



SEP

SES

TecNM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

**“DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FOTOCATALÍTICAS
Y MICROBICIDAS DE NANOPARTÍCULAS DE Fe/Zn Y Fe/Zn/Mg
FITOSINTETIZADAS UTILIZANDO *Hydrocotyle ranunculoides*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA:
M. EN C. JOSÉ ÁNGEL SANJURJO GARCÍA
No. DE CONTROL: 0728D1050**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA SONIA MIREYA MARTÍNEZ GALLEGOS**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
DR. PABLO SAMUEL SCHABES RETCHKIMAN**

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, ENERO DE 2022

CONTENIDO

Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	1
1. Fundamentos.....	2
1.1 Contaminación del agua	2
1.1.1 Contaminación microbiológica del agua.....	2
1.1.2 Técnicas de tratamiento de agua enfocadas a la carga orgánica y microorganismos.	4
1.2 Nanotecnología.....	5
1.2.1 Propiedades de los nanomateriales	6
1.2.2 Nanopartículas.....	7
1.2.3 Métodos de síntesis de NPs.....	8
1.2.4 Fitosíntesis.....	11
1.2.5 Aplicaciones de NPs bimetálicas fitosintetizadas.....	14
1.2.6 <i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	15
1.3. Compuestos polifenólicos	17
1.3.1 Taninos	18
1.3.2 Prueba de Folin-Ciocalteu	20
1.4. Técnicas de caracterización de NPs.....	21
1.4.1 Microscopía electrónica de barrido.....	21
1.4.2 Microscopía electrónica de transmisión	22
1.5. Colorantes sintéticos.....	22
1.5.1 Rojo No. 40.....	24
1.6. Actividad fotocatalítica	24
1.6.1 Fotocatálisis.....	25
1.6.2 Mecanismo de actividad fotocatalítica.....	26
1.6.3 Efecto de la concentración del catalizador	28
1.6.4 Efecto del pH	29

1.6.5 Efecto de la temperatura	30
2. Método.....	31
2.1 Materiales.....	32
2.2 Recolección y acondicionamiento de la muestra.....	32
2.3 Síntesis de nanopartículas.....	32
2.3.1 Método 1	32
2.3.2 Método 2.....	33
2.3.3 Método 3.....	33
2.4 Caracterización UV-Vis.....	34
2.4.1 Muestra cruda y EV2	34
2.4.2 Nanopartículas.....	34
2.4.3 Compuestos polifenólicos totales	34
2.5 Caracterización en SEM	35
2.6 Caracterización en TEM	35
2.7 Actividad fotocatalítica	35
2.8 Actividad microbica	36
3. Resultados.....	38
3.1. Caracterización de nanopartículas	38
3.1.1 Compuestos polifenólicos totales	38
3.1.2. Caracterización UV-Vis	39
3.1.3 Caracterización IR	46
3.1.4 SEM	48
3.1.5 TEM	54
3.2 Actividad fotocatalítica	69
3.3 Actividad microbica	71
Conclusiones	76
Referencias	78
Anexos.....	84

Relación de figuras

	Página
1.1	Técnicas de desinfección microbiológica 4
1.2	Técnicas híbridas de desinfección microbiológica 5
1.3	Clasificación general de nanopartículas 8
1.4	Métodos de síntesis de nanopartículas 9
1.5	Procesos generales para la producción de NPs 9
1.6	Rutas de generación de NPs por biosíntesis 10
1.7	Factores que influyen la estabilidad, tamaño y forma de NPs 12
1.8	Mecanismo autocatalítico de formación de NPs 13
1.9	<i>Hydrocotyle ranunculoides</i> 16
1.10	Compuestos polifenólicos presentes en <i>Hydrocotyle ranunculoides</i> 16
1.11	Estructura química de ácidos fenólicos 17
1.12	Estructura química de la 2-fenil-1,4-benzopirona 18
1.13	Estructuras químicas básicas de los taninos hidrolizables 19
1.14	Estructura básica de un tanino condensado 19
1.15	Mecanismo de reacción entre FC y ácido gálico 20
1.16	Estructura química del Rojo No. 40 24
1.17	Mecanismo de oxidación de los huecos de banda de valencia 27
1.18	Mecanismo de generación/acción de los ROS 28
1.19	Ecuaciones para el monitoreo cinético de fotocátalisis 28
1.20	Efecto del pH en fotocátalisis 29
2.1	Metodología 31
3.1	Curva estándar de Folin-Ciocalteu 38
3.2	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH4 40
3.3	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH4 41
3.4	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH4 42
3.5	Espectro UV-Vis de solución metálica Fe/Zn 42
3.6	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH7 43
3.7	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH7 44
3.8	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH7 44

3.9	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH10	45
3.10	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH10	46
3.11	Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH10	46
3.12	Espectros IR de NPs	47
3.13	Micrografías en SEM de M1 pH4	48
3.14	Micrografías en SEM de M2 pH4	49
3.15	Micrografías en SEM de M3 pH4	50
3.16	Micrografías en SEM de M1 pH7	50
3.17	Micrografías en SEM de M2 pH7	51
3.18	Micrografías en SEM de M3 pH7	51
3.19	Micrografías en SEM de M1 pH10	52
3.20	Micrografías en SEM de M2 pH10	53
3.21	Micrografías en SEM de M3 pH10	53
3.22	Micrografía por TEM de M1 con FFT	54
3.23	Micrografía por TEM de M2 con FFT	55
3.24	Micrografía por TEM de M3	55
3.25	Micrografía por TEM de M3 con FFT	56
3.26	Micrografías por TEM de M1 a baja amplificación	57
3.27	Acercamiento al borde de un racimo obtenido por M1	58
3.28	SAED obtenido por M1	59
3.29	Micrografías por TEM obtenidas por M2 a baja amplificación	59
3.30	Micrografías obtenidas por TEM de M2 y sus respectivos FFTs	60
3.31	SAED obtenido por M2	61
3.32	Micrografías por TEM obtenidas por M3 a baja resolución	61
3.33	Nanopartículas sintetizadas por M3	63
3.34	SAED obtenido por M3	64
3.35	Micrografías por TEM obtenidas por M1 a baja resolución	64
3.36	Nanopartículas sintetizadas por M1	65
3.37	Micrografías TEM de NPs obtenidas por M2 a pH10	66
3.38	Nanopartículas sintetizadas por M2	67
3.39	Micrografías TEM de NPs obtenidas por M3 a pH10	68

3.40	Nanopartículas sintetizadas por M3	69
3.41	Curva estándar de rojo No. 40	70
3.42	Gráficas de ajuste de fotocátalisis	71

Resumen

En el presente trabajo se ha verificado la reproducibilidad de los tres métodos de síntesis de nanopartículas metálicas de hierro, zinc y magnesio a partir del extracto vegetal de *Hydrocotyle ranunculoides*, cuyos compuestos fitoquímicos de dicho extracto se identificaron como flavonoides, saponinas y clorofilas.

La ruta de generación de nanopartículas deriva en tres métodos propuestos (M1, M2 y M3), los cuales difieren principalmente en la concentración de la solución metálica, tipo de solución de dispersión y de ajuste de pH.

La determinación de compuestos polifenólicos totales reveló que el extracto vegetal utilizado en el primer método presenta la menor concentración de compuestos fitoquímicos, mientras que el tercer método es que aprovecha en mayor proporción dichos fitoquímicos.

El M1 favorece la producción de FeNPs especiadas como Fe_3O_4 con forma cúbica, con tamaños de entre 5 y 10 nm, mientras que M2 favorece la producción de FeNPs y ZnNPs con tamaños menores de 5 nm, especiadas como zinc cero Valente y ZnO con sistemas hexagonal y cúbico, y el M3 además de producir FeNPs y ZnNPs, también forma MgNPs especiadas como MgO_2 con mayor tamaño de entre 10 y 20 nm con sistema cúbico.

La actividad fotocatalítica de las nanopartículas sintetizadas se ajustó mediante una cinética de degradación de orden uno, así mismo M2 y M3 presentaron los mayores porcentajes de degradación, esto en función de sus rendimientos de producción de NPs sobre M1.

La actividad microbiciada realizada mostró que existe poca diferencia entre los pH de síntesis 7 y 10, mientras que para el pH4 muestra la menor actividad.

Un análisis IR permitió conocer la permanencia de grupos funcionales provenientes de compuestos orgánicos involucrados en procesos metabólicos del vegetal, mismos que dan soporte y recubrimiento a las nanopartículas.

Abstract

In the present work, the reproducibility of three methods of synthesis of metal nanoparticles has been verified, those nanoparticles were made of iron, zinc and magnesium and from the plant extract of *Hydrocotyle ranunculoides*, whose phytochemical compounds were identified as flavonoids, saponins and chlorophylls.

The nanoparticle generation pathway was directed in three proposed methods (M1, M2 and M3), which differ mainly in the concentration of the metal solution, the type of dispersion solution and pH adjustment.

The determination of total polyphenolic compounds of the plant extract used in the first method showed the lowest concentration of phytochemical compounds, while the third method takes advantage of these phytochemicals having a greater amount.

M1 leads to the production of FeNPs spiced like Fe_3O_4 with a cubic shape with sizes between 5 and 10 nm, while M2 favors the production of FeNPs and ZnNPs with sizes smaller than 5 nm, spiced like zero Valent zinc and ZnO with hexagonal systems and cubic, and M3 in addition to producing FeNPs and ZnNPs, also forms MgNPs spiced as MgO_2 with a larger size of between 10 and 20 nm with cubic system.

The photocatalytic activity of the synthesized nanoparticles was adjusted with order one in the degradation kinetics, likewise M2 and M3 presented the highest degradation percentages, this as a function of their production yields of NPs on M1.

The microbicidal activity carried out showed that there is little difference between synthesis pH 7 and 10, while for pH4 it shows the least activity.

An IR analysis allowed know the permanence of functional groups from organic compounds involved in plant metabolic processes, which provide support and coating to the nanoparticles.

Introducción

Actualmente las aguas superficiales de México son afectadas por descargas urbanas ricas en contenido orgánico y también por descargas industriales no reguladas de colorantes sintéticos, principalmente de las industrias textiles. La presencia de ambos tipos de contaminantes representa riesgos al medioambiente y a la salud esta última debido a que el exceso de la materia orgánica conduce a la proliferación de microorganismos patógenos, mientras que los colorantes causan cáncer y enfermedades mentales. Los microorganismos patógenos tienen una habilidad especial de evolucionar conforme se sujetan a nuevas condiciones de estrés, esto se refiere al contacto continuo con sustancias microbidas convencionales que provocan el desarrollo de cápsides más resistentes a estos microbidas, es entonces donde las dosis mínimas de inhibición son aumentadas, reduciendo significativamente la disponibilidad del agua para consumo humano. Los riesgos al medio ambiente radican en que la presencia simultánea de microorganismos patógenos y de colorantes sintéticos en el agua, pueden dañar la flora y fauna del cuerpo acuático donde se detecten, además de que los colorantes inhiben el paso de la luz derivando en la disminución de oxígeno disuelto en el agua, la mayoría de estos colorantes son de constitución química compleja y por ende son de difícil degradación y en un tratamiento convencional de aguas residuales no logran ser removidos.

Es entonces cuando las nanopartículas metálicas se perfilaron como una propuesta de solución a esta problemática, en este trabajo se realizó la evaluación de la actividad microbida y fotocatalítica de nanopartículas de Fe/Zn y Fe/Zn/Mg fitosintetizadas mediante el extracto vegetal de la planta *Hydrocotyle ranunculoides*, variando el pH (4, 7 y 10). Los metales fueron seleccionados debido a que se consideran oligoelementos, además de que su efecto antimicrobiano ya ha sido probado por separado, pero su interacción bimetálica aún no ha sido estudiada.

1. Fundamentos

1.1 Contaminación del agua

Las matrices ambientales que rigen al planeta son el aire, el suelo y el agua. Esta última es un recurso esencial para los seres humanos, los animales y las plantas, y enfrenta problemas graves de contaminación que surgieron gradualmente con el aumento de la población urbana y a que la capacidad natural de autopurificación del agua superficial fue rebasada con este ritmo de desarrollo (García y Luciano, 2013).

Las tecnologías convencionales de tratamiento de aguas y de aguas residuales como la adsorción, precipitación, coagulación y procesos de lodos activados, entre otras, presentan algunos inconvenientes como la baja eficiencia del tratamiento, altos costos y/o contaminación secundaria, esta última referida a que las sustancias químicas usadas como desinfectantes y que en algunos casos generan productos secundarios más tóxicos (Xue *et al.*, 2016).

1.1.1 Contaminación microbiológica del agua

La presencia o aumento de bacterias, parásitos, virus y hongos en el agua surge usualmente por efecto directo o indirecto de cambios en el medio ambiente y en la población tales como urbanización no controlada, crecimiento industrial, pobreza, ocupación de regiones antes deshabitadas y la disposición inadecuada de excretas humanas y animales.

Los efluentes urbanos e industriales tienen un impacto importante en la cantidad de compuestos orgánicos que terminan beneficiando a microorganismos patógenos. Además de las actividades agropecuarias como la movilización de animales, cultivos, abonos orgánicos mal procesados y disposición inadecuada de aguas residuales que afectan la calidad microbiológica de las fuentes de agua (Ríos *et al.*, 2017).

Más del 80% de las bacterias que se conocen pueden aislarse del agua, estas son bacterias entéricas (o fecales), provenientes del tracto gastrointestinal de animales y humanos, cuya capacidad de sobrevivir y reproducirse en el agua se restringe debido al estrés fisiológico y a parámetros como pH, temperatura y presencia de materia orgánica.

Los microorganismos patógenos indicadores son seleccionados debido a que se transmiten por agua, además de tener una habilidad de resistencia a procesos de tratamiento y desinfección del agua. Además, poseen características de muestreo estandarizado y bien definido que produce una respuesta rápida a cambios ambientales como la contaminación. Así mismo, son considerados indicadores de contaminación fecal a corto plazo por la descarga de desechos y a largo plazo como indicadores de efectividad de los métodos de control microbiano entre estos microorganismos se encuentran *Escherichia coli* y *Cryptosporidium spp.* (Ríos *et al.*, 2017).

Dentro de las bacterias establecidas como contaminantes del agua se han aislado Gram negativas, especialmente pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*. Estas bacterias corresponden al 10% de los microorganismos intestinales humanos y animales, por lo que su presencia en el agua está asociada con contaminación fecal. Este grupo incluye al género *Escherichia*, que incluye cepas patógenas y no patógenas y corresponde al 80% de la microflora intestinal normal ; donde generalmente es inofensiva. En la actualidad, estas mismas cepas están descritas como patógenas para el humano causantes de enfermedades graves, como infecciones de vías urinarias, bacteriemia, meningitis y diarrea aguda (Ríos *et al.*, 2017).

1.1.2 Técnicas de tratamiento de agua enfocadas a la carga orgánica y microorganismos.

El agua potable se puede definir como aquella agua que es libre de microorganismos causantes de enfermedades y de sustancias químicas que pueden deteriorar la salud del consumidor, para lograr estas condiciones, la desinfección del agua puede alcanzarse mediante varios procesos químicos y físicos como lo muestra la Figura 1.1 (Pandit y Kumar, 2013).

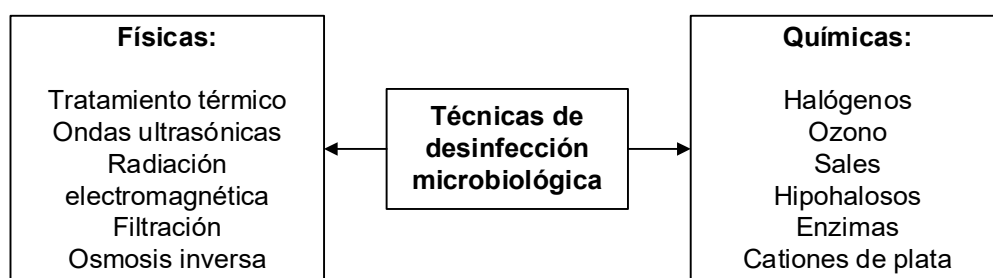


Figura 1.1 Técnicas de desinfección microbiológica.

Las técnicas físicas de desinfección por radiación electromagnética comprenden radiación ultravioleta, rayos X y radiación gama. La adopción de cualquiera de éstas técnicas depende de la calidad y la cantidad del agua a tratar, además poseen diferente eficacia contra microorganismos patógenos, razón por la cual en ocasiones llegan a emplearse dos o más al mismo tiempo, entonces reciben el nombre de técnicas híbridas de desinfección que se muestran en la Figura 1.2 (Pandit y Kumar, 2013).

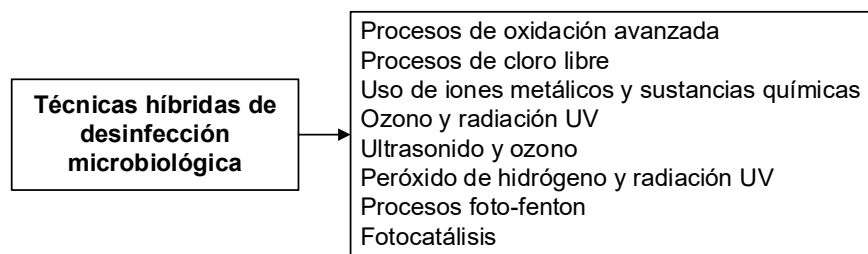


Figura 1.2 Técnicas híbridas de desinfección microbiológica.

1.2 Nanotecnología

El padre de la “nanociencia”, es considerado Richard Feynman, premio Nobel de Física, quién en 1959 propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas. En ese año, el gran físico escribió un artículo que analizaba cómo los ordenadores trabajando con átomos individuales podrían consumir muy poca energía y conseguir velocidades asombrosas. Sin embargo, el término “nanotecnología” fue establecido de manera formal por Norio Taniguchi en 1974 para describir procesos semiconductores como la deposición de películas delgadas y el fresado de haces de iones, en donde las características pueden ser controladas a un nivel nanométrico. Sin embargo, la definición más ampliamente aceptada de nanotecnología es: *La creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la escala de longitud nanométrica (1-100 nm) y la explotación de fenómenos y propiedades novedosas (físicas, químicas y biológicas) a esa escala de longitud* (Meyyappan y Dastoor, 2022).

La palabra nanotecnología refiere a la tecnología que es implementada a nanoescala y sus aplicaciones en el mundo macro. Propiedades químicas y físicas únicas de nanomateriales pueden ser explotados para aplicaciones que benefician a la sociedad ya que éstas propiedades de la materia a nanoescala son diferentes a sus propiedades a gran escala. Debajo de los 100 nm se ha reportado que ocurren cambios dramáticos en las propiedades de la materia. La palabra “nano” es un prefijo griego refiriendo algo muy pequeño de una billonésima parte de una unidad (10^{-9}) (Abdullaeva, 2017).

Como los nanomateriales tienen propiedades físicas, químicas y mecánicas muy específicas, pueden ser usados en una amplia gama de aplicaciones, desde pasta de dientes hasta satélites. El campo de uso de los nanomateriales es muy amplio, se aplican en cosméticos, textiles, cuidado de la salud, ingeniería, catálisis, diagnósticos médicos, tratamiento de la contaminación de agua y aire, entre otros (Busshan, 2017; Murty *et al.*, 2013).

1.2.1 Propiedades de los nanomateriales

Las nanopartículas en forma de soluciones coloidales, dispersiones y estados agregados guardan una relación con sus propiedades fisicoquímicas. Un sistema coloidal o dispersión coloidal se puede definir como un sólido homogéneamente distribuido en otra fase (generalmente agua) con un rango de tamaño de 1 nm a 1 μ m.

Una solución coloidal siempre tiende a agregarse o separarse debido a los tres procesos fundamentales de colisión partícula-partícula: agregación pericinéctica, agregación ortocinéctica y asentamiento diferencial. La agregación pericinéctica es referida al movimiento Browniano de las partículas, la agregación ortocinéctica se debe a partículas que viajan a diferentes velocidades en un flujo cortante y finalmente, el asentamiento diferencial es resultado de la interacción de partículas de diferente tamaño o densidad cuando se están asentando (Bhushan, 2017).

Las propiedades químicas de los nanomateriales están determinadas por su reactividad química, oxidación, cambio de superficie y efectos catalíticos. La reactividad química es la tendencia de una especie a realizar una reacción química consigo misma o con otra especie y liberar energía, además es proporcional a la superficie específica. La oxidación es un proceso en el cual una especie química cambia debido a la adición de oxígeno. El cambio de superficie está relacionado con la interacción entre las fuerzas de la especie modificadora y las fuerzas superficiales del sustrato, la cuales se controlan por las fuerzas de enlaces en la superficie. El efecto

catalítico de las nanopartículas refiere una superficie que retiene momentáneamente una especie química para hacerla reaccionar con otra y entonces liberarla (Bhushan, 2017).

1.2.2 Nanopartículas

Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas (NPs) tienen proporciones de superficie a volumen significativamente diferentes en comparación con materiales tamaño macro y por lo tanto, también diferentes propiedades fisicoquímicas. Las NP tienen aplicaciones en un amplio rango de áreas incluyendo: biosensores, desarrollo de medicamentos, bioimagen, catálisis, nanofabricación, lubricación, electrónica, industria textil y tratamiento de aguas (Bhushan, 2017).

Debido a que las nanopartículas pueden ser construidas a partir de materiales de diversa naturaleza química, dispersas en múltiples medios, y que una vez sintetizadas adoptan diferente morfología, que de acuerdo a esa morfología y naturaleza química se obtienen modificaciones de área superficial específica para lo cual fueron sintetizadas. Entonces las nanopartículas se pueden clasificar de acuerdo a la Figura 1.3 (Busshan, 2017).

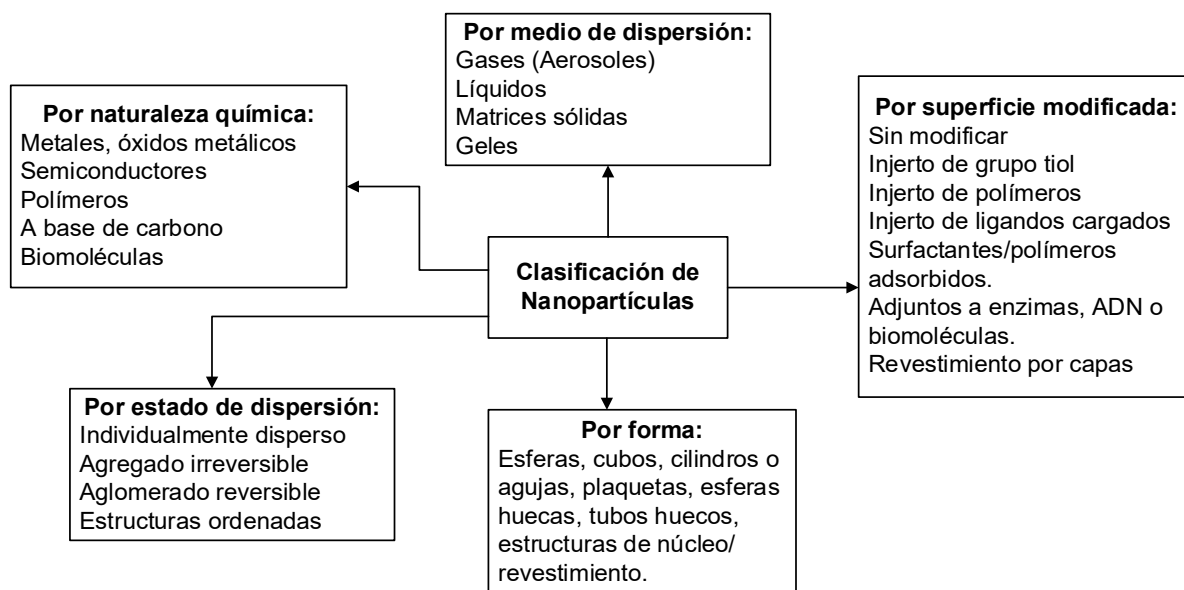


Figura 1.3 Clasificación general de nanopartículas.

1.2.3 Métodos de síntesis de NPs

De acuerdo al enfoque, existen dos rutas en la síntesis de nanomateriales y son el enfoque de arriba hacia abajo “*bottom up*” y el enfoque de abajo hacia arriba “*top down*”. El primero, está basado en la organización o arreglo de elementos individuales (átomos, moléculas y células biológicas) para construir nanomateriales (ejemplos: crecimiento de un cristal, síntesis de nanopartículas por soluciones coloidales), mientras que el segundo, está basado en el principio de dispersión de materiales en nanomateriales (ejemplos: desgaste, fresado, rectificado, pulverización y electrólisis). En la Figura 1.4 se muestran métodos de síntesis de nanomateriales (Abdullaeva, 2017).

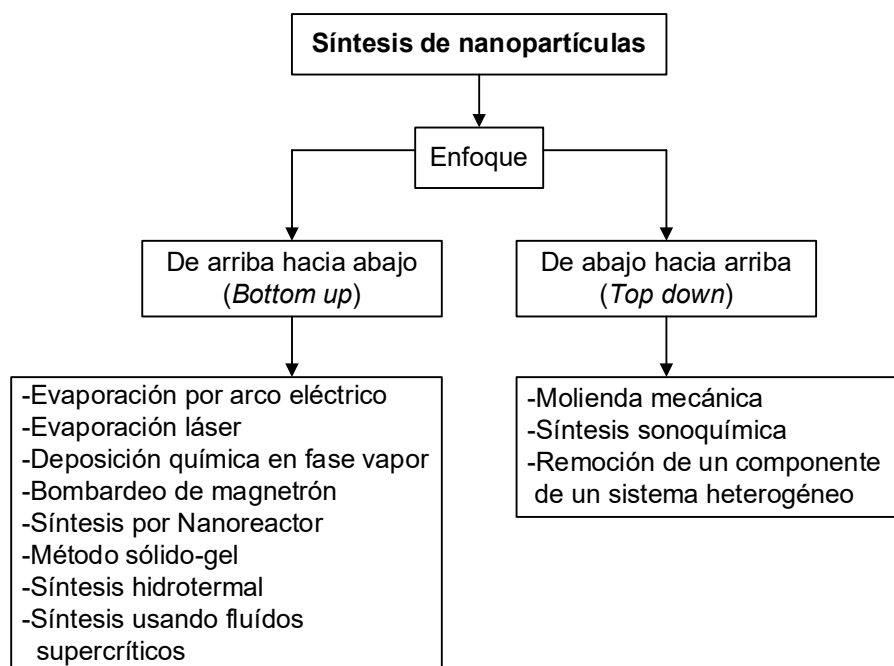


Figura 1.4 Métodos de síntesis de nanopartículas.

De manera general, las rutas de generación de nanopartículas se dividen por procesos químicos y físicos, en la Figura 1.5 se muestran las tecnologías que abarcan dichos procesos.

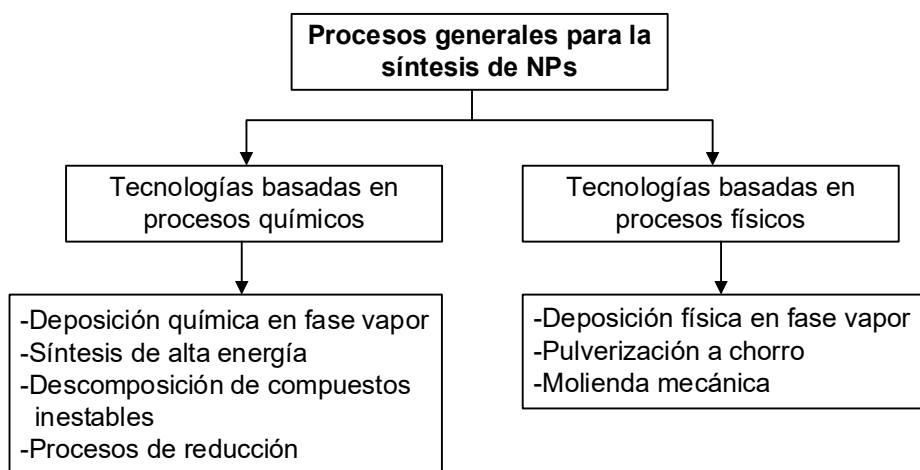


Figura 1.5 Procesos generales para la producción de NPs.

El uso de microorganismos, o bien metabolitos vegetales para la síntesis de NPs metálicas, son una alternativa para generar tecnologías verdes para la síntesis en nanotecnología. La Figura 1.6 muestra las diferentes rutas de generar NPs por biosíntesis.

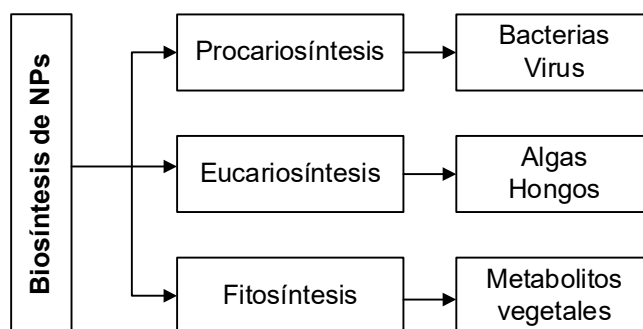


Figura 1.6 Rutas de generación de NPs por biosíntesis.

En la biosíntesis de NPs utilizando células procariotas (aquellas donde el material genético se encuentra disperso en el citoplasma) se utilizan normalmente bacterias y virus. El mecanismo de síntesis se basa en procesos bioquímicos gestionados por enzimas, se realiza mediante la biorreducción de los metales con la bacteria se basa en la interacción del metal con la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido que está presente en toda célula viva. Entonces, al ejecutar el intercambio iónico del citoplasma a la pared celular tiene contacto con el metal, reduciéndolo y finalmente generando la NP.

El principal uso que tienen los virus en la síntesis de materiales, es ser utilizados como andamios o plantillas para fabricar NPs metálicas y estructuras nanotubulares por técnicas de mineralización. El mecanismo propuesto de generación de NPs usando virus, se basa en la interacción del cápside con sales metálicas y una superficie de tirosina resultando en un intercambio iónico, que genera una nanopartícula metálica con carcasa viral.

La síntesis eucariótica se divide en síntesis por algas y síntesis por hongos. Las algas pueden ser organismos unicelulares o multicelulares, formalmente se clasifican como

plantas debido a que pueden realizar el proceso de la fotosíntesis ya que poseen clorofila y otros pigmentos. La síntesis de NPs por hongos se lleva a cabo intracelular o extracelular, se debe a la interacción de los iones metálicos con proteínas/enzimas que se encargan de procesos metabólicos, creando los clusters de manera intra o extra celular.

La biosíntesis, de nanopartículas a través de una entidad biológica depende de sus actividades enzimáticas y de sus procesos metabólicos intrínsecos. De manera general, las entidades biológicas con potencial de acumular metales pesados son idóneas para realizar síntesis de nanopartículas. En cuanto a tiempo, las algas pueden producir NPs de manera intracelular en 24 h, extracelular en 7 d, con extractos caroténico, clorofílico y proteínico en 24 h (Bhushan, 2017).

1.2.4 Fitosíntesis

La fitosíntesis de NPs se basa en el uso de metabolitos vegetales (en su mayoría compuestos polifenólicos), que provienen de los extractos de las plantas, esta sustancia es obtenida de una mezcla o material obtenido mediante un proceso físico o químico (digestión, destilación, y la acción de un solvente o bien separación mecánica). Una ventaja puntual de las NPs fitosintetizadas es que tienden a ser estables y cristalinas en solución, además menos costosas que las NPs sintetizadas haciendo uso de microorganismos, además de que las últimas puede ser riesgosas de acuerdo al microorganismo utilizado (Bhushan, 2017).

Las ventajas de la fitosíntesis de NPs se muestran en la Tabla 1.1, el procedimiento simple está referido a que no es necesario utilizar presiones, temperaturas controladas ni sustancias químicas tóxicas. Entre los agentes reductores naturales se encuentran proteínas, enzimas, polifenoles, alcaloides, flavonoides, saponinas, fenoles, aceites esenciales y polioles. Asimismo, la cero contaminación refiere que no se generan compuestos ni productos secundarios más tóxicos que los reactivos (Rajan *et al.*, 2015).

Tabla 1.1 Ventajas de la fitosíntesis de NPs.

1	Naturaleza del solvente
2	Procedimiento simple
3	Uso de agentes reductores naturales
4	Alto potencial reductor
5	Cero contaminación
6	Impacto ambiental reducido

Por otro lado, la Figura 1.7, presenta los factores que influyen en el tamaño, la forma y la estabilidad de las NPs (Rajan *et al.*, 2015).

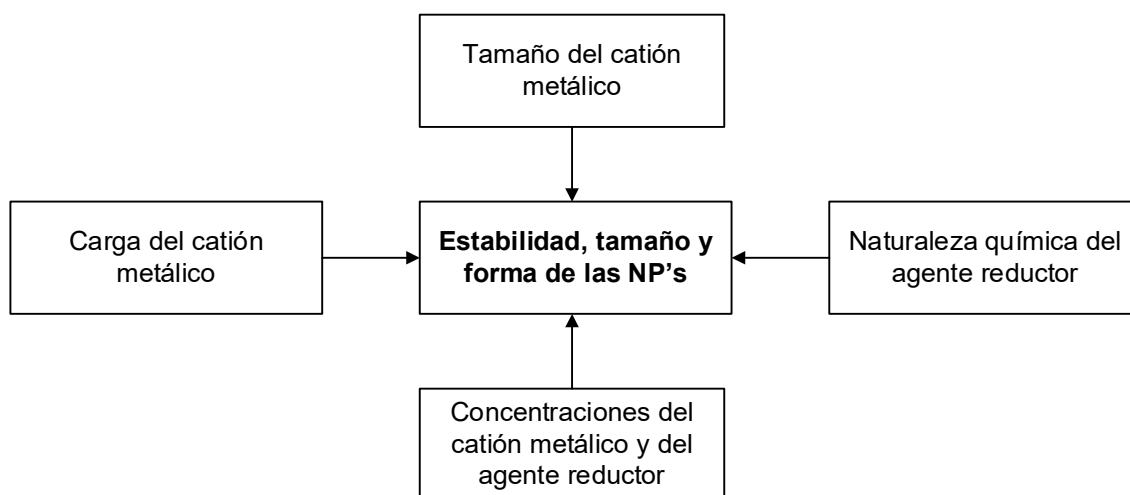


Figura 1.7 Factores que influyen en la estabilidad, tamaño y forma de NPs.

No es una regla que a mayor concentración del agente reductor la eficiencia de producción de NPs aumente, además el tamaño de la molécula del agente reductor puede aumentar o disminuir el tamaño de la NP. En cuanto a la concentración de la solución metálica, influye que a mayor sea la concentración del catión metálico mayor será el tamaño y el número de las NPs formadas (Bhushan, 2017).

En particular, los posibles fitoquímicos/fitoconstituyentes responsables de la reducción de los metales son: vitaminas, enzimas/proteínas, ácidos orgánicos, citratos, aminoácidos, polisacáridos. También algunos metabolitos secundarios en plantas como: terpenoides, saponinas, flavonoides, fenoles, alcaloides y proteínas. De los anteriores los grupos funcionales hidroxilo, carbonilo y amino son los responsables de darle estabilidad y biocompatibilidad a las NPs.

Uno de los mecanismos simultáneos que en teoría se ejecuta durante la fitosíntesis es la autocatálisis, donde al formarse cofactores reducidos y junto con las NPs ya obtenidas, inducen un efecto autocatalítico en la formación de más NPs como se muestra en la Figura 1.8 (Rajan *et al.*, 2015).

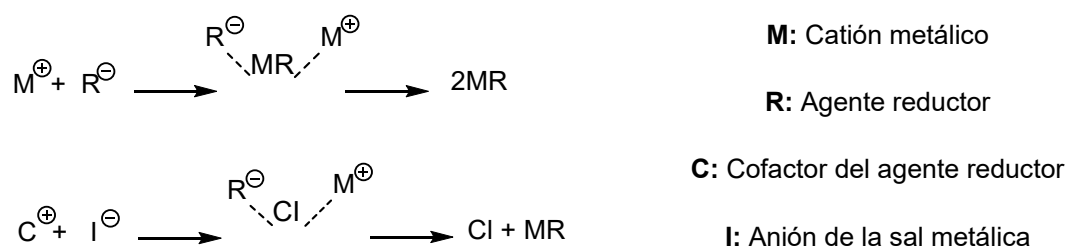


Figura 1.8 Mecanismo autocatalítico de formación de NPs.

De todos los compuestos y metabolitos vegetales, los polifenólicos son los que tienen un papel decisivo en la generación y estabilización de NPs ya que son los que poseen mayores sitios probables de enlace (péptidos cíclicos, ácido ascórbico, ácido cítrico, eufol, taninos elágicos, ácidos elágicos, ácido gálico, flavonoides) (Rajan *et al.*, 2015).

La fitosíntesis de NPs obedece a la química verde. Durante el siglo XX la química cambio por todas las vías de aprovechamiento que el humano podía darle, sin embargo, con el paso del tiempo algunos productos químicos utilizados causaban más efectos nocivos, tanto al ser humano como al ambiente, razón por la cual surge la

química verde, la cual pretende el desarrollo de tecnologías compatibles con el medio ambiente, así como la minimización de su impacto sobre el mismo.

Debido a lo anterior, la fitosíntesis de NPs es una alternativa compatible con el medio ambiente, principalmente al no hacer uso de reactivos tóxicos, al generar productos biodegradables y al aprovechar materia prima renovable, en este caso el uso de la especie macrófita invasora *Hydrocotyle ranunculoides*.

1.2.5 Aplicaciones de NPs bimetálicas fitosintetizadas

En la actualidad las NPs bimetálicas y trimetálicas tienen una mayor atención que las monometálicas, tanto desde el punto de vista tecnológico como científico.

Sus propiedades catalíticas han demostrado ser superiores que las de NPs monometálicas (Sharma *et al.*, 2017a; Sharma *et al.*, 2017b). En la Tabla 1.2 se muestran algunas NPs fitosintetizadas y sus aplicaciones.

Tabla 1.2 Algunas NPs bimetálicas fitosintetizadas y sus aplicaciones.

Autor	Metales	Especie vegetal	Aplicación
Sheny <i>et al.</i> , 2011	Ag/Au	<i>Anacardium occidentale</i>	Estudio de morfología, composición y estabilidad.
Zhan <i>et al.</i> , 2011	Au/Pd	<i>Platycladus orientalis</i>	Estudio de morfología, composición y estabilidad.
Abdelhamid <i>et al.</i> , 2013	Ag/Au	<i>Potamogeton pectinatus</i> L.	Estudio de morfología, composición y estabilidad.
Amala <i>et al.</i> , 2017	Ag/Pd	<i>Arachis hypogaea</i>	Detección electroquímica de peróxido de hidrógeno.
Devi y Ahmaruzzaman, 2017	Au/Ag	<i>Momordica charantia</i>	Eliminación de contaminantes emergentes en aguas residuales.

Kuppusamy <i>et al.</i> , 2017	Au/Ag	<i>Commelina nudiflora L.</i>	Estudio de su actividad antimicrobiana.
Olajire <i>et al.</i> , 2017	Pt/Cu	<i>Alchornea laxiflora</i>	Degradación catalítica de aceite comercial.
Prasad <i>et al.</i> , 2017	Ni/Fe	<i>Moringa oleifera</i>	Degradación de colorantes orgánicos en agua.
Rosbero y Camacho, 2017	Ag/Cu	<i>Carica papaya</i>	Degradación de insecticidas órgano-fosforados en agua.
Sorbiun <i>et al.</i> , 2017	Ag/Zn	<i>Quercus ellipsoidalis</i>	Estudio de su actividad fotocatalítica en la degradación de colorantes.
Weng <i>et al.</i> , 2017	Fe/Ni	<i>Eucalyptus</i>	Estudio de morfología, composición, estabilidad y actividad catalítica.
Akinsiku <i>et al.</i> , 2018	Ag/Ni	<i>Canna indica</i>	Estudio de propiedades ópticas y biológicas.
Syed <i>et al.</i> , 2018	Au/Ag	<i>Annona squamosa L.</i>	Estudio de su actividad antimicrobiana.

1.2.6 *Hydrocotyle ranunculoides*

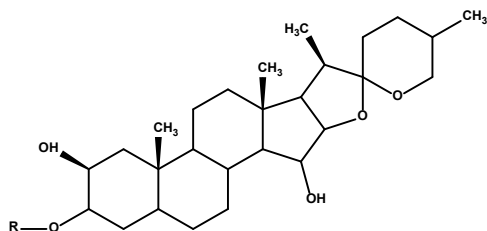
Perteneciente a la familia *Araliaceae*, la especie *Hydrocotyle ranunculoides L.f.* es una macrófita nativa en las américas e introducido en las demás partes del mundo. Tiene tallos horizontales, rizomatosos y estolóníferos, finos hasta robustos, glabros, acuáticos flotantes, y también rastreros en suelo saturado, con nudos radicales.

Debido a su resistencia a diferentes climas, su habilidad de reproducción, su potencial colonizador y su alto consumo de nutrientes en los cuerpos de aguas, se considera una especie exótica invasora capaz de amenazar especies endémicas. En la Figura 1.8 se presenta la imagen de la planta.

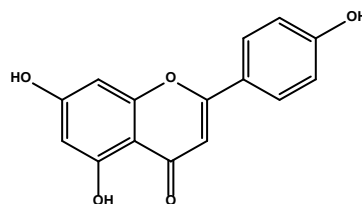


Figura 1.9 *Hydrocotyle ranunculoides*.

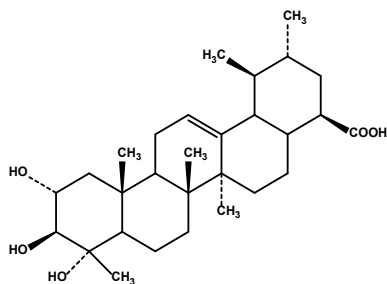
Esta especie vegetal contiene saponinas además de compuestos polifenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, siendo las saponinas las que se hallan en mayor proporción, en la Figura 1.10 muestra algunos compuestos polifenólicos ya identificados de la planta, el grupo R es una secuencia de azúcares: glucosa, galactosa y xilosa. (REMIB, 2018; Sparg *et al.*, 2004).



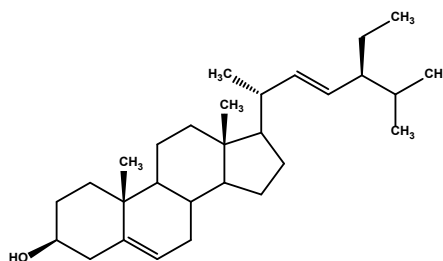
a) Estructura básica de una saponina



b) Estructura del kaempferol



c) Estructura del ácido asiático



d) Estructura del estigmasterol

Figura 1.10 Compuestos polifenólicos presentes en *Hydrocotyle ranunculoides*.

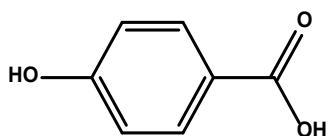
1.3. Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios que las plantas utilizan para la adaptación de condiciones no favorables en su desarrollo. Son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas caracterizados por tener grupos fenol en su estructura química. Dentro del vegetal, además de intervenir en el metabolismo, tienen las funciones de protección solar, microbicida, fungicida y de adaptación a condiciones no favorables para el vegetal como la salinidad y la temperatura (Elaloui *et al.*, 2017).

La complejidad del metabolismo de compuestos fenólicos en plantas permite la producción de una gran variedad de los mismos, desde los pigmentos naturales (flavonoides y antocianinas) hasta las estructuras complejas de una planta (lignina) (Wrolstad *et al.*, 2005).

Entre los ácidos fenólicos se pueden encontrar: ácido hidroxibenzóico y ácido hidroxicinámico y derivados; en la Figura 1.11 se muestran las estructuras químicas de éstos.

a) Ácido hidroxibenzóico



b) Ácido hidroxicinámico

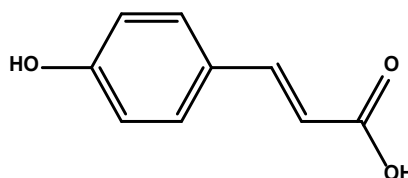


Figura 1.11 Estructura química de ácidos fenólicos.

En la Figura 1.12 se presenta la estructura química de la 2-fenil-1,4-benzopirona, de esta derivan los flavonoides y sus derivados y son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "ruta biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa (Sanjurjo, 2017).

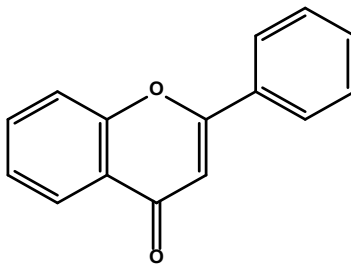


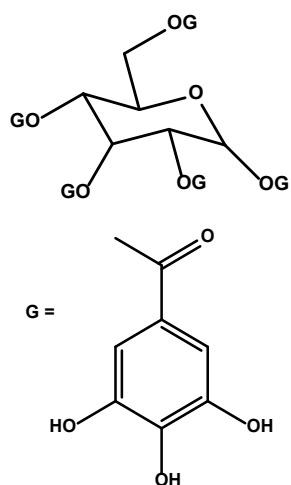
Figura 1.12 Estructura química de la 2-fenil-1,4-benzopirona.

1.3.1 Taninos

El grupo fenólico de los taninos es claramente distinguido de los otros metabolitos secundarios debido a que tiene una actividad química y biológica más pronunciada, además tienen estructuras polifenólicas consideradas complejas que, de manera general, se clasifican en hidrolizables y condensados. En los árboles y plantas, de un 10 a un 25% es aprovechable para la extracción de estos metabolitos secundarios (Jiménez *et al.*, 2016; Wrolstad *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2016).

Los taninos son capaces de precipitar proteínas, enzimas, carbohidratos y alcaloides, además son usados a nivel industrial para curtir piel animal cruda y la actividad curtidora de los taninos depende de su estructura química. En las plantas existen tres tipos de taninos: los taninos hidrolizables, los taninos condensados y los florotaninos. La estructura química de los primeros está basada en el ácido gálico, los taninos hidrolizables se subdividen en galotaninos y elagitaninos. En la Figura 1.13 se muestran las estructuras químicas básicas de los taninos hidrolizables (Julkunen y Häggman, 2009; Terblanche, 2017).

a) Galotanino



b) Elagitanino

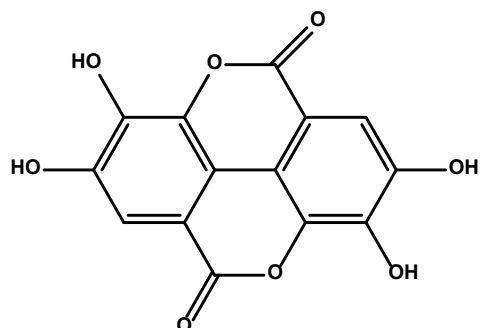


Figura 1.13 Estructuras químicas básicas de los taninos hidrolizables.

Los taninos condensados son oligómeros de antocianidinas, basados en la estructura del flavan-3-ol, conocidos también como proantocinidinas cuando no tienen glucósidos, y proantocianinas cuando si los tienen. La Figura 1.14 muestra la estructura básica de un tanino condensado (Julkunen y Häggman, 2009; Terblanche, 2017).

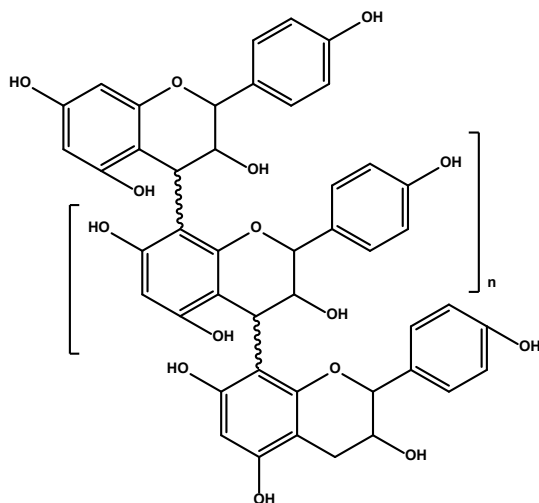


Figura 1.14 Estructura básica de un tanino condensado.

1.3.2 Prueba de Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas y su relevancia radica en su participación en la fisiología y el metabolismo celular como morfología, crecimiento, reproducción, defensa contra plagas y depredadores, y procesos germinativos, entre otros.

El método de Folin-Ciocalteu (FC) es simple, rápido, barato y es ampliamente usado para la determinación del contenido polifenólico total de extractos vegetales principalmente. Debe ser validado y optimizado de acuerdo al sistema de estudio donde se pretende aplicar. Este método es específico para extractos vegetales, pues no sólo actúa sobre compuestos polifenólicos, también sobre cualquier otra molécula fitoquímica con habilidad reductora, el reactivo está compuesto por ácidos de molibdeno y tungsteno con un color amarillo verdoso, conforme se lleva a cabo la reducción se forman complejos metálicos azules, permitiendo referir el contenido de compuestos reductores mediante un método colorimétrico UV-Vis. En la Figura 1.15 se muestra un mecanismo propuesto de reacción del reactivo FC y una molécula patrón reductora, en este caso ácido gálico (ac. 3,4,5-trihidroxibenzoico) (Muñoz et al., 2017).

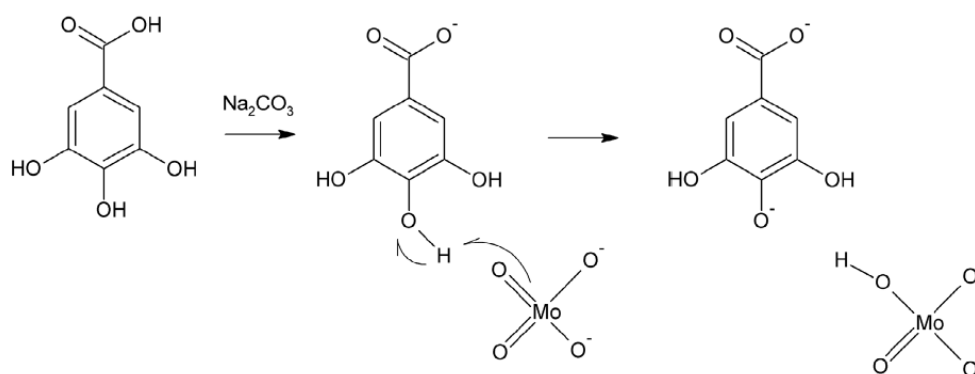


Figura 1.15 Mecanismo de reacción entre FC y ácido gálico.

1.4. Técnicas de caracterización de NPs

Entre las técnicas más utilizadas de caracterización de NPs se encuentran la microscopía electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión, que se describen a continuación.

1.4.1 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica de análisis topográfico, estructural y composicional, la cual se ha usado extensamente en el estudio de tópicos tales como semiconductores, modificación de productos comerciales, catálisis heterogénea, dispositivos de juntura p-n, películas delgadas, física de nanocomposiciones, fotoelectroquímica, dadas sus posibilidades de resolución, magnificación y versatilidad de variantes que permite que sea aplicada a diversidad de muestras, ambientes y necesidades experimentales (procesos térmicos, corrosivos, etc.).

En términos generales, un equipo de SEM es capaz de tomar una “imagen” de la muestra, aunque realmente lo que se detecta es la respuesta del material al impacto de un haz de electrones (electrones llamados primarios), en vez de registrar fotones propiamente dichos (como en la microscopía óptica). Al ser impactada por el haz de electrones de alta energía, la muestra produce una serie de señales como electrones secundarios, electrones retro-dispersados, rayos x, entre otras, que son registradas en los diferentes detectores del equipo, en donde cada una de dichas señales ofrece independientemente información acerca de la topografía, composición y hasta conductividad eléctrica de la muestra. Por supuesto, para adquirir la “imagen” se hace mover el haz en el plano xy (con sistemas ópticos, antes de impactar la muestra) de forma que recorra el área deseada o planificada. La resolución que puede alcanzarse, es decir, la capacidad de distinguir en la imagen entre dos puntos diferentes pero próximos entre sí en la superficie del material, puede ser tan alta como 2 nm (Goldstein *et al.*, 2018).

1.4.2 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés Transmission Electron Microscopy) es una de las técnicas más utilizadas en la caracterización de NPs hasta la escala de Angstroms ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$) proporcionando información del tamaño, forma y composición de los nanomateriales. La TEM es la técnica más utilizada para el estudio de elementos cuyas dimensiones se encuentran en el rango de 1-100 nm.

La técnica consiste en irradiar con electrones una muestra de no más de 100 nm de grosor, para que esta sea transparente a los electrones, estos últimos son acelerados con una energía del orden de 100 keV o superior. Parte de estos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios entre otros. La TEM emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra (Williams y Carter, 2009).

1.5. Colorantes sintéticos

La fabricación y uso de colorantes sintéticos en la actualidad ya es una industria masiva y como consecuencia, se han convertido en contaminantes ambientales industriales comunes durante su producción y más adelante en su aplicación.

El uso de tintes sintéticos y sus desechos tiene un efecto adverso en todas las formas de vida. En la salud humana dependiendo del área de aplicación, la irritación de la piel y la dermatitis son algunos perjuicios que se han reportado, el uso de tintes azoicos hechos de aminas con propiedades cancerígenas ha sido prohibido por la legislación en muchos países (Gürses et al., 2016, Chatwal, 2009).

Un colorante sintético es un compuesto o mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos que fijan color a un sustrato como tela, cuero, papel o plástico, etc. Debe tener las propiedades de alta estabilidad, capacidad de tinción, solubilidad en agua o de formar una dispersión estable en agua. Durante la producción de colorantes sintéticos se hace uso de sales de cromo, cobre y sales de diazonio principalmente, las últimas son la base para los enlaces azo de los colorantes.

Actualmente, millones de toneladas de colorantes sintéticos son fabricados anualmente, entre los más relevantes se encuentran los azo, catiónicos y aniónicos, de tina dispersivos, reactivos e indigoides. Estos colorantes son resistentes al calor, al agua, a la luz y a agentes oxidantes, lo que los hace muy estables y resistentes a la biodegradación. De todas las industrias, la textil produce en mayor cantidad residuos acuosos de colorantes sintéticos, dichos residuos contienen una mezcla de sustancias químicas inorgánicas, orgánicas y colorantes de diferentes clases (Dogdu y Yalcuk, 2015, Chatwal, 2009).

Una de las razones más significativas de la ruptura estética del agua por colorantes sintéticos es que éstos tienen un coeficiente de extinción elevado, esto es que coloraciones vibrantes pueden ser observadas incluso a concentraciones bajas (10-20 mg/L). Lo anterior inhibe la penetración de la luz solar en el agua reduciendo la actividad fotosintética de plantas y algas, lo que minimiza los niveles de oxígeno disuelto, además de disminuir la solubilidad gaseosa.

Los colorantes sintéticos se han vuelto irremplazables debido a su amplio rango de aplicaciones, sin embargo, el punto de contaminación que se genera por su descarga en cuerpos de agua produce la destrucción de ecosistemas acuáticos y se introduce en las cadenas tróficas. Es bien sabido que los colorantes sintéticos en agua no pueden ser tratados de manera efectiva antes de su descarga al ambiente, los tratamientos fisicoquímicos y biológicos comunes de agua residual, no ejecutan una depuración completa de colorantes sintéticos de manera adecuada debido a su estabilidad química y resistencia a microorganismos. (Dogdu y Yalcuk, 2015; Kooh *et al.*, 2015 y Lin *et al.*, 2016).

1.5.1 Rojo No. 40

También conocido como rojo allura, es un colorante aniónico tipo azo, su banda de absorción se encuentra a los 610 nanómetros, con un coeficiente de extinción de $25.9 \times 10^3 \text{ (M cm)}^{-1}$. Fue introducido originalmente al mercado de colorantes en Estados Unidos principalmente para alimentos, medicamentos y cosméticos. La estructura química de este colorante se muestra en la Figura 1.16 (Streit *et al.*, 2019; Alkahtani *et al.*, 2017 y Gungor *et al.*, 2015).

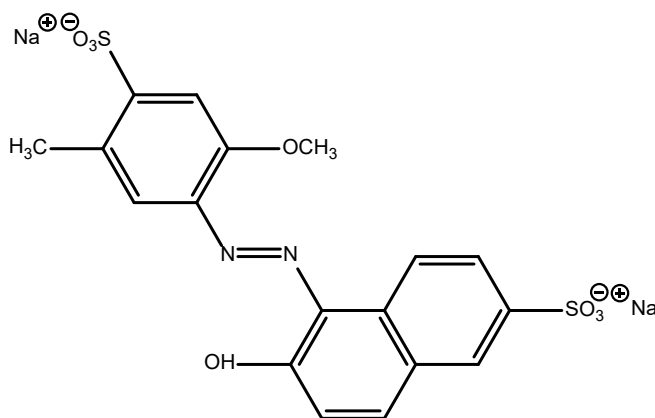


Figura 1.16 Estructura química del Rojo No. 40.

La problemática de este colorante además de la ambiental, es que al ser consumido por el ser humano tiende a producir cáncer, a desarrollar alta sensibilidad a la luz e hipertiroidismo, razón por la cual su uso como aditivo alimenticio ya se encuentra en escrutinio por la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos (Al-Shabib *et al.*, 2017 y Alkahtani *et al.*, 2017).

1.6. Actividad fotocatalítica

La sociedad actual es impulsada por la tecnología en continuo crecimiento, por ello, una necesidad urgente de captación eficiente de luz solar para lograr soluciones sostenibles en ciencia y la industria se ha hecho prioritaria.

En las últimas décadas con el desarrollo industrial, muchos tipos de contaminantes orgánicos han sido encontrados en el agua, entre ellos los colorantes sintéticos, que no son depurados de manera efectiva por tratamientos tradicionales de aguas residuales.

La fotocatalisis refiere a la reacción catalítica que hace uso de fotones para la degradación o modificación de una especie química. Una amplia gama de materiales ha sido probada como agente fotocatalítico con fines medio ambientales, entre los que se encuentran óxidos metálicos, calcógenos, nitruros, fosfatos, polímeros porosos basados en carbono y grafeno, actualmente está ganando atención gracias a su bajo costo, además de obedecer a los principios de la química verde (Ghosh, 2018).

Existen ya muchos estudios de la degradación completa de compuestos orgánicos a través de la fotocatalisis aplicando nanopartículas de óxidos metálicos bajo luz ultravioleta. Sin embargo, el aprovechamiento de ésta luz en procesos de fotodegradación se ve comprometido ya que sólo ocupa el 4% de la energía solar como fuente renovable, mientras que el 43% de la energía pertenece al espectro visible, es entonces cuando el desarrollo de nuevos fotocatalizadores que aprovechen la luz visible es necesario para el uso eficiente de la energía solar (Abroshan *et al.*, 2018).

1.6.1 Fotocatálisis

La actividad fotocatalítica fue descubierta en 1972, cuando se probó que la fotocatalisis usando materiales semiconductores demostró ser efectiva en la degradación de compuestos orgánicos. En contraste con los procesos de oxidación tradicionales, la fotocatalisis puede degradar y mineralizar sustancias químicas orgánicas estables hasta CO₂ y H₂O bajo condiciones atmosféricas y no requieren un suministro especial de O₂, además es relativamente barata en comparación a otros procesos de oxidación y no genera residuos peligrosos (Zhang *et al.*, 2018).

Entre los materiales aplicados para fotocatalisis se encuentran ZnO, Fe₂O₃, WO₃, CdSe y SrTiO₃. Para materiales de Fe/Zn se reportan tiempos óptimos de exposición

bajo luz solar entre 30 y 45 minutos mientras que para plata, cerio y cadmio se alcanzan hasta los 80 minutos.

Las características deseables de un material fotocatalizador son; ser químicamente activo bajo luz ultravioleta, visible o solar, resistentes a la degradación química biológica y a la fotocorrosión, no debe ser tóxico, ser de bajo costo y de alta disponibilidad (Zhang *et al.*, 2018).

1.6.2 Mecanismo de actividad fotocatalítica

Las reacciones químicas en materiales semiconductores usualmente ocurren por la transferencia de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, la primera es el orbital molecular más ocupado y se le conoce por sus siglas en inglés como HOMO (Highest occupied molecular orbital) y la segunda es el orbital molecular menos ocupado y se le conoce por sus siglas en inglés como LUMO (Lowest occupied molecular orbital).

Conforme aumentan el número de orbitales en el HOMO y en el LUMO, la energía necesaria para desplazar los electrones entre ambas bandas disminuye. A través de la radiación con energía igual o mayor que el intervalo de banda del fotocatalizador semiconductor, los electrones son promovidos del HOMO al LUMO, dejando “huecos” en la banda de valencia.

Estos electrones fotogenerados y huecos pueden recombinarse liberando energía en periodos cortos de tiempo (entre 10-100 ns). Este proceso de recombinación provoca una baja eficiencia cuántica del fotocatalizador. Este proceso de recombinación ocurre principalmente en superficies abultadas de material (aglomeraciones) y puede ser reducido significativamente si estas especies portadoras de carga están separadas mediante la adición de un secuestrante adecuado o bien por la incorporación de sitios trampa en la superficie como lo puede ser un material adsorbente.

Si el tiempo de recombinación entre huecos y electrones se alarga el tiempo suficiente, entonces se producirán cargas capaces de migrar a la superficie del catalizador, una

vez ahí podrán ser puntos de transferencia de carga y desencadenar las reacciones redox sobre los compuestos orgánicos en su periferia.

Un hueco de la banda de valencia (h^+) contiene un poder altamente oxidante por tener un potencial redox variado entre 1 y 3.5 V, dependiendo del semiconductor y el pH. La oxidación puede tomar lugar incluso de manera indirecta por medio de las reacciones superficiales de radicales $\bullet OH$, que desencadenan la formación de las especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés ROS (Reactive oxygen species) o bien, reacciones de manera directa en los h^+ donde la partícula es atrapada como lo muestra la Figura 1.17.

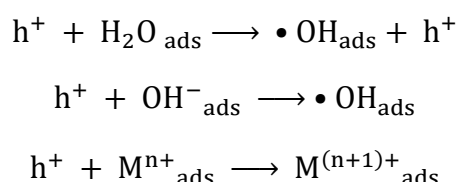


Figura 1.17 Mecanismo de oxidación de los huecos de banda de valencia.

Los parámetros de operación en la fotocatalisis tienen una alta relevancia en la degradación de compuestos orgánicos, los más importantes son el pH, las concentraciones del catalizador y del contaminante, el área superficial, longitud de onda de la luz empleada y la intensidad. De estos factores depende la cantidad de ROS que interaccionan en el sistema, en la Figura 1.18 se muestra el mecanismo de acción de los ROS (Arjunan *et al.*, 2017; Pathania *et al.*, 2016).

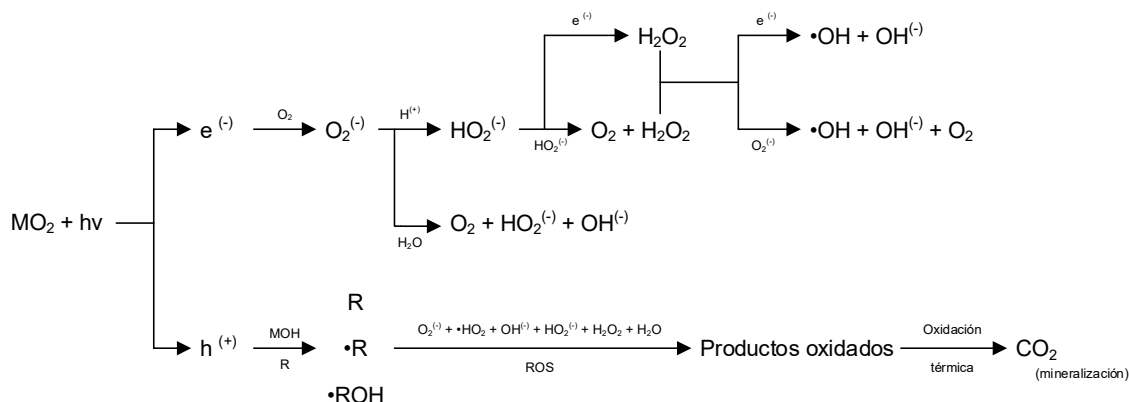


Figura 1.18 Mecanismo de generación/acción de los ROS.

En la Figura 1.19 se muestran las ecuaciones para el monitoreo cinético de la fotocatalisis, dichas derivan de la ecuación de Langmuir-Hinshelwood para orden de reacción uno.

$$a) \%Dec = \frac{C_F - C_0}{C_0} * 100 \qquad b) \ln \left| \frac{C_0}{C_F} \right| = k t$$

Figura 1.19 Ecuaciones para el monitoreo cinético de fotocatalisis.

a) Porcentaje de decoloración y b) Modelo de ajuste para la constante de velocidad.

Donde C_F y C_0 son concentraciones final e inicial respectivamente, k es la constante de velocidad de la reacción y t el tiempo (Arjunan *et al.*, 2017).

1.6.3 Efecto de la concentración del catalizador

Es uno de los parámetros más importantes en proceso de fotocatalisis que controla la velocidad de degradación de los compuestos orgánicos. La velocidad de degradación de colorantes sintéticos y otros contaminantes en la superficie del catalizador incrementa conforme lo hace la cantidad del catalizador.

Cuando la cantidad óptima es alcanzada, no hay incrementos sustanciales en la velocidad de degradación si se adiciona más catalizador, esto se debe a que grandes cantidades de catalizador particulado pueden aumentar la turbidez de la solución, interfiriendo con la refracción de la luz, haciendo el que porcentaje de degradación disminuya, además la probabilidad de aglomeración de partículas aumenta, lo cual abate la disponibilidad de sitios activos e incidencia de luz, reduciendo la generación de ROS. En la Tabla 1.3 se muestra el efecto de la concentración del catalizador (carga) con diferentes contaminantes (Ghosh, 2018).

Tabla 1.3 Efecto de la carga del catalizador en la degradación de contaminantes.

Tipo de contaminante	Fuente de luz	Fotocatalizador	Carga (g/L)	Carga óptima (g/L)
Amarillo reactivo No. 14	UV	TiO ₂	1 – 6	4
Rojo ácido No. 88	UV	ZnO	2 – 12	12
Acridina naranja	Vis	ZnO	0 - 0.35	0.25
Azul brillante	UV/Solar	TiO ₂	0.5-5	5
Azul ácido No. 80	Solar	ZnO	0.05 – 0.4	0.3
Azul supra BRL	Visible	K ⁺ /TiO ₂	0.25 – 2	1.5

1.6.4 Efecto del pH

El pH del sistema reactivo controla la adsorción del compuesto orgánico en la superficie del catalizador debido a que la superficie del semiconductor puede ser protonada o desprotonada bajo condiciones ácidas o básicas respectivamente, de acuerdo a las reacciones de la Figura 1.20.

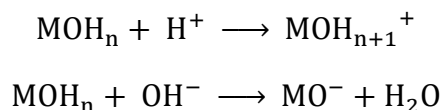


Figura 1.20 Efecto del pH en fotocátalisis

En la Tabla 1.4 se muestran los valores de pH de operación y óptimo para la degradación de algunos compuestos orgánicos.

Tabla 1.4 Valores de pH en la degradación de colorantes.

Colorante	Fuente de luz	Fotocatalizador	pH de operación	pH óptimo
Azul de metileno	Vis	La/TiO ₂	2 - 10	10
Rojo ácido No. 88	Vis	Ag/TiO ₂	0.2 - 1.8	1.8
Azul brillante remazol	Solar	TiO ₂	3 - 11	3
Naranja ácido No. 8	UV	TiO ₂	3 - 11	9
Azul ácido No. 80	Solar	ZnO	4 – 11	10
Naranja de metilo	UV	Pt/TiO ₂	2.5 – 11	2.5

1.6.5 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura no tiene un gran impacto sobre la fotocatálisis si durante los periodos de observación no existen grandes fluctuaciones; sin embargo, si la temperatura es excesivamente alta o baja, puede cambiar la reacción de degradación. El oxígeno disuelto es uno de los factores clave que rige a la fotocatálisis, y es útil en el proceso de expulsión de e^- y por ende en la creación de H^+ , que finalmente convienen en la formación de ROS, entonces a mayor temperatura menor es la cantidad de oxígeno disuelto, además de que la fotocatálisis al considerarse un fenómeno de adsorción, una temperatura elevada provoca la desorción de especies orgánicas en la superficie del catalizador. Lo anterior indica que a altas temperaturas la velocidad de degradación disminuye. Para colorantes sintéticos, la degradación se puede monitorear con la absorbancia ya que a mayor concentración mayor absorbancia tendrá la muestra, estudios previos han usado concentraciones límite de 10–200 mg/L, la cual es similar a las concentraciones comunes de estos contaminantes en agua residual (Zhang *et al.*, 2018).

2. Método

La metodología (Figura 2.1) para este trabajo fue establecida de acuerdo a Beheshtkhoo *et al.*, 2018; Akinsiku 2018; Ismail *et al.*, 2018; Kuppusamy *et al.*, 2017; Syed *et al.*, 2018; Rosbero y Camacho, 2017; Shen *et al.*, 2011.

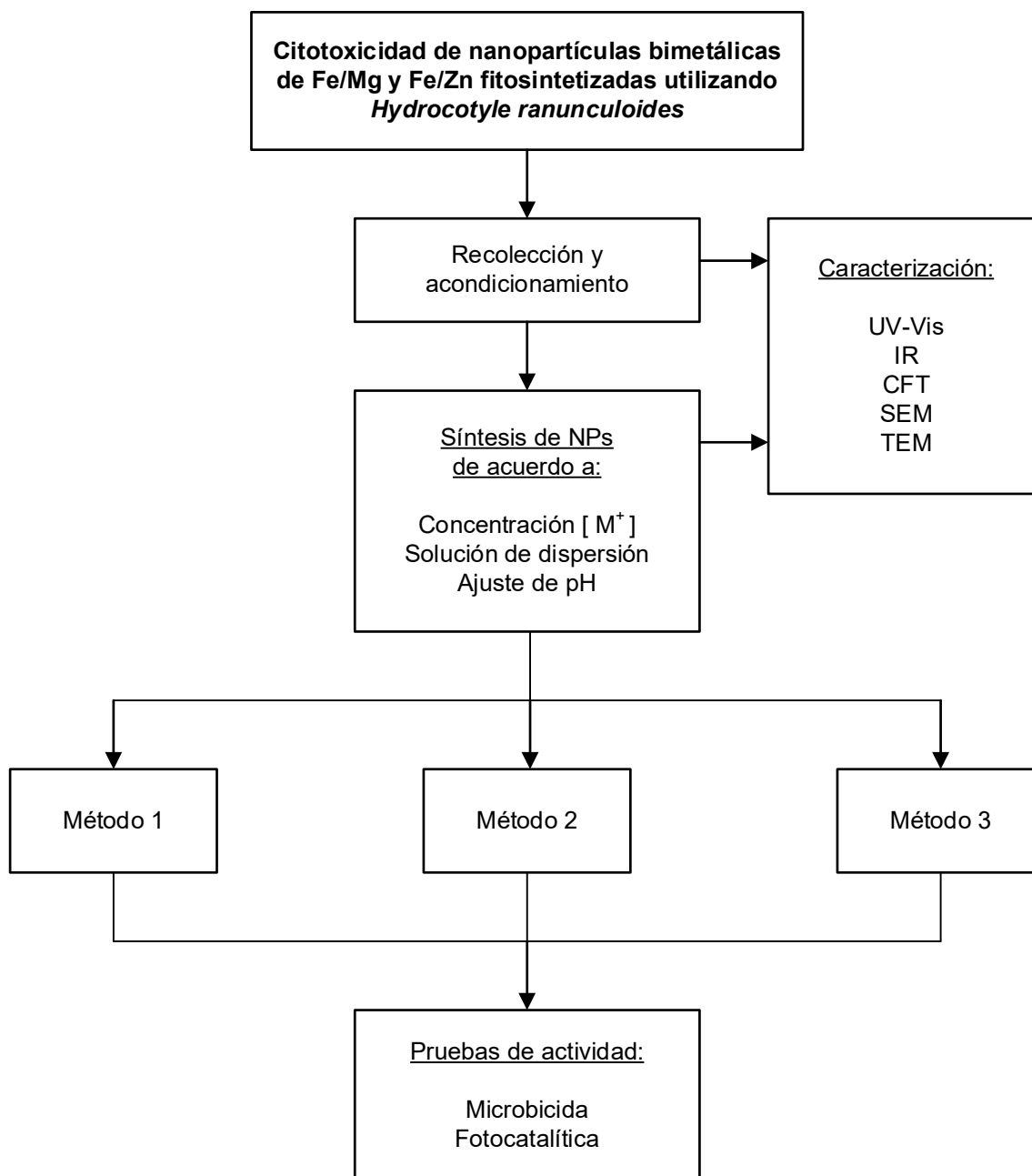


Figura 2.1 Metodología.

2.1 Materiales

Todos los reactivos referidos a continuación son marca Sigma-Aldrich; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, grado reactivo analítico, 99.95%, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ RG 98%, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ grado reactivo al 95%, HCl concentrado, ACS 36.5-38.0% y NaOH ACS 97.0%. Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N.

2.2 Recolección y acondicionamiento de la muestra

Se recolectó la especie vegetal *Hydrocotyle ranunculoides* en la Laguna de Chignahuapan, Almoloya del Río, Estado de México. La planta se lavó con agua potable y se seleccionaron únicamente las hojas, las cuales se secaron a temperatura ambiente durante 3 semanas. Una vez secas, las hojas se pulverizaron con un mortero, la muestra obtenida se lavó con disolución de HCl 0.1M dos veces, con periodos de contacto de 15 minutos antes del enjuague con agua desionizada, finalmente la muestra lavada se secó a 50 °C durante 12 horas y se colocó en frascos ámbar para su posterior uso en la generación de extractos vegetales.

2.3 Síntesis de nanopartículas

2.3.1 Método 1

Se pesaron 0.025 g de muestra lavada en un tubo de polietileno de 15 mL con tapa roscada, se adicionaron 5 mL de H_2O desionizada, el tubo se sonicó durante 15 min en un baño sonicador Branson® CPX3800H, luego se dejó reposar 5 min. Inmediatamente después, se centrifugó a 3 000 rpm durante 30 min en una centrífuga OHAUS-FC5714, luego se adicionó 1 mL de solución buffer a pH 4, 7 y 10, y fue sonicado de nuevo durante 15 min y luego de 5 min, la muestra se centrifugó 3 000 rpm durante 30 min. El extracto vegetal obtenido se identificó como EV1.

En un frasco ámbar de 25 mL se colocaron 10 mL de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 5 mM y 10 mL de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM, esta solución metálica se sonicó durante 20 min y se tomaron 5 mL de ésta y se añadieron al EV1, la solución fue sonicada 15 min, se dejó reposar

5 min y finalmente se centrifugó 30 min a 3 000 rpm. La muestra lavada fue separada por filtración. El sobrenadante obtenido fue identificado como M1 y refrigerado para su posterior análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

2.3.2 Método 2

Se colocaron 0.025 g de muestra lavada en un tubo de polietileno de 15 mL con tapa roscada, se adicionaron 10 mL de etanol al 80%, la muestra fue sonicada durante 15 minutos, después se filtró con membranas de 0.45 μm , el sobrenadante fue identificado como EV2 y refrigerado hasta la generación de NPs, mientras que el sólido recuperado fue secado a 50 °C durante 18 horas para su posterior análisis por FT-IR.

En un frasco ámbar de 25 mL se colocaron 10 mL de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M y 10 mL de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, se ajustó el pH a 4, 7 y 10 con NaOH, esta solución metálica se sonicó durante 20 min, se tomó una alícuota de 1 mL y se añadió al EV2. La muestra fue sonicada 20 min, se dejó reposar 5 min, se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante fue desechado y el sólido recuperado fue lavado con 15 mL de agua desionizada y centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos, este lavado se realizó por duplicado, finalmente se añadieron 10 mL de agua desionizada. Esta muestra fue identificada como M2 y se almacenó en refrigeración para sus posteriores análisis IR.

2.3.3 Método 3

Se colocaron 0.025 g de muestra lavada en un tubo de polietileno de 15 mL con tapa roscada, se adicionaron 10 mL de etanol al 80%, la muestra fue sonicada durante 15 minutos, se refrigeró durante 18 h, después se filtró con membranas de 0.45 μm , al sobrenadante se le identificó como EV2 y fue refrigerado hasta la generación de NPs. Al EV2 se le añadió 1 mL de una solución de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 15 mM, y 1 mL de solución de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M. la solución resultante fue sonicada 15 min, esta solución fue llevada a 400 °C x 2 h con una rampa de calentamiento de 150 °C durante 15 min, se le añadieron 10 mL de H_2O desionizada. La muestra se sonicó

durante 20 min, se realizó un centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y el sólido recuperado fue lavado con 15 mL de agua desionizada y centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos, finalmente se añadieron 10 mL de agua desionizada. Esta muestra fue identificada como M3 y se almacenó en refrigeración para su posterior análisis IR.

2.4 Caracterización UV-Vis

2.4.1 Muestra cruda y EV2

Se colocaron 0.025 g de muestra cruda en un tubo de polietileno de 15 mL con tapa roscada, se adicionaron 10 mL de etanol al 80%, la muestra fue sonicada durante 15 minutos, se refrigeró durante 18 h, después se filtró con membranas de 0.45 μm , el sobrenadante fue identificado como MC, y se realizó un barrido en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer-Lambda-35) desde una longitud de onda de 200 hasta 900 nm para la identificación de sus bandas de absorción características, a una dilución de 1/5. La muestra EV2 se obtuvo de acuerdo al procedimiento en 2.2.2.

2.4.2 Nanopartículas

A las suspensiones de las muestras M1, M2 y M3 se les llevó a dilución de 1/5 con agua desionizada y se les realizaron barridos por UV-Vis de 200 a 900 nm para la identificación de su plasmón superficial.

2.4.3 Compuestos polifenólicos totales

Se construyó una curva de calibración de seis puntos a partir de una solución estándar de ácido gálico a 0.4 mg/L de acuerdo a Chahardoli *et al.* (2018); Kumar *et al.* (2019b); Dlugosz *et al.* (2019). Con el propósito de determinar la fracción de compuestos fenólicos totales que son usados en la generación de NPs.

En frascos ambar envueltos en papel aluminio se añadieron 0.5 mL de muestra, 2.5 mL de reactivo Folin-Coicalteu 0.2 N y 2 mL de disolución de Na_2CO_3 700 mM, se dejaron reposar durante 90 minutos, se leyeron absorbancias a 760 nm, los resultados fueron referidos como gramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra.

2.5 Caracterización en SEM

A las muestras M1, M2 y M3 se les realizó una dilución a 1/5, se colocó una gota de cada muestra diluida en una rejilla de soporte para microscopía de cobre malla 200 recubierta previamente con carbono respectivamente y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-JSM-7800F.

2.6 Caracterización en TEM

Las rejillas con las muestras M1, M2 y M3 preparadas para su análisis en SEM, fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL-JEM-2010FEG. Se obtuvieron micrografías de alta resolución, así como transformadas de Fourier rápidas (FFT) y difracciones electrónicas de área selecta (SAED).

2.7 Actividad fotocatalítica

La siguiente metodología fue modificada de acuerdo a lo reportado por Elemike *et al.* (2017), Radini *et al.* (2018), Kumar *et al.* (2016), Kumar *et al.* (2018), Kumar (2019a), Li *et al.* (2019) y Pugazhendhi *et al.* (2019).

Se tomaron 0.005 g de NPs secadas previamente a 50 °C x 48 h y se le añadieron a 100 mL de una solución de rojo No. 40 a una concentración de 15 $\mu\text{mol/L}$, se sonicó el recipiente durante 1 minuto. Se construyó un reactor de aluminio, con una lámpara de luz UV de 350 nm y una bomba de aire como fuente de O_2 iniciador. Se tomaron

alícuotas de 5 mL conforme el curso de reacción, se registró la absorbancia de estas alícuotas a una longitud de onda de 540 nm.

2.8 Actividad microbici

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas sintetizadas con lirio acuático se evaluó utilizando *E. coli* ATCC 25992 (Bacteria Gram negativa), la cual ha sido ampliamente utilizada como modelo en experimentos bactericidas (Silva, 2016). Las etapas de la prueba se describen a continuación:

2.8.1 Cuenta de UFC/mL en cepas bacterianas: se utilizó el método de cuenta en placa, para determinar el número de bacterias viables (unidades formadoras de colonias, UFC) disponibles por cada cepa. El experimento se realizó por triplicado de acuerdo a la siguiente metodología:

2.8.1.1 Siembra de cepas de control: por separado se sembró en TSA (Agar Soya triptecaseína) por estría una asada de cada microorganismo y las placas se incubaron 24 horas a 36 ± 1 °C. Posteriormente, se tomó una asada de las cepas y se colocó en caldo TSB estéril contenido en un tubo de ensaye, el cual nuevamente se incubó 24 horas a 36 ± 1 °C.

2.8.1.2 Preparación del inóculo: una vez contando con la suspensión bacteriana, se efectuaron diluciones de las cepas, tomando un mililitro de la suspensión incubada en TSB, el cual se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de disolución amortiguadora de fosfato-cloruro de magnesio estéril hasta llegar a la dilución de 1×10^{-7} de *E. coli*. Entre cada dilución, las suspensiones fueron homogenizadas en un agitador de tubos vortex.

2.8.1.3 Siembra del inóculo: se tomó 1 mL de las diluciones 10^{-1} a 10^{-7} (*E. coli*) y se colocó en cajas petri estériles. Enseguida se adicionó el medio de cultivo (TSA) homogenizando perfectamente y una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron de 18-24 horas a 36 ± 1 °C. Al término de este periodo, se contó el número de colonias y se calculó la concentración de las suspensiones microbianas.

2.8.1.4 Determinación de UFC/mL con efecto microbici da cuantificable. Para poder determinar la dilución bacteriana en que el efecto microbici da de las NPs es detectable, las nanopartículas secas obtenidas en la sección 2.3, se secaron a 60°C durante 24 horas y con las NPs en polvo, se prepararon soluciones con concentraciones en el rango de 2-100mg/L. Posteriormente, se preparó el inóculo de cada bacteria de acuerdo a la sección 2.8.1.2, y se sembró la bacteria completa de diluciones 1×10^{-1} a 1×10^{-7} adicionando 1 mL de solución de NPs probando diferentes concentraciones de 10, 50 y 100 mg/mL.

2.8.1.5 Mínima concentración bacterici da (MIB): esta concentración se definió como la mínima cantidad de NPs en mg/L requerida para inhibir el 100% de los microorganismos presentes en la cuenta inicial del inóculo y se utilizó el método de cuenta en placa. Se colocó 1 mL del inóculo determinado en 2.8.1.3 en cajas petri y se les adicionó 1 mL de las soluciones de NPs preparadas en 2.8.1.4 probando concentraciones en el rango de 10, 50 y 100 mg/L dejando reposar 20 minutos antes de adicionar el medio de cultivo. Las placas se incubaron 24 horas a 36 ± 1 °C y se realizó la cuenta en placa.

3. Resultados

3.1. Caracterización de nanopartículas

3.1.1 Compuestos polifenólicos totales

La curva de calibración del reactivo Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como patrón, se muestra en la Figura 3.1. Esta curva fue útil para la medición de los compuestos polifenólicos totales (CPT) contenidos en los extractos vegetales y en las soluciones sobrenadantes de la síntesis de NPs.

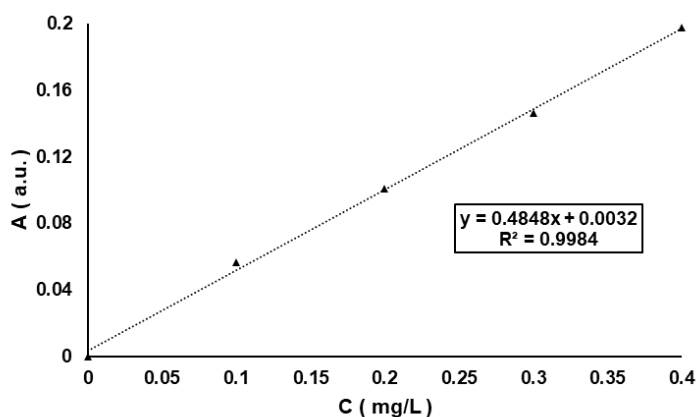


Figura 3.1 Curva estándar de Folin-Ciocalteu.

Del análisis del contenido de compuestos fenólicos totales se obtuvieron los siguientes resultados referidos a una solución estándar de ácido gálico. Con la curva estándar obtenida se determinaron los compuestos polifenólicos totales en equivalencia al ácido gálico (GAE) y se calculó el porcentaje de compuestos polifenólicos útiles (CPU) en la síntesis de NPs, estos resultados se muestran en la siguientes tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1 Compuestos polifenólicos totales de EV.

Muestra	Absorbancia (u.a.)	CPT (mg GAE)
EV1	0.1889	0.3938
EV2	*0.1801	0.7503

Tabla 3.2 Compuestos polifenólicos totales de muestras.

Muestra	Absorbancia (u.a.)			CPT (mg GAE)			% de CPU		
	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10
NPs M1 (EV1)	0.1729	0.1548	0.1277	0.3564	0.3191	0.2631	11.02	17.34	33.20
NPs M2 (EV2)	*0.1219	*0.1146	*0.1728	0.5022	0.4728	0.3563	32.1	37.99	52.72
NPs M3 (EV2)	0.1071	0.0917	0.1354	0.2205	0.1887	0.1767	70.18	75.26	76.45

*Estas absorbancias fueron obtenidas por dilución 0.5.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la caracterización en TEM, puesto que M1 demuestra tener NPs escasas y los métodos M2 y M3 tener mayor proporción de NPs, esto refiere que a mayor número de compuestos fitoquímicos reductores se extraigan mayor es la generación de NPs. Lo anterior sigue indicando que el método de extracción de compuestos fitoquímicos con capacidad reductora en M1 no es muy eficiente en contraste a los otros dos al tener hasta un 76%.

Lo anterior muestra que al aumentar el aprovechamiento de fitoquímicos se aumenta el número de nanopartículas producidas, así como un tamaño menor de las mismas con tamaño menor a 5 nm, con excepción del soporte en M3 ya que el soporte se encuentra en tamaños cercanos a los 10 nm, la misma tendencia se observa con el pH en sus tres valores, y siendo pH=10 el valor con mayor % de CPU, entonces se relaciona que una mayor proporción de los compuestos polifenólicos de menor tamaño en el extracto vegetal son removidos usando pH10 y método de extracción EV2.

3.1.2. Caracterización UV-Vis

3.1.2.1. pH4

La Figura 3.2 muestra el espectro UV-Vis de las NPs formadas por M1. De acuerdo a Amala *et al.* (2017), la banda de los polifenólicos presenta un desfase batocrómico debido a la formación del plasmón superficial de las NPs, este desplazamiento es aproximadamente de 15 nm, la muestra M1 presenta la cresta de los polifenoles en

275 nm, mientras que EV2 lo presenta en 266 nm. Por lo tanto, el desplazamiento de M1 confirma la presencia de NPs de óxido de hierro.

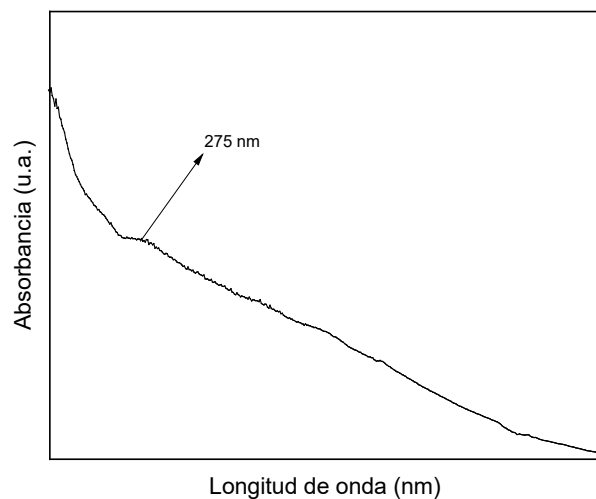


Figura 3.2 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH4.

El espectro UV-Vis de la muestra M2 se presenta en la Figura 3.3. Las crestas identificadas en 567 y 670 nm corresponden a las clorofilas que de manera análoga presenta el mismo fenómeno descrito por Amala *et al.* (2017). Es desfase batocrómico es aproximado a 100 y 3 nm, lo que indica la formación de NPs de Fe-Zn.

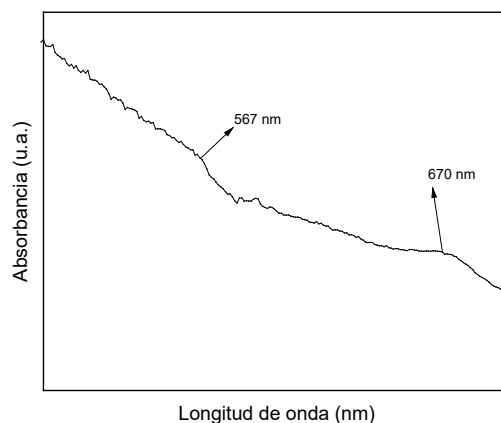


Figura 3.3 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH4.

La Figura 3.4 muestra el espectro UV-Vis de las NPs obtenidas por M3, exhibe tres crestas en 297, 524 y 645 nm, la primera corresponde a los compuestos polifenólicos y la tercera a las clorofilas. En este espectro se presenta el mismo fenómeno que en los espectros de M1 y M2 que de acuerdo a Amala et al. (2017), exhibe un desfase batocrómico de 40 nm para los polifenólicos que se ubican en 260 nm y un desfase hipsocrómico de 20 nm para las clorofilas que se ubican en 625 nm lo anterior indica la formación de clorofilas.

De acuerdo a Sahu *et al.*, (2018) el ruido presente se asocia a la presencia no solo de nanopartículas, sino de estructuras agregadas de óxidos metálicos. Por lo que, el ruido en este espectro se debe a la presencia de agregados de los nanosportes de Mg.

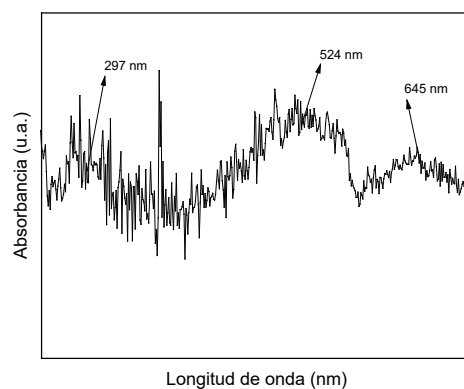


Figura 3.4 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH4.

Por último, la Figura 3.5 presenta el espectro UV-Vis de la solución metálica Fe/Zn 0.1M, el barrido de esta solución se realizó para identificar el plasmón superficial de los metales disociados en su forma iónica, el plasmón superficial para esta solución bimetalica se presenta a los 480 nm y que además es única. Este parámetro es útil para confirmar la posterior producción de NPs (Sravanthi *et al.*, 2018).

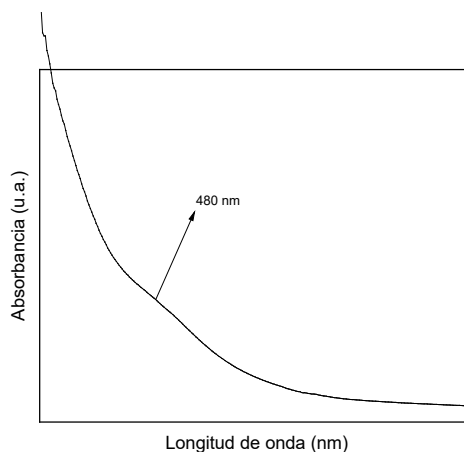


Figura 3.5 Espectro UV-Vis de solución metálica Fe/Zn.

3.1.2.2 pH7

La Figura 3.6 muestra el espectro UV-Vis de las NPs formadas por M1. De acuerdo a Amala *et al.*, (2017), la banda de los polifenólicos tiende a presentar un desfase batocrómico debido a la formación del plasmón superficial de las NPs, este desplazamiento de hasta 15 nm, que con respecto a pH4, el espectro presentado se define mejor, mostrando bandas en 265 y 357 nm y el desplazamiento de la banda de los polifenólicos es menor con solo 5 nm, lo anterior probablemente se debe a que presenta menos sólidos coloides interferentes en la solución debida a la solución metálica libre (no involucrada en la formación de NPs), por otro lado, la banda en 357 nm refiere al plasmón superficial de óxidos de hierro.

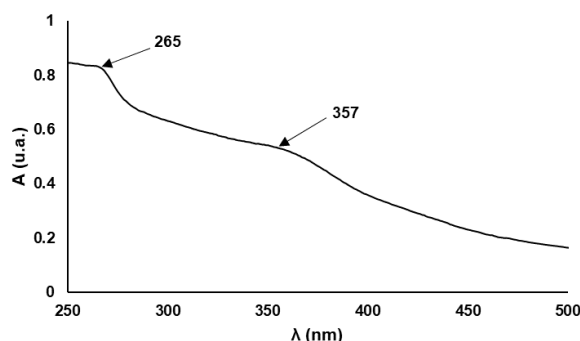


Figura 3.6 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH7.

El espectro UV-Vis de la muestra M2 se presenta en la Figura 3.7. Las crestas identificadas en 361 y 656 nm, que corresponden a los plasmones superficiales característicos de material nanoparticulado de hierro y zinc, aunque también poseen desfases descritos por Amala *et al.*, (2017), dichos desfases no son importantes. A diferencia de pH4 y análogo a M1, la interferencia disminuye, lo que permite identificar las bandas de los plasmones superficiales, sin embargo, la banda de los polifenólicos no se observa, dicho fenómeno se debe a que la cantidad de la concentración de solución metálica es mayor y genera la interferencia en la zona UV.

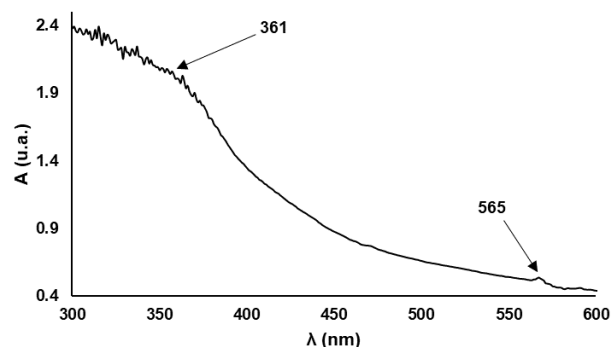


Figura 3.7 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH7.

La Figura 3.8 muestra el espectro UV-Vis de las NPs obtenidas por M3, exhibe tres crestas en 265, 360 y 565 nm, que corresponden a los compuestos polifenólicos, al plasmón superficial y a las clorofilas respectivamente. En este espectro se presenta el mismo fenómeno que en los espectros de M1 y M2 que de acuerdo a Amala *et al.* (2017) exhibe un desfase batocrómico para los polifenólicos y un hipsocrómico para las clorofilas, lo anterior indica la formación de nanopartículas.

Para disminuir la interferencia descrita por Sahu *et al.* (2018) que se debe a estructuras agregadas de óxidos metálicos, se le realizó una dilución 1/20. Por lo que el ruido en este espectro debido a la presencia de agregados de los nanosportes de Mg fue minimizado, permitiendo identificar las bandas de 265 y 360, así como un tenue incremento de cresta en 565 nm correspondiente a las clorofilas.

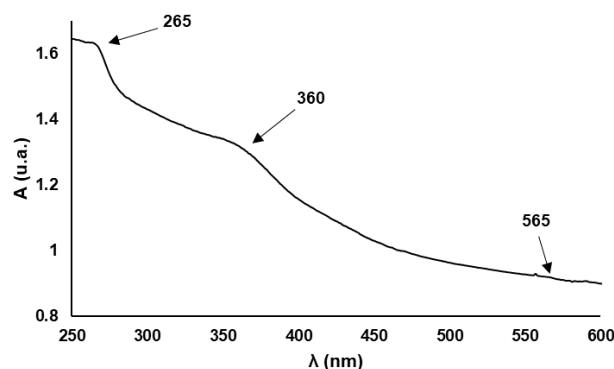


Figura 3.8 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH7.

3.1.2.3. pH10

La Figura 3.9 muestra el espectro UV-Vis de las NPs formadas por M1. A diferencia de los anteriores espectros de M1, esta no tiene definida la banda de polifenoles a 260 nm, sin embargo, si tiene la banda característica del plasmón superficial entre 350 y 400 nm para las nanopartículas de los metales empleados. El espectro posee interferencia atribuible a la especiación metálica coloide que se tiene en ese pH. La influencia del pH provoca un desplazamiento batocrómico mayor que en los otros pH, debido a la especiación de las sales metálicas empleadas.

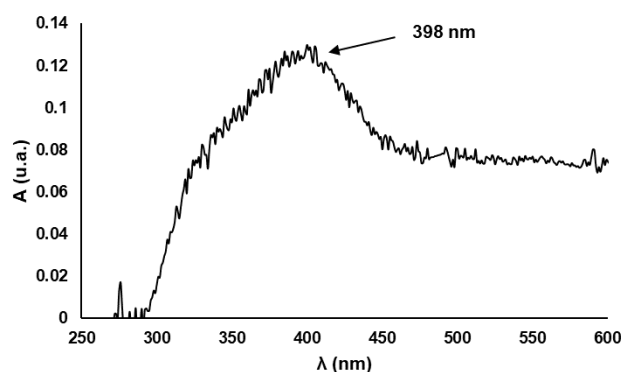


Figura 3.9 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M1 pH10.

En la Figura 3.10 se presenta el espectro UV-Vis de NPs generadas por M2, como se puede observar en la zona circundante a 260 nm se encuentra una banda solapada con otra a 400 nm, la primera banda corresponde a los compuestos polifenólicos y la segunda al plasmón superficial de las NPs generadas. También se observa interferencia en el espectro debida a la especiación coloide metálica.

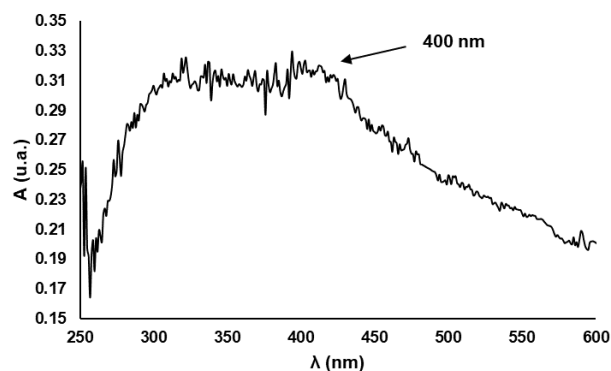


Figura 3.10 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M2 pH10.

De manera similar, el espectro UV-Vis que se muestra en la Figura 3.11 presenta interferencia debida a la especiación en fase coloide de las sales metálicas empleadas debida al pH. Se puede observar de nuevo el solapamiento entre las bandas de 260 de los compuestos polifenólicos y la de 400 atribuida al plasmón superficial de las NPs. De nueva cuenta el pH provoca un desfase batocrómico mayor que en otros pH, además de la interferencia antes mencionada.

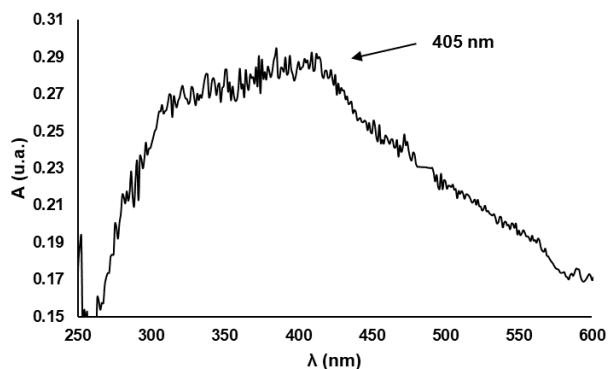
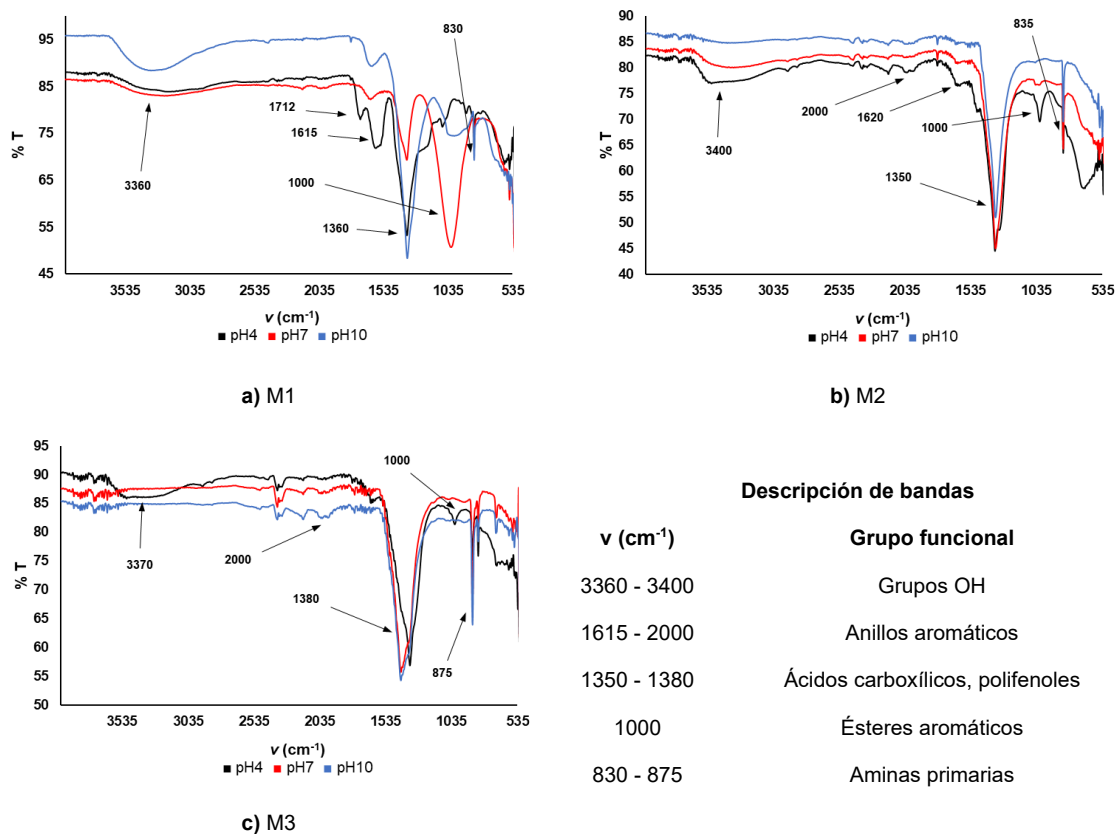


Figura 3.11 Espectro UV-Vis de NPs generadas por M3 pH10.

3.1.3 Caracterización IR

Los análisis de espectroscopía IR de las NPs permitieron obtener los espectros de la Figura 3.12, donde se muestran las bandas características y los grupos funcionales donde pertenecen.



Bandas identificadas de acuerdo a Silverstein et al, 2014, Mistry, 2009 y Siegdried, 2003.

Figura 3.12 Espectros IR de NPs.

Como se puede observar, la permanencia de grupos funcionales como anillos aromáticos, ácidos carboxílicos, esterres aromáticos y aminas, indican que las sustancias involucradas en procesos metabólicos vegetales son los responsables de reducir los metales, en específico, los compuestos glucosídicos conocidos también como flavonoides poseen estructuras aromáticas, grupos funcionales OH, la fenilalanina es uno de los precursores de los flavonoides, dicho compuesto posee grupos carboxílicos y aminados, finalmente, los esterres aromáticos también se encuentran dentro de la cadena de síntesis de los flavonoides dentro de los vegetales (Sanjurjo, 2017). De acuerdo a los espectros presentados, para los tres diferentes métodos el aumentar el pH provoca que los picos de compuestos relacionados con anillos aromáticos sean atenuados, confirmando su uso en la producción de NPs, así mismo

para los tres diferentes pH, en el método 1 los picos de compuestos relacionados con anillos aromáticos y compuestos polifenólicos son más destacables que en los otros dos métodos.

3.1.4 SEM

3.1.4.1 pH4

La Figura 3.13 presenta micrografías de SEM obtenidas por M1. En la primera micrografía se observan partículas sin forma definida, muy cercanas unas con otras, en la superficie central persisten protuberancias o partículas adheridas menores a 30 nm aproximadamente. En la segunda micrografía, un alejamiento permite observar partículas de diferentes tamaños, desde 100 nm hasta 0.4 μm . Por lo que en esta técnica y método no se confirman NPs esperadas.

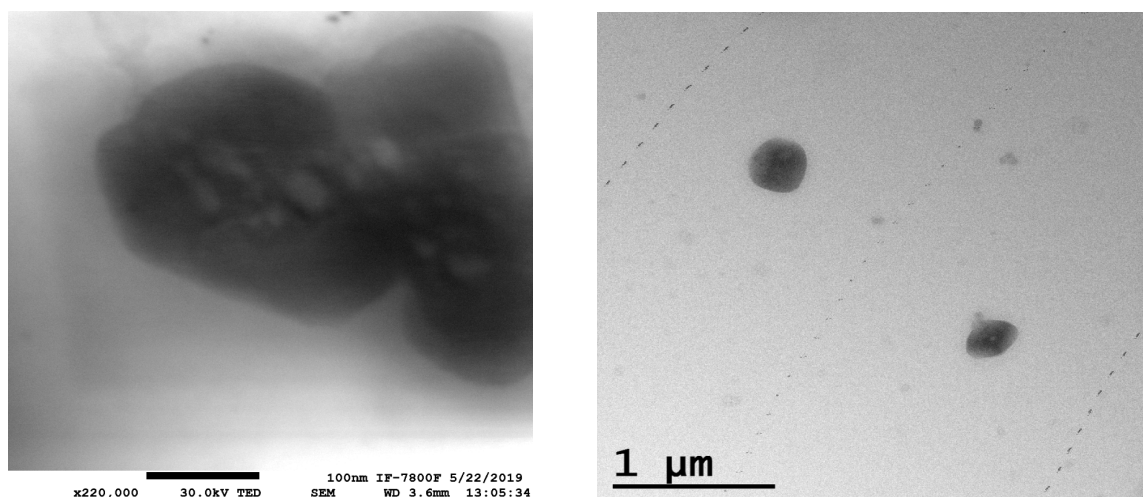


Figura 3.13 Micrografías en SEM de M1 pH4.

Las micrografías de SEM obtenidas por M2 se muestran en la Figura 3.14. La primera micrografía presenta partículas de diferentes tamaños y aglutinadas, se alcanzan a apreciar partículas menores a 100 nm. Esta morfología es similar a la obtenida por Bharathi *et al.*, (2018). En la segunda micrografía se presenta un acercamiento en el que se observan claramente NPs agregadas y menores a 50 nm.

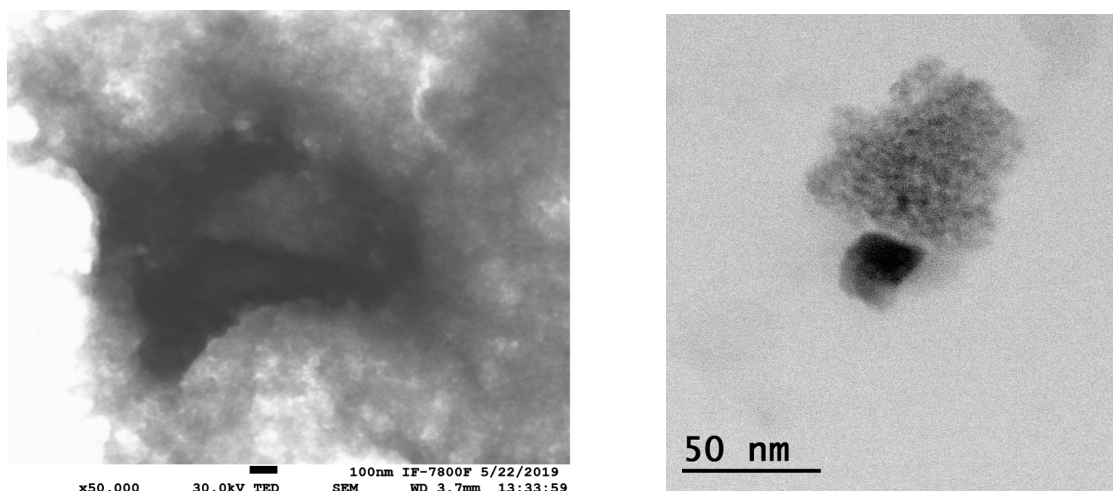


Figura 3.14 Micrografías en SEM de M2 pH4.

En la Figura 3.15 se muestran micrografías SEM obtenidas por M3. La primera micrografía muestra un agregado sin forma definida con NPs menores a 20 nm aproximadamente. Nasrollahzadeh *et al.*, (2019) obtuvo un nanocomposito de Cu/Ni soportados en óxido de grafeno, por SEM observaron partículas adheridas a su soporte bien definido. En la segunda micrografía obtenida de dicha figura se observa morfología no regular, no es tan uniforme como la observada por Nasrollahzadeh *et al.*, (2019) debido a que en este trabajo se usó MgO como soporte y la dispersión del material orgánico.

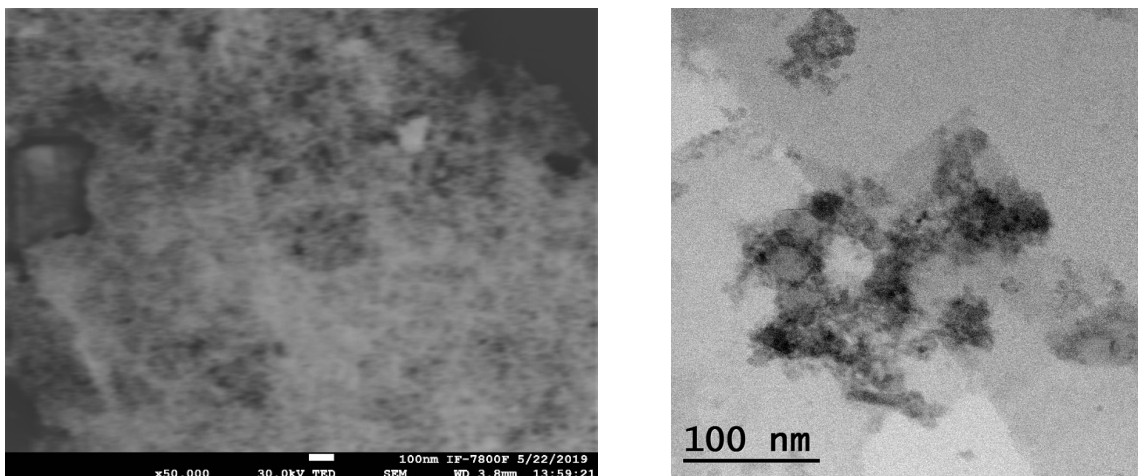


Figura 3.15 Micrografías en SEM de M3 pH4.

3.1.4.2 pH7

La Figura 3.16 presenta micrografías de SEM obtenidas a través del M1. La primer micrografía muestra partículas de tamaños mayores a 1 micrómetro con aparente aglomeración. La misma tendencia se observa en la segunda micrografía cuya escala nanométrica revela partículas de tamaño menor a 100 nm.

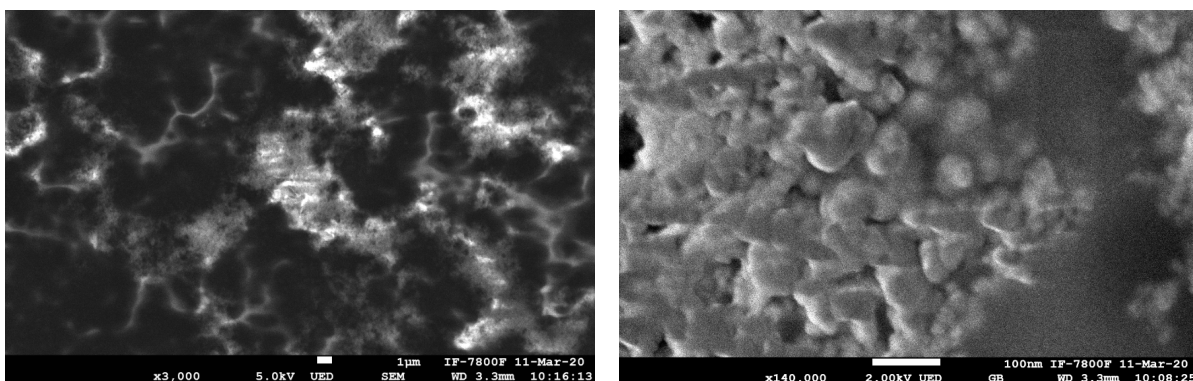


Figura 3.16 Micrografías en SEM de M1 pH7.

Las micrografías de SEM obtenidas por el M2 se muestran en la Figura 3.17. La primera micrografía presenta agujas además de partículas de tamaño y perfil no homogéneo. En la segunda micrografía se presenta un acercamiento en la que se observan nanopartículas dentro y fuera del cuerpo de la aguja con un tamaño mucho menor a 100 nm.

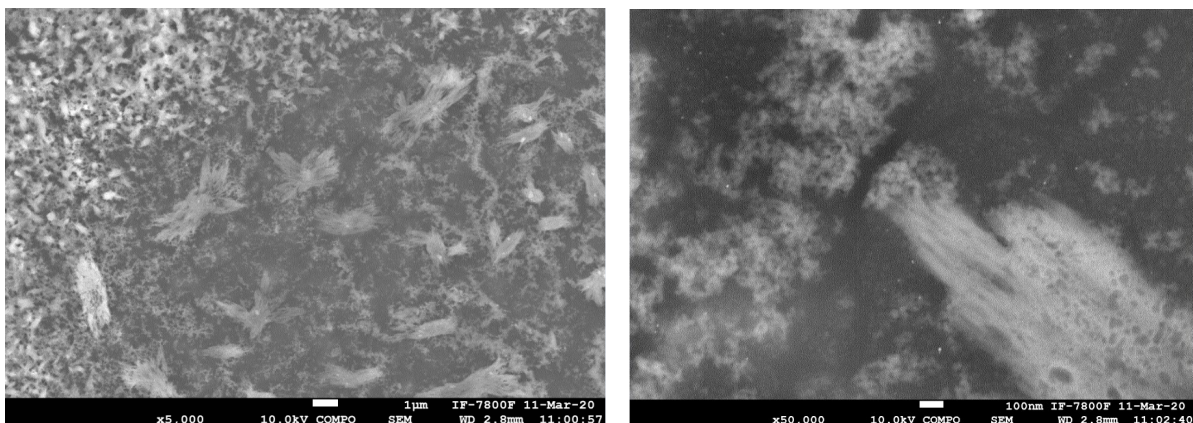


Figura 3.17 Micrografías en SEM de M2 pH7.

En la Figura 3.18 se muestran micrografías SEM obtenidas por el M3. La primera micrografía muestra material recubierto con morfología irregular. Un acercamiento se muestra en la segunda micrografía, en la que se observa material aglomerado en la parte central (zona clara), la cual se encuentra rodeada de nanopartículas menores a 20 nm aproximadamente.

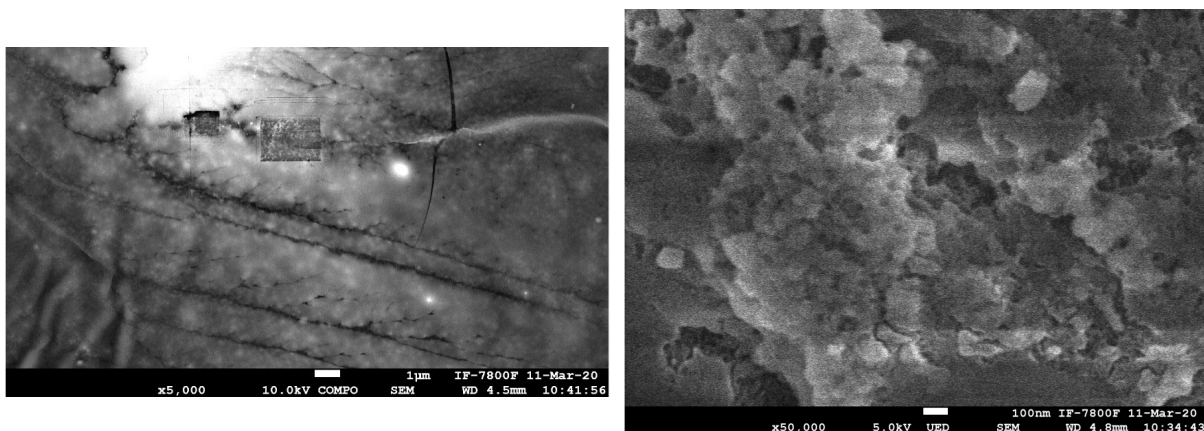


Figura 3.18 Micrografías en SEM de M3 pH7.

3.1.4.3 pH10

La Figura 3.19 presenta micrografías de SEM obtenidas a través del M1. La primera micrografía muestra partículas de tamaños mayores a 1 micrómetro con aparente aglomeración. La misma tendencia se observa en la segunda micrografía cuya escala nanométrica revela partículas de tamaño menor a 100 nm. Se observan agregados entre 20 y 30 nm.

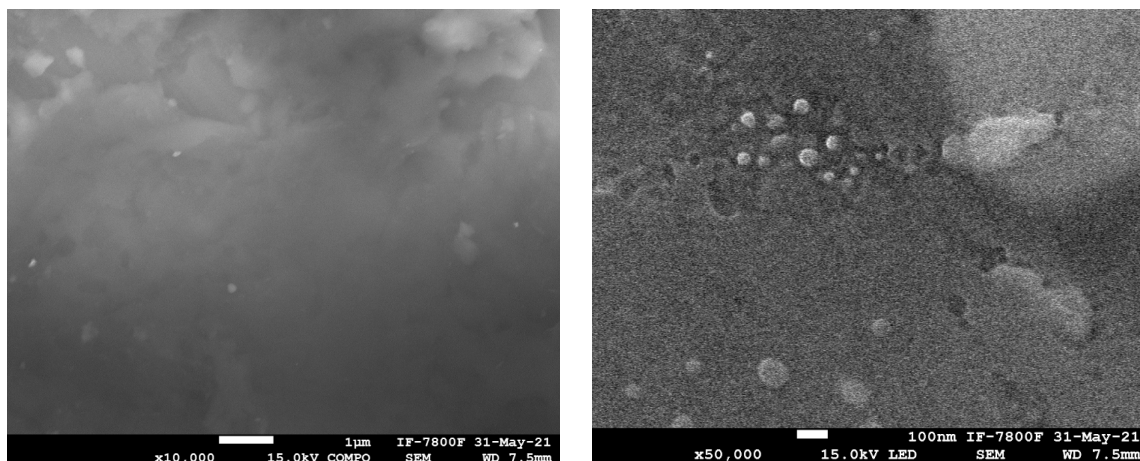


Figura 3.19 Micrografías en SEM de M1 pH10.

Las micrografías de SEM obtenidas por el M2 se muestran en la Figura 3.20. La primera micrografía presenta partículas de tamaño y perfil no homogéneo. En la segunda micrografía se presenta un acercamiento en la que se observan nanopartículas en la parte izquierda inferior del material microscópico.

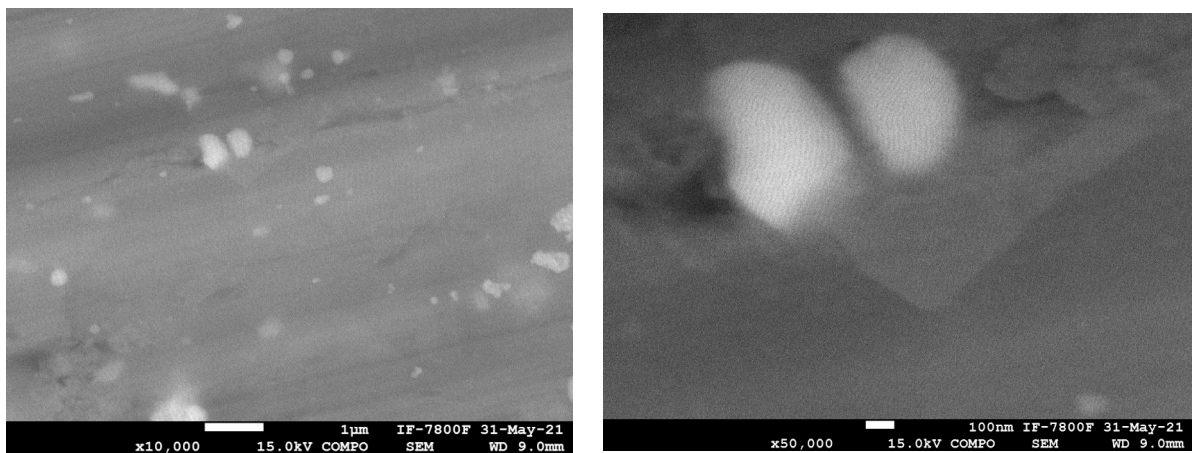


Figura 3.20 Micrografías en SEM de M2 pH10.

En la Figura 3.21 se muestran micrografías SEM obtenidas por el M3. La primera micrografía muestra material particulado disperso con tamaño y perfil no homogéneo. En la segunda micrografía obtenida de la misma que se observan partículas menores a $1\mu\text{m}$ distribuidas alrededor de los agregados más grandes.

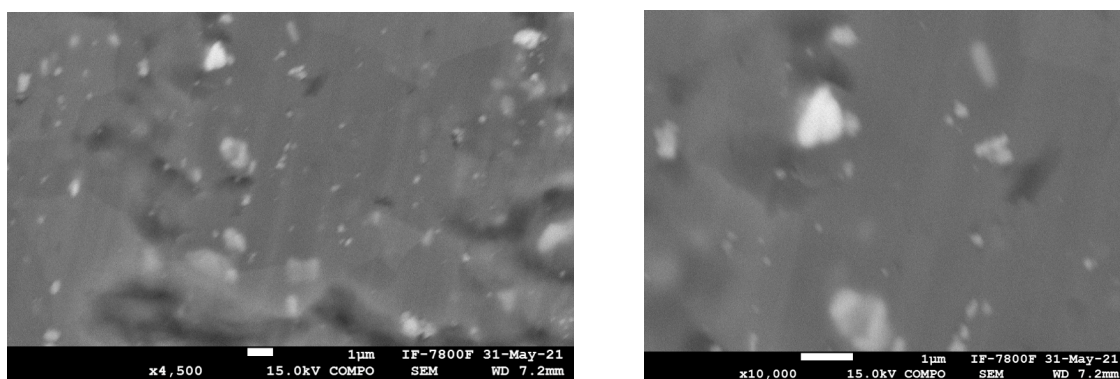


Figura 3.21 Micrografías SEM de NPs obtenidas por M3 a pH10.

3.1.5 TEM

3.1.5.1 pH4

La Figura 3.22 presenta los resultados de TEM de muestra obtenida por M1. En la micrografía se observa en la zona **a)** la presencia de dos NPs con tamaño de 5 nm, además se aprecian las líneas características de una partícula metálica. Una indexación primaria de dichas NPs reveló una composición de Fe_3O_4 con forma cúbica. Mientras que en **a1)** el FFT muestra las distancias interplanares 2.565 y 2.945 Å correspondientes a los índices de Miller (311) y (220) con referencia a la tarjeta PCPDFWIN No. 88-0866 situada en el Anexo 1.

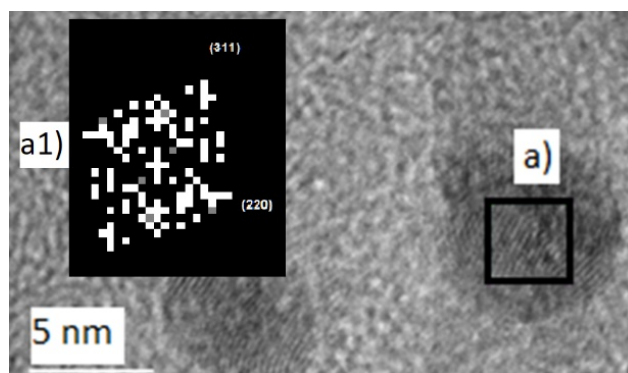


Figura 3.22 Micrografía por TEM de M1 con FFT.

En la Figura 3.23 presenta micrografías obtenidas por TEM para la muestra M2. Se observan NPs de tamaño aproximado de 5 nm, además de tener una distribución homogénea aparente y las líneas características de distancias interplanares. Una indexación primaria de dichas NPs están indicadas en a) y b), así mismo los FFTs correspondientes se muestran en a1) y b1). La zona a) reveló líneas características de planos de una estructura cúbica de Fe_3O_4 , en a1) se muestran las distancias interplanares 2.583, 2.421 y 2.492 Å con índices de Miller (222), (400) and (311) de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866. La zona b) mostró líneas características de

planos en una estructura hexagonal correspondiente a Zn^0 , la zona b1) reveló distancias interplanares de 2.019 and 2.466 Å correspondientes a índices de Miller (002) y (101) de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 04-0831.

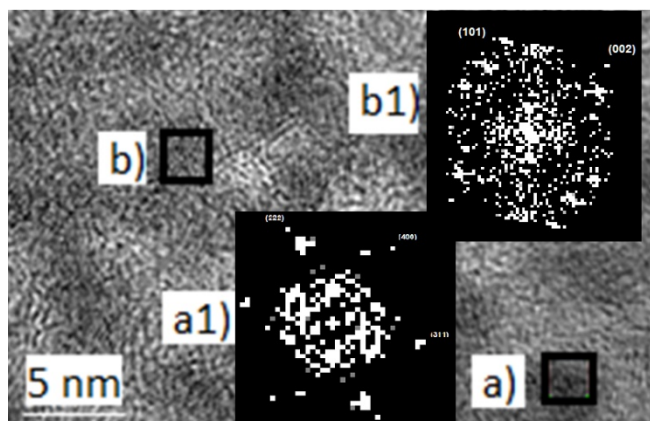


Figura 3.23 Micrografía por TEM de M2 con FFT.

En la Figura 3.24 se presenta una micrografía por TEM de M3. Dicha imagen muestra NPs de tamaños diferentes todas ellas menores a 50 nm. La presencia de los soportes ya es evidente en las partículas más claras.

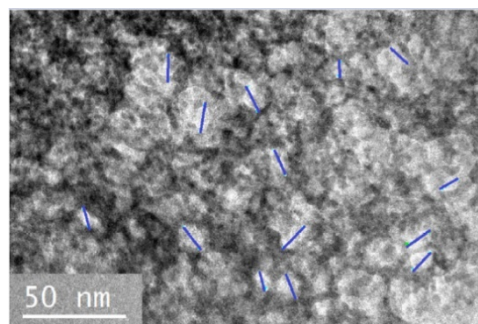


Figura 3.24 Micrografía por TEM de M3.

La Figura 3.25 también corresponde a M3, la micrografía revela un soporte aislado que está rodeado de NP menores de 5 nm. Una indexación primaria de las cuatro zonas está marcada en la figura. Los soportes de Mg se indican en a), el FFT de estas áreas que se muestra en a1) exhibió líneas características de una estructura hexagonal correspondiente a Mg^0 , con distancias interplanares de 2.469 y 1.372 Å

correspondientes a índices de Miller (101), (020) y (200). Del mismo modo, las franjas de la red de Fe y Zn NP están unidas en c) y d) y sus respectivas FFT están en c1) y d1). Mientras que c) y c1) revelaron una estructura cúbica correspondiente a Fe^0 con distancias interplanar 2.022 y 1.407 Å correspondientes a los índices de Miller (110) y (200), d) y d1) mostraron una estructura hexagonal correspondiente a Zn^0 con distancias interplanares de 2.022 y 1.642 Å correspondientes a los índices de Miller (101) y (102). Lo anterior está de acuerdo con las tarjetas PCPDFWIN 35-0821, 85-1410, 04-0831. Esta distribución es consistente con la descrita por Liu *et al.*, 2017, en la cual presenta un soporte identificado como MgO rodeado por NPs de Ag^0 y Pd^0 . De acuerdo a la indexación en este trabajo, hay un soporte de Mg^0 rodeado de Fe^0 y Zn^0 como se muestra en la FFT.

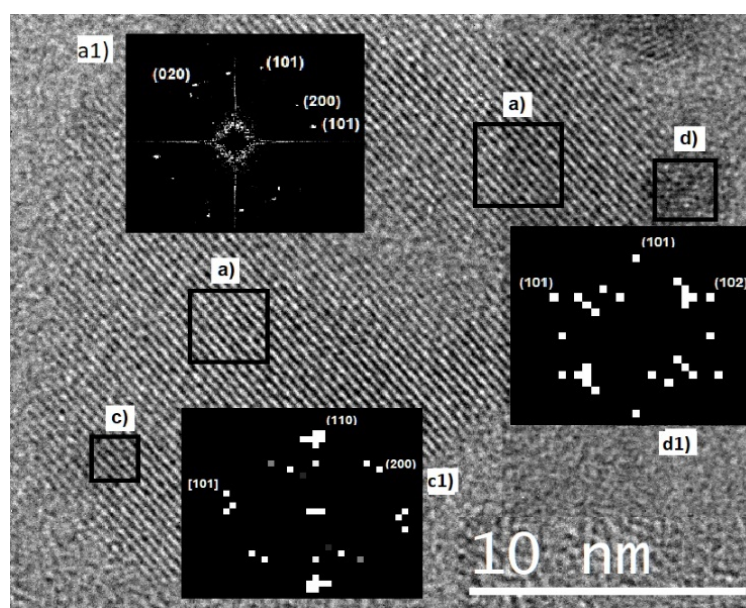


Figura 3.25 Micrografía por TEM de M3 con FFT.

3.1.5.2 pH7

En las micrografías de TEM por M1 de la Figura 3.26 se observa que el material sintetizado consta de racimos de partículas oscuras sujetas sobre el soporte vegetal, las escalas de las barras izquierda y derecha respectivamente son 200 nm y 50 nm.

De manera evidente, el usar pH 7 en la síntesis permitió generar una mayor cantidad de nanopartículas.

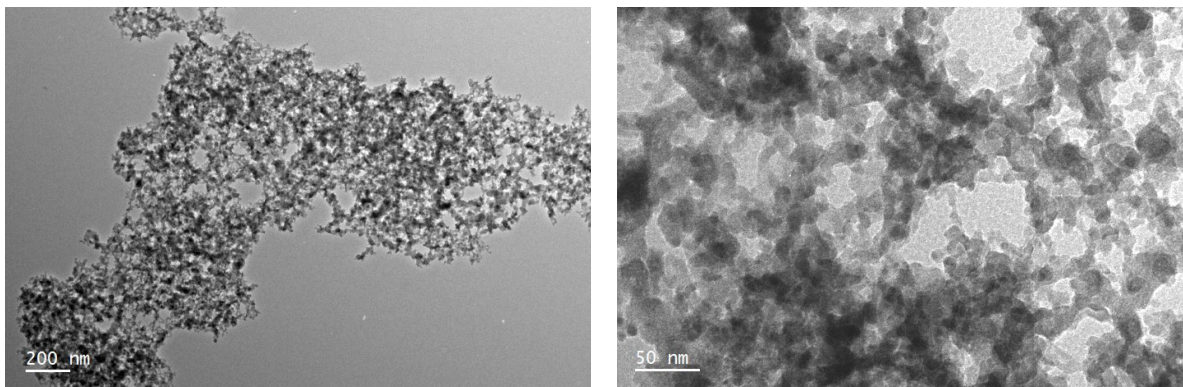


Figura 3.26 Micrografías por TEM de M1 a baja amplificación.

Un acercamiento a las partículas localizadas en la orilla de dichos racimos se muestra en la Figura 3.27, se aprecian líneas características de NPs metálicas escasas con franjas de red, también se presentan los FFTs de las áreas marcadas, estos revelan medidas de 1.490, 2.926 Å para c), 3.036 Å para b) y 2.489 y 3.055 Å para a), con índices de Miller (220), (222) y (440) atribuibles a sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 89-0951 que se encuentra en la sección de Anexos. De nueva cuenta este método sólo permitió generar FeNPs mientras que el Zn aún no se detecta en material nanoparticulado.

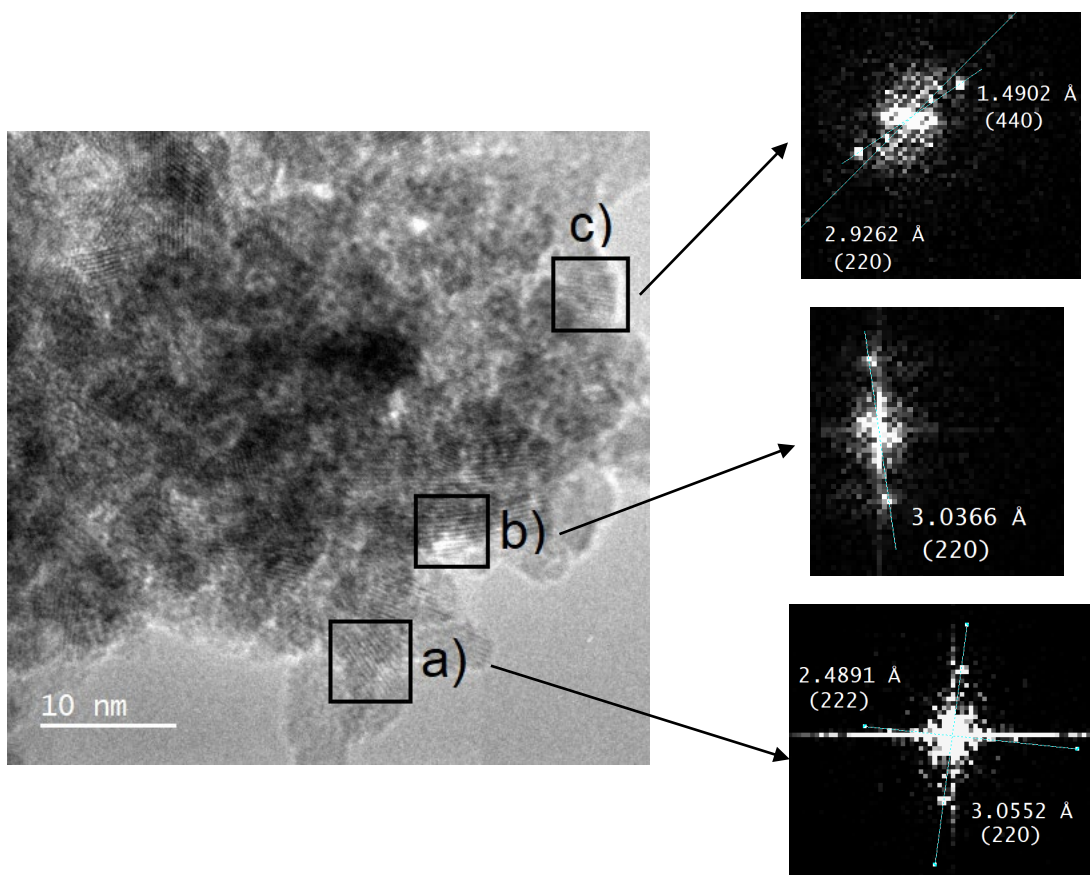


Figura 3.27 Acercamiento al borde de un racimo obtenido por M1.

En la Figura 3.28 se muestra el SAED del área anteriormente analizada, donde se corrobora únicamente la formación de las nanopartículas de óxidos de hierro.

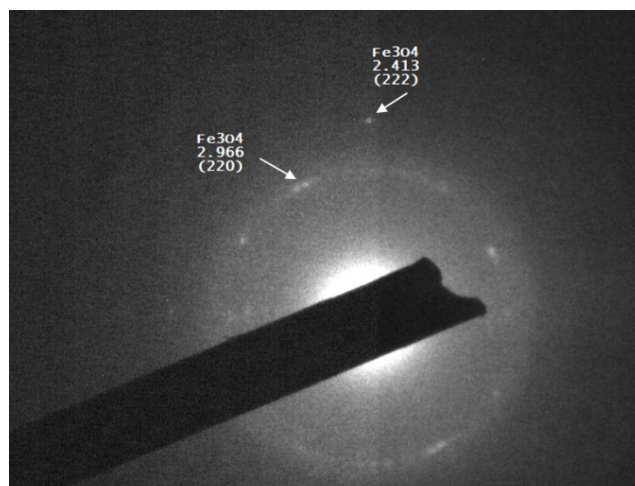


Figura 3.28 SAED obtenido por M1.

Para la muestra M2 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 3.29, donde se observa el material obtenido. En el lado izquierdo es evidente la aglomeración de material en la parte superior y en la parte inferior, este se encuentra disperso y hay partículas de tamaños variados, algunas de hasta 80 nm. Las escalas de las barras izquierda y derecha respectivamente son 200 nm y 20 nm. Dichas partículas son perfectamente cristalinas como se observa del lado derecho. El material sintetizado a pH 7 marca una evidente producción de nanopartículas, así como su aglomeración.

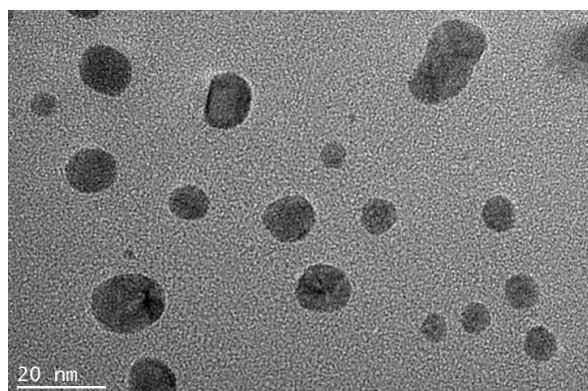
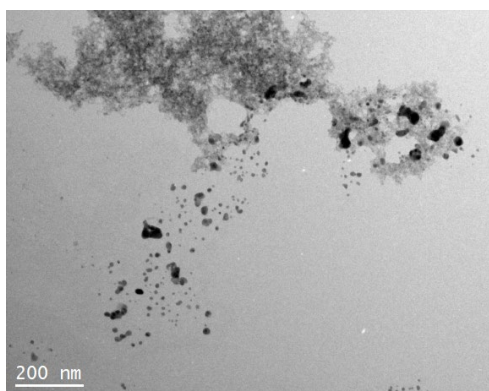


Figura 3.29 Micrografías por TEM obtenidas por M2 a baja amplificación.

Un acercamiento a las partículas dispersas se muestra en la Figura 3.30, se aprecian líneas características de NPs metálicas, donde sus FFTs revelan medidas de 1.4937, 2.5380 y 2.5188 Å, con índices de Miller (440) y (311) correspondientes a sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 89-0951 para a), mientras que para b) se encuentran medidas de 2.4573, 2.6614 y 2.6302 Å con índices de Miller (101) y (002) correspondientes a un sistema hexagonal de ZnO de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 89-1397, dichas tarjetas se encuentran en la sección de Anexos. Con lo anterior se establece que en este método, usando pH7 en la síntesis, aparte de generarse FeNPs, también se obtuvieron ZnNPs.

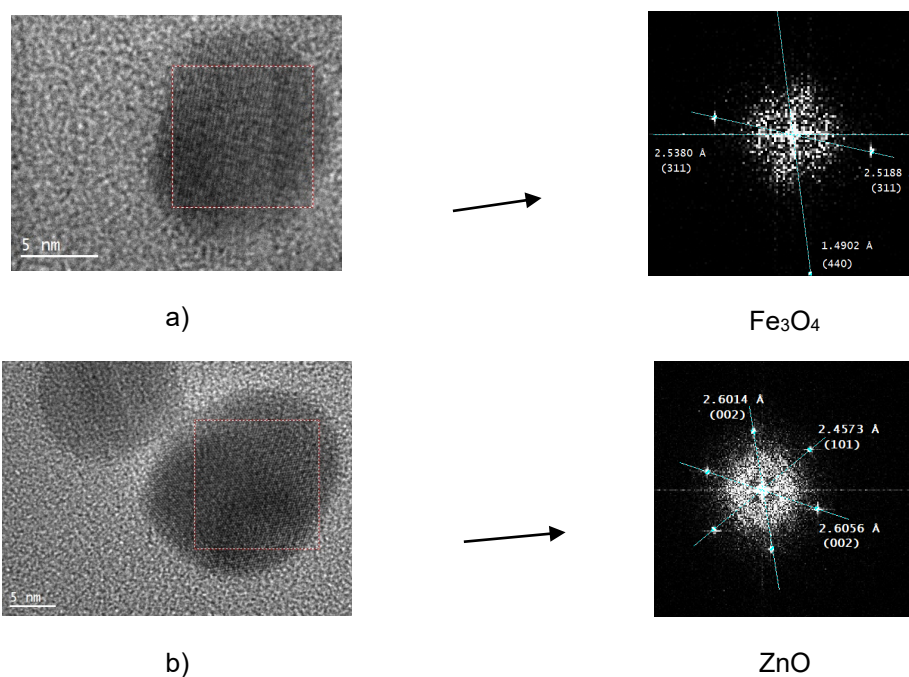


Figura 3.30 Micrografías obtenidas por TEM de M2 y sus respectivos FFTs. a) FeNPs, b) ZnNPs

El SAED correspondiente al área analizada de M2 se muestra en la Figura 3.31, donde se verifica la presencia de las nanopartículas de Fe y Zn.

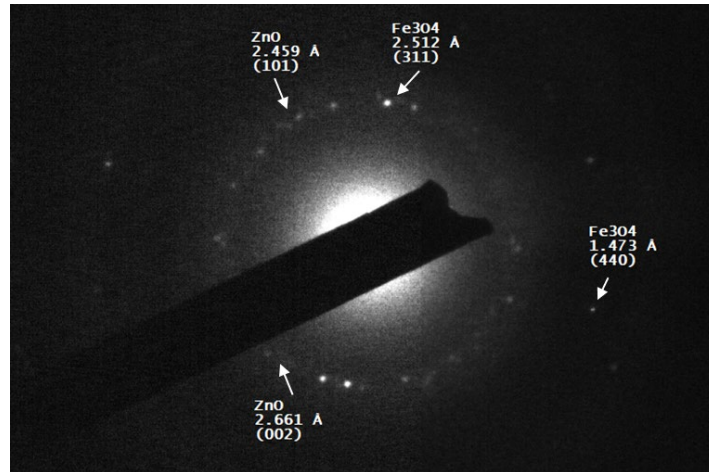


Figura 3.31 SAED obtenido por M2.

Finalmente, en la Figura 3.32 se presenta una micrografía por TEM para M3. Dicha imagen muestra NPs de tamaños diferentes todas ellas menores a 100 nm. La presencia de los soportes de Mg ya son evidentes en las partículas con contraste más claro. Dichos soportes se encuentran rodeados de partículas oscuras, con un tamaño menor a 10 nm.

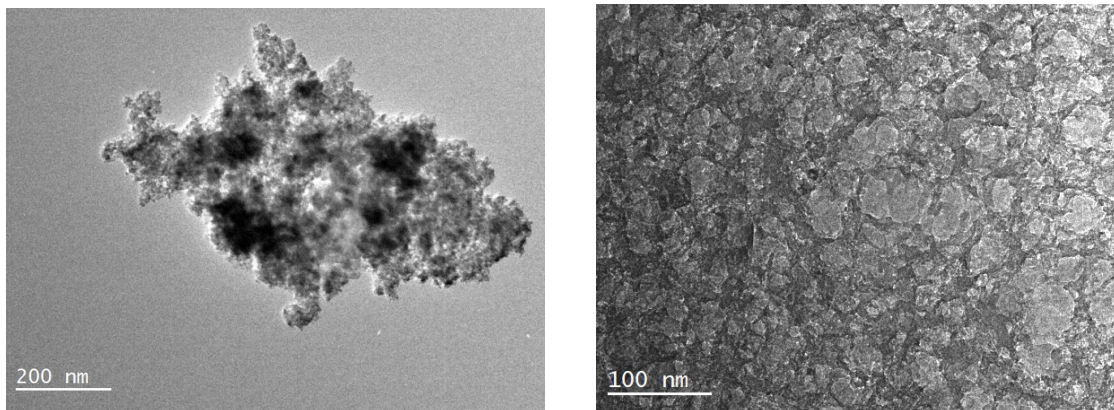
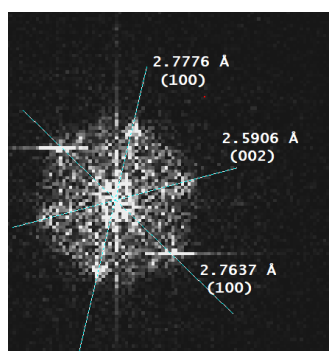
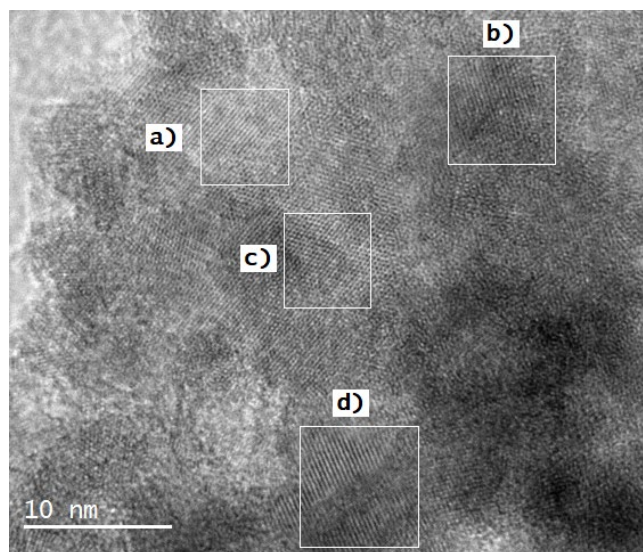
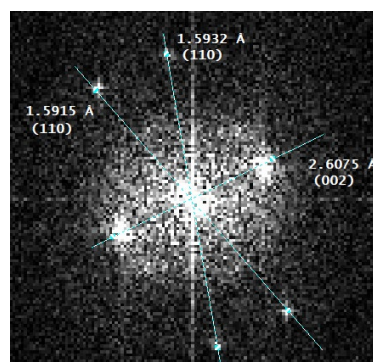


Figura 3.32 Micrografías por TEM obtenidas por M3 a baja resolución.

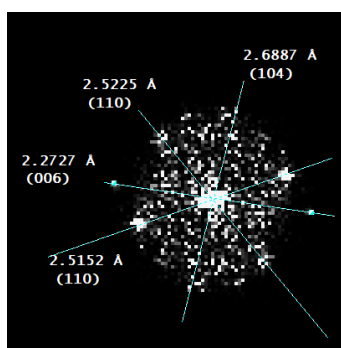
Un acercamiento a un soporte se presenta en la Figura 3.33, donde la barra de escala es de 10 nm, se realizaron FFTs en las zonas marcadas como a, b c y d. Las zonas a) y d) presentan distancias interplanares de 1.5915, 1.5932, 2.5906, 2.6075, 2.7637 y 2.7776 Å correspondientes a Mg^0 con un sistema hexagonal con índices de Miller de (110) y (002) de acuerdo a que tarjeta PCPDFWIN 35-0821. En la zona b) se presentan distancias interplanares de 2.2727, 2.5152, 2.5225 y 2.6887 Å correspondientes a Fe_2O_3 con un sistema romboedral con índices de Miller de (006), (110) y (104) de acuerdo a que tarjeta PCPDFWIN 89-0599. Finalmente, la zona c) presenta distancias interplanares de 2.4727, 2.4894 y 2.8248 Å correspondientes a ZnO con un sistema hexagonal con índices de Miller de (101) y (104) de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 89-1397. En contraste a M2, el uso de magnesio como material de soporte generó MgNPs con tamaño mayor a los de Fe y ZnNPs, situación que facilita que se fijen estas últimas a los soportes, además el tratamiento térmico permite la remoción de una proporción de material orgánico que no está involucrado en recubrir las NPs.



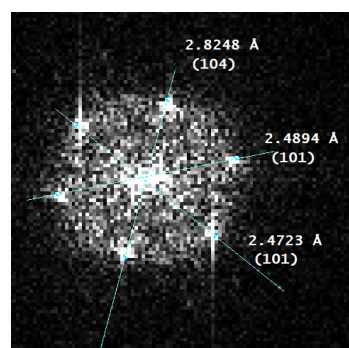
a) Mg^0



d) Mg^0



b) Fe_2O_3



c) ZnO

Figura 3.33 Nanopartículas sintetizadas por M3. Micrografías de alta resolución y sus respectivos FFTs de las áreas indicadas.

Finalmente, en la Figura 3.34 se muestra el SAED obtenido del área analizada de M3, donde se verifica la especiación de las nanopartículas además de la presencia del soporte.

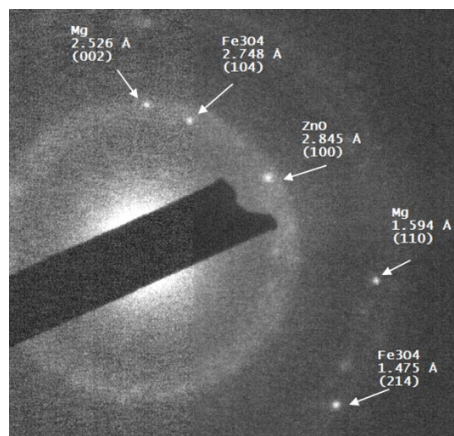


Figura 3.34 SAED obtenido por M3.

3.1.5.3 pH10

En las micrografías de la Figura 3.35 se observa que el material sintetizado consta de racimos de partículas oscuras sujetas sobre el soporte vegetal, las escalas de las barras izquierda y derecha respectivamente son 10 nm y 100 nm. De manera evidente, el usar pH 10 en la síntesis permitió generar una mayor cantidad de nanopartículas.

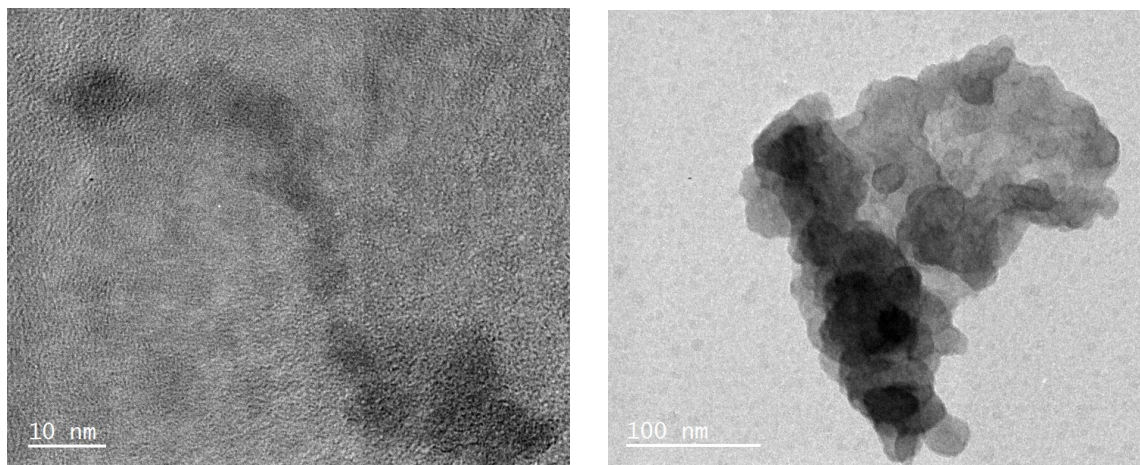


Figura 3.35 Micrografías por TEM obtenidas por M1 a baja resolución.

Un acercamiento a las partículas localizadas en la orilla de dichos racimos se muestra en la Figura 3.36, se aprecian líneas características de NPs metálicas con franjas de red, también se presentan los FFTs de las áreas marcadas, estos revelan medidas de 2.487, 2.849 y 2.412 Å para a) y 2.584, 2.425 y 3.039 Å para b), con índices de Miller (101), (100) y (101) para a), que son atribuibles a sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866, mientras que b) posee índices de Miller (311), (222) y (220), atribuibles a un sistema hexagonal de óxidos de zinc ZnO de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 36-1451 que se encuentra en la sección de Anexos. Este pH ya permite la generación de ZnNPs a diferencia de los anteriores.

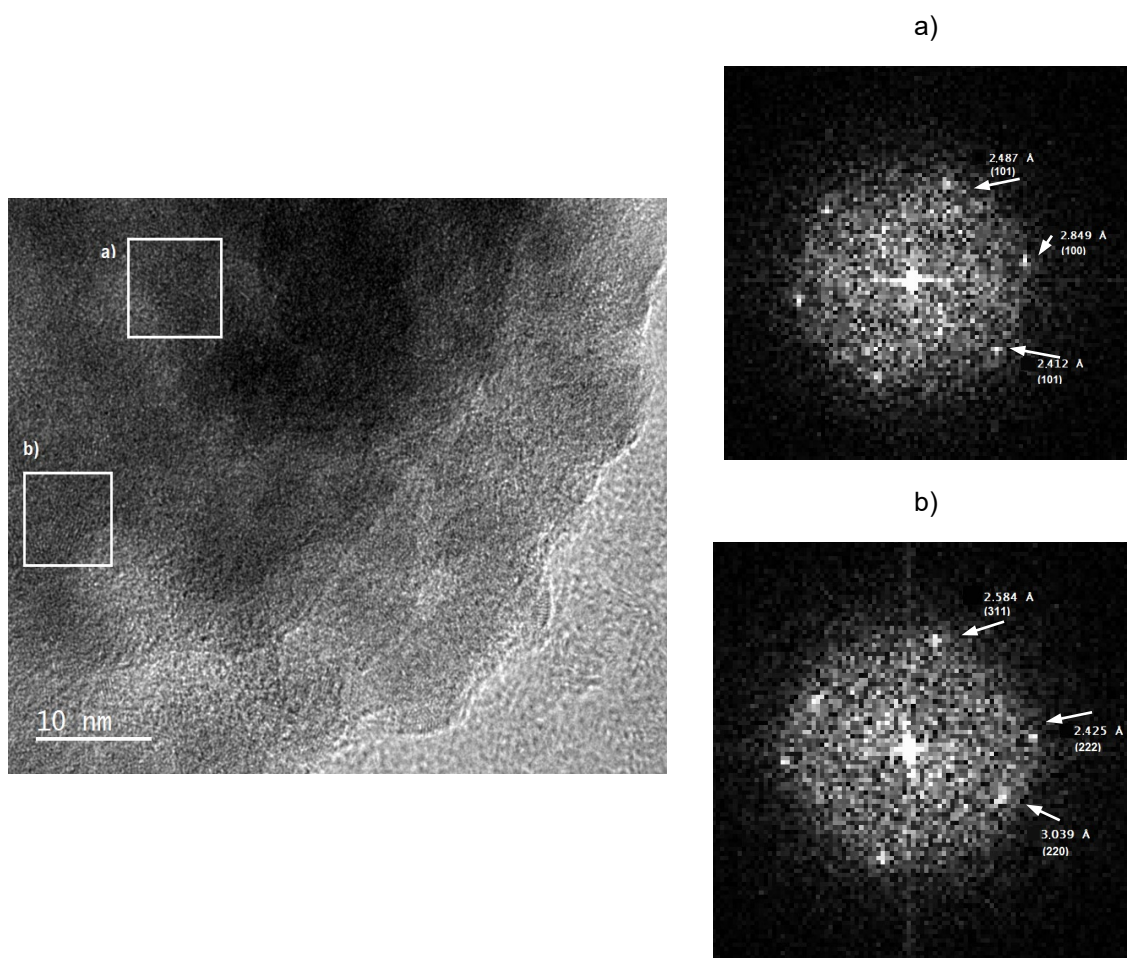


Figura 3.36 Nanopartículas sintetizadas por M1. Micrografías de alta resolución y sus respectivos FFTs de las áreas indicadas.

Para la muestra M2 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 3.37, donde se observa el material obtenido. En el lado izquierdo es evidente la mayor generación de material, este se encuentra disperso y hay partículas de tamaños variados, todas menores a 50 nm. Las escalas de las barras izquierda y derecha respectivamente son 50 nm y 5 nm. Algunas partículas se encuentran inmersas del material de recubrimiento como se ve en la parte derecha. El sintetizar el material a pH 10 marca una evidente producción de nanopartículas.

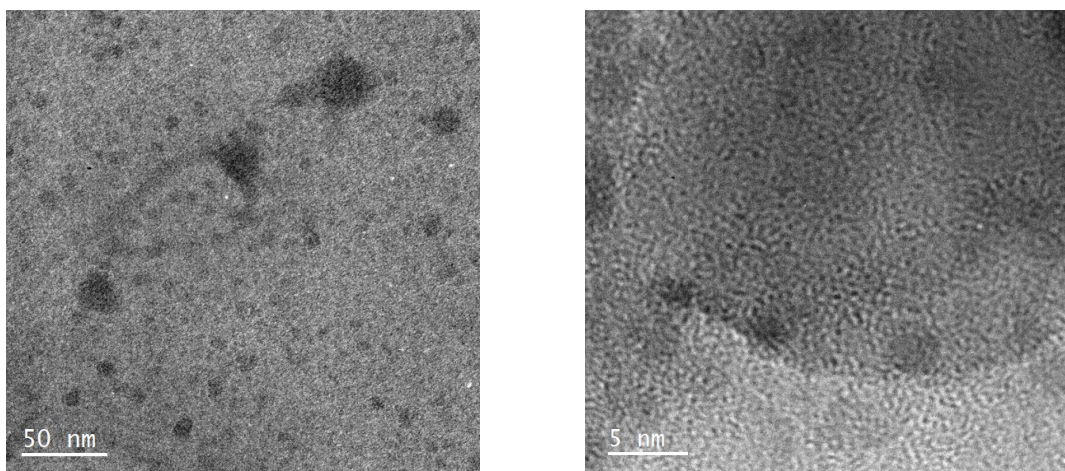


Figura 3.37 Micrografías TEM de NPs obtenidas por M2 a pH10.

Un acercamiento a las partículas localizadas en la orilla de dichas partículas se muestra en la Figura 3.38, se aprecian líneas características de NPs metálicas con franjas de red, también se presentan los FFTs de las áreas marcadas, estos revelan medidas de 2.622, 2.849 y 2.624 Å para a), 2.652, 2.881 y 2.427 Å para b), 2.541, 2.426 Å para c) y 2.498, 2.496 y 2.535 Å para d). Los índices de Miller quedan respectivamente (220) y (311) para a) que son atribuibles a un sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866, mientras que b) posee índices de Miller (002), (100) y (101) atribuibles a un sistema cúbico de óxidos de zinc ZnO de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 78-1124, c) y d) poseen los índices (311) y (222) atribuibles a sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866 que se encuentra en la sección de Anexos. Este pH ya permite la generación de ZnNPs a diferencia de los anteriores.

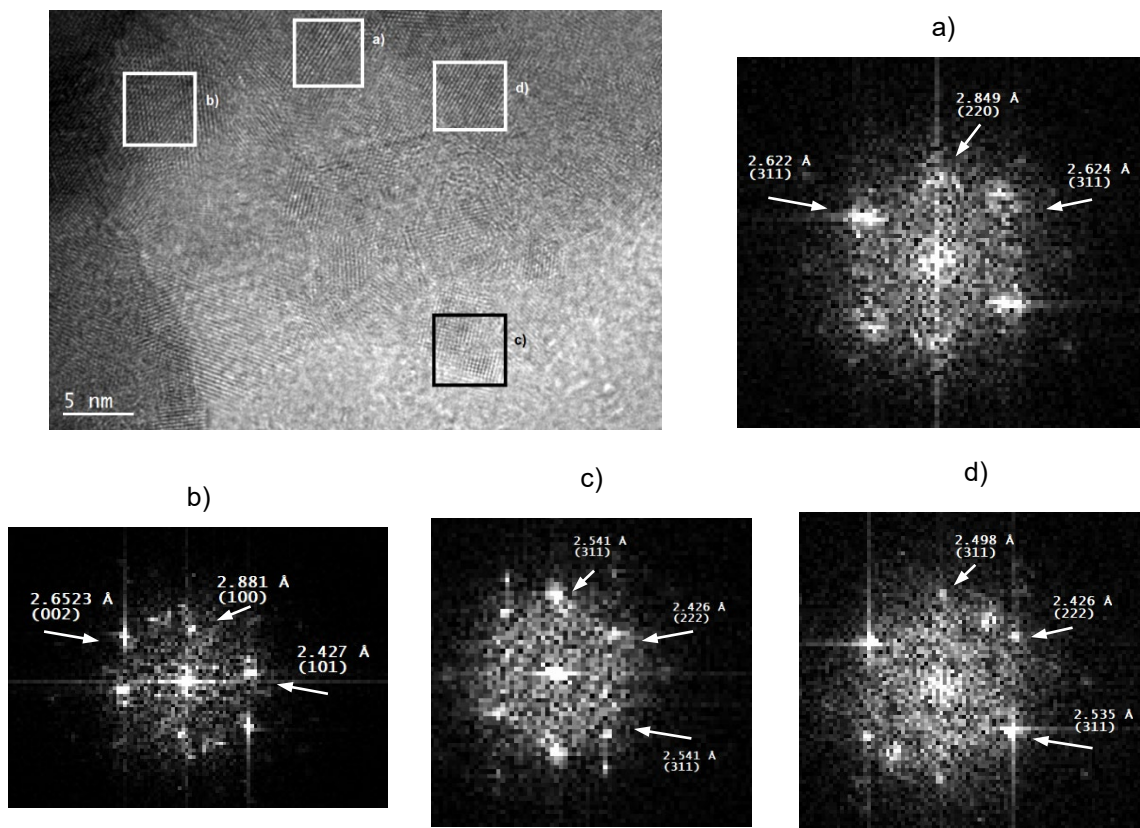


Figura 3.38 Nanopartículas sintetizadas por M2. Micrografías de alta resolución y sus respectivos FFTs de las áreas indicadas.

Finalmente, para M3 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Figura 3.39. En el lado izquierdo se observa material aglomerado de partículas de diferentes tamaños y densidades, todas menores a 50 nm. Las escalas de las barras izquierda y derecha respectivamente son 50 nm y 20 nm. Algunas partículas se encuentran inmersas del material de recubrimiento como se observa en la parte derecha.

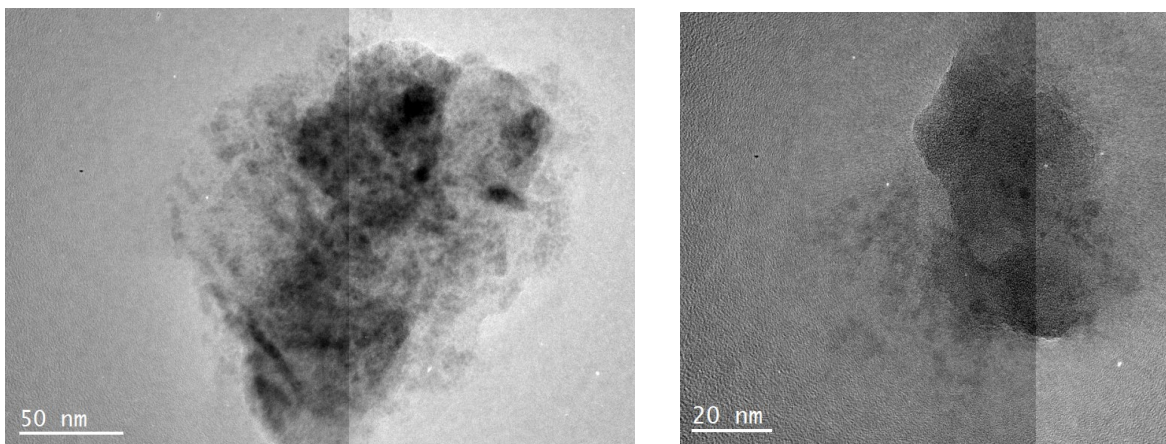


Figura 3.39 Micrografías TEM de NPs obtenidas por M3 a pH10.

Un acercamiento a las partículas localizadas en la orilla de dichas partículas se muestra en la Figura 3.40, se aprecian líneas características de NPs metálicas con franjas de red, también se presentan los FFTs de las áreas marcadas, estos revelan medidas de 1.659, 2.437 y 2.495 Å para a) y d), 2.414, 2.566 y 2.923 Å para b) y 1.750, 1.656, 2.446 Å para c). Los índices de Miller quedan respectivamente (210) y (101). que son atribuibles a sistema cúbico de óxidos de magnesio MgO_2 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 76-1163 para a) y d), mientras que b) posee índices de Miller (222), (311) y (220) atribuibles a sistema cúbico de óxidos de hierro Fe_3O_4 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866, finalmente, c) (220), (200) y (221) asociadas a sistema cúbico de óxidos de zinc ZnO_2 de acuerdo a la tarjeta PCPDFWIN 88-0866, que se encuentra en la sección de Anexos. Por primer vez se encuentra especiado el magnesio en forma de óxido, aun así los soportes permanecen.

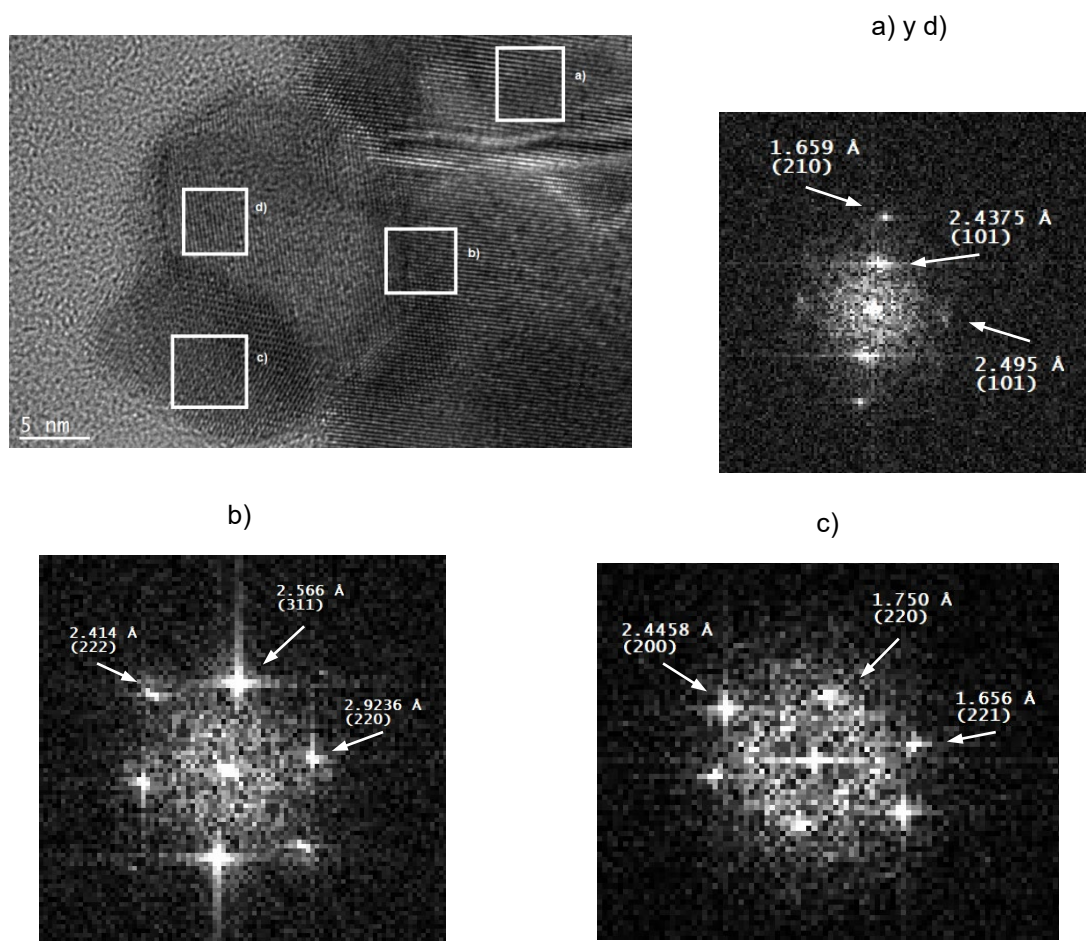


Figura 3.40 Nanopartículas sintetizadas por M3. Micrografías de alta resolución y sus respectivos FFTs de las áreas indicadas.

3.2 Actividad fotocatalítica

La curva estándar realizada de rojo No. 40 se muestra en la Figura 3.41, la cual presenta un coeficiente de correlación de 0.9994.

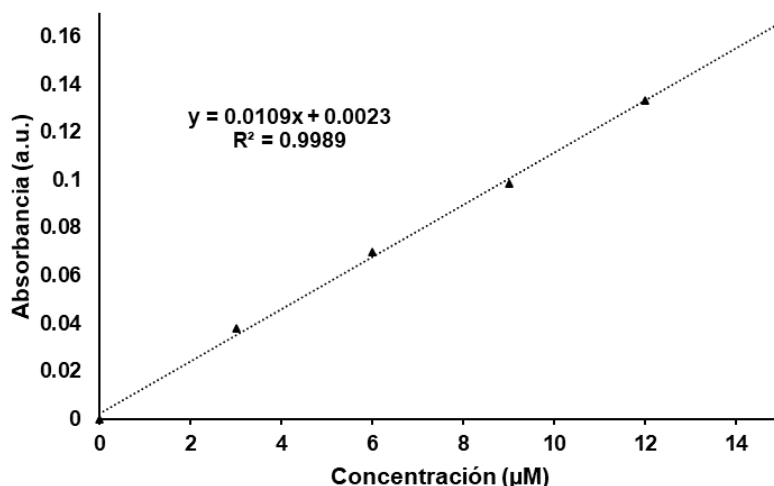


Figura 3.41 Curva estándar de rojo No. 40.

En la Figura 3.42, se presentan las gráficas de ajuste a orden 1 en las pruebas fotocatalíticas realizadas con los porcentajes de degradación de colorante de acuerdo a la ecuación b) presentada en la Tabla 1.1. Se presentan las curvas obtenidas para los pH 4 y 7 para los 3 métodos de síntesis M1, M2 y M3. Como se puede observar a pH4 el equilibrio se alcanza antes para M2 y M3 respecto a M1. En contraste, para pH7 el equilibrio se tarda más en llegar para M1, esto se debe a que el material nanoparticulado presente es de mayor proporción de acuerdo a los resultados mostrados de microscopía. Los resultados presentados entran dentro de los reportados por Elemike *et al.*, (2017), Radini *et al.*, (2018), Kumar *et al.*, (2016), Kumar *et al.*, (2018), Kumar (2019a), Li *et al.*, (2019) y Pugazhendhi *et al.*, (2019), cuyos porcentajes se encuentran entre el 60 y 90% de degradación, con excepción del M1 a pH4, cuyo porcentaje de degradación está debajo del 60%, este resultado confirma una menor formación de nanopartículas por M1, como se observó en los resultados por TEM, donde se detectó la presencia de nanos de Fe y no una mezcla de nanos como la obtenida por M2 y M3. Este resultado es correspondiente a los vistos en TEM, pues presume un bajo rendimiento de producción de NPs.

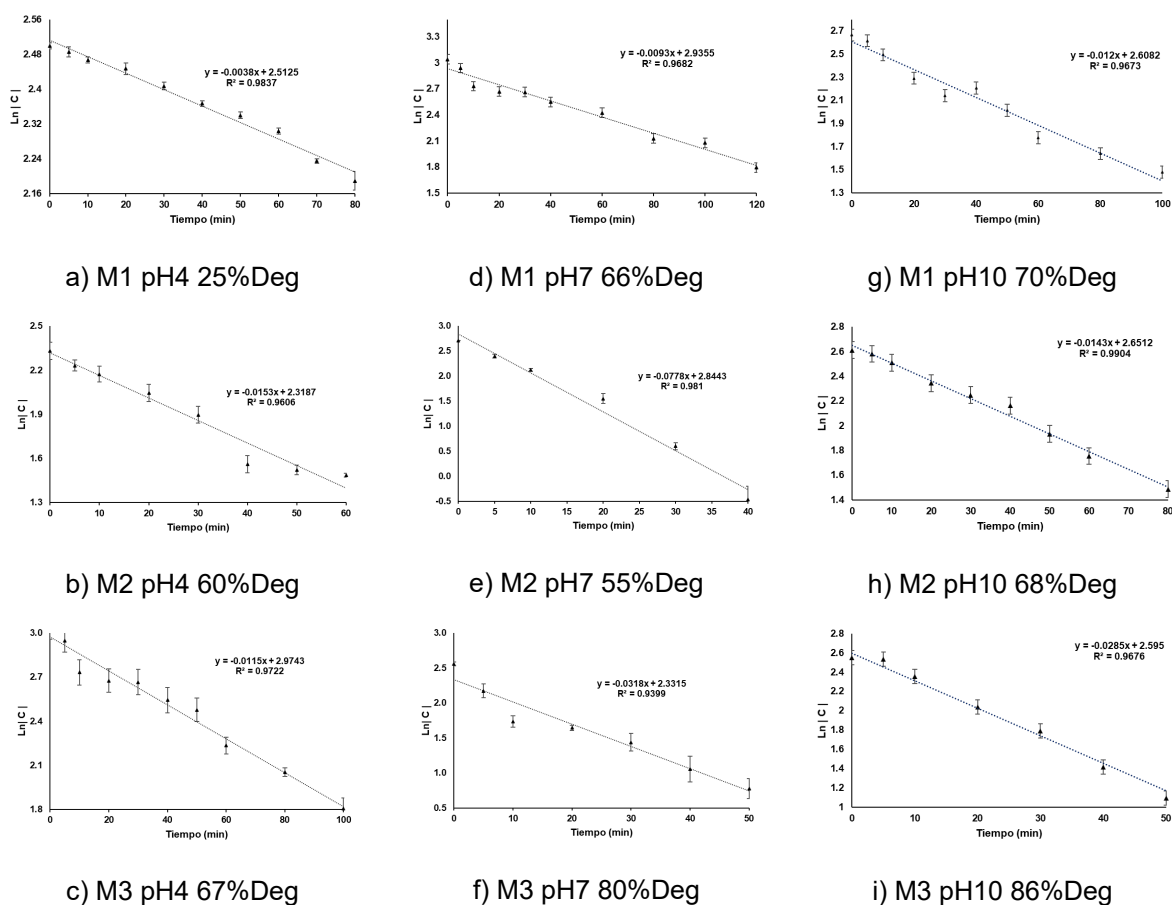


Figura 3.42 Gráficas de ajuste de fotocátalisis.

3.3 Actividad microbica

En la etapa inicial, se aplicaron tres diferentes concentraciones: 10, 50 y 100 mg/L de carga de nanopartículas en las cuales se ha reportado la inhibición del crecimiento de *E. coli* (Silva, 2016) y después del periodo de incubación de 24 horas, se obtuvieron los resultados de las siguientes tablas.

Tabla 3.3 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones del inóculo y NPs M1: Inc.-Incontable.

Dilución inóculo	UFC/mL inicial			Concentración de NPs aplicada								
				10 mg/L			50 mg/L			100 mg/L		
	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	283	Inc.	Inc.	247	Inc.	Inc.	165
1×10^{-6}	330	335	327	200	202	16	176	110	6	78	77	12
1×10^{-7}	75	78	69	35	23	6	27	12	1	17	9	0

Tabla 3.4 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones del inóculo y NPs M2: Inc.-Incontable.

Dilución inóculo	UFC/mL inicial			Concentración de NPs aplicada								
				10 mg/L			50 mg/L			100 mg/L		
	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	inc	647	840	566	202	360	275	95
1×10^{-6}	350	322	340	202	178	39	138	118	29	81	68	23
1×10^{-7}	79	76	66	31	21	6	18	6	0	0	0	0

Tabla 3.5 Cuenta en placa del crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones del inóculo y NPs M3: Inc.-Incontable.

Dilución inóculo	UFC/mL inicial			Concentración de NPs aplicada								
				10 mg/L			50 mg/L			100 mg/L		
	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10
1×10^{-1}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-2}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-3}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-4}	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.	Inc.
1×10^{-5}	Inc.	Inc.	Inc.	501	469	386	476	361	202	341	237	95
1×10^{-6}	342	310	308	153	114	39	98	77	29	57	21	17
1×10^{-7}	81	74	64	23	13	4	19	6	0	0	0	0

De acuerdo a Salgado *et al.*, (2018) y Madivoli *et al.*, (2019), la concentración óptima de FeNPs para los efectos esperados oscila entre los 200 y 500 mg/L, en el caso de esos estudios, disponían de mayor contenido de material nanoparticulado y menor concentración de material orgánico de recubrimiento. Para M1 se sabe que genera poca proporción de nanopartículas en relación al material orgánico en el que se encuentra relacionado, aun así, en la dilución 1×10^{-5} del inóculo ya se empieza a observar inhibición microbiana para la concentración de NPs de 100mg/L a pH10, acentuándose a la concentración de inóculo de 1×10^{-7} y una concentración de NPs aplicada de 100 mg/L a pH10 con un 100% de inhibición. Los métodos M2 y M3 se ubican de manera marcada por presentar inhibición microbiana a diluciones 1×10^{-5} desde concentraciones de 10 mg/L y alcanzar un 100% de inhibición a la dilución de 1×10^{-7} , pH10 y una carga de material nanoparticulado de 50 mg/L. Si bien la actividad microbiana para M3 se presenta desde concentración de NPs de 10 mg/L, el comportamiento microbiano entre M2 y M3 presenta similitud, mostrando que en cuanto a carácter microbiano no existe mucha diferencia entre dichos métodos.

Lo anterior se debe a que M1 es menos eficiente al producir ZnNPs en contraste a M2 y M3 como se mostró en el apartado 3.3.1., entonces debido a que M2 y M3 cuentan con FeNPs y ZnNPs de menor tamaño y en mayor proporción que M1, entonces es correspondiente que la actividad microbiana sea mayor en estos métodos.

Conclusiones

La caracterización UV-Vis permitió la identificación del plasmón superficial correspondiente a las NPs Fe-Zn a través del desplazamiento batocrómico de las bandas características de los polifenólicos y las clorofilas para M2 y M3.

La determinación de compuestos fenólicos totales permitió conocer la proporción de compuestos fitoquímicos con carácter reductor que se aprovechan en la generación de NPs en los tres métodos, siendo el M1 el que permite extraer una menor cantidad de fitoquímicos aprovechables para la síntesis, mientras que M2 y M3 muestran ser más eficientes para extraer fitoquímicos reductores, así mismo pH de 7 y 10 muestran mayor influencia para el mismo fin.

La caracterización realizada por SEM mostró que los métodos M2 y M3 se favorece la formación de agregados de material nanoparticulado de mayor tamaño y cantidad que M1. El método que brinda una morfología más eficiente es el M3, mientras M1 brinda la menor eficiencia.

De nueva cuenta, el análisis por TEM permitió la identificación y caracterización de las nanopartículas metálicas obtenidas por los tres métodos. La aglomeración en racimos por M1 y M2 ya es más evidente conforme aumenta el pH durante la de síntesis, generando NPs de menor tamaño, que de acuerdo bibliografía, la aglomeración de partículas en racimos es un comportamiento que va en función del pH conforme este último se va a niveles básicos. En cuanto a la composición se identificaron únicamente óxidos de Fe en M1, mientras que para M2 y M3 se identificaron óxidos de Fe y Zn además del Mg cero valente y óxido de magnesio para el soporte de M3.

El estudio de la actividad fotocatalítica ha mostrado que la degradación del colorante rojo allura tiene mayor influencia por M2 y M3, así como del pH=10, ya que degradan un porcentaje mayor de colorante que por el M1 de manera contrastante.

La caracterización IR permitió identificar la permanencia de algunos grupos funcionales característicos de sustancias involucradas en el metabolismo vegetal

como la fenilalanina, que son compuestos polifenólicos básicos, los espectros infrarrojos varían de acuerdo al pH y al método aplicado.

La actividad microbicida fue corroborada de manera exitosa mediante los barridos de diluciones aplicadas, siendo el M3 a pH10 el que mayor actividad exhibió de los tres métodos aplicados, de acuerdo a las difracciones de área selecta realizadas a las nanopartículas, las generadas por M3 son las que mayor cristalinidad tienen, lo que demuestra que la presencia de FeNPs y ZnNPs sujetas a dichos soportes mejora el proceso microbicida, dejando más expuestas dichas NPs.

Referencias

- Abdelhamid A., Ghobashy M., Fawzy M., Mohamed M. y Abdelmottaleb M. (2013). “*Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract of sago pondweed (Potamogeton pectinatus L.)*”. ACS Sustainable Chem. Eng. 1(12); 1520–1529. DOI: 10.1021/sc4000972.
- Abdullaeva Z. (2017). “*Synthesis of Nanoparticles and Nanomaterials: Biological approaches*”. Springer. 3-159. DOI: 10.1007/978-3-319-54075-7.
- Abroshan E., Farhadi S. y Zabardasti A. (2018). “Novel magnetically separable Ag₃PO₄/MnFe₂O₄ nanocomposite and its high photocatalytic degradation performance for organic dyes under solar-light irradiation”. Solar Energy Materials and Solar Cells 178; 154-163. DOI: 10.1016/j.solmat.2018.01.026.
- Al-Shabib et al. (2017). “*Negatively charged food additive dye Allura Red rapidly induces SDS-soluble amyloid fibril in beta-lactoglobulin protein*”. International Journal of Biological Macromolecules 107(B); 1706-1716. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.032.
- Alkahtani A., Alrub S. y Mahmoud A. (2017). “*Adsorption of food coloring allura red dye (E129) from aqueous solutions using activated carbon*”. International Journal of Food and Allied Sciences 3(1); 10-19. DOI: 10.21620/ijfaas.2017110-19.
- Akinsiku A., Dare E., Ajanaku K., Ajani O., Olugbuyiro J., Siyanbola T., Ejilude O., y Emetere M. (2018). “*Modeling and Synthesis of Ag and Ag/Ni Allied Bimetallic Nanoparticles by Green Method: Optical and Biological Properties*”. International Journal of Biomaterials 1; 1-17. DOI: 10.1155/2018/9658080.
- Amala G., Saravanan J., Yoo D., Kim A. y Kumar A. (2017). “*An environmentally benign one pot green synthesis of reduced graphene oxide based composites for the enzyme free electrochemical detection of hydrogen peroxide*”. New J. Chem. 41(10); 4022-4030. DOI: 10.1039/C6NJ04030F.
- Arjunan N. Singaravelu C. Chandra M. Kulanthaivel J. y Kandasamy J. (2017). “A potential photocatalytic, antimicrobial and anticancer activity of chitosan-copper nanocomposite”. International Journal of Biological Macromolecules 104(B): 1774-1782. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.006.
- Asada T. y Tamura H. (2012). “*Isolation of Bilberry Anthocyanidin 3-Glycosides Bearing ortho-Dihydroxyl Groups on the B Ring by Forming an Aluminum Complex and Their Antioxidant Activity*”. J. Agric. Food Chem 60; 10634–10640. DOI: 10.1021/jf302476n.
- Beheshtkhoo N., Kouhbanani M., Savardashtaki A., Ali Mohammad Amani A. y Taghizadeh S. (2018). “*Green synthesis of iron oxide nanoparticles by aqueous leaf extract of Daphne mezereum as a novel dye removing material*”. Applied Physics A; 124:363. DOI: 10.1007/s00339-018-1782-3.
- Bhushan B. (2017). “*Handbook of nanotechnology 4th*”. Springer. 1-82. ISBN: 978-3-662-54355-9.
- Chatwal G. (2009). “*Synthetic dyes*”. Himalaya Publishing House. Capítulos 1 y 5. ISBN: 978-81-84882-20-9.
- Chahardoli A., Karimi N. y Fattahi A. (2018). “*Nigella arvensis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Their characteristic properties and biological efficacy*”. Advanced Powder Technology 29; 202–210.

Devi T. y Ahmaruzzaman M. (2017). "Bio-inspired facile and green fabrication of Au@Ag@AgCl core-double shells nanoparticles and their potential applications for elimination of toxic emerging pollutants: A green and efficient approach for wastewater treatment". Chemical Engineering Journal 317; 726–741. DOI: 10.1016/j.cej.2017.02.082.

Dogdu G. y Yalcuk A. (2015). "Indigo dyeing wastewater treatment by eco-friendly constructed wetlands using different bedding media". Desalination and Water Treatment 1-13. DOI: 10.1080/19443994.2015.1070290.

Długosz O., Chwastowski J. y Banach M. (2019). "Hawthorn berries extract for the green synthesis of copper and silver nanoparticles". Chem. Pap. 1-14.

Elaloui M., Ennajah A., Ghazghazi H., Youssef I., Othman N., Hajlaoui M., Khouja A. y Laamouri A. (2017). "Quantification of total phenols, flavonoides and tannins from Ziziphus jujuba (mill.) and Ziziphus lotus (l.) (Desf). Leaf extracts and their effects on antioxidant and antibacterial activities". International Journal of Secondary Metabolite 4(1); 18-26. DOI: 10.21448/ijsm.275886.

Elemike E., Onwudiwe D., Ekennia A., Ehiri R. y Nnaji N. (2017). "Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations". Materials Science and Engineering C 75; 980–989. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.161.

García F. y Luciano C. (2013). "Waste Water; Treatment Technologies and Recent Analytical Developments". InTech. 3-15. ISBN: 978-953-51-0882-5.

Ghosh S. (2018). "Visible-Light-Active Photocatalysis: Nanostructured Catalyst Design, Mechanisms, and Applications". Wiley. 20-50. ISBN: 978-3-527-34293-8.

Goldstein J., Newbury D., Michael J., Ritchie N., Scott J. y Joy D. (2018). "Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis". Springer. 1-111. ISBN: 978-1-4939-6674-5.

Gungor A., Nadaroglu H., Kalkan E. y Celebi N. (2015). "Fenton process-driven decolorization of Allura Red AC in wastewater using apolaccase-modified or native nanomagnetite immobilized on silica fume". Desalination and Water Treatment. 1944-3994/1944-3986. DOI: 10.1080/19443994.2015.1074620.

Gürses A., Açıkyıldız M., Güneş K. y Gürses M. (2016). "Colorants in Health and Environmental Aspects. In: Dyes and Pigments". SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Capítulo 5; 69-83. DOI: 10.1007/978-3-319-33892-7_5.

Ismail M., Khan M., Khan S., Khan M., Akhtar K. y Asiri A. (2018). "Green synthesis of plant supported Cu\Ag and Cu\Ni bimetallic nanoparticles in the reduction of nitrophenols and organic dyes for water treatment". Journal of Molecular Liquids 260; 78–91. DOI: 10.1016/j.molliq.2018.03.058.

Jiménez J., Ospina M. y Sierra J. (2016). "Extracción y caracterización de taninos a partir de pino Pinus caribaea". Agronomía Colombiana 34(1); S1264-S1267. DOI: 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58409.

Julkunen R. y Häggman H. (2009). "Chapter 12. Tannins and Tannin Agents". Handbook of Natural Colorants. John Wiley & Sons. 201-218. DOI: 10.1002/9780470744970.ch12. ISBN: 9780470511992.

Kim J., Yhim W., Park J., Lee S., Kim T., Cha S., Kim H., Jang H., Cho M., Park Y. y Cho S. (2016). "Gallotannin-Capped Gold Nanoparticles: Green Synthesis and Enhanced Morphology of AFM Images". Journal of Nanoscience and Nanotechnology 16(6); 5991-5998. DOI: 10.1166/jnn.2016.10965.

Kooh M., Lim L. y Bandara J. (2015). "Batch adsorption studies on the removal of malachite green from water by chemically modified *Azolla pinnata*". Desalination and Water Treatment 1-15. DOI: 10.1080/19443994.2015.1065450.

Kumar B. et al. (2016). "Phytosynthesis and photocatalytic activity of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles using the Andean blackberry leaf". Materials Chemistry and Physics 179; 310e315. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2016.05.045.

Kumar B., Smita K., Debut A. y Cumbal L. (2018). "Utilization of *Persea americana* (Avocado) oil for the synthesis of gold nanoparticles in sunlight and evaluation of antioxidant and photocatalytic activities". Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management 10; 231-237. DOI: 10.1016/j.enmm.2018.07.009.

Kumar B., Vizuite S., Sharma V., Debut A. y Cumbal L. (2019a). "Ecofriendly synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Andean Mortiño berry as reductant and its photocatalytic activity". Vacuum 160; 272–278. DOI: 10.1016/j.vacuum.2018.11.027.

Kumar I., Mondal M., Meyappan V. y Sakthivel N. (2019b). "Green one-pot synthesis of gold nanoparticles using *Sansevieria roxburghiana* leaf extract for the catalytic degradation of toxic organic pollutants". Materials Research Bulletin 117; 18–27.

Kuppusamy P., Ilavenil S., Srigopalram S., Kim D., Govindan N., Maniam G., Yusoff M. y Choi K. (2017). "Synthesis of Bimetallic Nanoparticles (Au–Ag Alloy) Using *Commelina nudiflora* L. Plant Extract and Study its on Oral Pathogenic Bacteria". J Inorg Organomet Polym. 27(2); 562-568. DOI: 10.1007/s10904-017-0498-8.

Li X. et al., (2019). "Recent advances in 3D g-C₃N₄ composite photocatalysts for photocatalytic water splitting, degradation of pollutants and CO₂ reduction". Journal of Alloys and Compounds. 802(25); 196-209. DOI: 10.1016/j.jallcom.2019.06.185.

Liu X. et al. (2017). "Catalytic partial oxidation of cyclohexane by bimetallic Ag/Pd nanoparticles on magnesium oxide". Chem. Eur. J. 23(49); 11834-11842. DOI: 10.1002/chem.201605941.

Lin J. et al. (2016). "Tight ultrafiltration membranes for enhanced separation of dyes and Na₂SO₄ during textile wastewater treatment". Journal of Membrane Science 514; 217-228. DOI: 10.1016/j.memsci.2016.04.057.

Madivoli E., et al. (2019). "Biosynthesis of iron nanoparticles using *Ageratum conyzoides* extracts, their antimicrobial and photocatalytic activity". SN Applied Sciences. 1; 500. DOI: 10.1007/s42452-019-0511-7.

Meyyappan M. y Dastoor M. (10 de enero de 2022). "Nanotechnology in space exploration". NASA. <https://www.nano.gov/>

Mistry B. (2009). "A Handbook of Spectroscopic Data". Oxford. 1-25. ISBN: 978-81-89473-86-0.

Muñoz O. et al. (2017). "Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de folin-ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales". TIP 20(2); 23-28. DOI: 10.1016/j.recqb.2017.04.003.

Murty B., Shankar P., Raj B., Rath B. y Murday J. (2013). "Textbook of Nanoscience and Nanotechnology". Springer. 22-56. DOI: 10.1007/978-3-642-28030-6.

Nasrollahzadeh M., Sajjadi M., Komber H., Khonakdar H. & Sajadi S. (2019). "In situ green synthesis of Cu-Ni bimetallic nanoparticles supported on reduced graphene oxide as an effective and recyclable catalyst for the synthesis of N-benzyl-N-aryl-5-amino-1H-tetrazoles". *Appl Organometal Chem.* e4938. DOI: 10.1002/aoc.4938.

Olajire A., Kareem A. y Olaleke A. (2017). "Green synthesis of bimetallic Pt@Cu nanostructures for catalytic oxidative desulfurization of model oil". *J Nanostruct Chem.* 7(2):159–170. DOI 10.1007/s40097-017-0223-8.

Pandit A. y Kumar J. (2013). "Drinking water disinfection techniques". CRC Press 9-220. ISBN: 978-1-4398-7741-8.

Pathania D. et al. (2016). "Novel guar gum/Al₂O₃ nanocomposite as an effective photocatalyst for the degradation of malachite green dye". *International Journal of Biological Macromolecules* 87; 366–374. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.073.

Prasad C., Sreenivasulu K., Gangadhara S. y Venkateswarlu P. (2017). "Bio inspired green synthesis of Ni/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using *Moringa oleifera* leaves extract: A magnetically recoverable catalyst for organic dye degradation in aqueous solution". *Journal of Alloys and Compounds* 700; 252–258. DOI: 10.1016/j.jallcom.2016.12.363.

Pugazhendhi A., Prabhu R., Muruganantham K., Shanmuganathan R. y Natarajan S. (2019). "Anticancer, antimicrobial and photocatalytic activities of green synthesized magnesium oxide nanoparticles (MgONPs) using aqueous extract of *Sargassum wightii*". *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 190; 86–97. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.11.014.

Radini I., Hasan N., Malik M. y Khan Z. (2018). "Biosynthesis of iron nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* seed extract for photocatalytic methyl orange dye degradation and antibacterial applications". *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 183; 154–163. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.014.

Rajan R., Chandran K., Harper S., Yun S. y Kalaichelvan P. (2015). "Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials". *Industrial Crops and Products* 70; 356–373.

REMI: http://www.conabio.gob.mx/remib/cgi-bin/remib_checklist.cgi?nombres=117;lengua=es-MX. Fecha de consulta: 26/02/18.

Ríos S., Agudelo R. y Gutiérrez L. (2017). "Patógenos e Indicadores Microbiológicos de calidad del agua para beber". *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.* 35(2).

Rosbero T. y Camacho D. (2017). "Green preparation and characterization of tentacle-like silver/copper nanoparticles for catalytic degradation of toxic chlorpyrifos in water". *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5; 2524–2532. DOI: 10.1016/j.jece.2017.05.009.

Sahu K., et al. (2018). "Facile synthesis of ZnO nanoplates and nanoparticle aggregates for highly efficient photocatalytic degradation of organic dyes". *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 121; 186–195. DOI: 10.1016/j.jpcs.2018.04.023.

Salgado P., et al. (2018). "The effect of phenolic compounds on the green synthesis of iron nanoparticles (Fe₃O₄-NPs) with photocatalytic activity". *Applied Nanoscience.* 9; 371–385. DOI: 10.1007/s13204-018-0931-5.

Sanjurjo J. (2017). "*Encapsulamiento de pigmentos naturales con actividad antioxidante de especies florales*". Tesis de grado. Instituto Tecnológico de Toluca. 60-85.

Sharma G., Kumar A., Shweta Sharma S., Naushad M., Dwivedi R., Allothman Z., y Mola G. (2017a). "*Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review*". Journal of King Saud University – Science. DOI: 10.1016/j.jksus.2017.06.012.

Sharma G., Kumar D., Kumar A., Al-Muhtaseb A., Pathania D., Nushad M. y Mola G. (2017b). "*Revolution from monometallic to trimetallic nanoparticle composites, various synthesis methods and their applications: A review*". Materials Science and Engineering C 71; 1216–1230. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.002.

Sheny D., Mathew J. y Philip D. (2011). "*Phytosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of Anacardium occidentale*". Spectrochimica Acta Part A 79; 254–262. DOI: 10.1016/j.saa.2011.02.051.

Silva A. (2016). "Biosíntesis de nanopartículas de plata y pruebas de actividad microbiciada". Tesis de grado. Instituto Tecnológico de Toluca. 36-50.

Sorbiun M., Mehr E., Ramazani A. y Fardood S. (2017). "*Biosynthesis of Ag, ZnO and bimetallic Ag/ZnO alloy nanoparticles by aqueous extract of oak fruit hull (Jaff) and investigation of photocatalytic activity of ZnO and bimetallic Ag/ZnO for degradation of basic violet 3 dye*". J Mater Sci: Mater Electron. 29(4); 2806-2814. DOI 10.1007/s10854-017-8209-3.

Sparg S., Light M. y van Staden J. (2004). "*Biological activities and distribution of plant saponins*". Journal of Ethnopharmacology 94(2-3); 219-243. DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.016.

Pravanthi K., Ayodhya D. & Swamy P. (2018). "*Green synthesis, characterization of biomaterial-supported zero-valent iron nanoparticles for contaminated water treatment*". Journal of Analytical Science and Technology 9; 3. DOI: 10.1186/s40543-017-0134-9.

Streit A. et al. (2019). "*Development of high quality activated carbon from biological sludge and its application for dyes removal from aqueous solutions*". Science of the Total Environment 660; 277–287. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.027.

Syed B., Karthik N., Bhat P., Bisht N., Prasad A., Satish S. y Prasad M. (2018). "Phyto-biologic bimetallic nanoparticles bearing antibacterial activity against human pathogens". Journal of King Saud University 1; 1-6. DOI: 10.1016/j.jksus.2018.01.008.

Terblanche E. (2017). "Development of novel methods for tannin quantification in grapes and wine". Stellenbosch University. 3-91.

Weng X., Guo M., Luo F. y Chen Z. (2017). "One-step green synthesis of bimetallic Fe/Ni nanoparticles by eucalyptus leaf extract: Biomolecules identification, characterization and catalytic activity". Chemical Engineering Journal 308; 904–911. DOI: 10.1016/j.cej.2016.09.134.

Williams D. y Carter C. (2009). "*Transmission electron microscopy a textbook for materials science*". Springer. 33-58. ISBN: 978-0-387-76500-6.

Wrolstad R., Acree T., Decker E., Penner M., Reid D., Schwartz S., Shoemaker C., Smith D. y Sporns P. (2005). "Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants, flavors texture and bioactive food components". Wiley. 462-535. ISBN: 978-0-471-71817-8.

Xue X., Cheng R., Shi L., Ma Z. y Zheng X. (2016). "Nanomaterials for water pollution monitoring and remediation". *Environ Chem Lett* 1-5.

Zhan G. Huang J., Du M., Abdul I., Ma Y. y Li Q. (2011). "Green synthesis of Au-Pd bimetallic nanoparticles: Single-step bioreduction method with plant extract". *Materials Letters* 65; 2989–2991. DOI: 10.1016/j.matlet.2011.06.079.

Zhang J., Tian B., Wang L., Xing M. y Lei J. (2018). "Photocatalysis Fundamentals, Materials and Applications". Capítulos 1 y 2. ISBN: 978-981-13-2112-2.

Anexos

Anexo 1. Tarjetas PCPDFWIN 88-0866 y 89-0951 de Fe₃O₄

88-0866		Wavelength= 1.54060					C
Fe ₃ O ₄	d(Å)	Int	h	k	l		
Iron Oxide	4.8409	124	1	1	1		
	2.9644	307	2	2	0		
	2.5280	999*	3	1	1		
Magnetite (Cr-bearing)	2.4204	72	2	2	2		
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter:	2.0961	202	4	0	0		
	1.9235	2	3	3	1		
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Icor.: 4.93	1.7115	86	4	2	2		
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++	1.6136	282	5	1	1		
Ref: Burns, P.C et al., Neues Jahrb. Mineral., Monatsh., 1997,	1.4822	355	4	4	0		
163 (1997)	1.4172	7	5	3	1		
	1.3974	1	4	4	2		
Sys.: Cubic S.G.: Fd $\bar{3}$ m (227)	1.3257	27	6	2	0		
a: 8.3847(2) b: c: A: C:	1.2786	64	5	3	3		
α: β: γ: Z: 8 mp:	1.2640	23	6	2	2		
	1.2102	19	4	4	4		
Ref: Ibid.	1.1740	4	5	5	1		
	1.1204	29	6	4	2		
	1.0916	86	7	3	1		
Dx: 5.218 Dm: ICSD # : 085177							

Peak height intensity. Specimen from Ramberger, Hestmona, Norway. R-factor: 0.033. PSC: cF56. Structural reference: Burns, P.C et al., Neues Jahrb. Mineral., Monatsh., 1997, 163 (1997). Mwt: 231.54. Volume[CD]: 589.47.

 © 2001 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved
PCPDFWIN v. 2.2

89-0951		Wavelength= 1.54060					C
Fe ₃ O ₄	d(Å)	Int	h	k	l		
Iron Oxide	4.9022	134	1	1	1		
	3.0020	999*	2	2	0		
	2.5601	512	3	1	1		
Magnetite	2.4511	28	2	2	2		
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter:	2.1227	51	4	0	0		
	1.9479	3	3	3	1		
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Icor.: 1.18	1.7332	18	4	2	2		
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++	1.6340	10	5	1	1		
Ref: Mazzocchi, V.L., Parente, C.B.R., J. Appl. Crystallogr.,	1.5010	44	4	4	0		
31, 718 (1998)	1.4352	1	5	3	1		
	1.4151	18	4	4	2		
Sys.: Cubic S.G.: Fd $\bar{3}$ m (227)	1.3425	2	6	2	0		
a: 8.491(3) b: c: A: C:	1.2948	1	5	3	3		
α: β: γ: Z: 8 mp:	1.2800	6	6	2	2		
	1.2255	2	4	4	4		
Ref: Ibid.	1.1889	1	7	1	1		
	1.1346	2	6	4	2		
	1.1054	1	5	5	3		
Dx: 5.024 Dm: ICSD # : 085807							

Peak height intensity. R-factor: 0.033. PSC: cF56. At least one TF implausible. Structural reference: Mazzocchi, V.L., Parente, C.B.R., J. Appl. Crystallogr., 31, 718 (1998). Mwt: 231.54. Volume[CD]: 612.18.

 © 2001 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved
PCPDFWIN v. 2.2

Anexo 2. Tarjetas PCPDFWIN 35-0821 y 851410 de Zn⁰ y Fe⁰

87-0713		Wavelength= 1.54060					C
Zn	d(A)	Int	h	k	l		
Zinc	2.4735	396	0	0	2		
	2.3079	233	1	0	0		
	2.0915	999*	1	0	1		
Zinc	1.6874	144	1	0	2		
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter:	d-sp: Calculated	1.3417	152	1	0	3	
		1.3325	100	1	1	0	
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Icor.: 8.49		1.2367	23	0	0	4	
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+., (1997)		1.1731	107	1	1	2	
Ref: Swanson, H.E., Tatge, E., Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, 359, 11 (1953)		1.1539	12	2	0	0	
		1.1238	65	2	0	1	
		1.0901	19	1	0	4	
Sys.: Hexagonal	S.G.: P6 ₃ /mmc (194)						
a: 2.665 b:	c: 4.947 A:	C: 1.8563					
α:	β:	γ:	Z: 2	mp:			
Ref: Ibid.							
Dx: 7.136	Dm: 7.050	ICSD # : 064990					

Peak height intensity. PSC: hP2. Calc. density unusual but tolerable. No R value given. At least one TF missing. Structural reference: Swanson, H.E., Tatge, E., Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, 359, 11 (1953). Mwt: 65.38. Volume[CD]: 30.43.

 © 2001 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved
PCPDFWIN v. 2.2

85-1410		Wavelength= 1.54060					C
Fe	d(A)	Int	h	k	l		
Iron	2.0407	999*	1	1	0		
	1.443	116	2	0	0		
	1.1782	176	2	1	1		
Iron							
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter:	d-sp: Calculated						
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Icor.: 10.81							
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+., (1997)							
Ref: Swanson, H.E., Tatge, E., Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, 539, 4 (1955)							
Sys.: Cubic	S.G.: Im $\bar{3}$ m (229)						
a: 2.886 b:	c:	A:	C:				
α:	β:	γ:	Z: 2	mp:			
Ref: Ibid.							
Dx: 7.716	Dm: 7.870	ICSD # : 064795					

Peak height intensity. W type. PSC: cI2. See PDF 6-696. Calc. density unusual but tolerable. No R value given. At least one TF missing. Structural reference: Swanson, H.E., Tatge, E., Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, 539, 4 (1955). Mwt: 55.85. Volume[CD]: 24.04.

 © 2001 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved
PCPDFWIN v. 2.2