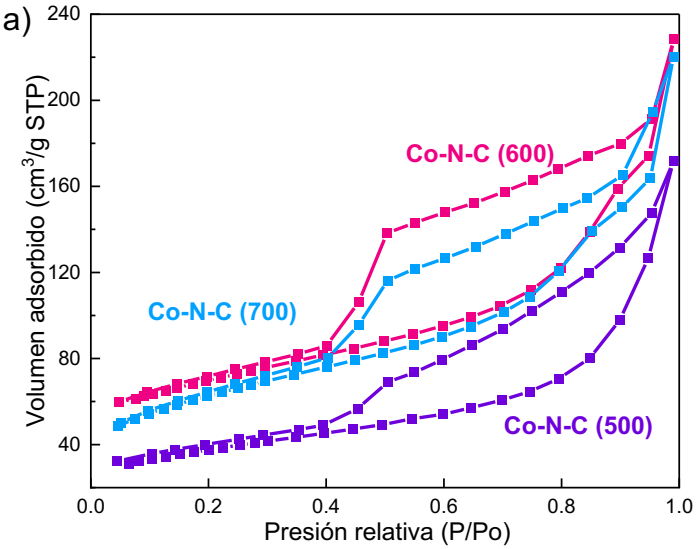
Como era de esperarse, la calcinación indujo una disminución generalizada del área superficial BET respecto al ZIF-67 original, consecuencia directa de la pérdida de la arquitectura microporosa y del colapso parcial de la estructura durante la pirólisis. El material Co–N–C calcinado a 500 °C presentó la menor área superficial, lo cual se relaciona con la formación de una morfología core@shell, que limita el acceso a los poros internos debido a la densificación de la cáscara carbonosa externa.

A medida que se incrementó la temperatura de calcinación, se observó una evolución morfológica significativa que impactó positivamente la textura del material. A 600 °C, la conversión de estructuras core@shell a morfologías predominantemente huecas favoreció un incremento del área superficial hasta alcanzar 250.7 m²/g. Este aumento se asocia con la generación de cavidades internas accesibles y con el desarrollo de mesoporos durante la descomposición térmica controlada.

Sin embargo, a 700 °C, la agregación térmicamente inducida de las nanopartículas de cobalto provocó una ligera disminución del área superficial (224.6 m²/g). A pesar de ello, este valor sigue siendo superior al registrado a 500 °C, lo cual puede explicarse por el despliegue de las estructuras huecas en morfologías laminares bidimensionales de carbono, como se observa en la micrografía correspondiente (figura 36c1). Estas

estructuras extendidas no solo preservan parte de la porosidad desarrollada a temperaturas intermedias, sino que también ofrecen una mayor exposición superficial, aspecto crítico en aplicaciones catalíticas y de adsorción.

a)




b)

| Material | Área BET ($m^2/g$) | Volumen de poro ($cm^3/g$) | Tamaño de poro (nm) |
|---|---|---|---|
| ZIF-67 | 1128.7 | 0.07 | 1.56 |
| Co-N-C (500) | 133.4 | 0.22 | 2.1 |
| Co-N-C (600) | 250.7 | 0.27 | 1.69 |
| Co-N-C (700) | 224.6 | 0.27 | 1.7 |

*Figura 40. a) Isotermas BET de los materiales derivados del ZIF-67, junto con una b) tabla de área superficial, volumen de poro y tamaño de poro calculados.*

## 4.2 Evaluación electroquímica para la detección de $H_2O_2$ como marcador de estrés oxidativo

La generación de $H_2O_2$ es una señal del estrés oxidativo inducido en bacterias. En este capítulo se evalúa la respuesta electroquímica de los ZIFs y de los materiales tipo Co–N–C soportados sobre nanotubos de carbono como sensores de $H_2O_2$. Se analiza su sensibilidad, respuesta voltamétrica y eficiencia catalítica, sentando las bases para su uso como plataformas analíticas de daño oxidativo.

### 4.2.1 Comparación de Co–N–C/N-NTCG calcinados (500 - 700°C) en la detección de $H_2O_2$

#### 4.2.1.1 Voltamperometría cíclica (VC)

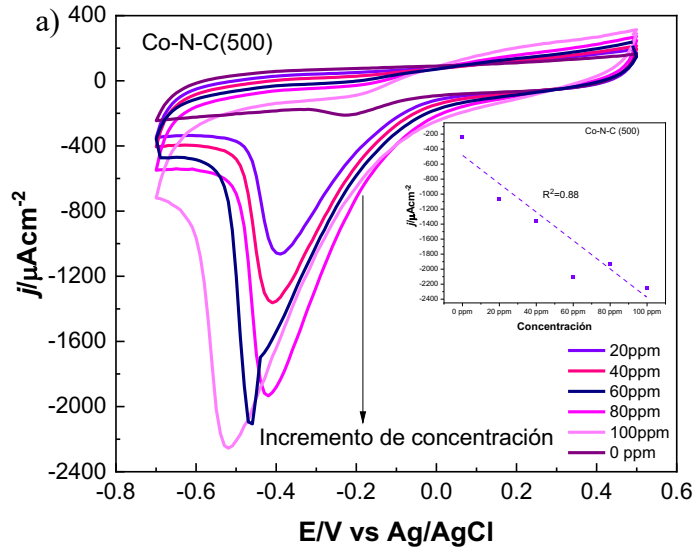
La voltametría cíclica fue utilizada como técnica preliminar para evaluar la actividad electrocatalítica de los materiales Co–N–C obtenidos por calcinación de ZIF-67/N-NTCG a distintas temperaturas (500, 600 y 700 °C), con el objetivo de determinar su capacidad para detectar peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) en soluciones modelo. Las curvas de calibración obtenidas en el intervalo de 20 a 100 ppm revelaron diferencias marcadas en el comportamiento electroquímico de los materiales en función de la temperatura de calcinación.

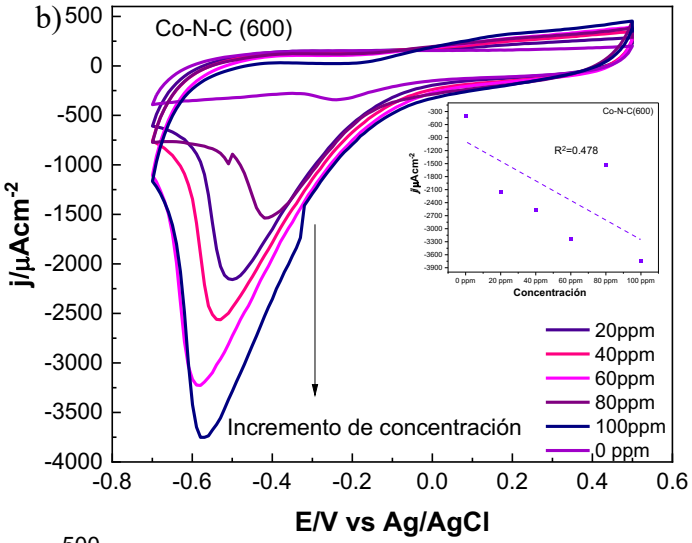
Los materiales obtenidos a 500°C y 600°C mostraron una respuesta no lineal entre la densidad de corriente pico y la concentración de $H_2O_2$ (Figs. 41a y b). Además, se observaron desplazamientos significativos en el potencial de reducción y bajos valores de $R^2$, lo que sugiere posibles problemas relacionados con el transporte de masa. Esta respuesta podría estar influenciada por una perturbación en la capa doble eléctrica (EDL), resultado de la interacción entre el analito y la superficie activa de los materiales.

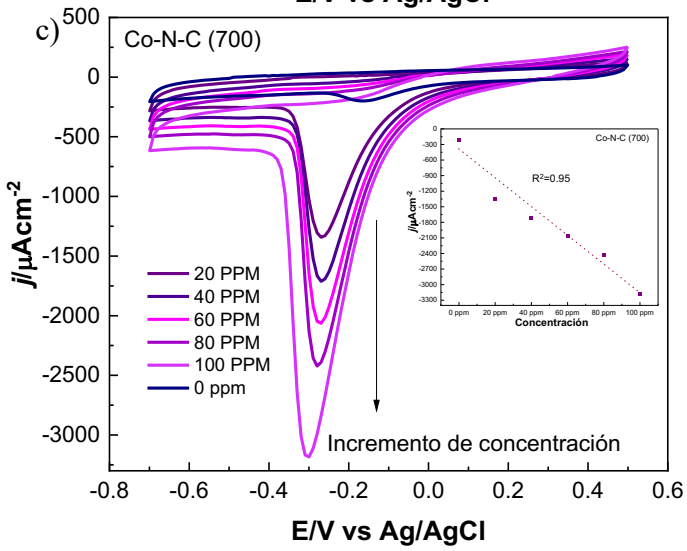
En contraste, el material calcinado a 700°C (Co–N–C (700)) mostró un comportamiento electroquímico más favorable (Fig. 41d), con una respuesta lineal, desplazamientos mínimos en el potencial pico, y un coeficiente de correlación $R^2$ de 0.99. Este desempeño sugiere una mayor eficiencia en la transferencia de carga, atribuible a una mejor exposición de los átomos de cobalto en la red carbonosa dopada con nitrógeno. La sensibilidad calculada para este material fue de 76.8 μA/ppm·cm², con un límite de detección (LOD) de 1.64 ppm (48 μM) y una excelente repetibilidad, reflejada en una desviación estándar de solo 1.79% (n = 3) (Figura 42).

Un aspecto relevante observado en las curvas de CV fue la ausencia de un pico de retorno correspondiente a la oxidación del metal, lo cual sugiere un proceso de reducción irreversible del $H_2O_2$. Asimismo, el perfil de corriente no regresa completamente a la línea base tras la inversión del barrido de potencial, lo que indica la posible retención de especies adsorbidas en la superficie del electrodo. Esto puede estar asociado a un mecanismo de reducción en múltiples etapas, como el siguiente:

1. $H_2O_2 + e^- \rightarrow \bullet OH + OH^-$
2. $\bullet OH + e^- \rightarrow OH^-$
3. $OH^-(ads) + H^+(\text{libre}) \rightarrow H_2O(\text{libre}) + \text{sitio libre}$



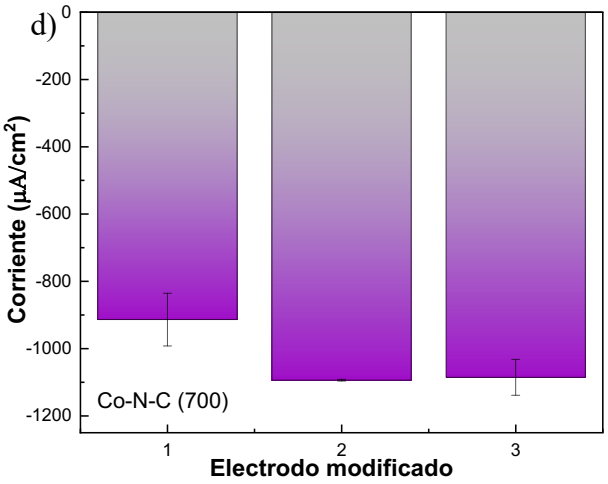



*Figura 41. Voltamperometría cíclica con adiciones de 20–100 ppm de $H_2O_2$: a) Co-N-C (500), b) Co-N-C (600), c) Co-N-C (700) y d) prueba de repetibilidad de Co-N-C (700) con 40 ppm de $H_2O_2$ (± desviación estándar)*

Esto sugiere un mecanismo donde el $H_2O_2$ es reducido a través de la formación de radicales hidroxilo ($^{\bullet}OH$) o iones $OH^-$, los cuales pueden quedar atrapados temporalmente en la red porosa del ZIF o interactuar de forma más fuerte con los centros metálicos.

A diferencia de sensores basados en metales nobles donde los productos tienden a desorberse rápidamente, en materiales tipo ZIF carbonizados como los usados en este trabajo, los radicales hidroxilo o aniones formados tienden a permanecer adsorbidos por más tiempo. Esta interacción prolongada podría generar desplazamientos en los potenciales y una posible saturación de sitios activos, afectando la reversibilidad del sistema.

La irreversibilidad observada en los ciclos sugiere que los procesos de adsorción/desorción del $H_2O_2$ y sus especies intermediarias están condicionados por interacciones fuertes con los centros activos del ZIF, lo que podría afectar la estabilidad y repetibilidad del sensor bajo condiciones de operación continua. Por tal motivo, se decidió complementar este análisis mediante DPV, técnica que permite una mejor resolución de procesos redox superpuestos y proporciona mayor sensibilidad al minimizar la corriente capacitiva.

#### 4.2.1.2 Voltamperometría de pulso diferencial (DPV)

La técnica de DPV se aplicó para mejorar la resolución de los picos redox y reducir la contribución de la corriente capacitiva, lo que permitió confirmar que la respuesta no lineal observada en los materiales calcinados a 500 y 600 °C podría estar relacionada con fenómenos de quimiosorción y alteraciones en la estructura de la doble capa eléctrica (EDL). Estas variaciones sugieren que, a dichas temperaturas, la interacción del $H_2O_2$ con los sitios activos del material no ocurre de manera uniforme, sino que puede estar influenciada por la heterogeneidad superficial, la distribución de defectos estructurales y la presencia de especies residuales derivadas de la calcinación. En consecuencia, los procesos de transferencia de carga parecen estar parcialmente limitados por dichas irregularidades en la interfaz electrodo/electrolito.

En contraste, el material Co–N–C (700) mostró una respuesta electroquímica más clara y consistente. La DPV permitió observar un pico bien definido, estable y proporcional a la concentración de $H_2O_2$, lo que sugiere una mayor densidad y accesibilidad de los sitios catalíticamente activos, junto con una cinética de reducción más favorable. Este comportamiento puede asociarse tanto a la optimización de la porosidad y la conductividad eléctrica como a la estabilización de los sitios Co–N_x generados a la mayor temperatura de calcinación.

En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que la temperatura de tratamiento térmico no solo modula la morfología y la estructura del material carbonoso, sino que también regula de manera significativa la dinámica de adsorción, la organización de la EDL y la cinética de la reacción de reducción de $H_2O_2$. Por lo tanto, el uso de DPV permitió no solo comparar la sensibilidad y la resolución entre los diferentes materiales, sino también inferir mecanismos de interacción electroquímica que posicionan al Co–N–C (700) como la plataforma más prometedora para el desarrollo de sensores de peróxido de hidrógeno.

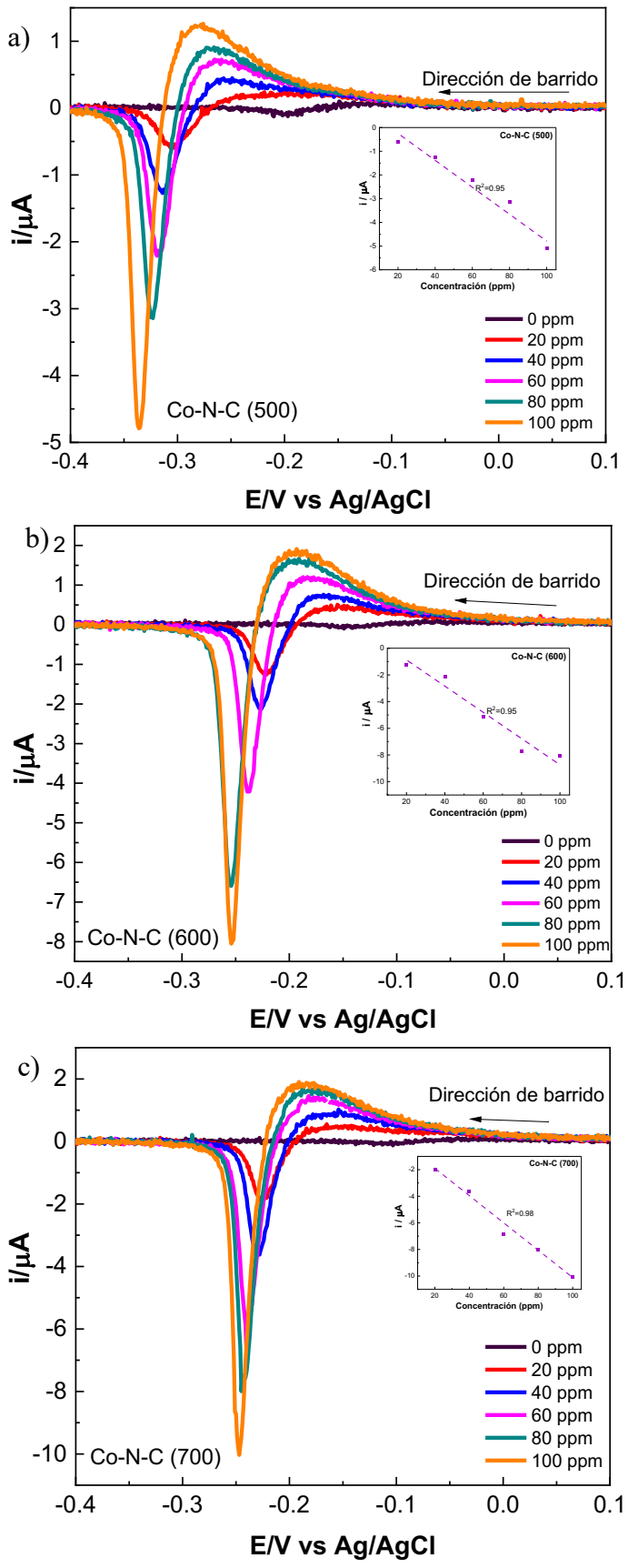



*Figura 42. DPV de los materiales a) Co-N-C(500)/N-NTCG, b) Co-N-C(600)/N-NTCG y c)Co-N-C (700)/N-NTCG con adiciones de 20-100 ppm de $H_2O_2$.*

#### 4.2.1.3 Voltamperometría líneal (VL) y cronoamperometría (CA)

Para evaluar el desempeño electrocatalítico del material Co–N–C (700) en la detección de especies oxidantes, se llevaron a cabo experimentos de voltametría lineal (VL) ante adiciones sucesivas de $H_2O_2$ en concentraciones crecientes, desde 5 µM hasta 100 µM. De manera complementaria, se llevaron a cabo pruebas de cronoamperometría bajo las mismas condiciones, con el objetivo de analizar la respuesta del catalizador en tiempos prolongados y a diferentes niveles de concentración, verificando así su estabilidad.

La Figura 43a muestra la evolución de la respuesta voltamétrica, en la cual se observa un incremento progresivo en la corriente de reducción conforme aumenta la concentración del analito, evidenciando una respuesta catalítica sensible y proporcional. Un aspecto notable en esta serie es el desplazamiento sistemático del potencial de pico de reducción (Ep) hacia valores más negativos conforme se incrementa la concentración de $H_2O_2$.

Este comportamiento se interpreta como una necesidad creciente de energía para inducir el proceso de reducción. Es decir, a mayor concentración de $H_2O_2$, el sistema requiere un mayor sobrepotencial, reflejado en un potencial más negativo, para que la transferencia electrónica tenga lugar de manera eficiente. Esto puede atribuirse al incremento en la carga electroquímica del sistema, que impone una mayor demanda energética al material electrocatalítico para sostener la cinética del proceso redox.

Este fenómeno también puede estar relacionado con el aumento en la cantidad de moléculas disponibles para ser reducidas, lo cual puede generar una mayor resistencia en el sistema (ya sea por efectos de difusión, reorganización superficial o saturación), exigiendo un potencial más negativo para continuar favoreciendo la reacción de reducción. En este sentido, el desplazamiento del pico no indica una pérdida de actividad, sino más bien una respuesta adaptativa del sistema a condiciones de mayor carga analítica.

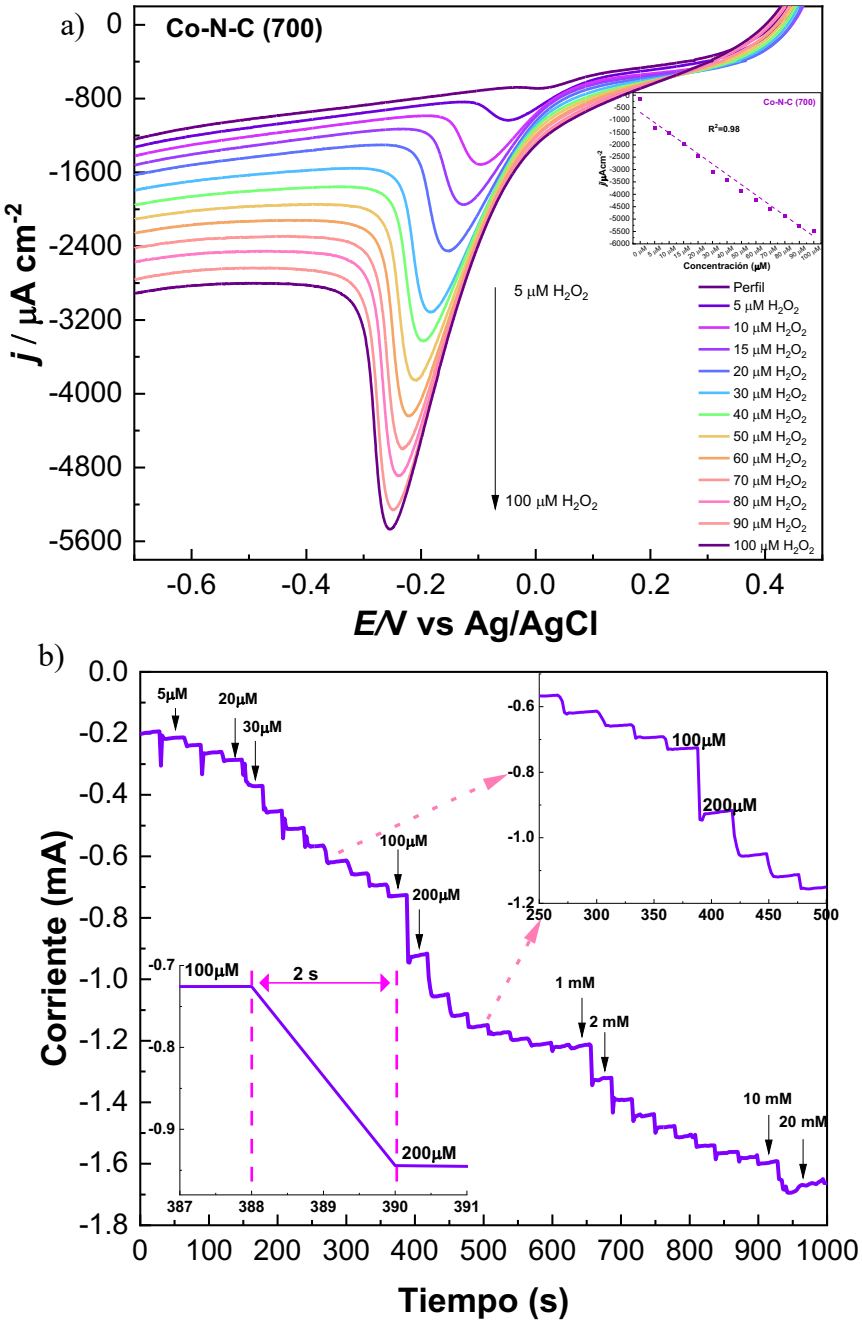



*Figura 43. a) Voltamperometría lineal con adiciones de $H_2O_2$ con el material Co-N-C (700)/N-NTCG y b)cronoamperometría del Co-N-C (700)/N-NTCG con adiciones de5 µM a 20 mM $H_2O_2$, con tiempo de respuesta.*

En la figura 43b se presentan los ensayos de cronoamperometría realizados mediante inyecciones sucesivas de $H_2O_2$, abarcando cinco rangos de concentración (5–20 µM, 20–100 µM, 100 µM–1 mM, 1–10 mM y 10–20 mM). En todos los casos, el sistema respondió de manera inmediata en todos los intervalos, alcanzando una corriente estable en menos de 2 segundos después de cada adición. Este comportamiento no solo

confirma la rápida cinética de transferencia electrónica del catalizador, sino que también evidencia la robustez del recubrimiento activo, el cual mantuvo su adherencia y actividad sin deterioro perceptible aun tras múltiples ciclos de detección.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante CV, DPV, voltametría lineal y cronoamperometría posicionan al material Co–N–C (700) como un sensor altamente sensible, reproducible y versátil para la detección de $H_2O_2$. Su comportamiento electroquímico robusto, sumado a su respuesta amplia y rápida, lo convierten en un candidato idóneo para aplicaciones en sistemas de monitoreo de estrés oxidativo bacteriano o en entornos clínicos y ambientales donde el peróxido de hidrógeno actúe como biomarcador determinante.

### 4.2.2 Comparación entre sensores basados en ZIF-67/N-NTCG y en Co–N–C/N-NTCG

La comparación entre los sensores fabricados con ZIF-67 y sus derivados carbonosos Co–N–C calcinados a diferentes temperaturas revela diferencias sustanciales en términos de sensibilidad, límite de detección (LOD), estabilidad operativa y versatilidad analítica. Estas observaciones permiten establecer criterios claros sobre la idoneidad de cada sistema en aplicaciones de detección de $H_2O_2$, particularmente en contextos *in operando* donde se requiere precisión, respuesta rápida y robustez electroquímica.

De forma destacada, el material Co–N–C(700)/N-NTCG presentó el mejor desempeño global, superando de forma notable a los sensores basados exclusivamente en ZIF-67. En condiciones óptimas, el sensor calcinado a 700 °C mostró una sensibilidad de 18.76 $\mu A \cdot \mu M^{-1} \cdot cm^{-2}$, un límite de detección tan bajo como 0.5 µM y un tiempo de respuesta inferior a 2 s, atributos críticos para el monitoreo de especies reactivas de vida media corta como el $H_2O_2$. Además, el dispositivo mostró una alta repetibilidad (1.79 %) y estabilidad en un amplio rango de concentración (desde 5 µM hasta 20 mM), abarcando tanto condiciones fisiológicas como escenarios de estrés oxidativo severo. Esta amplitud de respuesta sugiere una cinética de reducción eficiente y un transporte de carga facilitado por la naturaleza carbonosa dopada con Co y N, que mejora la densidad de sitios catalíticos redox.

En contraste, los sensores fabricados a partir de ZIF-67 sin calcinación, aunque presentan una sensibilidad comparable (18.45 $\mu A \cdot \mu M^{-1} \cdot cm^{-2}$), exhiben un comportamiento más limitado. Su respuesta lineal se restringe a concentraciones más bajas (20–100 ppm), y los valores de LOD (0.79 µM) y LOQ (hasta 26.15 µM) son más altos. Además, las pruebas en rangos amplios revelaron un menor control sobre la estabilidad del voltamperograma, especialmente bajo técnicas como DPV y voltametría lineal (VL). Esto podría estar relacionado con la naturaleza porosa del ZIF-67, que si bien favorece la difusión del analito, limita la eficiencia electrónica por la escasa cantidad de sitios activos metálicos y la posible saturación superficial por adsorción de intermedios redox.

*Tabla 9. Tabla comparativa de los diferentes materiales con las diferentes técnicas.*

| Material | Técnica de detección | Rango | LOD ppm (µM) | LOQ ppm (µM) | Sensibilidad | Selectividad, Repetibilidad Reproducibilidad |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Co-N-C*(500)* /N-NTCG | VC<br>DPV | 20 - 100 ppm | -<br>19.9 (590) | -<br>66.4 (1,968) | - | - |
| Co-N-C*(600)* /N-NTCG | VC<br>DPV | 20 - 100 ppm | -<br>25.29 (737) | -<br>84.32 (2,458) | - | - |
| Co-N-C*(700)* /N-NTCG | VC<br><br>DPV<br>VL<br>CA | 20-100 ppm<br>5-20 µM,<br>20-100 µM,<br>0.1-1 mM,<br>1-10 mM y 20 mM | <br><br>1.64 (48)<br>13.38 (389) | <br><br>5.47 (161)<br>44.62 (1,299) | 18.76 µA/µMcm$^2$ | Repetibilidad 1.79%<br>Respuesta del sensor 2 s |
| ZIF-67/N-NTCG | VC<br><br>DPV<br>VL | 20 - 40 ppm<br>60 - 100 ppm<br>20 - 60 ppm<br>60 - 100 ppm | 5.05 (150)<br>7.18 (210)<br>7.84 (115)<br>6.64 (195) | 16.83 (490)<br>23.92 (703)<br>26.15 (384)<br>22.15 (651 | 18.45 µA/µMcm$^2$ | - |

Los materiales Co–N–C calcinados a 500 y 600 °C también fueron evaluados, mostrando mejoras graduales respecto al ZIF-67 original, pero sin alcanzar el desempeño del sistema calcinado a 700 °C. En particular, Co–N–C(600)/N-NTCG alcanzó una sensibilidad de 84.32 $\mu A \cdot ppm^{-1} \cdot cm^{-2}$, pero sin lograr un LOD tan bajo, lo que indica que el grado de grafitización y la exposición efectiva de sitios activos aún no es óptima a esa temperatura. La evolución de la actividad electroquímica con la temperatura de calcinación demuestra que la estructura final del Co–N–C está altamente influenciada por los parámetros térmicos, afectando la organización de los centros Co–Nx y la conductividad global del material.

En conjunto, estos resultados (resumidos en la Tabla 9) consolidan al material Co–N–C(700)/N-NTCG como una plataforma superior para la detección electroquímica de $H_2O_2$, tanto en condiciones controladas como en sistemas dinámicos. Su elevada sensibilidad, bajo LOD, rápida respuesta y estabilidad lo convierten en un sensor particularmente útil para aplicaciones biomédicas, biosensado y estudios mecanísticos de estrés oxidativo inducido por nanomateriales antimicrobianos. Por tanto, esta aproximación basada en la conversión térmica de ZIFs hacia estructuras tipo M–N–C representa una estrategia efectiva para el desarrollo de sensores electroquímicos de nueva generación.

### 4.2.3 Evaluación de selectividad frente a interferentes

La selectividad es un aspecto crítico en el desarrollo de sensores electroquímicos. En esta sección se analiza el efecto de posibles interferentes relevantes en medios reales, como el oxígeno molecular disuelto, y la presencia de bacterias vivas (*E. coli* y *S. aureus*), sobre la señal electroquímica de $H_2O_2$. Estos estudios permiten validar la robustez y confiabilidad del sensor en condiciones complejas.

#### 4.2.3.1 Interferencia por oxígeno molecular ($O_2$)

Con el objetivo de evaluar la selectividad de los materiales Co-N-C hacia el $H_2O_2$ frente a otras especies reactivas de oxígeno, se realizaron pruebas de interferencia utilizando oxígeno gaseoso ($O_2$), una molécula que puede competir por los sitios activos debido a su capacidad de adsorción superficial. Estas pruebas permiten determinar si alguno de los materiales presenta una mayor afinidad y sensibilidad específica hacia $H_2O_2$, lo cual es esencial para su aplicación como sensor selectivo.

Las voltamperometrías cíclicas obtenidas para los diferentes Co-N-C con adiciones de $O_2$ y $H_2O_2$ se muestran en la Figura 44. Se estudiaron también materiales calcinados derivados de ZIFs, en particular aquellos que contienen cobalto como centro activo. Entre ellos, el material Co–N–C (700) evidenció un comportamiento altamente selectivo hacia $H_2O_2$, mostrando la menor interferencia ante la adición de $O_2$, con variaciones mínimas

en la densidad de corriente pico, incluso a concentraciones elevadas de interferente (20 y 60 ppm). Tal como se observa en las Figuras 44a–c, la región faradaica (de 0 a −0.7 V) se mantiene alrededor de los 300 μA/cm$^2$ en la condición de blanco, lo cual es atribuible a la adsorción no específica de especies en el electrodo. Sin embargo, este valor permanece prácticamente constante tras la adición de oxígeno, evidenciando que este gas no interactúa significativamente con los sitios catalíticos activos del material.

La figura 44c presenta la respuesta voltamétrica del Co–N–C (700) sin la presencia de interferentes, sirviendo como línea base para la evaluación de adsorción. En la figura 44b, se muestra el comportamiento del mismo material tras la adición de 20 ppm de $O_2$, donde la curva prácticamente se sobrepone a la del blanco, indicando una alteración mínima en la señal faradaica. Finalmente, en la Figura 44a**,** aun con 60 ppm de $O_2$, no se observan desplazamientos importantes en la intensidad de la señal ni en la posición del pico de reducción. Esta estabilidad frente a la interferencia sugiere que la naturaleza estructural del Co–N–C (700), producto del tratamiento térmico a 700 °C, favorece una interacción preferente hacia el $H_2O_2$, posiblemente gracias a la presencia de sitios activos tipo Co–$N_x$ embebidos en una matriz de carbono dopado con nitrógeno.

Este comportamiento contrasta con el de otros materiales analizados, donde sí se evidenciaron incrementos en la señal tras la exposición a oxígeno, lo que puede ser indicativo de sitios activos menos selectivos o una mayor susceptibilidad a procesos de adsorción competitiva. En el caso del Co–N–C (700), la alta resistencia a interferencias posiciona a este material como un candidato ideal para sensores electroquímicos de peróxido de hidrógeno con aplicaciones en ambientes complejos, como fluidos biológicos o sistemas atmosféricos, donde la presencia de oxígeno es inevitable.

Con el objetivo de evaluar la selectividad del sensor electroquímico basado en Co-N-C(700)/N-NTCG, se realizaron ensayos de detección de $H_2O_2$ en presencia de interferentes biológicos relevantes, específicamente las bacterias *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva). La incorporación de estos microorganismos permitió simular condiciones reales en medios biológicos donde la presencia de células vivas podría interferir con la señal del analito de interés mediante formación de biofilm, adsorción superficial, o emisión de especies redox activas.

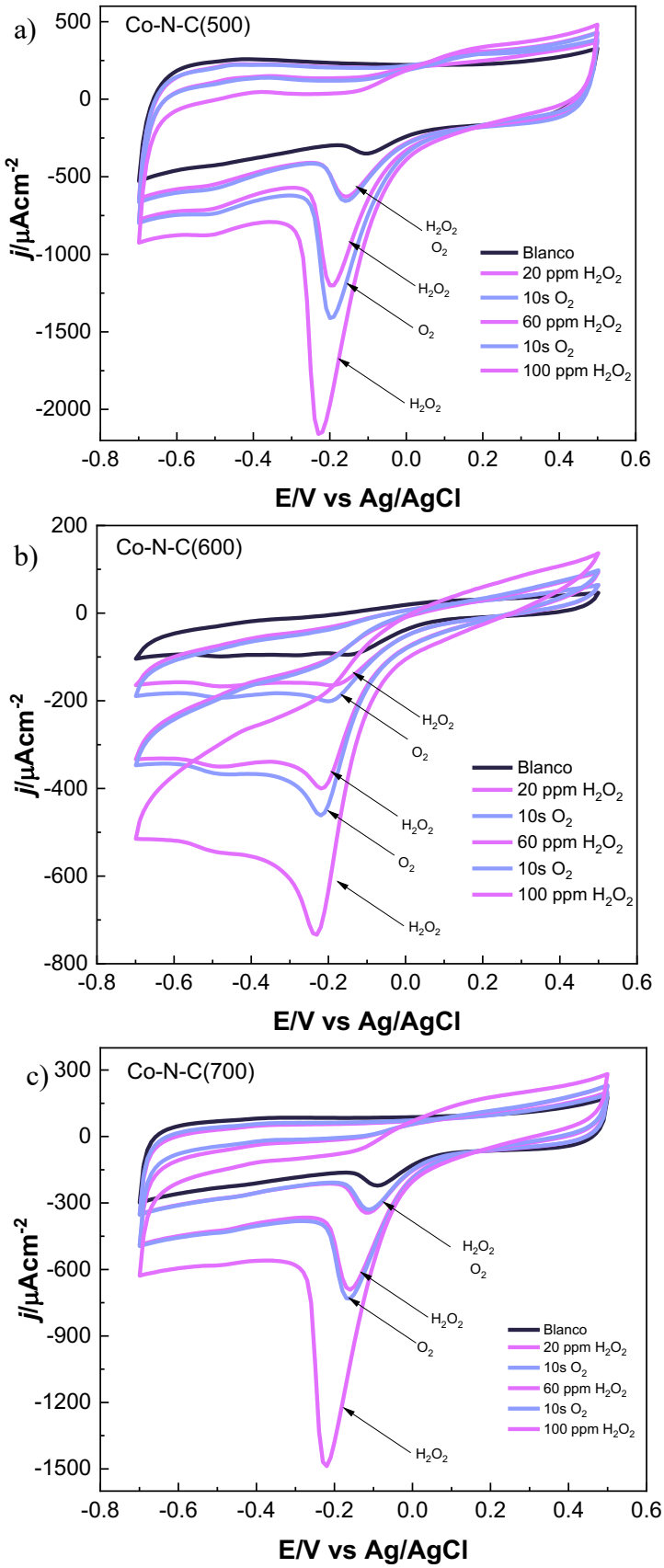



*Figura 44. Voltamperometría cíclica de a) Co-N-C(500)/N-NTCG, b)Co-N-C(600)/N-NTCG y c)Co-N-C(700)/N-NTCG con adiciones de $H_2O_2$ y $O_2$.*

### 4.2.4 Evaluación de la interferencia por presencia bacteriana (*E. coli* y *S. aureus*)

En primer lugar, se introdujo *S. aureus* a una concentración de $1\times10^8$ UFC/mL en un medio MH:PBS, y se realizaron barridos voltamétricos en ausencia de $H_2O_2$. No se observó señal electroquímica significativa, lo que indica que bajo las condiciones experimentales empleadas, la bacteria no genera una respuesta directa detectable. Posteriormente, se realizaron adiciones secuenciales de $H_2O_2$ en concentraciones de 5 a 15 µM. Tal como se observa en la Figura 45a, el incremento de señal se corresponde exclusivamente con el proceso de reducción del peróxido, sin alteraciones atribuibles a la presencia de *S. aureus*. Esto sugiere que esta especie no interfiere con el reconocimiento ni con la señal del sensor en el intervalo de concentración evaluado.

Se aplicó un protocolo análogo con *E. coli*. La Figura 45b muestra que, incluso en presencia de esta bacteria, las señales características de reducción de $H_2O_2$ permanecen claramente definidas. Aunque *E. coli* posee una membrana externa compleja y tiene potencial para formar biofilms que podrían obstaculizar la superficie del electrodo, dicho efecto no se manifiesta en escalas de tiempo cortas (<5 h), por lo que las mediciones inmediatas no se ven comprometidas.

No obstante, se observaron diferencias en el comportamiento voltamétrico entre ambas bacterias. En presencia de *S. aureus*, la curva de respuesta al $H_2O_2$ se observa una tendencia lineal, lo que indica una interacción más estable y una menor perturbación de la superficie del electrodo. En contraste, en presencia de *E. coli,* se registró una pendiente más pronunciada, sin embargo mantiene la tendencia lineal. Esta diferencia puede atribuirse a una mayor interacción superficial entre *E. coli* y el material, que puede modificar la distribución de cargas en el electrodo y facilitar la transferencia electrónica, incluso en presencia de $H_2O_2$ añadido externamente.

Sin embargo, se observó una disminución de corriente al agregar *S. aureus*, atribuible a las interacciones electrostáticas que afectan la EDL en la interfase del electrodo. Por un lado, *E. coli* (Gram-negativa) posee membrana con carga negativa debido a los lipopolisacáridos, mientras que *S. aureus* (Gram-positiva) presenta carga superficial más positiva por el peptidoglicano. Los materiales basados en cobalto, con carga positiva bajo condiciones fisiológicas, interactúan más eficientemente con *E. coli*, facilitando la detección de $H_2O_2$. En contraste, la similitud de cargas superficiales con *S. aureus*

genera un efecto de exclusión electrostática, que modifica la EDL e incrementa la resistencia a la transferencia de carga, reduciendo la densidad de corriente del pico. Esta barrera limita la disponibilidad de $H_2O_2$ en la interfase del electrodo, requiriendo mayor concentración para una detección efectiva.

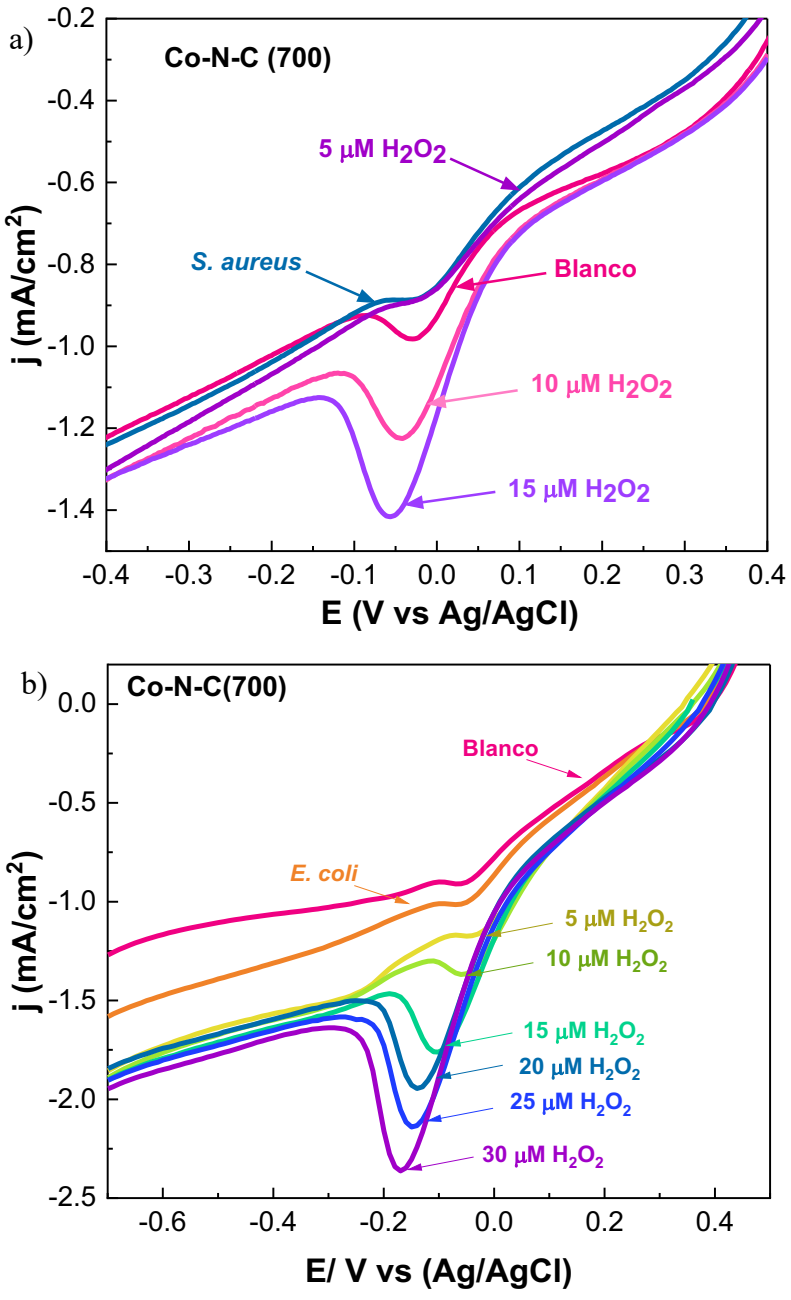



*Figura 45. Voltamperometría lineal con adiciones de $H_2O_2$ para el material Co-N-C(700)/N-NTCG con a) S. aureus y b) E. coli.*

En conjunto, estos resultados confirman que ni *E. coli* ni *S. aureus* interfieren significativamente con la detección electroquímica del peróxido de hidrógeno en las

condiciones evaluadas. La respuesta observada se mantiene atribuible al $H_2O_2$, lo que valida la alta especificidad y robustez del sistema sensor. Esto es especialmente relevante para aplicaciones en medios biológicos complejos, donde es indispensable que la señal del analito se mantenga distinguible frente a posibles interferencias celulares o moleculares.

### 4.2.5 Análisis de la densidad parcial de estados (PDOS).

Con el fin de comprender las diferencias observadas, se realizaron cálculos teóricos de energía de adsorción para evaluar la interacción de grupos hidroxiperóxido (–OOH) sobre diversas superficies representativas. Se consideraron: grafito prístino, grafito dopado con nitrógeno piridínico (dominante en el material derivado de ZIF-67 calcinado a 500 °C), centros activos de cobalto tipo Co–$N_4$ (presentes en los materiales tipo M–N–C), y partículas metálicas de cobalto con orientación cristalográfica Co(111). Los resultados, presentados en la figura 46c, muestran que la energía de adsorción del grupo –OOH varía significativamente según la superficie. El valor más bajo se obtuvo en carbono puro (0.20 eV), mientras que el más alto se registró en la superficie Co(111), con 6.23 eV. Estos datos indican una interacción más fuerte del –OOH con los sitios Co–4N y Co(111), lo cual se correlaciona con la mayor actividad hacia la reducción de peróxidos, como se muestra también en la figura 46d,e,f y g.

Además, se realizó un análisis de la Densidad Parcial de Estados (PDOS) para las superficies Co–4N y Co(111), ilustrado en las Figuras 46a y 46b. Cada figura incluye dos paneles: el superior muestra el PDOS de los orbitales O-2p (en rojo), y el inferior los de Co-3d (en azul). En la superficie Co–4N, ambos orbitales exhiben una distribución cercana al nivel de Fermi (línea punteada vertical), lo que sugiere una interacción moderada entre los átomos de oxígeno y cobalto. En contraste, en la superficie Co(111), los orbitales Co-3d presentan una densidad significativamente mayor en el nivel de Fermi, lo que se relaciona con una mayor energía de enlace y, por tanto, una mayor afinidad por el grupo –OOH.

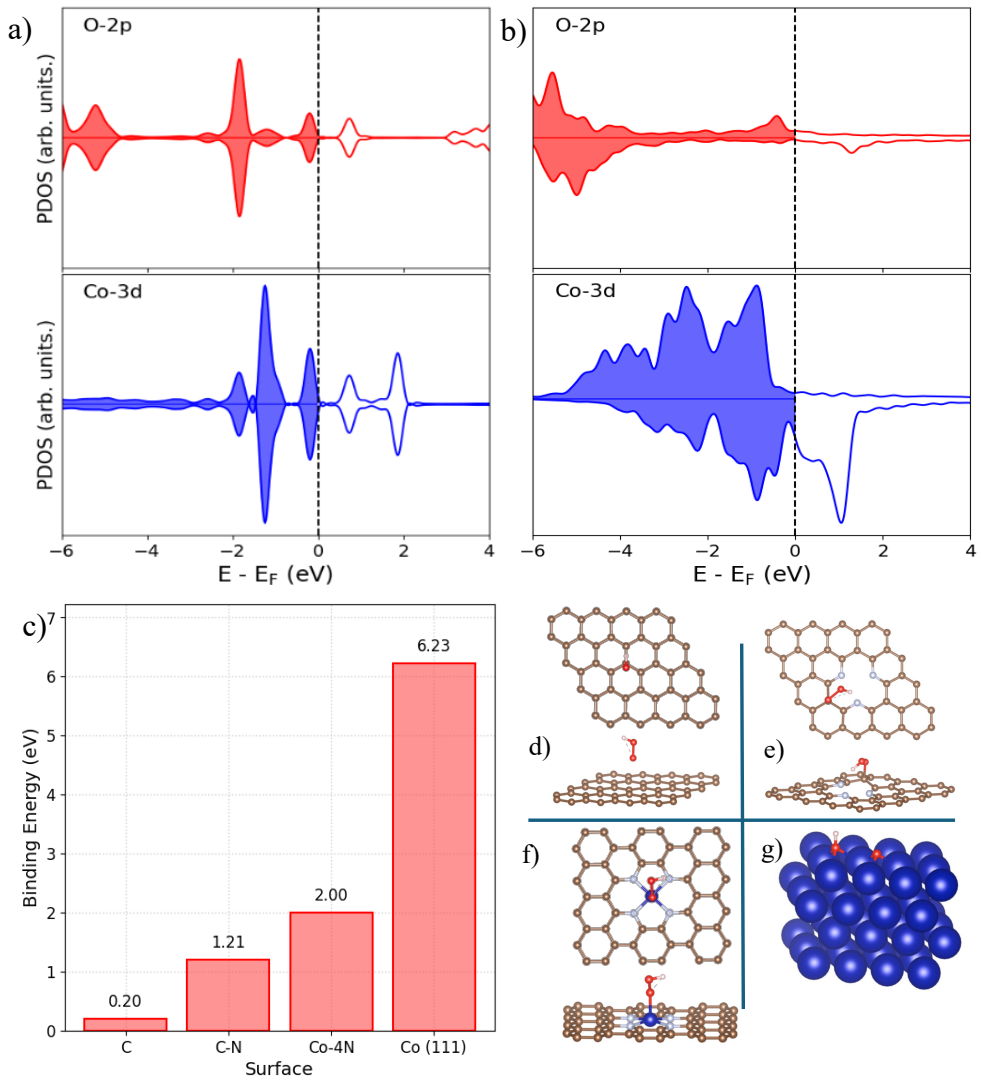



*Figura 46. Análisis de la Densidad Parcial de Estados (PDOS) de OOH quimisorbido en las superficies a) Co-4N y b) Co(111),c) energías de enlace calculadas de OOH en superficies catalíticas y estructuras atómicas optimizadas de la especie –OOH adsorbida en diferentes superficies: d) grafito prístino, e) grafito dopado con piridina, f) átomo único de Co–4N y g) superficie Co (111).*

En conjunto, estos análisis computacionales permiten sustentar los resultados electroquímicos observados y explicar el comportamiento altamente selectivo del material Co–N–C (700), atribuido a su estructura y composición optimizada para la interacción específica con $H_2O_2$. Esta correlación entre experimentación y modelado teórico resulta fundamental para el diseño racional de sensores basados en ZIFs y derivados, orientados a una detección precisa y sin interferencias.

# 5 CAPÍTULO 5. ANÁLISIS *IN OPERANDO* DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ZIF-67 Y DETECTADO CON Co-N-C(700)/N-NTCG

La evaluación del daño bacteriano bajo condiciones *in operando* constituye una estrategia avanzada para el estudio del efecto de agentes antimicrobianos en tiempo real. A diferencia de los enfoques *ex situ*, que capturan un momento estático del sistema, esta metodología permite registrar directamente las fluctuaciones fisiológicas de las bacterias vivas durante su interacción con materiales activos, proporcionando una visión más completa de los mecanismos de acción antimicrobiana. En este capítulo se presenta un sistema experimental dual enfocado en estudiar la interacción entre *E. coli* y el material ZIF-67, con énfasis en la detección electroquímica de especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular del $H_2O_2$, como marcador de estrés oxidativo.

Este sistema integra dos componentes esenciales: (i) el ZIF-67 como generador de ROS en presencia bacteriana y (ii) un sensor electroquímico basado en un electrodo modificado con Co–N–C (700 °C) sobre N-NTCG. Esta arquitectura híbrida favorece la transferencia electrónica y proporciona sitios catalíticos activos, permitiendo la reducción eficiente de $H_2O_2$. La señal electroquímica obtenida es, por tanto, una lectura directa y cuantificable del nivel de estrés oxidativo en el entorno biológico.

## 5.1 Validación del sistema: electroquímica, fluorescencia y microbiología

Para validar el desempeño del sistema, se realizaron experimentos *in operando* empleando *E. coli* a una concentración de $1 \times 10^8$ UFC/mL. Como primer paso, se estableció una línea base en PBS 1X (pH 7.4) sin bacterias ni ZIF-67, lo que permitió obtener voltamogramas carentes de contribuciones redox atribuibles a $H_2O_2$. Este control inicial resultó esencial para confirmar la ausencia de interferencias en el rango de potencial estudiado. Posteriormente, tras estabilizar la suspensión bacteriana, se adicionó ZIF-67 (2 mg/mL), iniciando así el monitoreo dinámico. En los primeros ciclos, la corriente catódica permaneció constante, lo que permitió establecer un umbral confiable de referencia para la detección electroquímica, como se aprecia en la Figura 47a.

A partir de los 90 minutos de incubación a 37 °C, se observó un incremento progresivo en la corriente de reducción en torno a –0.35 V, acompañado por un desplazamiento anódico del potencial de pico. Este fenómeno refleja la acumulación de peróxido de hidrógeno en la superficie del electrodo, atribuible a la activación de mecanismos bacterianos relacionados con el estrés oxidativo. Desde el punto de vista electroquímico, la alta sensibilidad del electrodo modificado con Co–N–C (700)/N-NTCG permitió detectar variaciones sutiles en la concentración de $H_2O_2$ con elevada resolución temporal, lo cual constituye un aspecto clave para trazar la evolución del proceso antimicrobiano en tiempo real.

Sin embargo, a partir de las 2 horas, la señal comenzó a decrecer paulatinamente. Este comportamiento no responde a una disminución de la sensibilidad del sensor, sino más bien a una reducción real en la producción de ROS, atribuida a la pérdida de viabilidad bacteriana. A medida que las células sucumben al daño oxidativo inducido por el ZIF-67, su capacidad de generar $H_2O_2$ se ve comprometida. Es importante destacar que en tiempos superiores a 3 horas, se observó una estabilización e incluso interferencia en la señal, posiblemente asociada a la formación de biopelículas que bloquean parcialmente la superficie activa del electrodo, afectando la difusión del analito.

La evidencia electroquímica se vio reforzada por los ensayos de fluorescencia específicos para especies reactivas de oxígeno (Figura 47b). Dichos experimentos mostraron un incremento en la señal fluorescente desde la primera hora de exposición, alcanzando un máximo alrededor de los 90 minutos, en concordancia con el aumento observado en la corriente de reducción. Este resultado confirma que el incremento electroquímico corresponde efectivamente a la acumulación de ROS intracelulares, lo que valida la naturaleza biológica del fenómeno registrado por el sensor. Sin embargo, tras este punto máximo, la señal fluorescente disminuyó abruptamente, lo que refleja la pérdida progresiva de la capacidad bacteriana de generar ROS debido al daño oxidativo ocasionado por la interacción con ZIF-67.

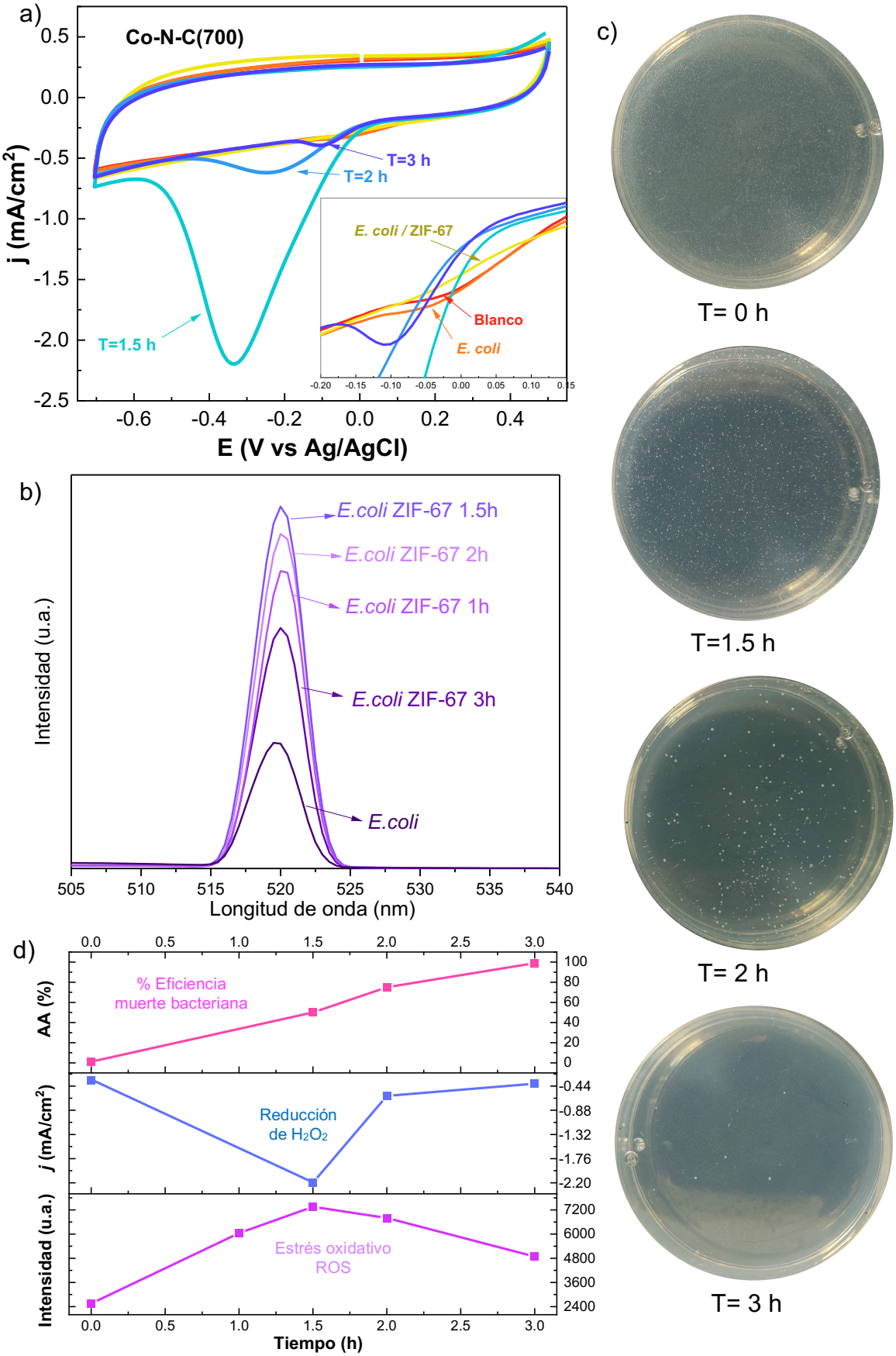



*Figura 47. a) Voltamperometría cíclica con E. coli y la medición a tiempo 0, 1.5 h, 2 h y 3 h. b) espectro de fluorescencia para detectar ROS, c) cajas petri con alícuotas en los tiempos determinados y d)comparación de los métodos.*

De manera complementaria, los análisis microbiológicos mediante recuento de colonias viables (Figura 47c) confirmaron la correlación entre el incremento inicial de la señal electroquímica y fluorescente y la posterior pérdida de viabilidad celular. Durante las primeras horas, el número de colonias disminuyó gradualmente, en concordancia con la aparición de un ambiente oxidativo intracelular hostil. A partir de las 2 horas de incubación, la señal electroquímica comenzó a decrecer, no por una pérdida en la sensibilidad del sensor, sino debido a una menor producción de ROS por parte de una población bacteriana cada vez más comprometida en términos fisiológicos. Finalmente, en tiempos superiores a 3 horas, tanto los recuentos como la señal electroquímica tendieron a estabilizarse, lo que se asocia a la formación de biopelículas. Estas estructuras complejas, además de limitar la viabilidad de la población libre, dificultan la difusión del analito hacia la superficie activa del electrodo, generando interferencias adicionales en la detección.

En la Figura 47d se comparan los tres métodos empleados. Las placas muestran la reducción progresiva de bacterias hasta alcanzar un 99 % de eficiencia a las 3 h, mientras que a las 1.5 h la viabilidad aún es cercana al 50 %. En ese mismo punto, la fluorescencia revela la mayor generación de ROS, lo que indica un nivel máximo de estrés oxidativo previo a la muerte celular. De manera consistente, la densidad de corriente evidencia en 1.5 h la mayor reducción de $H_2O_2$, confirmando que este proceso está asociado al estrés oxidativo.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran de manera integral la capacidad del sistema electroquímico basado en Co–N–C (700)/N-NTCG para registrar dinámicamente la evolución del estrés oxidativo bacteriano inducido por ZIF-67. La integración de las técnicas no solo valida que la señal electroquímica corresponde al peróxido de hidrógeno, sino que también establece una correlación directa entre la respuesta electroquímica, la generación intracelular de ROS y la viabilidad bacteriana. De este modo, se consolida este sistema como una herramienta robusta para la detección sensible, continua y selectiva de $H_2O_2$ en sistemas biológicos activos, con implicaciones significativas para el estudio de mecanismos antimicrobianos y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en materiales avanzados.

# 6 CAPÍTULO 6. PROPUESTA DEL MECANISMO DE DAÑO BACTERIANO INDUCIDO POR ZIFs.

A partir de los resultados obtenidos, es posible proponer un modelo mecanístico integral que explique la acción bactericida de los ZIFs. En este capítulo se integran los hallazgos estructurales, microbiológicos y electroquímicos para describir cómo la composición y estructura del ZIF influye en la generación de ROS, el daño a nivel celular y genético, y la detección electroquímica del estrés oxidativo inducido [24], [112] .

En este trabajo, la producción de especies reactivas de oxígeno se corroboró mediante ensayos de fluorescencia, tanto en el espectro como a través de imágenes de microscopía en *E. coli*, evidenciando un incremento notable de la señal asociada a ROS en las bacterias expuestas a los materiales. Esta observación se traduce en la confirmación de un ambiente intracelular prooxidante generado por la interacción con los materiales, directamente relacionado con el inicio del daño celular. De manera complementaria, la fragmentación del ADN bacteriano se confirmó mediante el análisis genético por RAPD-PCR en *E. coli*, donde los patrones de bandas alterados respecto al control constituyen una evidencia clara de daño directo al material genético, lo cual impacta la capacidad de replicación bacteriana.

Asimismo, las micrografías de SEM permitieron visualizar alteraciones en la morfología de *S. aureus* tras la exposición a los materiales; si bien la susceptibilidad de esta cepa fue menor en comparación con *E. coli*, las imágenes mostraron cambios en la superficie celular y pérdida de integridad, lo que aporta evidencia adicional del efecto de daño físico ejercido por los materiales.

La integración de estas evidencias experimentales permite establecer una correlación sólida entre la generación de estrés oxidativo, el daño genómico y las alteraciones estructurales de la célula bacteriana, explicando de manera integral la disminución en la viabilidad celular observada. De este modo, el presente trabajo no solo valida la ocurrencia de estos procesos, sino que aporta un modelo mecanístico más completo, en el que la liberación de iones metálicos, la producción de ROS y el daño al ADN se articulan como eventos centrales y sinérgicos en la actividad antibacteriana de los materiales estudiados.

Por su parte, la literatura ha descrito que los grupos amina presentes en el ligando orgánico cumplen un doble papel en el proceso antimicrobiano: (i) favorecen las interacciones electrostáticas entre los microorganismos y los nanomateriales y (ii) actúan como agentes amortiguadores de coordinación que facilitan la liberación de $Co^{2+}$ desde la estructura del ZIF [29], [32], [34]. Dichos iones metálicos, una vez liberados, se acumulan en la superficie bacteriana debido a las cargas negativas de la membrana de *E. coli* y son capaces de atravesarla, generando la destrucción celular [113]. Estos procesos descritos complementan y refuerzan los resultados experimentales obtenidos en este estudio.

En el caso específico del ZIF-9, su actividad antibacteriana se ha asociado en la literatura tanto a la presencia de grupos amino en el ligando benzimidazol, como a la capacidad de dicho ligando de interferir con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos bacterianos. Esta combinación favorece una actividad antimicrobiana sostenida tanto a corto como a largo plazo.

En el ZIF-67, se ha descrito que la liberación controlada de iones $Co^{2+}$ altera significativamente la homeostasis celular bacteriana, provocando la disrupción de la membrana plasmática y, en consecuencia, la muerte celular. Además, su estructura tipo jaula puede alojar otras moléculas bioactivas, lo que amplifica su efecto antibacteriano. Se ha reportado que tanto los iones metálicos como el material completo [114] pueden penetrar la bacteria y generar alteraciones estructurales en la pared y membrana celular, incluyendo la pérdida de proteínas de membrana, la reorganización estructural y la incorporación intracelular del material, efectos que contribuyen de manera conjunta a su actividad antimicrobiana.

En el caso del ZIF-L-Co, el grupo imidazol presente se considera un agente bactericida eficaz, ya que promueve una liberación rápida de iones $Co^{2+}$. No obstante, este proceso acelerado puede representar una limitante para mantener la eficacia a largo plazo.

En conjunto, la interacción sinérgica entre el ligando orgánico y los iones de cobalto se posiciona como un factor determinante en la acción antimicrobiana de los ZIFs, confiriéndoles un prometedor potencial como agentes antimicrobianos de nueva generación. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales para esclarecer completamente este mecanismo de acción. La Figura 48 representa esquemáticamente

el modelo propuesto de acción antibacteriana de los ZIFs con cobalto, en función de la conformación del ligando orgánico.

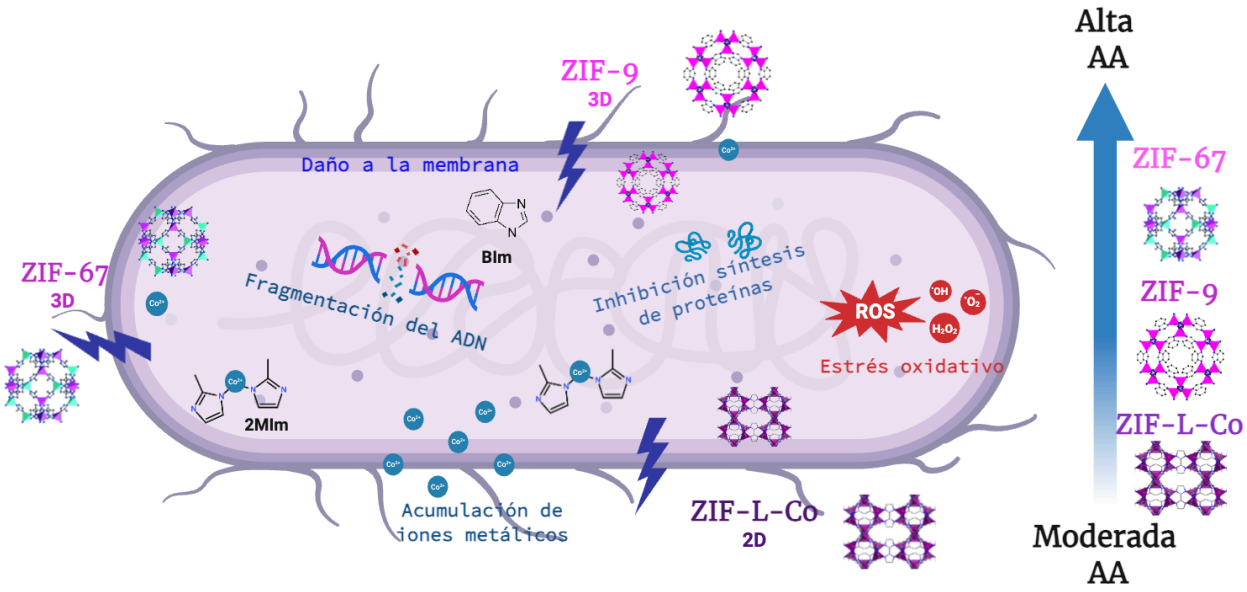



*Figura 48. Esquema representativo de la actividad antibacteriana de los ZIFs con cobalto frente a E. coli, donde se muestra la acumulación de iones metálicos, inhibición síntesis de proteínas, estrés oxidativo, daño a la membrana y fragmentación del ADN*

# 7 CAPITULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis doctoral se logró desarrollar un método electroquímico *in operando* para la detección temprana de ROS como indicadores de daño bacteriano inducido por materiales tipo ZIFs, integrando de manera efectiva la síntesis de materiales avanzados, su caracterización estructural y fisicoquímica, la evaluación de su actividad antimicrobiana, y la implementación de técnicas electroquímicas para monitoreo en tiempo real.

En primer lugar, se sintetizaron y caracterizaron con éxito materiales ZIFs (ZIF-67, ZIF-8, ZIF-7, ZIF-9, ZIF-L y ZIF-L-Co) empleando cobalto y zinc como centros metálicos y distintos ligandos orgánicos. Se demostró que las propiedades fisicoquímicas, incluyendo alta área superficial específica, para ZIF-67 de 1865 $m^2/g$, con tamaño de partícula calculados por SEM de 200 nm, y estabilidad estructural, impactan de forma directa su capacidad para liberar iones metálicos de manera controlada y su desempeño como agentes antimicrobianos.

En segundo lugar, la actividad antibacteriana frente a *E. coli* se confirmó mediante ensayos de dilución seriada, análisis de daño morfológico por SEM y daño genético mediante RAPD-PCR, observándose un daño estructural diferencial entre los ZIFs. En particular, ZIF-67 presentó una capacidad superior para inducir daño bacteriano sostenido (CMI de 62.5 µg /ml y CMB de 250 µg/ml), correlacionado con una mayor liberación de iones $Co^{2+}$ y generación de ROS, confirmada mediante ensayos de fluorescencia para detección de ROS.

Posteriormente, se obtuvieron materiales tipo Co–N–C a partir de la calcinación controlada de ZIF-67 a 500, 600 y 700 °C, soportados sobre N-NTCG, los cuales fueron caracterizados estructural y fisicoquímicamente mediante DRX, XPS, Raman, SEM y TEM, mostrando un cambio de morfología de core@shell pasando a una mezcla de estructura hueca y partícula metálicas, terminando en estructuras laminares.

Estos materiales demostraron alta actividad electrocatalítica para la detección de $H_2O_2$ mediante técnicas voltamperométricas, alcanzando sensibilidades de 18.76 $\mu A/\mu M cm^2$, límites de detección de 0.5 µM y tiempos de respuesta de 2 s, incluso en medios bacterianos, mostrando buena estabilidad y reproducibilidad para el caso de Co-N-C(700).

La integración de los materiales Co–N–C/N–NTCG en un sistema electroquímico *in operando* permitió monitorear en tiempo real la generación de $H_2O_2$ durante la interacción de *E. coli* con ZIF-67, correlacionándose con la pérdida de viabilidad bacteriana y con señales fluorescentes de ROS. Este sistema demostró ser una herramienta analítica rápida y sensible para la evaluación del estrés oxidativo bacteriano, validado frente a métodos convencionales de detección de ROS.

A partir de estos resultados, se propone un mecanismo de acción de los ZIFs basado en una acción sinérgica entre la liberación de iones metálicos, interacción electrostática con la membrana bacteriana, disrupción de la integridad de membranas y la generación de ROS intracelular, que en conjunto inducen estrés oxidativo y muerte bacteriana, destacando el rol de la estructura del ligando orgánico en la magnitud del efecto observado.

Como perspectivas del trabajo se tiene explorar la detección electroquímica de otras especies ROS relevantes ($O_2$•$^-$, •OH, $ONOO^-$) utilizando materiales Co–N–C/N–NTCG u otros electrocatalizadores derivados de MOFs. Así como desarrollar configuraciones portátiles de sensores *in operando* para aplicación en ambientes clínicos y ambientales para el monitoreo de infecciones bacterianas y evaluación rápida de tratamientos antimicrobianos. Integrar estrategias combinadas con técnicas de microscopía fluorescente o espectroscopía Raman *in situ* para correlacionar la señal electroquímica con procesos celulares específicos. Evaluar la interacción de estos materiales con cepas bacterianas multirresistentes, ampliando el impacto potencial de estos sistemas en el combate a la resistencia bacteriana.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


[1] K. A. Dunne *et al.*, "Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original Escherichia coli strain", doi: 10.6084/m9.figshare.4235762.

[2] K. Bush and P. A. Bradford, "β-lactams and β-lactamase inhibitors: An overview," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 6, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

[3] L. S. Redgrave, S. B. Sutton, M. A. Webber, and L. J. V. Piddock, "Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success," 2014, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007.

[4] A. H. Delcour, "Outer membrane permeability and antibiotic resistance," May 2009. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.

[5] X. Z. Li, P. Plésiat, and H. Nikaido, "The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria," *Clin Microbiol Rev*, vol. 28, no. 2, pp. 337–418, 2015, doi: 10.1128/CMR.00117-14.

[6] H. C. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," Sep. 2010. doi: 10.1038/nrmicro2415.

[7] C. J. H. Von Wintersdorff *et al.*, "Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer," Feb. 19, 2016, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.

[8] J. A. Imlay, "Where in the world do bacteria experience oxidative stress?," Feb. 01, 2019, *Blackwell Publishing Ltd*. doi: 10.1111/1462-2920.14445.

[9] Y. Huang, J. Ren, and X. Qu, "Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications," Mar. 27, 2019, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00672.

[10] G. Storz and J. A. Imlay, "Oxidative stress," 1999. [Online]. Available: http://biomednet.comlelecrefl1369527400200188

[11] E. Cabiscol, J. Tamarit, and J. Ros, "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species," *International Microbiol*, pp. 3–8, Dec. 2000.

[12] J. A. Imlay, "The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium," Jul. 2013. doi: 10.1038/nrmicro3032.

[13] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, and J. J. Collins, "How antibiotics kill bacteria: From targets to networks," Jun. 2010. doi: 10.1038/nrmicro2333.

[14] S. Demirci, Y. Yildrim, and N. Sahiner, "A comparison study about antibacterial activity of zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs) prepared with various metal ions," *Inorganica Chim Acta*, vol. 542, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.ica.2022.121110.

[15] X. Zhang, F. Peng, and D. Wang, "MOFs and MOF-Derived Materials for Antibacterial Application," Dec. 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/jfb13040215.

[16] Z. Chen *et al.*, "Metal-organic framework-based advanced therapeutic tools for antimicrobial applications," Feb. 01, 2024, *Acta Materialia Inc*. doi: 10.1016/j.actbio.2023.12.023.

[17] M. J. Martín-Martínez, L. Álvarez-Contreras, C. Ramos-Castillo, N. Arjona, and B. L. España-Sánchez, "Evaluation of the antibacterial activity of Co-based Zeolitic Imidazolate Frameworks and validation in a daily environment," *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 707, Feb. 2025, doi: 10.1016/j.colsurfa.2024.135917.

[18] J. Yang, Y. Chen, Y. Cao, W. Liu, T. Zhang, and H. Zhou, "pH-Responsive Bimetallic MOFs ZIF-8@ZIF-67 for Enhanced Antibacterial Activity," *ChemistrySelect*, vol. 9, no. 4, Jan. 2024, doi: 10.1002/slct.202304908.

[19] S. Sadiq *et al.*, "Synthesis of Metal-Organic Framework-Based ZIF-8@ZIF-67 Nanocomposites for Antibiotic Decomposition and Antibacterial Activities," *ACS Omega*, vol. 8, no. 51, pp. 49244–49258, Dec. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c07606.

[20] P. Khattami Kermanshahi and K. Akhbari, “The antibacterial activity of three zeolitic-imidazolate frameworks and zinc oxide nanoparticles derived from them,” *RSC Adv*, vol. 14, no. 8, pp. 5601–5608, Feb. 2024, doi: 10.1039/d4ra00447g.
[21] C. Zhang *et al.*, “ZIF-67 Derived Hollow Structured Co3O4 Nanocatalysts: Tunable Synthetic Strategy Induced Enhanced Catalytic Performance,” *Catal Letters*, vol. 149, no. 11, pp. 3058–3065, Nov. 2019, doi: 10.1007/s10562-019-02871-y.
[22] X. Xia *et al.*, “Antibacterial and anti-inflammatory ZIF-8@Rutin nanocomposite as an efficient agent for accelerating infected wound healing,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Oct. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.1026743.
[23] H. Wu, W. Zhou, and T. Yildirim, “Hydrogen storage in a prototypical zeolitic imidazolate framework-8,” *J Am Chem Soc*, vol. 129, no. 17, pp. 5314–5315, 2007, doi: 10.1021/ja0691932.
[24] R. Li, T. Chen, and X. Pan, “Metal-organic-framework-based materials for antimicrobial applications,” Mar. 23, 2021, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acsnano.0c09617.
[25] S. Aguado, J. Quirós, J. Canivet, D. Farrusseng, K. Boltes, and R. Rosal, “Antimicrobial activity of cobalt imidazolate metal-organic frameworks,” *Chemosphere*, vol. 113, pp. 188–192, 2014, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.029.
[26] M. José Martín-Martínez *et al.*, “Dual antibacterial/antiviral performance of ZIFs for highly contaminated sanitary surfaces,” *Mater Lett*, vol. 366, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.matlet.2024.136488.
[27] J. Zhang, T. Zhang, D. Yu, K. Xiao, and Y. Hong, “Transition from ZIF-L-Co to ZIF-67: A new insight into the structural evolution of zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs) in aqueous systems,” *CrystEngComm*, vol. 17, no. 43, pp. 8212–8215, 2015, doi: 10.1039/c5ce01531f.
[28] A. Lewis *et al.*, “Growth of Nanostructured Antibacterial Zeolitic Imidazolate Framework Coatings on Porous Surfaces,” *ACS Appl Nano Mater*, vol. 5, no. 11, pp. 16250–16263, Nov. 2022, doi: 10.1021/acsanm.2c03278.
[29] A. M. Mohamed, W. A. Abbas, G. E. Khedr, W. Abass, and N. K. Allam, “Computational and experimental elucidation of the boosted stability and antibacterial activity of ZIF-67 upon optimized encapsulation with polyoxometalates,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-20392-4.
[30] G. Khandelwal, N. P. Maria Joseph Raj, and S. J. Kim, “Zeolitic Imidazole Framework: Metal–Organic Framework Subfamily Members for Triboelectric Nanogenerators,” *Adv Funct Mater*, vol. 30, no. 12, Mar. 2020, doi: 10.1002/adfm.201910162.
[31] A. A. Abass, W. M. Abdulridha, W. K. Alaarage, N. H. Abdulrudha, and J. Haider, “Evaluating the antibacterial effect of cobalt nanoparticles against multi-drug resistant pathogens,” *J Med Life*, vol. 14, no. 6, pp. 823–833, 2021, doi: 10.25122/JML-2021-0270.
[32] R. Gallegos-Monterrosa *et al.*, “Antibacterial and antibiofilm activities of ZIF-67,” *Journal of Antibiotics*, vol. 76, no. 10, pp. 603–612, Oct. 2023, doi: 10.1038/s41429-023-00637-8.
[33] X. Zheng *et al.*, “Highly effective antibacterial zeolitic imidazolate framework-67/alginate fibers,” *Nanotechnology*, vol. 31, no. 37, Sep. 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab978a.
[34] J. He *et al.*, “Antibacterial Properties of Three-Dimensional Flower Cluster ZIF-L Modified by N-Doped Carbon Dots,” *Crystals (Basel)*, vol. 13, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/cryst13040564.
[35] Q. Qiu and L. Lan, “ZIF-L coated cotton fabric for antibacterial and self-cleaning applications,” Oct. 01, 2024. doi: 10.21203/rs.3.rs-4975082/v1.
[36] J. Li, Y. Zhang, H. Zhao, and G. Sui, “Preparation of 2D ZIF-L and Its Antibacterial and Antifouling Properties,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/nano13010202.

[37] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibnsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” Apr. 01, 2016, *Xi’an Jiaotong University*. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
[38] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, “Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances,” *Nat Protoc*, vol. 3, no. 2, pp. 163–175, Feb. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
[39] X. Li *et al.*, “Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 10, pp. 10682–10686, Oct. 2014, doi: 10.1021/nn5042625.
[40] R. Tofalo and A. Corsetti, “RAPD-PCR as a rapid approach for the evaluation of genotoxin-induced damage to bacterial DNA,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1644, Humana Press Inc., 2017, pp. 195–201. doi: 10.1007/978-1-4939-7187-9_18.
[41] M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann, and T. Egli, “Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 10, pp. 3283–3290, May 2007, doi: 10.1128/AEM.02750-06.
[42] Y. Xiao *et al.*, “Dual stimuli-responsive metal-organic framework-based nanosystem for synergistic photothermal/pharmacological antibacterial therapy,” *Acta Biomater*, vol. 122, pp. 291–305, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.045.
[43] B. Shen, Y. Wang, X. Wang, F. E. Amal, L. Zhu, and L. Jiang, “A Cruciform Petal-like (ZIF-8) with Bactericidal Activity against Foodborne Gram-Positive Bacteria for Antibacterial Food Packaging,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 14, Jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23147510.
[44] S. Alfei, G. C. Schito, A. M. Schito, and G. Zuccari, “Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Antibacterial Oxidative Therapies: Available Methods to Generate ROS and a Novel Option Proposal,” May 24, 2024. doi: 10.20944/preprints202405.1628.v1.
[45] B. Li *et al.*, “Visible-Light-Driven Antimicrobial Activity and Mechanism of Polydopamine-Reduced Graphene Oxide/BiVO4 Composite,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 14, Jul. 2022, doi: 10.3390/ijms23147712.
[46] X. Huang *et al.*, “Nonphytotoxic and pH-responsive ZnO-ZIF-8 loaded with honokiol as a ‘nanoweapon’ effectively controls the soil-borne bacterial pathogen Ralstonia solanacearum,” *J Hazard Mater*, vol. 472, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.jhazmat.2024.134502.
[47] E. Saygili, M. Ucuncu, and N. Horzum, “Colorimetric detection of hydrogen peroxide using nanozymes,” in *Nanozymes: Approachable Bio-applications*, Elsevier, 2024, pp. 295–314. doi: 10.1016/B978-0-443-13788-4.00007-8.
[48] P. Hou *et al.*, “Colorimetric determination of hydrogen peroxide based on the robust peroxidase-like activities of flower-like YVO4 microstructures,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 618, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.126427.
[49] R. Canaparo, F. Foglietta, T. Limongi, and L. Serpe, “Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles,” Jan. 01, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ma14010053.
[50] M. R. Krishnendu and S. Singh, “Reactive oxygen species: Advanced detection methods and coordination with nanozymes,” May 01, 2025, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.cej.2025.161296.
[51] M. A. Abdulzahra, N. Jt Al-Musawi, and R. D. Marsoul, “Chemiluminescence of Luminol: A Review,” 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/379180898
[52] V. N. Montesinos, M. Sleiman, S. Cohn, M. I. Litter, and H. Destaillats, “Detection and quantification of reactive oxygen species (ROS) in indoor air,” *Talanta*, vol. 138, pp. 20–27, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.02.015.

[53] D. Wang, D. Jana, and Y. Zhao, “Metal-Organic Framework Derived Nanozymes in Biomedicine,” 2019.
[54] Y. Zhang, M. Jiang, and T. Wang, “Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials for treating myocardial ischemia-reperfusion injury,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fbioe.2024.1469393.
[55] S. Alfei, G. C. Schito, A. M. Schito, and G. Zuccari, “Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Antibacterial Oxidative Therapies: Available Methods to Generate ROS and a Novel Option Proposal,” Jul. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms25137182.
[56] Y. Yu, M. Pan, J. Peng, D. Hu, Y. Hao, and Z. Qian, “A review on recent advances in hydrogen peroxide electrochemical sensors for applications in cell detection,” *Chinese Chemical Letters*, vol. 33, no. 9, pp. 4133–4145, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.cclet.2022.02.045.
[57] H. Liu, L. Weng, and C. Yang, “A review on nanomaterial-based electrochemical sensors for H2O2, H2S and NO inside cells or released by cells,” May 01, 2017, *Springer-Verlag Wien*. doi: 10.1007/s00604-017-2179-2.
[58] M. Murphy, K. Theyagarajan, P. Ganesan, S. Senthilkumar, and K. Thenmozhi, “Electrochemical biosensor for the detection of hydrogen peroxide using cytochrome c covalently immobilized on carboxyl functionalized ionic liquid/multiwalled carbon nanotube hybrid,” *Appl Surf Sci*, vol. 492, pp. 718–725, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2019.06.283.
[59] Y. Yu, M. Pan, J. Peng, D. Hu, Y. Hao, and Z. Qian, “A review on recent advances in hydrogen peroxide electrochemical sensors for applications in cell detection,” *Chinese Chemical Letters*, vol. 33, no. 9, pp. 4133–4145, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.cclet.2022.02.045.
[60] K. Żamojć, M. Zdrowowicz, D. Jacewicz, D. Wyrzykowski, and L. Chmurzyński, “Fluorescent Probes Used for Detection of Hydrogen Peroxide under Biological Conditions,” May 03, 2016, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/10408347.2015.1014085.
[61] H. Flamm, J. Kieninger, A. Weltin, and G. A. Urban, “Advanced electrochemical in vitro detection of superoxide radicals with fully integrated microsensor system,” in *Procedia Engineering*, Elsevier Ltd, 2015, pp. 26–30. doi: 10.1016/j.proeng.2015.08.558.
[62] S. Duanghathaipornsuk *et al.*, “Detection Technologies for Reactive Oxygen Species: Fluorescence and Electrochemical Methods and Their Applications,” 2021, doi: 10.3390/bios11020.
[63] T. Zhang, X. Du, and Z. Zhang, “Advances in electrochemical sensors based on nanomaterials for the detection of lipid hormone,” Sep. 09, 2022, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fbioe.2022.993015.
[64] S. Duanghathaipornsuk, E. J. Farrell, A. C. Alba-Rubio, P. Zelenay, and D. S. Kim, “Detection Technologies for Reactive Oxygen Species: Fluorescence and Electrochemical Methods and Their Applications,” Feb. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/BIOS11020030.
[65] M. P. Murphy *et al.*, “Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo,” *Nat Metab*, vol. 4, no. 6, pp. 651–662, Jun. 2022, doi: 10.1038/s42255-022-00591-z.
[66] A. N. Vaneev *et al.*, “In Vitro and in Vivo Electrochemical Measurement of Reactive Oxygen Species after Treatment with Anticancer Drugs,” *Anal Chem*, vol. 92, no. 12, pp. 8010–8014, Jun. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01256.
[67] A. Mechoor, S. Berchmans, and G. Venkatachalam, “Bimetallic Cu-Zn Zeolitic Imidazolate Frameworks as Peroxidase Mimics for the Detection of Hydrogen Peroxide: Electrochemical and Spectrophotometric Evaluation,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 42, pp. 39636–39650, Oct. 2023, doi: 10.1021/acsomega.3c05535.

[68] J. Liu *et al.*, “Advances in Non-Enzymatic electrochemical materials for H2O2 sensing,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 954, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.jelechem.2024.118060.
[69] S. Zhou *et al.*, “ZIF-67 MOF-derived Co nanoparticles supported on N-doped carbon skeletons for the amperometric determination of hydrogen peroxide,” *Microchimica Acta*, vol. 188, no. 11, Nov. 2021, doi: 10.1007/s00604-021-05020-8.
[70] Y. Dong and J. Zheng, “Environmentally friendly synthesis of Co-based zeolitic imidazolate framework and its application as H2O2 sensor,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 392, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.cej.2019.123690.
[71] Z. Wu, L. P. Sun, Z. Zhou, Q. Li, L. H. Huo, and H. Zhao, “Efficient nonenzymatic H2O2 biosensor based on ZIF-67 MOF derived Co nanoparticles embedded N-doped mesoporous carbon composites,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 276, pp. 142–149, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.08.100.
[72] Y. Qin, Y. Sun, Y. Li, C. Li, L. Wang, and S. Guo, “MOF derived Co3O4/N-doped carbon nanotubes hybrids as efficient catalysts for sensitive detection of H2O2 and glucose,” *Chinese Chemical Letters*, vol. 31, no. 3, pp. 774–778, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.cclet.2019.09.016.
[73] M. Liu, S. He, and W. Chen, “Co3O4 nanowires supported on 3D N-doped carbon foam as an electrochemical sensing platform for efficient H2O2 detection,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 20, pp. 11769–11776, Oct. 2014, doi: 10.1039/c4nr03043e.
[74] M. Wu, Y. Hong, X. Zang, and X. Dong, “ZIF-67 Derived Co3O4/rGO Electrodes for Electrochemical Detection of H2O2 with High Sensitivity and Selectivity,” *ChemistrySelect*, vol. 1, no. 18, pp. 5727–5732, Nov. 2016, doi: 10.1002/slct.201601259.
[75] D. Zhang *et al.*, “Quick synthesis of zeolitic imidazolate framework microflowers with enhanced supercapacitor and electrocatalytic performances,” *RSC Adv*, vol. 5, no. 72, pp. 58772–58776, 2015, doi: 10.1039/c5ra08226a.
[76] S. Zhao *et al.*, “Recent advances of electrochemical sensors for detecting and monitoring ROS/RNS,” May 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.bios.2021.113052.
[77] Q. Lyu *et al.*, “Real-Time and In-Situ Monitoring of H 2 O 2 Release from Living Cells by a Stretchable Electrochemical Biosensor Based on Vertically Aligned Gold Nanowires,” Sep. 2019. Accessed: Jun. 02, 2025. [Online]. Available: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b02610
[78] Q. Song, Q. Li, J. Yan, and Y. Song, “Echem methods and electrode types of the current in vivo electrochemical sensing,” Jun. 15, 2022, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d2ra01273a.
[79] A. S. Deshpande, W. Muraoka, and S. Andreescu, “Electrochemical sensors for oxidative stress monitoring,” Oct. 01, 2021, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.coelec.2021.100809.
[80] A. Berndt *et al.*, “Ultra-fast genetically encoded sensor for precise real-time monitoring of physiological and pathophysiological peroxide dynamics,” Mar. 25, 2024. doi: 10.21203/rs.3.rs-4048855/v1.
[81] J. Niemeyer, D. Scheuring, J. Oestreicher, B. Morgan, and M. Schroda, “Real-time monitoring of subcellular H2O2 distribution in Chlamydomonas reinhardtii,” *Plant Cell*, vol. 33, no. 9, pp. 2935–2949, Sep. 2021, doi: 10.1093/plcell/koab176.
[82] S. Duanghathaipornsuk *et al.*, “Detection Technologies for Reactive Oxygen Species: Fluorescence and Electrochemical Methods and Their Applications,” 2021, doi: 10.3390/bios11020.
[83] X. Wu, M. Niknam Shahrak, B. Yuan, and S. Deng, “Synthesis and characterization of zeolitic imidazolate framework ZIF-7 for CO2 and CH4 separation,” *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 190, pp. 189–196, May 2014, doi: 10.1016/j.micromeso.2014.02.016.

[84] M. A. Rahaman, B. Mousavi, F. Naz, and F. Verpoort, “Two-Dimensional Zeolitic Imidazolate Framework ZIF-L: A Promising Catalyst for Polymerization,” *Catalysts*, vol. 12, no. 5, May 2022, doi: 10.3390/catal12050521.
[85] R. Castellanos-Espinoza *et al.*, “The impact of the design of MoO3 nanorods on the bactericidal performance,” *Appl Surf Sci*, vol. 684, Mar. 2025, doi: 10.1016/j.apsusc.2024.161889.
[86] J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V Tingey, “DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.” [Online]. Available: http://nar.oxfordjournals.org/
[87] O. E. Valencia-Ledezma, C. A. Castro-Fuentes, E. Duarte-Escalante, M. G. Frías-De-león, and M. D. R. Reyes-Montes, “Selection of Polymorphic Patterns Obtained by RAPD-PCR through Qualitative and Quantitative Analyses to Differentiate Aspergillus fumigatus,” *Journal of Fungi*, vol. 8, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/jof8030296.
[88] K. Archana, N. G. Pillai, K. Y. Rhee, and A. Asif, “Super paramagnetic ZIF-67 metal organic framework nanocomposite,” *Compos B Eng*, vol. 158, no. September 2018, pp. 384–389, 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2018.10.005.
[89] X. Guo, T. Xing, Y. Lou, and J. Chen, “Controlling ZIF-67 crystals formation through various cobalt sources in aqueous solution,” *J Solid State Chem*, vol. 235, no. 3, pp. 107–112, 2016, doi: 10.1016/j.jssc.2015.12.021.
[90] B. N. Joshi *et al.*, “Tuning crystalline structure of zeolitic metal–organic frameworks by supersonic spraying of precursor nanoparticle suspensions,” *Mater Des*, vol. 114, pp. 416–423, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.matdes.2016.11.001.
[91] A. L. Chang, V. H. Nguyen, K. Y. A. Lin, and C. Hu, “Selective synthesis of ZIFs from zinc and nickel nitrate solution for photocatalytic H2O2 production,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 11, pp. 8301–8308, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.04.027.
[92] A. Khan *et al.*, “ZIF-67 filled PDMS mixed matrix membranes for recovery of ethanol via pervaporation,” *Sep Purif Technol*, vol. 206, no. April, pp. 50–58, 2018, doi: 10.1016/j.seppur.2018.05.055.
[93] B. Sherino, S. Mohamad, S. N. Abdul Halim, and N. S. Abdul Manan, “Electrochemical detection of hydrogen peroxide on a new microporous Ni–metal organic framework material-carbon paste electrode,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 254, pp. 1148–1156, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.08.002.
[94] Z. Öztürk, J. P. Hofmann, M. Lutz, M. Mazaj, N. Z. Logar, and B. M. Weckhuysen, “Controlled synthesis of phase-pure zeolitic imidazolate framework Co-ZIF-9,” *Eur J Inorg Chem*, vol. 2015, no. 9, pp. 1625–1630, 2015, doi: 10.1002/ejic.201403077.
[95] V. A. Polyakov;, V. V. Butova;, E. A. Erofeeva;, Tereshchenko;, A. A.;, and A. V. Soldatov, “MW Synthesis of ZIF-7. The E ect of Solvent on Particle Size and Hydrogen Sorption Properties,” *Energies (Basel)*, vol. 13, no. 6303, p. 9245, 2020.
[96] X. Yang, J. Gu, C. Liu, Z. Bai, and L. Yang, “Partial deligandation activated ZIF-67 for efficient electrocatalytic oxygen reduction reaction,” *Front Chem*, vol. 10, Oct. 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.983549.
[97] J. Narimbi, S. Balakrishnan, T. S. Perova, G. Dee, G. F. Swiegers, and Y. K. Gun’ko, “XRD and Spectroscopic Investigations of ZIF—Microchannel Glass Plates Composites,” *Materials*, vol. 16, no. 6, Mar. 2023, doi: 10.3390/ma16062410.
[98] R. Miguel Sábio, G. Corrêa Carvalho, J. Li, M. Chorilli, and H. A. Santos, “Advanced porous materials for antimicrobial treatment,” *Nano Select*, vol. 5, no. 7–8, Aug. 2024, doi: 10.1002/nano.202300114.
[99] M. E. Özgür *et al.*, “The in vitro toxicity analysis of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on kinematics and biochemical quality of rainbow trout sperm cells,” *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 62, pp. 11–19, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.etap.2018.06.002.

[100] M. E. Özgür *et al.*, "The Cytotoxicity, DNA Fragmentation, and Decreasing Velocity Induced By Chromium(III) Oxide on Rainbow Trout Spermatozoa," *Biol Trace Elem Res*, vol. 201, no. 2, pp. 968–983, Feb. 2023, doi: 10.1007/s12011-022-03211-9.
[101] F. Moreno-Olivas, V. U. Gant, K. L. Johnson, J. R. Peralta-Videa, and J. L. Gardea-Torresdey, "Random amplified polymorphic DNA reveals that TiO2 nanoparticles are genotoxic to Cucurbita pepo," *Journal of Zhejiang University: Science A*, vol. 15, no. 8, pp. 618–623, 2014, doi: 10.1631/jzus.A1400159.
[102] Y. Peng *et al.*, "Oxygen-Containing Functional Groups Regulating the Carbon/Electrolyte Interfacial Properties Toward Enhanced K+ Storage," *Nanomicro Lett*, vol. 13, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2021, doi: 10.1007/S40820-021-00722-3/FIGURES/5.
[103] K. Dai, N. Zhang, L. Zhang, L. Yin, Y. Zhao, and B. Zhang, "Self-supported Co/CoO anchored on N-doped carbon composite as bifunctional electrocatalyst for efficient overall water splitting," *Chemical Engineering Journal*, vol. 414, p. 128804, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.CEJ.2021.128804.
[104] J. C. Li, X. T. Wu, L. J. Chen, N. Li, and Z. Q. Liu, "Bifunctional MOF-derived Co-N-doped carbon electrocatalysts for high-performance zinc-air batteries and MFCs," *Energy*, vol. 156, pp. 95–102, Aug. 2018, doi: 10.1016/J.ENERGY.2018.05.096.
[105] H. M. Xu *et al.*, "Recent advances in Fe-N-C- and Co-N-C-based materials as bifunctional electrocatalysts for oxygen reduction and oxygen evolution," *Science China Chemistry 2023 67:4*, vol. 67, no. 4, pp. 1137–1160, Dec. 2023, doi: 10.1007/S11426-023-1863-8.
[106] N. Liu *et al.*, "Synthesis of highly efficient Co3O4 catalysts by heat treatment ZIF-67 for CO oxidation," *J Solgel Sci Technol*, vol. 88, no. 1, pp. 163–171, Oct. 2018, doi: 10.1007/s10971-018-4784-x.
[107] A. Liu *et al.*, "Metal-Organic-Framework-Derived Cobalt-Doped Carbon Material for Electrochemical Ammonia Synthesis under Ambient Conditions," *ChemElectroChem*, vol. 7, no. 24, pp. 4900–4905, Dec. 2020, doi: 10.1002/celc.202001332.
[108] P. Wu, P. Du, H. Zhang, and C. Cai, "Microscopic effects of the bonding configuration of nitrogen-doped graphene on its reactivity toward hydrogen peroxide reduction reaction," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 18, pp. 6920–6928, Apr. 2013, doi: 10.1039/C3CP50900A.
[109] L. Li *et al.*, "Tailoring Selectivity of Electrochemical Hydrogen Peroxide Generation by Tunable Pyrrolic-Nitrogen-Carbon," *Adv Energy Mater*, vol. 10, no. 21, p. 2000789, Jun. 2020, doi: 10.1002/AENM.202000789.
[110] W. Peng *et al.*, "Facilitating two-electron oxygen reduction with pyrrolic nitrogen sites for electrochemical hydrogen peroxide production," *Nature Communications 2023 14:1*, vol. 14, no. 1, pp. 1–11, Jul. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-40118-y.
[111] R. Wang, L. Jiang, Q. Wang, G. F. Wei, and X. Wang, "Metal-organic framework-derived highly active cobalt-nitrogen-carbon hybrid arrays for efficient hydrogen evolution reaction," *Adv Compos Hybrid Mater*, vol. 6, no. 5, pp. 1–13, Oct. 2023, doi: 10.1007/S42114-023-00735-Z/METRICS.
[112] N. Ahmad, N. A. H. M. Nordin, J. Jaafar, A. F. Ismail, and M. K. N. B. Ramli, "Significant improvement in antibacterial property of ZIF-8 decorated graphene oxide by post-synthetic modification process," *J Environ Chem Eng*, vol. 9, no. 5, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.jece.2021.105887.
[113] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, and M. Epple, "Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions," *Chemistry of Materials*, vol. 22, no. 16, pp. 4548–4554, Aug. 2010, doi: 10.1021/cm100023p.
[114] A. Maleki, M. A. Shahbazi, V. Alinezhad, and H. A. Santos, "The Progress and Prospect of Zeolitic Imidazolate Frameworks in Cancer Therapy, Antibacterial Activity, and Biomineralization," Jun. 01, 2020, *Wiley-VCH Verlag*. doi: 10.1002/adhm.202000248.

[115] M. Fasnacht and N. Polacek, “Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology,” May 10, 2021, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmolb.2021.671037.
[116] C. Marambio-Jones and E. M. V. Hoek, “A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment,” Jun. 2010. doi: 10.1007/s11051-010-9900-y.
[117] X. Wang *et al.*, “Initiative ROS generation of Cu-doped ZIF-8 for excellent antibacterial performance,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 466, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.cej.2023.143201.
[118] D. Mao, J. M. Griffin, R. Dawson, A. Fairhurst, and N. Bimbo, “Metal organic frameworks for hydrogen purification,” *Int J Hydrogen Energy*, vol. 46, no. 45, pp. 23380–23405, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijhydene.2020.12.181.
[119] A. L. Chang, V. H. Nguyen, K. Y. A. Lin, and C. Hu, “Selective synthesis of ZIFs from zinc and nickel nitrate solution for photocatalytic H2O2 production,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 11, pp. 8301–8308, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2020.04.027.
[120] T. Shi, S. Hussain, C. Ge, G. Liu, M. Wang, and G. Qiao, “ZIF-X (8, 67) based nanostructures for gas-sensing applications,” Aug. 01, 2023, *De Gruyter Open Ltd*. doi: 10.1515/revce-2021-0100.
[121] J. Zakzeski, A. Dbczak, P. C. A. Bruijnincx, and B. M. Weckhuysen, “Catalytic oxidation of aromatic oxygenates by the heterogeneous catalyst Co-ZIF-9,” *Appl Catal A Gen*, vol. 394, no. 1–2, pp. 79–85, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.apcata.2010.12.026.
[122] R. Gonzalez-Pastor *et al.*, “Current Landscape of Methods to Evaluate Antimicrobial Activity of Natural Extracts,” Feb. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules28031068.
[123] A. N. AlSharksi, S. Sirekbasan, T. Gürkök-Tan, and A. Mustapha, “From Tradition to Innovation: Diverse Molecular Techniques in the Fight Against Infectious Diseases,” Nov. 04, 2024. doi: 10.20944/preprints202411.0180.v1.
[124] Y. Mirzaei, A. Gholami, A. Sheini, and M. M. Bordbar, “An origami-based colorimetric sensor for detection of hydrogen peroxide and glucose using sericin capped silver nanoparticles,” *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-34299-1.
[125] H. Sohrabi, F. Maleki, P. Khaaki, M. Kadhom, N. Kudaibergenov, and A. Khataee, “Electrochemical-Based Sensing Platforms for Detection of Glucose and H2O2 by Porous Metal–Organic Frameworks: A Review of Status and Prospects,” Mar. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/bios13030347.

# ANEXOS

## Anexo I. Producción cientifica

Materials Letters
Volume 366, 1 July 2024, 136488

### Dual antibacterial/antiviral performance of ZIFs for highly contaminated sanitary surfaces

María José Martín-Martínez [a], Alejandro López-Amador [a], Abel Gutiérrez-Ortega [b], Claramaría Rodríguez-González [a], Lorena Álvarez-Contreras [c], Noe Arjona [a] ✉, Beatriz Liliana España-Sánchez [a] ✉

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects
Volume 707, 20 February 2025, 135917

### Evaluation of the antibacterial activity of Co-based Zeolitic Imidazolate Frameworks and validation in a daily environment

María José Martín-Martínez [a], Lorena Álvarez-Contreras [b], Carlos Ramos-Castillo [a], Noé Arjona [a] ✉, Beatriz Liliana España-Sánchez [a] ✉

Biosensors and Bioelectronics
Volume 284, 15 September 2025, 117556

### *In-operando* electrochemical detection of hydrogen peroxide during bacteria damage using ZIF-67 derived electrocatalysts

María José Martín Martínez [a], Alexander Suárez-Barajas [a], Carlos M. Ramos-Castillo [a], Lorena Álvarez Contreras [b], Beatriz Liliana España Sánchez [a] ✉, Noé Arjona [a] ✉

# Anexo II. Premios y participación en congresos

La Sociedad Mexicana de Electroquímica

Otorga la presente

**CONSTANCIA**

A: **M. J. Martín Martínez, L. Álvarez-Contreras, M. Guerra-Balcázar, B. L. España Sánchez, N. Arjona**

Por su destacada participación en la modalidad Oral/Presencial, con el trabajo titulado:

**Efecto de la temperatura de calcinación de ZIFs en la obtención de carbono mesoporoso dopado con heteroatomos (M-N-C) y su impacto en la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno**

Dentro del XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 15th Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society, **en modalidad híbrida**, celebrado del 10 al 14 de octubre de 2022 en la Facultad de Ciencias Químicas y Facultad de Ingeniería de la BUAP. Puebla, Pue., México.

**Dr. José A. Cabral Miramontes**
Presidente del Comité Ejecutivo
SMEQ 2021 - 2023

**Dra. Erika Méndez Albores**
Presidenta del Comité Organizador
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS 2023 Cancún, México

The Organizing Committee
Acknowledges the Participation of

**María José Martín Martínez**

in the

**31st International Materials Research Congress**
held in Cancun, Mexico
from August 13th to 18th, 2023

**Dr. Jesús González Hernández**
SMMater President

Se otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

María José Martín Martínez

Por su asistencia y presentación del trabajo titulado:

**Hydrogen peroxide detection on interface-engineered atomically dispersed Co material / N-doped carbon composites**

Por:
María José Martín Martínez, Lorena Alvarez Contreras, Beatriz Liliana España Sanchez, Noé Arjona

En la modalidad de cartel en el VIII Congreso de Especies Reactivas del Oxigeno en Biologia y Medicina 26 - 29 de septiembre de 2023, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Mina Königsberg Fainstein

La Sociedad Mexicana de Electroquímica

Otorga la presente

*Constancia*

A: *M. J. Martín Martínez, L. Álvarez-Contreras, B. L. España Sanchez, N. Arjona**

Por su destacada participación en la modalidad **Oral/Presencial**, dentro del ***XXXVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica*** y el ***16th Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society***, en modalidad híbrida, en la Facultad de Ingeniería Mochis de la Universidad Autónoma de Sinaloa, con el trabajo **(EM-OB)** titulado:

***Efecto de los ligandos orgánicos en ZIFs para la detección electroquímica de $H_2O_2$***

Los Mochis, Sinaloa, México; Octubre 16 al 20 de 2023.

**Dr. José Ángel Cabral Miramontes**
Presidente del Comité Ejecutivo
SMEQ 2021-2023

**Dra. Rosa Elba Núñez Jaquez**
Presidente del Comité Organizador
Universidad Autónoma de Sinaloa

**Dr. Carlos Paulino Barrios Durstewitz**
Presidente del Comité Organizador
Universidad Autónoma de Sinaloa

EL CAPÍTULO ESTUDIANTIL SMMATER CFATA-UNAM Y EL CAPÍTULO ESTUDIANTIL SMMATER-QUERÉTARO
OTORGAN LA PRESENTE CONSTANCIA DE

**2DO LUGAR**

A: MARÍA JOSÉ MARTÍN MARTÍNEZ

Por su destacada participación en la modalidad **Cartel/Presencial**, dentro del "**Tercer Congreso Estatal de Materiales**" en modalidad híbrida, en el Centro Académico Cultural UNAM, Campus Juriquilla, Qro.

Santiago de Querétaro, Querétaro, México; 21 al 24 de mayo del 2024

M. C. VÍCTOR JULIÁN GONZÁLEZ NAVA
Presidente del CE SMMater-Querétaro

ING. LILIANA MENDOZA OLGUÍN
Vicepresidenta del CE SMMater-Querétaro

SMEQ 2024

LA SOCIEDAD MEXICANA DE ELECTROQUÍMICA
OTORGA EL PRESENTE

**RECONOCIMIENTO**

A:

María José Martín-Martínez, Lorena Álvarez Contreras, Beatriz Liliana España Sánchez, Noé Arjona

Por haber participado en el XXXIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y 17th Meeting of the Mexican Section of the Electrochemical Society, del 7 al 11 de octubre de 2024 en la ciudad de San Francisco de Campeche, Campeche, con el trabajo en modalidad **oral-presencial** titulado:

**EMB-001 Análisis in situ del estrés oxidativo de E. coli en contacto con ZIF-67 mediante la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno.**

**DRA. CITLALLI GAONA TIBURCIO**
Presidenta del Comité Ejecutivo de la SMEQ 2023-2025

**DR. TEZOZOMOC PÉREZ LOPEZ**
Presidente del Comité Organizador Congreso SMEQ 2024

RECONOCIMIENTO
A
*María José Martín Martínez*
POR OBTENER EL
**PRIMER LUGAR**
EN EL CONCURSO DE CARTELES DEL 1ER CONGRESO ESTUDIANTIL ECS-MX 2024
"NUEVAS TENDENCIAS EN ELECTROQUÍMICA"

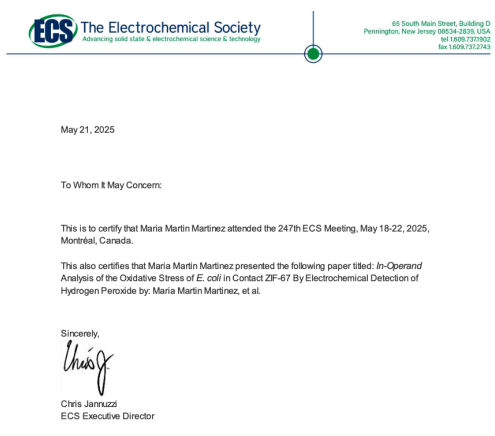
Celebrada del 18 al 20 de septiembre de 2024 en el Cerro de las Campanas S/N-Polifórum Deportivo-Cultural, Centro Universitario, 76017 Santiago de Querétaro, Qro.

M. en C. Alexander Suárez Barajas
Presidente del Capítulo Estudiantil ECS-CIDETEQ

Dr. René Antaño López
Director General del CIDETEQ

Ing. Sebastián Mori Huerta
Presidente del Capítulo Estudiantil ECS-UAQ

Dr. Luis Arturo Godínez Mora-Tovar
Coordinador del Doctorado en Ciencia y Tecnología Químico-Ambiental



The Electrochemical Society
Advancing solid state & electrochemical science & technology

65 South Main Street, Building D
Pennington, New Jersey 08534-2839, USA
tel 1.609.7371902
fax 1.609.7372743

May 21, 2025

To Whom It May Concern:

This is to certify that Maria Martin Martinez attended the 247th ECS Meeting, May 18-22, 2025, Montréal, Canada.

This also certifies that Maria Martin Martinez presented the following paper titled: *In-Operand* Analysis of the Oxidative Stress of *E. coli* in Contact ZIF-67 By Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide by: Maria Martin Martinez, et al.

Sincerely,

Chris Jannuzzi
ECS Executive Director