



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

EFFECTO ANTIBACTERIAL DE FOTOCATALIZADORES DE Bi_2O_3 Y ZnO SINTETIZADOS EN
FILTROS DE VIDRIO Y SU IMPLEMENTACIÓN EN UN REACTOR SOLAR

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
ALBERTO BERNAL DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MONSERRAT BIZARRO SORDO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR
DRA. SANDRA ELIZABETH RODIL POSADA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, DEPeI



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Efecto antibacterial de Fotocatalizadores de Bi_2O_3 y ZnO Sintetizados en Filtros de Vidrio y su Implementación en un Reactor Solar

BERNAL DÍAZ ALBERTO

22 de noviembre de 2018

Aquí estamos, y aquí seguiremos.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Argelia Almaguer por la enorme paciencia que tuvo conmigo.

Agradezco infinitamente al Taller Mecánico de la Facultad de Ciencias por el apoyo y ayuda en la construcción de las piezas del reactor. Muchas gracias Sr. Fabián, Gabriel, Cristian y a Rodrigo del Taller de Carpintería.

Igualmente agradezco enormemente el apoyo del Sr. Fernando del Control Numérico del Taller del IIM. Gracias a usted las piezas fueron exactas y precisas.

Gracias al Dr. Omar Novelo por ayudarme a caracterizar las muestras con el microscopio electrónico de barrido (SEM).

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada para la realización de esta tesis y a los proyectos PAPIIT IN106015 y IN108618.

Índice general

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	IX
Resumen	IX
Introducción	1
Capítulo 1: MARCO TEÓRICO	5
1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA	7
1.2 ENTEROBACTERIAS	9
1.3 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA (POA)	10
1.4 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA	12
1.7 REACTOR SOLAR DE TIPO COLECTOR PARABÓLICO COMPUESTO	18
Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS	22
2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X	23
2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	24
2.3 PROPIEDADES ÓPTICAS	25
2.4.1 REFLECTANCIA DIFUSA	25
2.4 PERFILOMETRÍA	27
2.5 BAÑO QUÍMICO	27
2.6 ROCÍO PIROLÍTICO	30
2.6.1 SISTEMA DE DEPÓSITO POR ROCÍO PIROLÍTICO	32
2.8 PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR	35
CAPÍTULO 3: DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
3.1 PRUEBAS ANTIBACTERIALES	41
3.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA	43
3.3 PRUEBAS DE ADHESIÓN BACTERIANA	45
3.4 FABRICACIÓN DEL REACTOR	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS DEPÓSITOS	49
4.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD BACTERIANA	56
4.3 REACTOR SOLAR	68
4.4 TRABAJO A FUTURO	72

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	73
Bibliografía	77
ANEXOS	81
ANEXO A: ESPECIFICACIONES APARATOS	83
ANEXO B: ESPECIFICACIONES DE LOS COMPUESTOS Y MATERIAL . . .	83

Índice de figuras

1. Posible distribución de las bacterias.	3
2. Las enterobacterias habitan el intestino del ser humano.	9
3. Bacteria <i>E. coli</i>	9
4. Niveles electrónicos resultantes de enlaces entre átomos idénticos y aparición de bandas prohibidas.	11
5. Esquema del proceso fotocatalítico en un semiconductor.	13
6. Posición de bandas de distintos semiconductores.	13
7. Estructra Bi_2O_3 tetragonal.	15
8. Estructra ZnO tipo wurtzita.	17
9. Radiación solar reflejada en un colector CPC. Toda la luz que llega a la apertura del colector será reflejada sobre el reactor si el ángulo de incidencia es menor del ángulo de aceptación.	19
10. Construcción de un reactor Cilindro-Parabólico Compuesto (CPC).	20
11. Diagrama de difracción de un haz de rayos X en un cristal.	23
12. Diagrama del microscopio electrónico de barrido.	25
13. de una esfera integradora.	26
14. Filtro de vidrio.	29
15. Esterilización de las muestras.	34
16. Esquema del ángulo de contacto de una gota sobre una superficie.	35
17. Influencia de la rugosidad en el ángulo de contacto.	35
18. Curva de crecimiento bacteriano.	36
19. Esquema medición de turbidez.	38
20. Vaciado y extendido en placa.	38
21. Diluciones y cuenta en placa.	39
22. Diagrama del proceso de fluorescencia.	40
23. Disposición de las muestras para las pruebas antibacteriales.	42
24. Configuración del sistema experimental.	42
25. Diagrama del proceso experimental.	43
26. Lavado de películas.	44
27. Procedimiento para el sonicado de las muestras.	44
28. Diluciones para el sembrado en placa TSA.	45
29. Procedimiento prueba de fluorescencia.	45
30. Diseño del reactor con el progama INVENTOR.	47
31. Caracterización de la película de ZnO	50
32. SEM de la película de ZnO	51
33. Caracterización de la película de Bi_2O_3	52
34. SEM de la película de Bi_2O_3	53

35. Ángulo de contacto entre medio TSB y las muestras.	54
36. Resultados O.D. con una concentración inicial de 1×10^4 cel/mL	56
37. Resultados O.D. con una concentración inicial de 1×10^8 cel/mL	57
38. CFU's con una concentración inicial de 1×10^4 cel/mL	58
39. CFU's con una concentración inicial de 1×10^8 cel/mL	58
40. SEM de sustratos de vidrio sin depósito.	60
41. SEM de sustratos con depósito de ZnO.	61
42. SEM de sustratos con depósito de Bi_2O_3	62
43. SEM de muestras después de ser sonicadas.	63
44. SEM de la película de Bi_2O_3 después de 24 horas con luz UV / 1×10^4 cel/ml	64
45. SEM de la película de Bi_2O_3 después de 24 horas con luz UV / 1×10^8 cel/ml	64
46. Posible reacción entre el reactivo y las películas Bi_2O_3 y ZnO (100x).	65
47. Fluorescencia - Prueba de 4 horas bajo luz blanca	65
48. Fluorescencia - Prueba de 4 horas bajo luz UV	66
49. Promedio de bacterias encontradas en cada superficie después de 4 horas.	66
50. Fluorescencia - Prueba de 24 horas bajo luz blanca	67
51. Fluorescencia - Prueba de 24 horas bajo luz UV	67
52. Promedio de bacterias encontradas en cada superficie después de 24 horas.	67
53. Depósitos sobre filtros de vidrio.	69
54. Imágenes de SEM de filtros de vidrio recubiertos con Bi_2O_3	69
55. Imágenes de SEM de filtros de vidrio recubiertos con ZnO.	70
57. Reactor final.	70
56. Análisis EDS de los filtros con depósito.	71
58. Prueba en el reactor solar con índico carmín.	72

Índice de tablas

1. Propiedades del óxido de bismuto fase beta.	16
2. Propiedades del óxido de zinc.	17
3. Especificaciones de las piezas del reactor.	47
4. Ángulo de contacto.	54

RESUMEN

La creciente necesidad de preservar el medio ambiente ha conducido a los científicos de todo el mundo a desarrollar nuevos métodos que aprovechen la energía solar con la finalidad de eliminar de manera eficiente la mayor cantidad de compuestos que alteran la estabilidad de nuestros recursos, entre los cuales destaca el agua. A su vez, la creciente aparición de resistencia en los microorganismos contra agentes antibacteriales ha impulsado el desarrollo de nuevos materiales efectivos para el tratamiento de eliminación de dichos microorganismos. Un problema derivado de este fenómeno es el relacionado con la calidad del agua y las enfermedades que provoca debido a la presencia de bacterias y parásitos. Recientemente, los procesos de oxidación avanzada (POA's) se han investigado como un tratamiento efectivo para limpiar contaminantes de los cuerpos de agua. Los POA's se definen como procesos que implican la generación de radicales libres como el hidroxilo (OH°) con un alto potencial de oxidación. Estos radicales son capaces de oxidar compuestos orgánicos. En el caso de microorganismos, estos atacan la bicapa de lípidos que conforma la pared celular externa, generando reacciones de peroxidación lipídica que puede ser letal para el microorganismo. Entre los POA's se encuentra la fotocatalisis heterogénea, que implica la absorción de luz por un catalizador (semiconductor). Durante el proceso de fotocatalisis, ocurren reacciones de óxido-reducción que pueden degradar compuestos orgánicos y reducir iones inorgánicos.

En este trabajo, se usaron fotocatalizadores de óxido de bismuto (Bi_2O_3) y óxido de zinc (ZnO) en películas delgadas para conocer su efecto antibacterial en la bacteria *E. coli*. Los materiales se caracterizaron después de su síntesis y se encontró que los depósitos de Bi_2O_3 presentan una fase beta con estructura tetragonal y un ancho de banda prohibida de 2.42 eV. Los depósitos de ZnO presentaron una estructura hexagonal tipo wurtzita y un ancho de banda prohibida de 3.19 eV; esto nos garantiza que los materiales pueden trabajar en la región del visible y ultravioleta del espectro solar, respectivamente. El estudio de las propiedades antibacteriales mediante procesos de fotocatalisis se llevó a cabo usando las muestras inmersas en 2 mL de caldo de tripticasa soya (TSB) con dos concentraciones iniciales de bacteria *E. coli* (ATCC33780), 1×10^4 y 1×10^8 células/mL. Las muestras se irradiaron con una lámpara de luz UV y una de luz blanca por separado en intervalos de tiempo de 4 y 24 horas cada una. Como una muestra control y a modo de comparación se usaron sustratos de vidrio bajo las mismas condiciones. El análisis se realizó midiendo la densidad óptica del medio en el que estuvieron inmersas las muestras. La cantidad de posibles bacterias viables adheridas a las muestras se desprendieron mediante sonicación y se sembraron para contar visualmente unidades formadoras de colonias. Para conocer la cantidad de bacterias adheridas a la superficie las muestras se analizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM) y con microscopía de fluorescencia.

Las pruebas de laboratorio indicaron que los depósitos de Bi_2O_3 posiblemente tengan actividad bacteriostática bajo luz blanca y UV. Las imágenes de SEM muestran que las bacterias que estuvieron en presencia del ZnO sufren una deformación en su estructura, por lo que puede pensarse que el ZnO ocasiona daño en la bacteria. Es decir, el ZnO tiene un efecto antibacterial. La implementación de estos materiales dentro de un reactor solar para comprobar su funcionamiento en condiciones más reales es un proceso muy complejo ya que se requiere controlar un gran número de variables. En primer lugar, se debe evaluar el efecto del depósito de los fotocatalizadores en los sustratos de vidrio poroso en la respuesta antibacterial o bacteriostática, pues el hecho de tener una porosidad grande implica el paso de las bacterias por dichos canales. Además se debe considerar el factor de la seguridad, pues el manejo de bacterias sin el debido cuidado puede ser riesgoso para la salud.

INTRODUCCIÓN

La constante actividad humana en todos sus ámbitos, ha contribuido a la contaminación de los diferentes cuerpos de agua. Esto ha motivado la búsqueda de nuevos métodos de limpieza de agua contaminada con microorganismos que son cada vez más resistentes a los tratamientos convencionales. Por otro lado, el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los antibióticos de uso convencional ha implicado la búsqueda de nuevas técnicas para tratar y erradicar enfermedades infecciosas. Esta resistencia necesita de tratamientos con dosis cada vez más elevadas de antibióticos, que a su vez puede generar toxicidad intolerable [1]. El uso inapropiado de antimicrobianos es la causa principal del rápido desarrollo de resistencias específicas en microorganismos causantes de enfermedades. Es fácil notar que cada vez es más común cambiar el tipo de antibiótico recetado para combatir una infección concreta por otros distintos; precisamente por el incremento de resistencias desarrolladas por el microorganismo causante de la enfermedad [2]. Por otra parte, en muchos de los casos las dosis prescritas no son correctas así como la duración de los tratamientos. A todo lo anterior se le puede agregar la influencia por parte del paciente, pues éste puede incumplir con el tratamiento y suspenderlo en cuanto nota una mejoría en su estado.

Si bien los genes de resistencia y sus productos son los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos, existen otros medios menos explorados, como, por ejemplo, la producción de biopelículas. Una biopelícula es una estructura colectiva de microorganismos que se adhiere a superficies vivas o inertes y está revestida por una capaprotectora segregada por los propios microorganismos. De esta manera, las bacterias que viven como biopelículas son capaces de resistir a los biocidas y a los antibióticos de un modo más eficaz que aquellas que viven como organismos libres [3-5].

Con la finalidad de reducir y evitar la aparición de multirresistencia en microorganismos, se han buscado posibles estrategias o nuevas alternativas de tratamiento [6]. Éstas podrían basarse en la sustitución y estricto control del uso de antibióticos para impedir el desarrollo de resistencia, o bien, el empleo de agentes sustitutos o complementarios que posean múltiples mecanismos de acción.

Debido a la multirresistencia desarrollada por los microorganismos su presencia como contaminantes de cuerpos de agua dificulta su remoción. Por lo tanto, se ha desarrollado una amplia variedad de sistemas de tratamiento, los cuales pueden ser aplicados de manera individual o en conjunto para alcanzar la calidad deseada en el agua tratada. El sistema de tratamiento seleccionado depende, en gran parte, del propósito final para el agua tratada. Aunque existe una larga lista de sistemas de tratamiento de agua, basados en procesos como

filtración, biodegradación, oxidación y adsorción, un número importante de contaminantes permanecen después del tratamiento; ya sea porque son poco biodegradables, afines a los lodos residuales o resistentes a los procesos de desinfección. Es por eso que se han desarrollado procesos avanzados de tratamiento terciario que sean lo suficientemente agresivos para transformar, degradar o inactivar los agentes contaminantes de mayor recalcitrancia [7].

Recientemente los procesos de oxidación avanzada (POA's) han demostrado ser efectivos en tratamientos antimicrobianos. Estas tecnologías están basadas en procesos físico-químicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los microorganismos pues involucran la generación de especies oxidantes altamente reactivas capaces de atacar y degradar sustancias orgánicas. Entre los diferentes POA's se encuentra la fotocatalisis heterogénea que se basa en un procesos físico-químico que se lleva a cabo gracias a la acción de absorción de radiación de luz visible sobre un fotocatalizador que se encuentra en fase distinta al sistema reactivo. El catalizador utilizado es un semiconductor, que al absorber radiación electromagnética con energía mayor o igual a su ancho de banda prohibida, genera pares electrón-hueco. Estos pares a su vez facilitan la generación de especies reactivas de oxígeno para llevar a cabo reacciones de óxido-reducción y poder degradar los contaminantes. La fotocatalisis heterogénea, ha sido utilizada en los últimos años para la eliminación de un amplio grupo de agentes contaminantes de carácter orgánico, inorgánico y microbiológico presentes el agua [8-11].

Se ha encontrado que los procesos de eliminación o inactivación de bacterias mediante la actividad fotocatalítica son ocasionados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical hidroxilo (OH°), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido (O_2^-). Dichas especies reactivas de oxígeno pueden causar: a) interrupción de la replicación celular por daño en el ADN bacteriano causado por radicales OH° [12], b) daño estructural en la membrana y la pared celular por estrés oxidativo [13], lo cual lleva a la fuga de material intracelular [14], y c) decaimiento de la respiración celular por la oxidación intracelular de la acetil coenzima A [15] producida por los huecos generados (h^+).

El objetivo de esta investigación es evaluar las propiedades antibacteriales de recubrimientos de óxido de bismuto (Bi_2O_3) y óxido de zinc (ZnO) para su posible implementación en un reactor solar de tipo colector parabólico compuesto. La finalidad es utilizar este sistema compuesto para procesos fotocatalíticos de desinfección de agua. El efecto antibacterial fue evaluado por la inhibición de la especie *E. coli* en presencia de Bi_2O_3 y ZnO bajo luz UV y luz visible en pruebas de laboratorio mediante ensayos de viabilidad celular.

JUSTIFICACIÓN

Los procesos de fotocatalisis heterogénea para la eliminación de microorganismos contaminantes de agua ha llevado a los investigadores a buscar nuevos materiales con propiedades antibacteriales, o bien, mejorar sus propiedades. Entre las principales modificaciones se encuentran la presentación (nanopartículas o películas delgadas), su morfología, técnica de depósito, energía de activación, dopado de materiales, impurezas, etc. Diversos artículos presentan sus resultados señalando la disminución de la concentración inicial de microorganismos al final de las pruebas tomando muestras a diferentes tiempos del volumen a tratar.

Cuando se usan nanopartículas la muestra se toma filtrando el agua mediante membranas especiales de celulosa con un tamaño de poro entre $0.25 - 0.45 \mu\text{m}$ que posteriormente se transfiere a un medio de cultivo para el desarrollo de bacterias, usar ensayos de viabilidad celular, o bien, medir la turbidez del medio [10, 16–19]. También es posible separar las nanopartículas mediante centrifugación. Ambas formas se usan bajo el supuesto de que ninguna nanopartícula queda en el filtro e inhibe el crecimiento en los cultivos o que las velocidades de centrifugado no afectan a los microorganismos. En algunos casos no se menciona que exista separación alguna y simplemente se toma la muestra del medio [20, 21]. Cuando el fotocatalizador está en forma de películas delgadas el mecanismo puede cambiar. Sin embargo, la mayoría de los trabajos aplican el mismo procedimiento que con las nanopartículas tomando únicamente el sobrenadante¹, figura 1(b) [22]. Los trabajos así reportados no consideran la adherencia de las bacterias en la superficie de la película por lo que no contabilizan aquellas bacterias que son viables, figura 1(c) [23]. En el trabajo reportado por Contreras y colaboradores en donde utilizan una película de TiO_2 , rasparon la película para intentar separar las bacterias [24]. Por otro lado, es sabido que las bacterias buscan superficies a las cuales adherirse, por ser más adecuada esta condición para su proliferación [25]. En este trabajo consideramos hacer mediciones tanto del sobrenadante como de las bacterias adheridas a los sustratos de vidrio con y sin película fotocatalizadora. De esta manera se busca entender mejor la interacción de las bacterias con el fotocatalizador, así como encontrar un método adecuado para su cuantificación después del tratamiento.

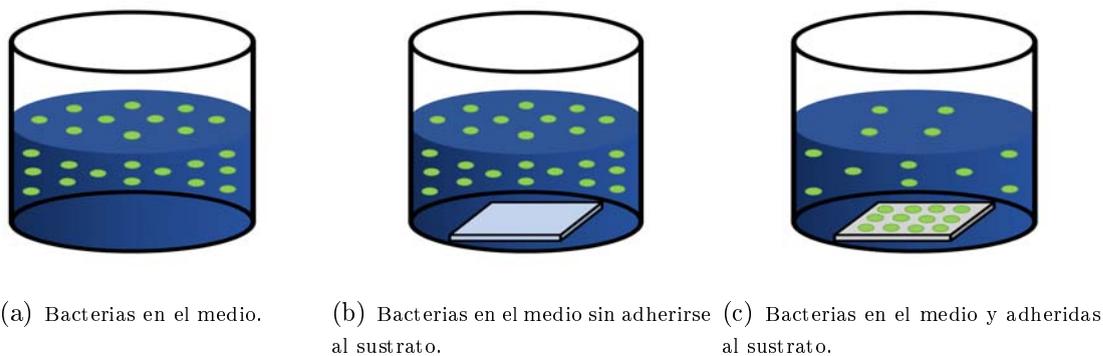


Figura 1: Posible distribución de las bacterias.

El presente trabajo se desarrolló en dos etapas. La primera etapa está enfocada en evaluar la actividad bactericida de películas delgadas de Bi_2O_3 y ZnO depositadas en sustratos de vidrio convencional. La intención de utilizar el ZnO es porque se ha reportado que presenta actividad antibacteriana como fotocatalizador [26–29]. Mientras que en el caso del Bi_2O_3 su brecha de banda prohibida es de $\approx 2.5 \text{ eV}$ lo que le permite trabajar en la región del visible del espectro solar [30, 31]. De esta manera se analiza la viabilidad celular en pruebas de laboratorio usando métodos de turbidimetría, conteo en placa y fluorescencia.

La segunda etapa está destinada al diseño y construcción de un reactor solar parabólico compuesto para su aplicación en procesos de purificación de agua mediante fotocátalisis

¹Volumen del medio que queda en la parte superior de las películas.

heterogénea. El interés principal para un futuro, es poder aplicar el efecto bactericida de los fotocatalizadores, estudiados previamente, en un sistema de mayor tamaño que pueda operar fuera del laboratorio para aprovechar la energía solar. Se propone como componente principal del reactor, el uso de filtros de vidrio poroso como soporte para el Bi_2O_3 y ZnO . La ventaja de usar filtros como sustratos de los fotocatalizadores es permitir el flujo de agua a través del tubo receptor del reactor y poder mantenerla en circulación durante todo el proceso. Con este sistema se busca una alternativa de saneamiento de agua que aprovecha la radiación solar disponible en la superficie de la Tierra.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar la actividad antibacterial de películas de óxido de zinc (ZnO) y óxido de bismuto (Bi_2O_3) mediante procesos de fotocatalisis.
- Diseño y construcción de un reactor solar de tipo colector parabólico compuesto para su implementación en procesos de fotocatalisis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar depósitos Bi_2O_3 y ZnO sobre sustratos de vidrio por spray pyrolysis y realizar su caracterización estructural, morfológica y óptica.
- Evaluar la actividad antibacterial en ambiente controlado de las películas de Bi_2O_3 y ZnO (temperatura, radiación, concentración de bacterias, etc.) usando la especie *E. coli* (ATCC 33780).
- Diseñar y construir un reactor solar para procesos fotocatalíticos.
- Obtener recubrimientos de Bi_2O_3 y ZnO sobre filtros de vidrio por baño químico para su uso en el reactor.

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

De entre todos los recursos naturales disponibles, el agua destaca por ser un elemento vital para la vida humana. Durante las últimas décadas la contaminación del agua se ha vuelto un problema alarmante debido a que su disponibilidad depende tanto de la cantidad como de la calidad que ésta tenga. La calidad del agua hace referencia a las características químicas, físicas y biológicas. Esta es una medida de la condición del agua en relación con su impacto en los seres vivos ya sea para su consumo o uso recreativo. Los estándares más comunes que se utilizan para evaluar la calidad del agua se relacionan con la salud de los ecosistemas, la seguridad del contacto humano y el agua potable [32]. Si el agua está contaminada, es imposible darle un uso adecuado acorde al que se desea, provocando que su empleo se limite. Actualmente existen diversos programas gubernamentales que tienen como objetivo principal el abastecimiento de agua para uso y consumo humano para asegurar que toda la población alcance una dotación adecuada de agua de buena calidad. En México, lamentablemente no se ha logrado alcanzar esta meta, lo que implica que cada vez más personas decidan recurrir a métodos intradomiciliarios para subsanar deficiencias de la calidad del agua suministrada a nivel municipal. Estos métodos para purificar el agua consisten básicamente en la aplicación de equipos potabilizadores y/o sustancias germinicidas, orientados fundamentalmente al aspecto bacteriológico, considerado como de riesgo inmediato a la salud y en casos específicos a la depuración de características físicas y/o químicas (NOM-181-SSA1-1998). La contaminación microbiológica es responsable de más del 90 % de las intoxicaciones y transmisión de enfermedades por el agua. Los principales microorganismos que se transmiten a través del agua engloban a las bacterias, virus y protozoarios. En el proceso de abastecimiento del agua, pueden surgir problemas de contaminación microbiológica tanto en los recursos como en el proceso de almacenamiento y distribución. La presencia y extensión de la contaminación fecal es un factor importante en la determinación de la calidad de un cuerpo de agua. La norma mexicana para la calidad del agua NMX-AA-102-SCFI-2006 establece que es necesario hacer un análisis a muestras de aguas tratadas para determinar la presencia de miembros del grupo coliforme, que habitan normalmente en el intestino del hombre y otros animales de sangre caliente.

Para determinar si una sustancia germinicida cumple con las propiedades que le son atribuidas es necesario inocular una muestra de agua con un número conocido de colonias del microorganismo seleccionado para probar su eficiencia. Posteriormente el agua se somete a la acción de dicha sustancia germinicida, bajo las condiciones necesarias. Se analizan muestras del agua de prueba antes y después de haberse sometido al tratamiento. Después de haber

transcurrido el tiempo de contacto necesario, se toman tres muestras de agua de prueba sin tratar y, a continuación, tres muestras de agua tratada para determinar la concentración de organismos mesófilos aerobios mediante el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y la concentración de organismos coliformes totales.

Para que la sustancia germinicida pase la prueba de potabilidad de forma aceptable se necesita que el porcentaje en reducción bacteriana sea igual o mayor al 95 % para organismos mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994) e igual o mayor a 99.99 % para organismos coliformes totales (NOM-112-SSA1-1994).

1.2 ENTEROBACTERIAS

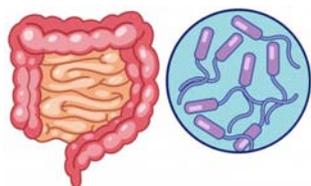


Figura 2: Las enterobacterias habitan el intestino del ser humano.

Las Enterobacterias son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). Algunos microorganismos entéricos, por ejemplo, *Escherichia coli*, son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedades, en tanto que otros, las salmonelas y las shigelas, por lo regular son patógenos para el ser humano. Las Enterobacterias son aerobios o anaerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Estas bacterias también se denominan coliformes. Las Enterobacterias son el grupo más frecuente de bacilos gramnegativos que se cultivan en el laboratorio clínico y junto con los estafilococos y los estreptococos son las bacterias que más a menudo producen enfermedades [33].

Las bacterias coliformes forman parte de los desechos de las aguas negras y no se desarrollan en el agua, de manera que un recuento de las bacterias coliformes constituye un indicio del grado de contaminación de esas aguas. Se considera que el número de microorganismos portadores de enfermedad en el agua es proporcional al número total de microorganismos y que una cantidad total baja representa un menor riesgo de contraer una enfermedad. Sin embargo, se han dado casos en que las enfermedades virales han sido transmitidas por aguas que cumplen estrictamente con las normas de control de bacterias. Para el hombre el efecto más perjudicial del agua contaminada ha sido la transmisión de enfermedades por microorganismos que pueden habitar en ella [34].

1.2.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae que forma colonias circulares, convexas y lisas con bordes distintivos. Es la especie bacteriana más común de la microbiota intestinal; se presenta como un comensal del intestino humano pocas horas después del nacimiento. Es raro encontrar cepas comensales asociadas a enfermedad, sin embargo, hay algunas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Organización Mundial de la Salud). *E. coli* y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de ser responsables de producir vitamina B y K. El tamaño promedio de los bacilos es de $0.5 \mu\text{m}$ de ancho por $3 \mu\text{m}$ de largo. Algunas especies son móviles por flagelos peritricos, no espuruladas, fermenta la glucosa y la lactosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos. Hay tipos específicos de *E. coli* que pueden causar enfermedades y también hay tipos que no cau-



Figura 3: Bacteria *E. coli*

san ninguna. Algunos de los tipos dañinos de *E. coli* se clasifican en los siguientes grupos: Enterotoxigénico (ETEC), Enteropatógenos (EPEC), Enterohemorrágico (EHEC) y Enteroinvasivo (EIEC). Estos son transmitidos a través de alimentos y agua contaminada [32,35].

El aumento en la aparición de microorganismos en el agua potable o en las aguas residuales ha generado preocupación por los efectos sistémicos en la salud humana. Estos microorganismos se eliminan en el material fecal y la ruta de transmisión es fecal-oral, por lo tanto, los alimentos y agua contaminada son las formas más comunes de ser expuestos a *E. coli*. En particular, existen preocupaciones sobre los posibles efectos a largo plazo de la exposición sistémica a una cierta clase de toxinas, por ejemplo, la liberación de endotoxinas debidas a *E. coli*. Es por eso que existe una creciente preocupación por las enfermedades patógenas relacionadas con la contaminación microbiológica del agua. Esto ha provocado el establecimiento de estándares más estrictos para cumplir con los requisitos existentes en materia de protección y reutilización para mejorar la salud pública y protección del medio ambiente [19].

La reproducción de bacterias coliformes fecales fuera del intestino de los seres vivos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc. También pueden reproducirse en las biopelículas que se forman en las tuberías de distribución de agua potable. Las bacterias coliformes fecales y *E. coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide (causantes de enfermedades infecciosas) y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras de aguas contaminadas [36].

A la contaminación del agua con microorganismos se añade el hecho de la multirresistencia desarrollada por los mismos. Por lo que actualmente se han desarrollado procesos avanzados de tratamiento para eliminar este tipo de contaminantes [7].

1.3 PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADA (POA)

Los procesos de oxidación avanzada (POA) se han desarrollado durante los últimos treinta años desempeñando un papel importante en la degradación de contaminantes del agua. Los tratamientos se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes, lo cual permite degradar compuestos orgánicos que no son biodegradables a través de su oxidación. Estos procesos involucran la generación y uso de especies transitorias como radicales hidroxilo (OH°) que pueden ser generados por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía. El uso de los POA's como tratamiento terciario, puede mejorar la biodegradabilidad de las aguas residuales, aumentar la eficiencia del proceso global y al mismo tiempo reducir significativamente los costos operativos [37,38].

Recientemente los procesos de oxidación avanzada (POA's) también han demostrado ser efectivos en tratamientos antimicrobianos. Eso se debe a que son capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los microorganismos. Esto se debe a que involucran la generación de especies oxidantes altamente reactivas capaces de atacar y transformar una

sustancia compleja en otra más sencilla (degradar).

Entre los POA se encuentra la fotocatalisis. Se trata de un proceso fotoquímico que se lleva a cabo gracias a la acción de absorción de radiación de luz sobre un fotocatalizador. El fotocatalizador utilizado es un semiconductor, que al absorber radiación electromagnética con energía mayor o igual que el ancho de banda prohibida, genera pares electrón hueco capaces de originar radicales OH° . Esto permite que se lleven a cabo reacciones de óxido-reducción; oxidando, por ejemplo, materia orgánica a dióxido de carbono.

Se ha encontrado que los procesos de destrucción completa (eliminación) o inactivación de bacterias mediante la actividad fotocatalítica, son ocasionados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical hidroxilo (OH°), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido (O_2^-). Dichas especies reactivas de oxígeno pueden causar: a) interrupción de la replicación celular por daño en el ADN bacteriano causado por radicales OH° [12], b) daño estructural en la membrana y la pared celular por estrés oxidativo [13], lo cual lleva a la fuga de material intracelular [14], y c) decaimiento de la respiración celular por la oxidación intracelular de la acetil coenzima A [15]) producida por los huecos generados (h^+).

La catálisis puede ser de dos tipos: homogénea y heterogénea. Se llama homogénea cuando el catalizador y el sistema reactivo forman un sistema homogéneo con una sola fase. En la heterogénea el catalizador está en una fase distinta al sistema reactivo. El presente trabajo se basa en el uso de fotocatalisis heterogénea utilizando un sólido semiconductor como catalizador (fotocatalizador).

Los semiconductores usados en procesos de fotocatalisis son generalmente óxidos o calcogenuros. Estos materiales tienen algunas características eléctricas únicas que los hacen especialmente útiles. El solapamiento de los orbitales atómicos forma una configuración de estados deslocalizados muy próximos entre sí. Debido a que existen tantos niveles electrónicos como átomos en la red (red infinita), la diferencia entre dos estados electrónicos es prácticamente nulo. De esta forma, la configuración electrónica se expresa como bandas a partir de la función de densidad de estados electrónica (DDE). Esta función representa un conteo de los niveles electrónicos comprendidos en un intervalo infinitesimal. Entre las bandas existen intervalos de energía en los cuales no hay estados electrónicos permitidos (figura 4). A estos intervalos se les llama brecha prohibida (band gap) [8].

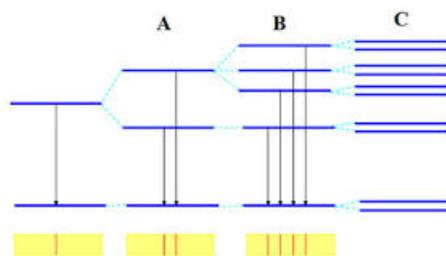


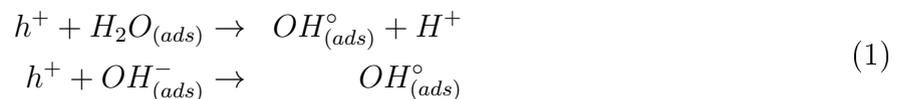
Figura 4: Niveles electrónicos resultantes de enlaces entre átomos idénticos y aparición de bandas prohibidas.

Las bandas que limitan la brecha prohibida son la banda de valencia (BV) y la de conducción (BC), que son la de menor y mayor energía respectivamente. La posición de las BV y BC es lo que distingue a los conductores de los semiconductores y los aislantes. Si las bandas se solapan, son materiales conductores. La diferencia entre el semiconductor y el aislante está dada por el ancho de brecha prohibida. En el caso de los semiconductores este ancho es lo suficientemente pequeño como para poder excitar electrones de la BV a la BC mediante procesos térmicos, con luz o con descargas eléctricas [39]. Cada electrón que se excita a la BC deja detrás un estado electrónico vacante en la BV. Esta ausencia se trata como una partícula cargada positivamente. Por lo tanto tenemos dos portadores de carga, electrones libres y huecos (e^- , h^+) [40].

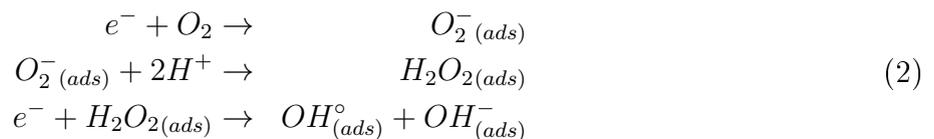
1.4 FOTOCATÁLISIS HETEROGÉNEA

En los procesos de fotocatalisis heterogénea, el fotocatalizador está en contacto con el contaminante. El proceso inicia cuando el semiconductor se irradia con una luz de longitud de onda igual o mayor energía que la de su brecha prohibida. Esto ocasiona la fotogeneración de pares electrón-hueco. Si este par es capaz de migrar a la superficie del material, puede permanecer ahí en condiciones metaestables y participar en reacciones de óxido-reducción (redox) con las especies adsorbidas en la superficie (contaminantes) y promover su degradación. Sin embargo, puede ocurrir que antes de que el par electrón hueco llegue a la superficie ocurra su recombinación produciendo energía que será liberada en forma de calor y, en algunos casos, con emisión de fotones [41].

Dentro de los sistemas acuosos a tratar, además de tener como constituyentes a los contaminantes a remover, se encuentran el agua y el oxígeno molecular. En fase acuosa y en presencia de oxígeno disuelto, los huecos fotogenerados en la banda de valencia del semiconductor pueden oxidar a las moléculas de agua o a cualquier otro componente adsorbido en el catalizador. Esto genera radicales hidroxilo activados OH° que actúan como agentes oxidantes fuertes [42].



Por otro lado, los electrones promovidos hacia la banda de conducción del semiconductor reaccionan con las moléculas de oxígeno adsorbidas para producir el radical superóxido (O_2^-). Estos radicales son rápidamente convertidos en peróxido de hidrógeno y posteriormente, en radicales hidroxilo activados. A continuación, se presenta un esquema de las reacciones descritas.



La figura 5 muestra este proceso.

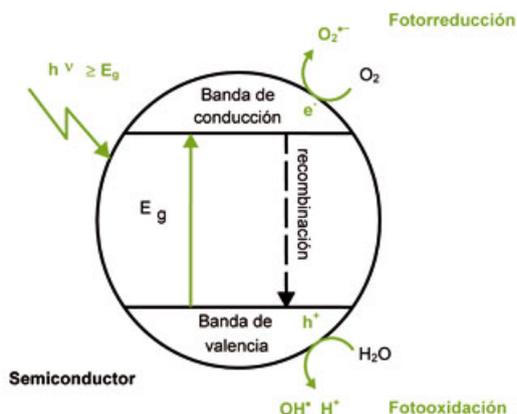


Figura 5: Esquema del proceso fotocatalítico en un semiconductor.

Para que el fotocatalizador sea eficiente, el valor mínimo de la BC tiene que ser más negativo que el potencial redox de H^+/H_2 (0 eV vs NHE²). Esto asegura la producción de radicales hidroxilo en el proceso de fotocatalisis. Por otro lado, el valor máximo de la BV debe ser más positivo que el potencial redox de O_2/H_2O (1.23 eV vs NHE). lo que ocasiona que se produzcan radicales superóxido [43]. En la figura 6 se muestran los potenciales redox para diferentes materiales.

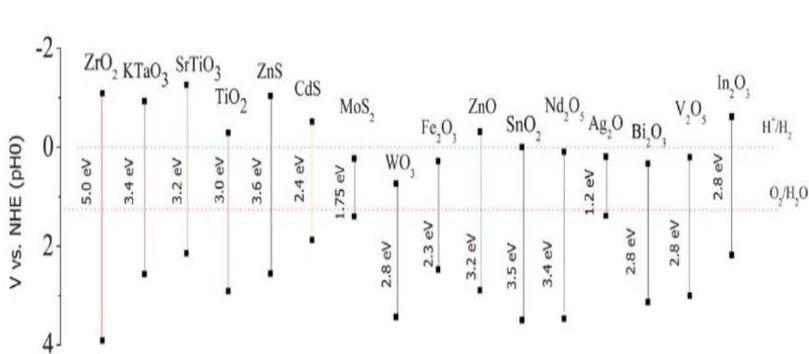


Figura 6: Posición de bandas de distintos semiconductores.

La degradación de contaminantes se puede tratar bajo distintas condiciones de operación, pero siempre va enfocada a darle importancia a los factores que influyen en la velocidad de reacción, al mismo tiempo, en el desarrollo de estos procesos de degradación se busca que sean rentables y renovables.

Una opción es utilizar catalizadores de bajo costo que sean eficientes utilizando luz solar como fuente de radiación en el proceso de fotocatalisis. Los sulfuros y óxidos se encuentran

²Electrodo Normal de Hidrógeno como referencia

dentro de los materiales fotocatalizadores más usados. El rendimiento fotocatalítico del óxido de titanio (TiO_2) es el más ampliamente estudiado debido a sus propiedades como: su alta actividad fotocatalítica, es estable químicamente, de bajo costo y no es tóxico. Sin embargo, la desventaja que presenta es que para que funcione como fotocatalizador es necesario irradiarlo con luz ultravioleta. Otro material usado e investigado es el ZnO , eficiente y de menor costo [44,45].

1.4.1 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS FÍSICOS

Llevar a cabo reacciones fotocatalíticas eficientes puede estar determinado por una gran cantidad de factores que intervienen directamente en su eficiencia además de la energía necesaria para activar al fotocatalizador. A continuación se describen dichos factores.

Las características del dispositivo en el cual se llevan a cabo los procesos de fotocatalisis (fotorreactor) es de suma importancia. Depende de la geometría y de las condiciones del fotorreactor, donde existe una superficie máxima expuesta que puede estar totalmente iluminada. [46].

Una concentración elevada de contaminante puede impedir un desplazamiento de fotones libres a través de la solución y una concentración baja puede provocar una reacción lenta debido a que el contaminante pueden tardar más en interactuar con el fotocatalizador debido a su gran espaciado. Por lo tanto, una concentración intermedia puede ser la óptima para una fotodegradación eficiente. El límite puede estar determinado por la naturaleza del contaminante. Aunque la fotocatalisis no es normalmente una opción conveniente si las concentraciones superan el valor de 1g/L , se puede recurrir a una etapa previa de dilución.

El pH tiene también una gran influencia en la degradación debido a que un aumento o disminución del pH de la solución modifica la adsorción de los contaminantes en la superficie del fotocatalizador. Esto ocasiona una variación en la velocidad de reacción y como consecuencia, un cambio en el porcentaje de degradación que puede ser alcanzado.

Un parámetro importante es la fotólisis (degradación por luz) que pueden presentar los contaminantes, es decir, se debe comprobar que no absorben la luz para conservar la fotoactivación exclusiva del catalizador para un verdadero régimen catalítico heterogéneo.

Ahora bien, los fotocatalizadores generalmente son utilizados en forma de polvo debido a que de esta forma tienen una mayor área superficial, por lo tanto, son capaces de reaccionar con un mayor número de moléculas del contaminante. Esto implica una mayor fotodegradación. Lamentablemente su uso en esta presentación implica un proceso adicional para su separación una vez que ha sido completada la degradación. Una solución al problema de extracción del fotocatalizador al final del proceso de degradación es el uso de películas depositadas con estos materiales, pues se encuentran adheridos a sustratos y al finalizar el proceso simplemente basta con retirarlos; la desventaja de utilizar películas es que éstas presentan una menor área de contacto en comparación con el polvo, causando una disminución de su eficiencia. Es por esto que las investigaciones recientes se han enfocado en producir películas

con mayor rugosidad y nanoestructura que incremente el área efectiva.

1.4.2 ÓXIDO DE BISMUTO

Un material más que se agrega a la lista es el óxido de bismuto (Bi_2O_3), el cual es un semiconductor que en los últimos años ha ido tomando importancia dentro de la fotocatalisis debido a las propiedades que presenta. La intención de utilizar el óxido de bismuto en este trabajo se debe a sus excelentes propiedades fotocatalíticas. Su estructura cristalina en capas o estructura especial en forma de poliedro permite que los óxidos de bismuto presenten gran superficie y puedan funcionar bajo radiación visible. Esta es la principal ventaja sobre el óxido de titanio, ya que este último sólo es capaz de absorber radiación ultravioleta. La absorción de luz en el visible representa una gran ventana de oportunidad para el aprovechamiento de la energía solar puesto que la radiación solar sólo proporciona cuatro por ciento de luz ultravioleta. Los reactores para la degradación de moléculas orgánicas y limpieza de aguas residuales basados en TiO_2 requieren de lámparas de luz ultravioleta, pues su eficiencia bajo radiación solar no es suficientemente alta. Esto implica un costo que puede evitarse con el uso de Bi_2O_3 .

El óxido de bismuto tiene un gran potencial en diversas aplicaciones debido a que el ancho de energía de su banda varía de 2 eV hasta 3.96 eV. Además, presenta un alto índice de refracción, permitividad dieléctrica, además de una fotoconductividad y fotoluminiscencia característica. Se sabe que el óxido de bismuto tiene 6 polimorfismos: $\alpha\text{-Bi}_2\text{O}_3$, $\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Bi}_2\text{O}_3$, $\delta\text{-Bi}_2\text{O}_3$, $\epsilon\text{-Bi}_2\text{O}_3$ y $\omega\text{-Bi}_2\text{O}_3$. Dos de ellas, la fase de baja temperatura α y la fase de más alta temperatura δ son fases estables del compuesto, mientras que las fases restantes, son fases metaestable [30].

Además de emplearse en soluciones acuosas, es posible utilizarlo para purificación de aire tanto en exteriores como interiores o en la implementación de sistemas de limpieza hospitalaria con un fin bactericida. Un quirófano podría tener paredes tratadas con óxido de bismuto que impida el crecimiento de bacterias [47]. En particular, la fase $\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$ cuando se encuentra como película delgada presenta una fase estable a altas temperaturas, una estructura tetragonal y un ancho de banda prohibida de entre 2.4 - 2.8 eV que le permite trabajar en la región del visible del espectro solar [48]. Una representación de la estructura del $\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$ se muestra en la figura 7. Se ha encontrado que cuando se usa $\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$ para la degradación de colorantes textiles éste sólo logra su decoloración. Una posible explicación es que la posición de las bandas electrónicas permite la generación de radicales superóxido (O_2^-) que es capaz de romper los ciertos enlaces en los colorantes. Sin embargo, la producción de radicales OH° no se completa. Se ha demostrado que el radical O_2^- es capaz de producir estrés oxidativo en microorganismos y por lo tanto causar daños a las células. Es por eso que el uso de $\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$ puede ser de utilidad para eliminar microorganismos del agua debido a trabaja en el visible y produce radicales O_2^- .

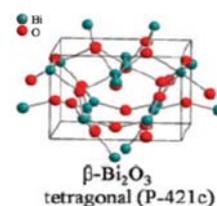


Figura 7: Estructura Bi_2O_3 tetragonal.

Algunas de las propiedades generales del Bi_2O_3 se muestran en la tabla 1 [49].

Propiedades físicas y químicas del óxido de bismuto fase beta	
Fórmula molecular	$\beta\text{-Bi}_2\text{O}_3$
Peso molecular	465.96 g/mol
Apariencia	Sólido blanco
Punto de fusión	817 °C
Punto de ebullición	1890 °C
Band Gap	2.4 - 2.8 eV
Estructura cristalina	Tetragonal
Cte. de red (Å)	a= 8.17, c= 8.17 y c/a = 5.41
Densidad	8.9 g/cm ³

Tabla 1: Propiedades del óxido de bismuto fase beta.

Los minerales de bismuto raramente aparecen en concentraciones que permitan la extracción del metal como producto primario, la mayor parte de la producción mundial de este metal se obtiene como co-producto del refinamiento metalúrgico de minerales como plomo, plomo-cobre y en menor medida de tungsteno y estaño. En el 2017, México fue el tercer productor de este elemento a nivel mundial detrás de China y Laos, produciendo 540 toneladas según el portal de la Secretaría de Economía. Se considera el menos tóxico de los metales pesados que se utilizan actualmente en la industria, puesto que el bismuto y sus compuestos no parecen ser responsables de intoxicaciones.

En México el bismuto sólo se vende como materia prima o dentro de la industria farmacéutica y cosmética a un bajo costo, por lo que no reedita mucho al país. Es por eso que investigadores de diferentes áreas tienen gran interés en este mineral con el propósito de poder emplearlo dentro de los avances científico-tecnológicos y así poder dar un valor agregado al material favorable para la nación.

1.4.3 ÓXIDO DE ZINC

El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto semiconductor que puede presentar una estructura cúbica o hexagonal; debido a esto, su naturaleza de enlace se encuentra en la frontera de un semiconductor covalente y uno iónico. Las estructuras cristalinas para el ZnO son: cúbica (sal de roca), cúbica (blenda de zinc) y hexagonal (wurtzita); esta última es la fase termodinámicamente estable en condiciones ambientales. Por otro lado, la estructura blenda de zinc se puede estabilizar mediante un crecimiento sobre sustratos cúbicos mientras que la estructura sal de roca puede obtenerse a presiones relativamente altas. Dado que el desarrollo de las películas delgadas se hace bajo condiciones de presión atmosféricas y temperatura moderada la estructura que se espera se forme es la tipo wurtzita. Una representación de la estructura de ZnO wurtzita se muestra en la figura 8 [50].

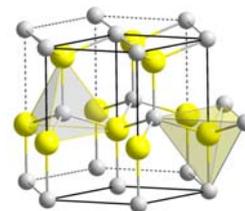


Figura 8: Estructura ZnO tipo wurtzita.

El óxido de zinc es conocido como uno de los fotocatalizadores más destacados para el tratamiento de agua debido a su comportamiento en la degradación de contaminantes orgánicos. Esto es por su fuerte habilidad oxidativa debida a su facilidad para la formación de radicales hidroxilo (OH^\bullet). Pese a que el óxido de titanio (TiO_2) es el fotocatalizador más ampliamente estudiado se ha reportado que el ZnO tiene una eficiencia fotocatalítica mayor atribuida a su habilidad para generar H_2O_2 más eficientemente que el TiO_2 [51]. Sin embargo, el ZnO sólo puede ser activado bajo radiación UV.

Algunas de las propiedades generales del ZnO se muestran en la tabla 2 [50].

Propiedades físicas y químicas del óxido de zinc	
Fórmula molecular	ZnO
Peso molecular	81.408 g/mol
Apariencia	Sólido blanco
Punto de fusión	1975 °C
Punto de ebullición	2360 °C
Band Gap	3.3 eV
Estructura cristalina	Hexagonal wurtzita
Cte. de red (Å)	a= 3.24, c= 5.28 y c/a = 1.63
Densidad	5.62 - 5.78 g/cm ³

Tabla 2: Propiedades del óxido de zinc.

En este trabajo se utilizaron películas delgadas de Bi_2O_3 y ZnO para realizar pruebas antibacteriales. El propósito de usar estos dos materiales es poder aprovechar la eficiencia del ZnO para producir radicales OH^\bullet bajo radiación UV y la capacidad del Bi_2O_3 para generar radicales O_2^- bajo luz visible. El estudio de esta combinación determinaría su eficiencia en la eliminación de microorganismos contaminantes en el agua en procesos de fotocatalisis. Además, se propone utilizar estos materiales depositados por separado sobre filtros de vidrio en un sistema mixto para ser usados como componente principal dentro del tubo receptor

de un reactor solar parabólico compuesto.

1.7 REACTOR SOLAR DE TIPO COLECTOR PARABÓLICO COMPUESTO

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por combinar la fotocatalisis heterogénea con tecnologías solares para lograr la degradación de contaminantes presentes en el agua. El uso de luz artificial requerida durante el proceso de fotocatalisis es una fuente importante de costos al momento de operar las plantas de tratamiento. En contraste, el sol es una fuente de luz económica y ecológica, por eso, la propuesta ha cobrado valor y se ha convertido en un tema de investigación actualmente.

Se puede definir la tecnología fotocatalítica solar como aquella que colecta de forma eficiente los fotones generados por la luz solar y los hace entrar en un dispositivo adecuado para promover reacciones específicas. El equipo que realiza esta función se llama reactor solar o colector solar.

Existen diversos reactores solares para el tratamiento fotocatalítico del agua que se clasifican de acuerdo a su capacidad para concentrar luz solar (concentración solar) y la temperatura que es posible obtener con el sistema. La concentración solar (C) se define como la relación entre el área de abertura del colector (que intercepta la radiación) y el área de absorción (del componente que recibe la radiación solar). La clasificación se divide en tres grupos que son: de alta, de mediana y de baja o nula concentración. El factor de concentración RC se define como la relación entre el área de la superficie reflejante (A_i) y el área de absorción del tubo reflector (A_a). El factor se mide en soles donde 1 sol equivale a 1000 Watts/m². Es decir, un $RC = 1$ implica que se aprovecha toda la radiación solar.

$$RC = \frac{A_i}{A_a} \quad (3)$$

Los colectores sin concentración, se caracterizan por ser estáticos y no contar con un sistema de seguimiento solar. Básicamente consisten en una placa plana que se orienta hacia el sol con una inclinación determinada que normalmente depende de la latitud del sitio geográfico en donde se ubique. Entre sus ventajas principales se encuentran su simplicidad y bajo costo. Un ejemplo de este tipo de colectores son los calentadores solares domésticos.

Los colectores de media concentración, por otro lado, logran concentrar la radiación entre 5 y 50 veces, entre ellos se encuentran los colectores con superficies reflectantes cilindro-parabólicas. Estos colectores concentran la radiación sobre un receptor tubular situado en la línea focal de la superficie cilindro-parabólica. Adicional a esta característica pueden ser de seguimiento en un eje (acimutal o altura) o en dos ejes (acimutal más altura).

Finalmente, los colectores de alta concentración no usan un receptor tubular (línea focal) sino que sólo es un receptor situado en el foco de una superficie parabólica. Consisten en un paraboloide con seguimiento solar que concentra la radiación entre 100 y 1000 veces. Ejemplos de éstos son los discos parabólicos y los hornos solares. Su principal característica radica en que pueden aprovechar eficazmente la radiación solar directa y la energía térmica. Pero, dentro de sus principales desventajas, se encuentra el hecho de que no aprovechan la radiación difusa, tienen un alto costo, bajo rendimiento óptico y menor eficiencia cuántica.

Puesto que la temperatura no desempeña un papel relevante en los procesos fotoquímicos solares, la tecnología desarrollada para fines de fotocatalisis se basa en colectores solares sin concentración y de media concentración. Dichos sistemas pueden aprovechar tanto la radiación directa como la difusa. Los componentes básicos de este tipo de colectores son: la superficie reflectante concentradora, el receptor tubular (donde pasa el efluente) y la estructura de soporte. Su eficiencia óptica se encuentra entre el 50 y 70 %.

Los colectores solares sin concentración, llamados también colectores de un sol, tienen la ventaja de ser más baratos en comparación con colectores cilindro parabólicos pues sus componentes son más simples, sus estructuras de soporte son más fáciles y baratas de instalar. Además, es menor la superficie requerida para su instalación. Estas propiedades se traducen en un mantenimiento más fácil y de bajo costo. Para aplicaciones en fotocatalisis, los colectores sin concentración se dividen en dos grupos: los reactores planos y los colectores parabólicos compuestos.

Los colectores de tipo parabólico compuesto (CPC) son sistemas estáticos con una superficie reflectante enfocada hacia un fotorreactor cilíndrico siguiendo una involuta (figura 9). Estos dispositivos proporcionan una de las mejores ópticas para los sistemas de baja concentración, pudiendo además ser diseñados con un factor de concentración $RC = 1$, con lo que se consiguen simultáneamente las ventajas de los cilindro parabólicos y de los reactores sin concentración. El diseño de su superficie reflectante, casi toda la radiación que llega al área de apertura del colector (no sólo la directa, también la difusa) puede ser recogida y estar disponible para el proceso fotocatalítico en el reactor. La radiación UV reflejada por el CPC es además distribuida alrededor de la parte trasera del tubo fotorreactor y como resultado la mayoría de la circunferencia del tubo fotorreactor se encuentra iluminada.

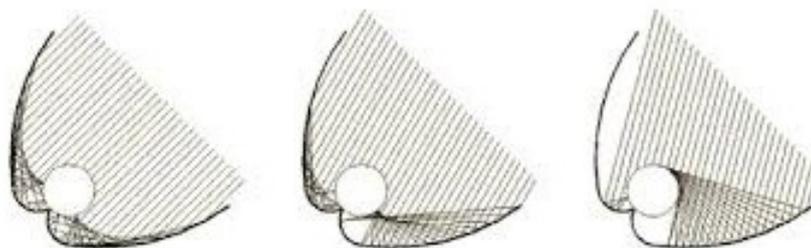


Figura 9: Radiación solar reflejada en un colector CPC. Toda la luz que llega a la apertura del colector será reflejada sobre el reactor si el ángulo de incidencia es menor del ángulo de aceptación.

Algunas iniciativas han tenido como objeto el desarrollo de reactores CPC, sin concentración solar, para aplicaciones fotocatalíticas [52]. Cuando no hay concentración solar ($RC = 1$) ningún punto del tubo recibe mucho más de 1 Sol de radiación UV, debido a la relación entre la superficie del tubo fotorreactor y del colector. Como resultado, la radiación UV incidente en el reactor es muy similar a la de los fotorreactores basados en colectores de placa plana. La eficiencia máxima de captación anual, para colectores estáticos sin seguimiento, se consigue con un ángulo de inclinación del colector sobre la horizontal semejante a la latitud del lugar de emplazamiento. Es importante resaltar también que en estos reactores sin concentración se tiene una relación lineal entre la velocidad de la reacción y la intensidad de irradiación incidente. Todos estos factores contribuyen a un excelente comportamiento de los colectores CPCs en las aplicaciones fotocatalíticas solares.

La ecuación explícita para un reflector CPC con un reactor tubular se indica en la figura 9; un punto reflector genérico S puede describirse en términos de dos parámetros: el ángulo θ , sostenido por líneas originadas en O (centro del tubo reactor) y los puntos A y R, y la distancia ρ , dado por segmento RS, que es tangente al tubo reactor en el punto R:

$$\theta = \bar{OA} \sphericalangle \bar{OR} \quad (4)$$

$$\rho = \bar{RS} \quad (5)$$

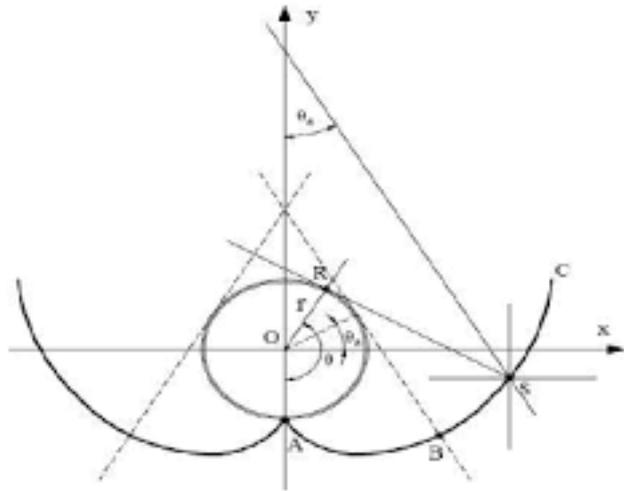


Figura 10: Construcción de un reactor Cilindro-Parabólico Compuesto (CPC).

Un parámetro importante para la definición de CPC es el ángulo de aceptación $2\theta_a$, que es el rango angular dentro del cual todos los rayos incidentes en el plano de apertura del colector van, bien a incidir directamente sobre el reactor, o bien a ser reflejados sobre el, sin

necesidad de mover el conjunto.

La solución a la curva del CPC viene dada por dos porciones separadas, una involuta ordinaria para la curva AB y una porción exterior para la curva que va desde B a C:

$$\rho = r\theta \text{ para } \theta \leq \theta_a + \frac{\pi}{2} \text{ parte AB de la curva} \quad (6)$$

$$\rho = r \frac{\theta + \theta_a + \pi - \cos(\theta - \theta_a)}{1 + \sin(\theta - \theta_a)} \text{ para } \theta_a + \frac{\pi}{2} \leq \theta \leq \frac{3\pi}{2} - \theta_a \text{ parte BC} \quad (7)$$

El valor de RC del CPC está dado por:

$$RC = \frac{1}{\sin(\theta_a)} \quad (8)$$

En el caso especial de $\theta_a = 90^\circ$, se tiene una $RC = 1$ y los puntos B y C son coincidentes. En este caso $2\theta_a = 180^\circ$, lo que quiere decir que cualquier fotón que llegue al plano de apertura del colector, sea cual sea su dirección, va a poder ser aprovechado en el reactor. Este hecho es especialmente importante ya que permite aprovechar la radiación solar UV difusa. Además, este amplio ángulo de aceptación permite absorber posibles errores de alineación y reflexión del conjunto superficie reflectora-tubo reactor, lo que también es una virtud importante para permitir un bajo coste del fotorreactor.

Uno de los componentes importantes a considerar en un sistema fotocatalizador es el receptor. Éste debe ser tubular para que el agua pueda ser fácilmente recirculada; debe de transmitir eficientemente los rayos UV con una pérdida mínima de carga a través del sistema hidráulico y además debe poder soportar suficiente presión como para manejar un gran volumen de agua en una planta de tratamiento. Existen pocos materiales que cumplen las características antes mencionadas y que además sean inertes a los químicos agresivos que podrían circular a lo largo del receptor. Entre los materiales que cumplen estas condiciones se encuentran algunos plásticos y varios tipos de vidrios. Sin embargo, algunos de los plásticos sólo pueden soportar bajas presiones. El vidrio es una buena alternativa, aunque cuando se trata de vidrio normal, resulta insatisfactorio porque su alto contenido de hierro absorbe una parte importante de la luz UV incidente. Es por eso que el vidrio con baja concentración de hierro (i.e. Pyrex o Duran) es el material apropiado para reactores fotocatalíticos [53]. Además del material, un factor importante es el diámetro del tubo receptor. Se necesita que dentro, el flujo se mantenga uniforme en todo momento, ya que un flujo no uniforme puede provocar una deficiencia comparada con la ideal. La turbulencia dentro del tubo implica una disminución de la presión. Este es un parámetro importante que puede condicionar el diseño del reactor especialmente para el caso de las plantas industriales con tubos de longitudes

grandes. Después de varios experimentos en diferentes fotorreactores se ha concluido que los diámetros no pueden ser menores a 20-25 mm y el diámetro ideal debe estar en el rango de 25 - 50 mm.

En el caso de aplicaciones fotocatalíticas, la reflexión en la superficie reflejante de longitudes de onda que se encuentren entre los 300 y 400 nm es de especial interés. Las condiciones ideales de una superficie reflejante para ser utilizada en un reactor son: una alta reflexión en el rango UV, resistencia al clima y un costo razonable. Los espejos basados en aluminio son claramente la mejor opción debido a que este metal es altamente reflejante en la parte ultravioleta del espectro solar; es más, su eficiencia de reflexión es del 83 % en el rango de 295 - 387 nm. Sin embargo, las superficies de aluminio metálico son muy frágiles y se oxidan rápidamente, por lo que es necesario protegerla. Actualmente la solución más apropiada es la de electropulir y anodizar las superficies de aluminio. El proceso de anodizar consiste en crear una capa muy delgada de óxido de aluminio sobre el aluminio depositado electrolíticamente para hacerlo más resistente a la abrasión y a los químicos.

En el presente trabajo se diseñó y construyó un reactor solar de tipo colector parabólico compuesto para llevar a cabo procesos fotocatalíticos. Como componente principal dentro del tubo receptor se propone usar filtros de vidrio con recubrimientos de Bi_2O_3 y ZnO como fotocatalizadores. Esta es la principal aportación de la tesis al desarrollo de la tecnología de los procesos de oxidación avanzada mediante fotocatalisis. El interés en utilizar Bi_2O_3 y ZnO depositados en filtros radica en que el Bi_2O_3 tiene un rango de absorción en el visible mientras que el ZnO lo tiene en el UV. Esto implicaría el uso de gran parte de la radiación que llega del sol. Como beneficio adicional se tiene que los filtros permiten el flujo de agua a través de ellos y al mismo tiempo pueden impedir el paso de partículas sólidas dentro del effluente.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X es la técnica utilizada para identificar las fases cristalinas presentes en el material y conocer las propiedades estructurales. Para esto, se hace incidir un haz de rayos X sobre un cristal, éste interacciona con los átomos provocando que los electrones que se encuentran en su trayectoria vibren con una frecuencia igual a la de la radiación incidente. A su vez, los electrones actúan como fuentes secundarias de nuevos frentes de onda de rayos X con las mismas propiedades.

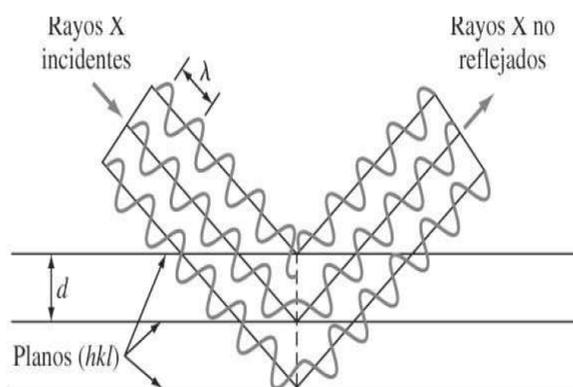


Figura 11: Diagrama de difracción de un haz de rayos X en un cristal.

En el diagrama anterior dos rayos atraviesan puntos distintos del cristal, cada uno con diferente camino óptico. Se considera que los planos paralelos están separados entre sí una distancia d . Si las longitudes de onda que salen del cristal están en fase, la amplitud de la onda resultante es la suma de cada una de las amplitudes de las ondas. Esto quiere decir que existe interferencia constructiva que resulta en un haz lo suficientemente intenso para ser medido con un detector de rayos X. Si la diferencia de caminos ópticos es un número entero n de la longitud de onda λ , entonces la diferencia en la trayectoria correspondiente a los rayos reflejados en planos adyacentes es $2d\text{sen}\theta$. θ se mide a partir del plano. Este fenómeno es conocido como la Ley de Bragg.

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (9)$$

En este caso la reflexión se produce únicamente para longitudes de onda $\lambda \leq 2d$. Es por eso que no es posible usar luz visible para esta prueba.

La prueba de rayos X para los filtros depositados con Bi_2O_3 se llevó a cabo con el equipo Rigaku-Ultima IV System ($\text{CuK}\alpha$ 1.5496 Å, 40 kV, 44 mA). La intención fue identificar el compuesto presente (y la posible existencia de impurezas de otro compuesto) y determinar la fase cristalina en que se encuentra.

2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscope) proporciona imágenes y datos fisicoquímicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones. Las muestras son barridas por un haz delgado de electrones que recorre la superficie. Las señales que resultan son captadas por detectores que las transforman en corrientes eléctricas para formar una imagen en un monitor. El microscopio (figura 12) está constituido por las siguientes partes: circuito de óptica electrónica y sus circuitos de alimentación, cámara de espécimen, generador de alto voltaje y producción de barrido, detectores de electrones secundarios emitidos por la muestra y retrodispersados, y dispositivo de observación y registro de imágenes [54].

Con esta técnica es posible realizar el análisis de espectrometría de energía dispersada (EDS). Este procedimiento sirve para identificar y cuantificar la composición elemental de áreas de muestra con tamaño de hasta micrómetros cúbicos. La muestra es bombardeada con electrones del SEM que colisionan con electrones de capas internas del átomo para excitarlo y dejar una vacante. Cuando el átomo excitado vuelve a su estado de mínima energía, desplaza un electrón de un orbital más energético a la vacante que dejó el electrón expulsado. Cuando el electrón libera la energía excedente permite la creación de rayos X que son medidos con un espectroscopio. Como cada elemento posee una energía característica es posible identificarlo con sólo saber la energía.

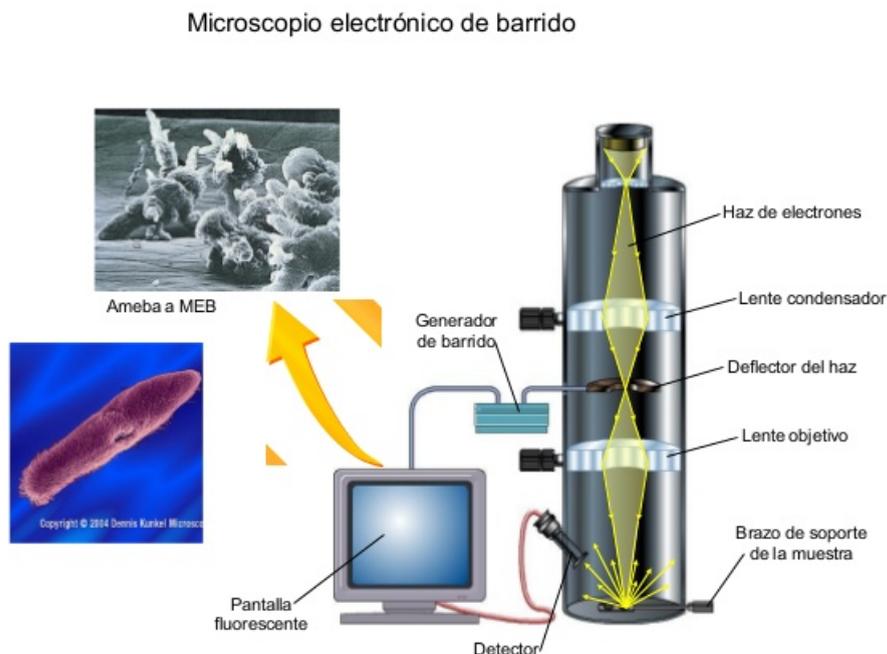


Figura 12: Diagrama del microscopio electrónico de barrido.

Los filtros con depósito fueron caracterizados con el microscopio JEOL 7600F para conocer la morfología de la película y la composición química por energía dispersada [55].

2.3 PROPIEDADES ÓPTICAS

2.3.1 REFLECTANCIA DIFUSA

Es posible realizar un análisis óptico de los materiales midiendo la reflexión de la luz por la superficie de una sustancia en función de la longitud de onda. Principalmente estas mediciones se realizan en longitudes de onda para las que un material es fuertemente absorbente y no es posible obtener un espectro de absorción. Medir la reflectancia R en función de λ proporciona información acerca de la estructura electrónica de los sólidos y el estado de la superficie del material. En general, se utilizan longitudes de onda visibles en el caso de semiconductores y ultravioleta en el caso de aislantes. Existen dos técnicas diferentes para medir la reflectancia: especular y difusa.

La reflectancia difusa consiste en medir la luz que ha sido dispersada por la superficie del material en todas direcciones. Para esto se utiliza una esfera integradora (figura [13]) que se encarga de recoger y enviar a un detector toda la luz que provenga de la muestra sin importar su dirección de salida (Martin, 1993).

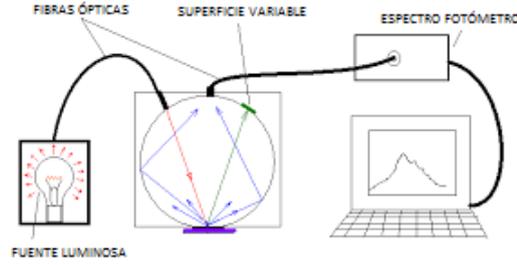


Figura 13: de una esfera integradora.

La esfera integradora se acopla a los espectrofotómetros para aprovechar la fuente luminosa y todo el equipo electrónico. Es posible usar los espectros de reflectancia para calcular la energía del band gap especialmente de materiales que dispersan mucho la luz.

Es posible describir el comportamiento de la luz que viaja en el interior de un material que dispersa la luz con las siguientes ecuaciones:

$$-di = -(S + K)idx + Sjdx \quad (10)$$

$$dj = -(S + K)jdx + Sidx \quad (11)$$

En las ecuaciones i y j son las intensidades de luz que viaja en el interior de la muestra hacia sus superficies iluminadas, y no iluminadas respectivamente; dx es el segmento diferencial a lo largo de la trayectoria de la luz; S y K se llaman coeficientes K-M (Kulbelka-Munk) de dispersión y absorción. Los coeficientes K-M no tienen un significado físico directo. El modelo anterior se conserva cuando el tamaño de la partícula es comparable o menor que la longitud de onda incidente. La reflexión difusa no permite separar las contribuciones de la reflexión, refracción y difracción.

Si tuviéramos una superficie infinitamente gruesa, el espesor y soporte no tendrían ninguna influencia sobre el valor de R . Por lo tanto tendríamos la ecuación de Kulbelka-Munk para cualquier longitud de onda como:

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = F(R_\infty) \quad (12)$$

Donde $F(R_\infty)$ es la función de Kulbelka-Munk, $R_\infty = R_{muestra}/R_{estandar}$ [56].

La energía de la banda prohibida representa la mínima diferencia de energía entre la parte superior de la BV y la parte inferior de la BC. En un semiconductor la banda prohibida

directa tiene un valor igual al del momento de los electrones. Cuando el valor con respecto al momento de los electrones no es el mismo se trata de la banda prohibida indirecta. Es posible representar las BV y BC parabólicamente y obtener una relación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\alpha h\nu = A(h\nu - E_g)^2 \quad (13)$$

Donde α es el coeficiente lineal de absorción del material, $h\nu$ es la energía del fotón y A es una constante de proporcionalidad. Cuando la dispersión del material es perfectamente difusa, el coeficiente de absorción K es igual a 2α . Si tomamos como constante el coeficiente de dispersión de K-M con respecto a la longitud de onda y usamos la función de Kubelka-Munk en la ecuación 19 obtenemos:

$$[F(R_\infty)h\nu]^2 = A(h\nu - E_g) \quad (14)$$

De esta forma es posible obtener $F(R_\infty)$ de la ecuación 18 y graficar $[F(R_\infty)h\nu]^2$ contra $h\nu$ para encontrar el valor de E_g [56].

En un semiconductor de banda prohibida indirecta, la parte superior de BV no tiene el mismo valor de momento que la parte inferior de la BC. En este caso las bandas se relacionan de la siguiente manera:

$$[F(R_\infty)h\nu]^{\frac{1}{2}} = A(h\nu - E_g) \quad (15)$$

Las mediciones de reflectancia difusa se realizaron con un espectrofotómetro Shimadzu 2600 al que se le acopló una esfera integradora y se usó un blanco de $BaSO_4$ como referencia.

2.4 PERFILOMETRÍA

Es posible medir el espesor y rugosidad de las películas delgadas utilizando un perfilómetro mecánico. Éste consiste en una punta móvil que se pone en contacto con la muestra y recorre la superficie aplicando sobre ella una fuerza constante. La punta está conectada a un sistema de medición que registra los movimientos verticales que sufre en su recorrido. Para esto, es necesario que la muestra tenga un escalón y posicionar la punta un poco antes de la frontera entre el escalón formado por la película y la parte sin película para determinar los cambios en el espesor. La rugosidad y el espesor de las muestras se determinó usando un Perfilómetro Mecánico Dektak 150.

2.5 BAÑO QUÍMICO

El depósito por baño químico es una técnica para preparar materiales en películas delgadas a presión atmosférica y temperatura moderada. Con este método es posible fabricar películas delgadas en áreas a bajo costo. Se ha utilizado para preparar películas semiconductoras de calcogenuros, principalmente sulfuros y seleniuros, los cuales tienen importantes aplicaciones relacionadas con energía solar.

La técnica consiste básicamente en una serie de reacciones químicas que se llevan a cabo sobre un sustrato sólido sumergido en la mezcla de reacción. La mezcla típica contiene soluciones acuosas diluidas de una fuente de iones metálicos (generalmente una sal), un agente acomplejante (anión o molécula que se une a un átomo de un metal para formar un ion complejo) y una fuente de iones calcogenuro. Los compuestos iónicos cuando se disuelven en agua se disocian en sus iones correspondientes, de manera que en solución los iones metálicos se encuentran libres. El agente acomplejante (que puede ser un compuesto orgánico), tiene la función de atrapar a los iones metálicos en la mezcla de reacción y liberarlos lentamente [57]. Esto ocurre mediante una reacción de equilibrio como la siguiente:



Donde M representa al ion metálico de valencia n y A al agente acomplejante. $M(A)^{n+}$ se denomina ion complejo. La concentración de los iones metálicos libres a una temperatura dada está determinada por la constante de equilibrio de la reacción representada por la ecuación anterior. Esta constante de equilibrio se denomina constante de estabilidad del ion complejo. Para que los iones metálicos se liberen lentamente es necesario escoger un agente acomplejante adecuado que forme un complejo con el metal con un valor alto de constante de estabilidad. Por otra parte, el anión calcogenuro se genera mediante la hidrólisis del compuesto que lo contiene. Los iones metálicos y calcogenuros producidos de esta manera reaccionan ya sea en el volumen de la solución obteniendo un precipitado del producto, o bien, en la superficie del sustrato mediante un proceso heterogéneo que permita la formación de la película.

El uso de agentes acomplejantes para la liberación lenta de los iones metálicos en la mezcla de reacción es un factor importante debido a que los compuestos depositados son altamente insolubles. Si los iones metálicos no se encuentran acomplejados, existirá una alta concentración de éstos en la mezcla de reacción, y por el principio del producto de solubilidad se tendrá una precipitación espontánea y no gradual. Otro factor que se debe considerar es la disponibilidad de núcleos sobre la superficie del sustrato. Para que ocurra la reacción en la superficie del sólido, ésta debe contener núcleos. Éstos se forman cuando especies metal-hidroxilo se adsorben en la superficie y se combinan con otras especies adsorbidas formando pequeños aglomerados. Al proceso de formación de estos aglomerados se le llama nucleación. Los grupos hidroxilo se sustituyen por iones sulfuro o seleniuro formando una capa inicial de metal-calcogenuro. El depósito de la película ocurre por la condensación de iones metálicos

y calcogenuros sobre la capa inicial.

La composición, estructura y morfología de las películas depositadas por baño químico son altamente sensibles a las condiciones del proceso tales como: las condiciones químicas, temperatura y naturaleza del sustrato.

2.5.1 SUSTRATOS

Para los depósitos por baño químico se usaron filtros circulares (30 mm de diámetro y 5 mm de grosor (± 0.05 mm) de vidrio (sintered disc) de poro 1 (100-160 μm , (figura 14) de la marca PYREX. Este vidrio contiene bórax entre sus ingredientes fundamentales, junto con sílice y álcali. Destaca por su durabilidad y resistencia a los ataques químicos y las altas temperaturas, por lo que se utiliza mucho en utensilios de cocina, aparatos de laboratorio y equipos para procesos químicos. Para las pruebas en el reactor se utilizaron los filtros con una perforación de 3 mm en el centro.



Figura 14: Filtro de vidrio.

La limpieza de los filtros se llevó a cabo con un baño ultrasónico BRANSON 1800 para eliminar residuos de fábrica dentro de los poros como restos de vidrio producidos durante el corte y suciedad ocasionada por la perforación. El proceso consistió en 3 ciclos de 5 minutos con tricloroetileno, acetona y metanol respectivamente. Después se secaron con N_2 comprimido.

2.5.2 SOLUCIONES PRECURSORAS Y DEPÓSITO

Para la solución precursora de acetato de bismuto se pesó acetato de bismuto ($\text{Bi}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ Sigma-Aldrich 99.99 %), según la cantidad necesaria para obtener una disolución con una concentración de 0.05 M y se disolvió en un 25 % v/v de ácido acético. Se mantuvo en agitación y a temperatura constante (50°C) hasta obtener una solución transparente. Pasado el tiempo se agregó poco a poco agua desionizada (75 % v/v) bajo las mismas condiciones durante 15 min. Al final la solución precursora tuvo un pH cercano a 3.

La solución precursora de acetato de zinc se obtuvo pesando acetato de zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich 98 %), según la cantidad necesaria para obtener una disolución con una concentración de 0.2 M y se disolvió en agua desionizada en agitación constante a temperatura ambiente por unos minutos hasta tener una solución transparente. Se agregaron unas gotas de ácido acético para evitar la formación de hidróxidos y precipitados. Al final, la solución presentó un pH cercano a 6.

Para determinar la concentración del depósito se usó la siguiente fórmula:

$$m = PM \times C \times V \quad (17)$$

Donde m es la masa del soluto (en g), PM es el peso molecular (g/mol), C es la concentración deseada y V es el volumen de la solución (L).

Los filtros (figura 53(a)) se introdujeron en vasos de precipitados con 10 ml de la solución precursora respectivamente, y posteriormente se metieron en una mufia OMEGA CN370 a 150° por 20 min. Pasado el tiempo la temperatura se aumentó a 250°C por un periodo de 10 minutos. Finalmente la temperatura se elevó a 450°C durante 30 minutos.

2.6 ROCÍO PIROLÍTICO

La técnica de depósito por rocío pirolítico permite depositar películas delgadas por medio de la atomización de una solución precursora sobre una superficie caliente. Esta solución reacciona con la superficie para formar el compuesto químico deseado. Es posible dividir el proceso en tres etapas principales: atomización de la solución precursora, el transporte del aerosol generado y la descomposición del precursor en la superficie del sustrato.

1. La atomización de la solución precursora puede hacerse con dispositivos neumáticos o ultrasónicos. En el caso del dispositivo neumático la forma de atomizar la solución implica dos fluidos en donde la solución líquida pasa junto con un gas presurizado y, de esta forma, las fuerzas de presión superan la tensión superficial del líquido. El resultado es la formación de gotas que son arrojadas instantáneamente hacia la superficie. En el caso de la atomización ultrasónica el principio básico se basa en la vibración y efectos de cavitación inducidos por la explosión de una solución líquida a un ultrasonido de frecuencia entre 1 kHz y 1MHz. El aerosol es dirigido con ayuda de un gas portador y/o director hacia el sustrato.

Los depósitos, por lo general, son el resultado de las gotas que llegan al sustrato y tienen un tamaño que va desde los micrómetros hasta los sub-micrómetros. Es posible obtener una distribución de gotas más uniforme atomizando la solución por medio de nebulización ultrasónica.

2. El transporte del aerosol se lleva a cabo con ayuda de un gas portador. Es posible que las gotas puedan experimentar evaporación del disolvente durante el transporte hacia el sustrato. Esto implica una reducción del tamaño de las gotas por lo tanto un gradiente de concentración. El precursor precipita en la superficie de la gota, cuando la concentración de superficie excede el límite de solubilidad. Esto resulta en la formación de una costra porosa y partículas huecas, que aumentan la rugosidad de la película.

3. La descomposición del precursor (depósito) ocurre cuando las gotas golpean la superficie del sustrato. En esta etapa se llevan a cabo varios procesos simultáneamente como: evaporación del disolvente residual, difusión de las gotas y descomposición del precursor. Los procesos que se llevan a cabo debido al aumento en la temperatura del sustrato son:
- a) En el régimen más bajo de temperatura las gotas llegan y se difunden sobre el sustrato, donde se evapora el disolvente, se descompone el precursor y se forma el compuesto. Si la temperatura es muy baja puede ocurrir que no todo el disolvente se evapore y no se obtenga el compuesto deseado en su totalidad o se presenten problemas de adherencia.
 - b) A temperaturas mayores a la de ebullición, el disolvente se evapora durante el transporte de las gotas y el precursor incide sobre el sustrato en forma de un precipitado seco, donde se produce su descomposición.
 - c) A temperaturas incluso superiores el disolvente también se evapora antes de que la gota llegue al sustrato. A medida que se aproxima al sustrato, el precursor en forma de precipitado seco se funde y vaporiza, pero al llegar a la superficie, se difunde y descompone formando los compuestos deseados. Esta es una reacción clásica de CVD (chemical vapor deposition), lo que resulta en una película de alta calidad y una alta probabilidad de adherencia.
 - d) A temperaturas más altas se sigue el mismo proceso anterior, sólo que la formación del compuesto deseado se da aún en la fase vapor, llegando éste en forma sólida al sustrato donde sólo se deposita.

El equipo o cámara de rocío pirolítico está compuesto por un sistema de rocío y atomización, un calentador del sustrato con controlador de temperatura, un compresor de aire o tanque del gas portador y rotámetros para medir el flujo de la solución precursora y del gas. Es necesario optimizar los parámetros de depósito para obtener películas delgadas de buena calidad como: la concentración de la solución precursora, la temperatura y los flujos de aire y de solución.

La solución precursora afectará principalmente la morfología y propiedades de la película depositada; el soluto debe ser compatible con el disolvente, de este modo la solución será más estable a presión y temperatura ambiente. Es posible agregar aditivos o modificar el pH a la solución precursora. Por otro lado, la temperatura de evaporación del disolvente y de descomposición del soluto deben ser bajas comparadas con la temperatura del pirólisis, asegurando que la reacción química de los materiales precursores se lleve a cabo.

La concentración de la solución determina la cantidad del compuesto precursor que reacciona sobre la superficie del sustrato. Si la concentración es baja, menor a 0.01 M, la cinética de depósito es muy lenta y las películas son muy delgadas. Por el contrario, si es muy alta, (del orden de decenas de mol/L) la solución se vuelve muy viscosa reduciendo la eficiencia

del rociado. Además, es posible que la energía proporcionada pudiera no ser la suficiente para la descomposición de los precursores, incorporándose éstos a la película depositada.

El tamaño de las gotas está determinado por la tasa de flujo, mientras mayor sea la tasa de flujo, menor será el tamaño de las gotas que se produzcan. Por lo general, no se excede de los 15 L/min pues la turbulencia generada provocaría inestabilidad y un aumento en el tamaño de las gotas, lo que a su vez provocaría una baja calidad de las películas depositadas.

Al mismo tiempo, la tasa de flujo determina la cantidad de solución que incide sobre la superficie del sustrato por unidad de tiempo. Si la tasa de flujo es grande, entonces, es posible que se provoque una evaporación lenta del disolvente generando una película formada principalmente por los compuestos precursores sin que hayan alcanzado a reaccionar. Si la tasa de flujo es pequeña, los tiempos de depósito tendrán que aumentar considerablemente para obtener una película de espesor adecuado.

Se ha encontrado que para el caso de las películas de ZnO por rocío pirolítico es posible usar acetato de zinc como precursor con una concentración de 0.2 M y una temperatura de 450°C. De esta forma es posible obtener películas uniformes formadas por granos pequeños.

También se ha estudiado la incorporación de otros elementos en películas de ZnO para investigar el cambio en sus propiedades físicas y químicas. Entre los elementos utilizados se encuentra el Al que puede incrementar la conductividad eléctrica y eficiencia fotocatalítica sin afectar la transparencia óptica. El Mg es capaz de incrementar el valor de la banda prohibida y por lo tanto incrementar la actividad fotocatalítica [58]. Es posible utilizar otro tipo de elementos dependiendo de las propiedades que se quieran mejorar o cambiar para fines específicos. El depósito de películas delgadas por rocío pirolítico proporciona, por lo antes mencionado, un método de síntesis sencillo, con un alto grado de reproducibilidad y también un bajo costo.

2.6.1 SISTEMA DE DEPÓSITO POR ROCÍO PIROLÍTICO

Ambos sistemas (óxido de zinc y óxido de bismuto) están instalados en cámaras de acrílico independientes conectados a un compresor de aire. Éste se distribuye a un rotámetro de aire y un rotámetro de solución precursora, ambos conectados a una boquilla de atomización. La boquilla se encuentra a una distancia vertical de 30 cm y 26 cm del sustrato, respectivamente. El baño de estaño se encuentra en una placa de calentamiento que usa 5 resistencias de 500 W a 120 V y está conectado a un termopar y un controlador de temperatura. Ambas cámaras cuentan con un sistema extractor de gases.

2.6.2 SUSTRATOS

Las películas de óxido de zinc y óxido de bismuto por rocío pirolítico fueron depositadas en sustratos cuadrados de vidrio Corning de 1 cm x 1 cm. Previamente, los sustratos se limpiaron en un baño ultrasónico por 10 minutos con los siguientes disolventes: tricloroetileno,

acetona y metanol. Una vez limpios, se secaron con nitrógeno comprimido. Sobre una de las caras del sustrato se colocó grafito disuelto con isopropanol. Esta capa fue la que estuvo en contacto con el baño de estaño y la finalidad del grafito fue evitar que el estaño se adhiriera al sustrato. Los depósitos se realizaron por lotes de 8 sustratos.

2.6.3 SOLUCIONES PRECURSORAS Y DEPÓSITO

La solución precursora de acetato de zinc se obtuvo pesando acetato de zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich 98 %), según la cantidad necesaria para obtener una disolución con una concentración de 0.05 M y se disolvió en agua desionizada en agitación constante a temperatura ambiente por unos minutos hasta tener una solución transparente. Se agregaron unas gotas de ácido acético para eliminar partículas que no se disolvieron. Al final, la solución presentó un pH cercano a 6.

Para la solución precursora de acetato de bismuto se pesó acetato de bismuto ($\text{Bi}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ Sigma-Aldrich 99.99 %), según la cantidad necesaria para obtener una disolución con una concentración de 0.05 M y se disolvió en un 25 % v/v de ácido acético. Se mantuvo en agitación y a temperatura constante (50°C) hasta obtener una solución transparente. Pasado el tiempo se agregó poco a poco agua desionizada (75 % v/v) bajo las mismas condiciones durante 15 min. Al final la solución precursora tuvo un pH cercano a 3.

Los sistemas de spray (zinc y bismuto) se pusieron en funcionamiento con las soluciones precursoras respectivas para inundar el sistema y se calentó el baño de estaño a una temperatura de 400°C. La intención de inundar el sistema con las soluciones es asegurarse que el primer rocío que llega al sustrato es de la solución precursora y no del agua de lavado. Se cerraron los flujos y se colocaron los sustratos sobre el baño de estaño y se dejaron un par de minutos para asegurar el equilibrio térmico. Después, se aumentó la temperatura y una vez que se llegó a 450°C se realizó el depósito con un flujo de aire de 80 psig (1028 mL/min) y un flujo de solución de 20 psig (8mL/min) para el depósito de óxido de zinc. El depósito de óxido de bismuto se realizó con un flujo de aire de 85 psig (1028 mL/min) y un flujo de solución de 30 psig (8mL/min). Los tiempos de depósito fueron de 15 y 12 minutos respectivamente.

Las películas se caracterizaron mediante las técnicas de:

- Difracción de rayos X (DRX) con un equipo Rigaku Ultima IV XRD system con una fuente de radiación de $\text{Cu K}\alpha$.
- Espectrometría UV/Vis usando un equipo Shimadzu UV 2600 con una esfera integradora usando un blanco de BaSO_4 como referencia.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM) con un equipo JEOL JSM-7600F.

- Perfilometría usando un perfilómetro mecánico Dektak 150.

Las muestras se esterilizaron por lote en autoclave por una hora.



Figura 15: Esterilización de las muestras.

2.7 ÁNGULO DE CONTACTO

Como ya se mencionó antes, para que los procesos de fotocatalisis heterogénea se lleven a cabo, es necesario que el fotocatalizador y el medio a tratar se encuentren en fases distintas. En este caso se trata de un fotocatalizador sólido sumergido en un medio líquido. Por lo tanto, este proceso se trata de un fenómeno de superficie, pues es donde se llevan a cabo las reacciones. Para conocer qué tanto entra en contacto el medio líquido con el fotocatalizador, se midió el ángulo de contacto que se forma entre la superficie de la película y una gota de agua y una de medio TSB por separado. El valor de dicho ángulo variará según sea la relación existente entre las distintas fuerzas de adhesión y cohesión entre la fase líquida y la sólida. Cuando las fuerzas de adhesión del sólido en su superficie son bastante grandes, en comparación con las fuerzas de cohesión en el líquido, el ángulo de contacto tendrá un valor entre 0 y 30°. Esto implica que el líquido se ve atraído por la superficie del sólido y se extenderá. En el caso del agua se denomina superficie hidrófila. Cuando las fuerzas de adhesión son muy bajas, la superficie tenderá a repeler el líquido y el ángulo será mayor de 90°. En el caso del agua se le llama se denomina superficie hidrófoba. En el caso de encontrar estos comportamientos muy acentuados ($> 120^\circ$) se añade el prefijo súper. La figura 16 muestra este fenómeno.



Figura 16: Esquema del ángulo de contacto de una gota sobre una superficie.

Una forma de entender este comportamiento es con los siguientes parámetros:

- El tipo de líquido y por lo tanto su tensión superficial.
- El tipo de superficie y su composición química.
- La rugosidad de la superficie (figura 17). Por ejemplo, si se tienen protuberancias a escala micro o nanométricas en la superficie, la gota queda apoyada entre los picos de las protuberancias, lo que ocasiona que el contacto total sea menor y su forma sea más esférica (mayor ángulo de contacto).

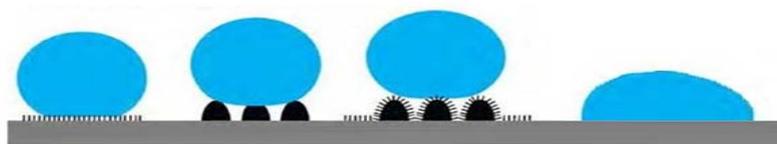


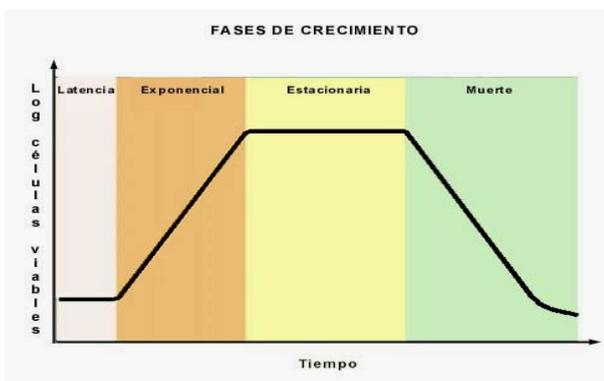
Figura 17: Influencia de la rugosidad en el ángulo de contacto.

Conocer el ángulo de contacto sirve para conocer la interacción entre el medio de cultivo TSB (Trypticase Soy Broth) que se utilizará en los experimentos y las películas delgadas. Para llevar a cabo las mediciones se colocó una gota ($200 \mu\text{L}$) de medio de cultivo sobre la superficie de las películas y de un sustrato de vidrio.

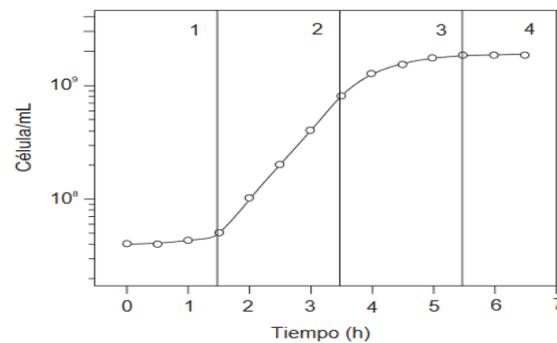
2.8 PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR

Las pruebas de viabilidad celular tienen la finalidad de dar a conocer la magnitud de la población bacteriana. Estas pruebas se basan en la determinación de las bacterias capaces de replicarse o de transferir material genético (viables). Para determinar el tiempo de duración de las pruebas antes de la medición se tomó en cuenta la curva de crecimiento de la bacteria *E. coli*.

La curva normal de crecimiento poblacional bacteriano presenta 4 fases que se pueden ver en la figura 18(a). La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase no hay incremento de células pero hay gran actividad metabólica. En la fase exponencial las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente debido a que hay suficientes nutrientes. En la fase estacionaria las limitaciones de crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente o que el número de células sea elevado para el espacio disponible. Por último, si la incubación continúa después de que una población alcanza la fase estacionaria, la población comenzará a disminuir debido a la falta de nutrientes. A esta fase se le conoce como de muerte. En la bacteria *E. coli* la fase exponencial empieza aproximadamente a las dos horas de incubación y entre las 4 y 5 horas comienza un periodo de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria (figura 18(b)) [59].



(a) Curva de crecimiento poblacional.



(b) Fases de crecimiento *E. coli*.

Figura 18: Curva de crecimiento bacteriano.

Las pruebas que se utilizaron en el trabajo fueron las siguientes: turbidimetría, conteo en placa y microscopía de fluorescencia. Se determinó que los tiempos de medición serán a las 4 y 24 horas de haber comenzado al prueba. La medición a las 4 horas tiene el propósito de medir el cultivo en el periodo de transición entre la fase exponencial y estacionaria. Esta hora también se eligió por cuestiones de horario del laboratorio. Se decidió medir a las 24 horas para dar seguimiento al proceso.

2.8.1 TURBIDIMETRÍA

La turbidez se define como la reducción de la transparencia de un líquido causado por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. Puesto que es un indicador de apariencia óptica ocasionado por la dispersión y la absorción de la energía lumínica a través del líquido, la turbidez sólo puede ser medida usando técnicas ópticas. Este fenómeno se fundamenta mediante la ley de Lambert-Beer (ecuación 18), en la que la turbidez es proporcional a la concentración C de partículas. Un haz de radiación monocromática con intensidad I_0 llega al medio absorbente perpendicular a la superficie. Luego, pasa a través de la longitud X del medio, que contiene partículas absorbentes que bloquearán la transmisión de la luz. La intensidad de la luz disminuye (I) como resultado de la absorción y la dispersión. Si el material se compone de partículas con diferentes coeficientes de absorción (αA y βB), es igual a la suma de los coeficientes de absorción y de dispersión de todas las partículas.

$$I = I_0 e^{-[\alpha A + \beta B]XC} \quad (18)$$

En el caso de bioprocesos, las muestras que se miden son los medios de cultivo donde la turbidez producida se debe al crecimiento de microorganismos. Las muestras a determinar son generalmente traslucidas cuando no presentan crecimiento microbiano. La proporcionalidad entre la intensidad de la luz incidente y la luz dispersada por el medio depende del tamaño y la forma de las células que se encuentren en el medio que se esté analizando. También puede ser afectada por las condiciones ambientales. La correlación entre la concentración de partículas y la turbidez, depende, en el caso de cultivos bacterianos, de las especies analizadas, y en ocasiones, incluso de la cepa específica utilizada. En soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco de los microorganismos. Para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una curva de calibración con cada tipo de microorganismo. Sólo de esta forma es posible relacionar la absorbancia o densidad óptica (O.D.) con el número de microorganismos totales o con Unidades Formadoras de Colonias (UFC's). La medición de la turbidez se usa para estimar los indicadores de crecimiento de bacterias como una alternativa a los recuentos de las placas tradicionales; si bien es un método de medición más rápido presenta varias desventajas como problemas asociados al medio de cultivo, homogeneidad, la presencia de partículas ajenas o microorganismos muertos [60]. Su utilización se ha incrementado como nueva tendencia en la microbiología predictiva. La unidad de medición es la Unidad Nefelométrica de Turbidez (UNT). Para las mediciones de densidad óptica se utilizó un biofotómetro Eppendorf D30 (longitud de onda de 600 nm) con una calibración $O.D. = 1$ que es directamente proporcional a una concentración de 1×10^9 cel/mL [60].

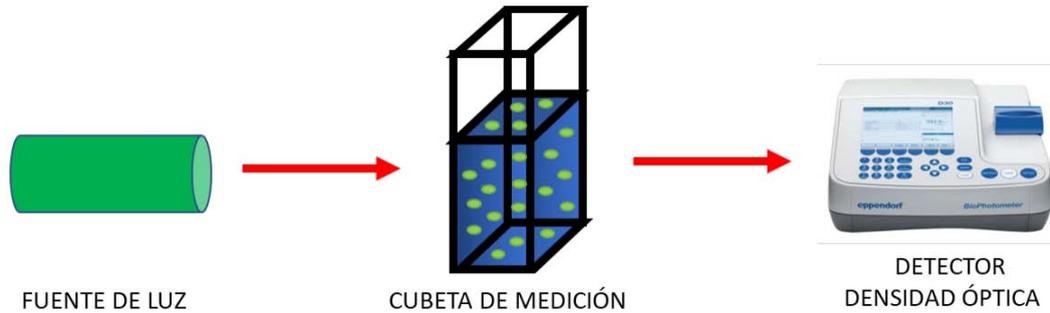


Figura 19: Esquema medición de turbidez.

Previo a las pruebas se obtuvieron 1.5 mL de suspensión de bacterias ajustada a una O.D. = 1. Posteriormente se tomaron 100 μL de la suspensión, se agregó en un nuevo tubo de centrifugado y se adicionaron 900 μL de medio TSB enriquecido para disminuir la concentración de bacterias. Este procedimiento se repitió para obtener diluciones hasta llegar a una concentración de $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$.

2.8.2 CONTEO EN PLACA

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en una muestra, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. La técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias (CFU's) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de la muestra bajo estudio. Ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar una colonia.



Figura 20: Vaciado y extendido en placa.

Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen diluciones decimales necesarias de la muestra antes de ponerla en el medio de cultivo. Este método se utiliza principalmente para la cuantificación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Para

ver el procedimiento paso a paso puede consultarse [61].

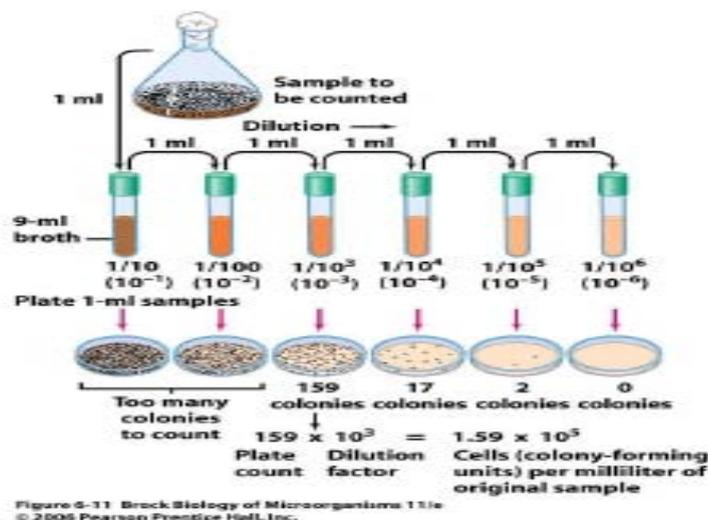


Figura 21: Diluciones y cuenta en placa.

El método permite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de diversos factores. Es muy importante apegarse a la técnica y controlar cuidadosamente las condiciones.

2.8.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso de interacción entre la radiación y la materia en el cual un material absorbe radiación de una fuente específica y muy rápidamente emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido. Cuando la fluorescencia es ocasionada por la absorción de fotones se llama fotoluminiscencia, donde la energía de excitación absorbida es inmediatamente emitida como radiación luminosa. La molécula responsable de este fenómeno se llama fluorocromo. El proceso se puede ver en la figura [22]

1. La absorción de la luz de excitación eleva la molécula de fluorocromo a un estado de excitación con un mayor contenido de energía, S1.
2. En este estado de excitación se mantiene un tiempo determinado, en el cual, la molécula sufre cambios conformacionales e interacciona con las moléculas de su entorno. Como consecuencia, parte de la energía del estado S1 se disipa, creándose un estado S1' de menor energía.
3. Pasado este tiempo de excitación, la molécula emite luz de menor energía, regresando a su estado fundamental, S0.

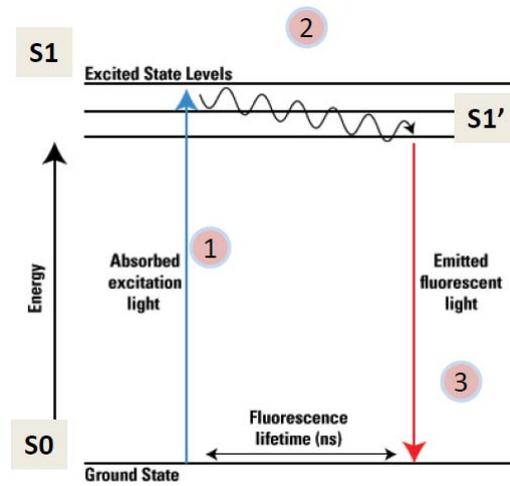


Figura 22: Diagrama del proceso de fluorescencia.

Las bacterias se tiñeron con el fluorocromo calceína acetoximetilada (calceína-AM) que tiñe las células y emite una fuerte fluorescencia verde (λ_{ex} 494 nm, λ_{em} 517 nm). La observación se llevó a cabo con un microscopio Nikon Eclipse Ni conectado a una lámpara de mercurio de alta presión Nikon y una cámara DS-Ri1 también Nikon.

CAPÍTULO 3: DESARROLLO EXPERIMENTAL

Antes de poder utilizar el reactor solar, fue necesario caracterizar los materiales (ver la sección Caracterización de los Depósitos) y por supuesto, estudiar su interacción con el microorganismo seleccionado mediante pruebas de laboratorio. Las pruebas se realizaron en el laboratorio de Biología Periodontal ubicado en la Unidad de Posgrado en Odontología dentro de Ciudad Universitaria, México. Las pruebas se realizaron utilizando las películas de óxido de bismuto y óxido de zinc depositadas por spray pirólisis para evaluar su efecto antibacterial usando la especie *E. coli*. Como se mencionó antes, el objetivo de utilizar películas delgadas es tener un mejor control al momento de cuantificar células vivas durante el procesos de fotocatalisis.

La especie *E. coli* (ATCC33780) fue descongelada, transferida y purificada en placas de Trypticase Soy Agar (TSA) por periodos de 24 horas a 35°C respectivamente y previo a cada prueba. Se utilizó un Biofotómetro (600 nm) para obtener una concentración de bacterias de 1×10^9 (con una densidad óptica O.D. = 1). A partir de dicha concentración se realizaron diluciones dependiendo la prueba.

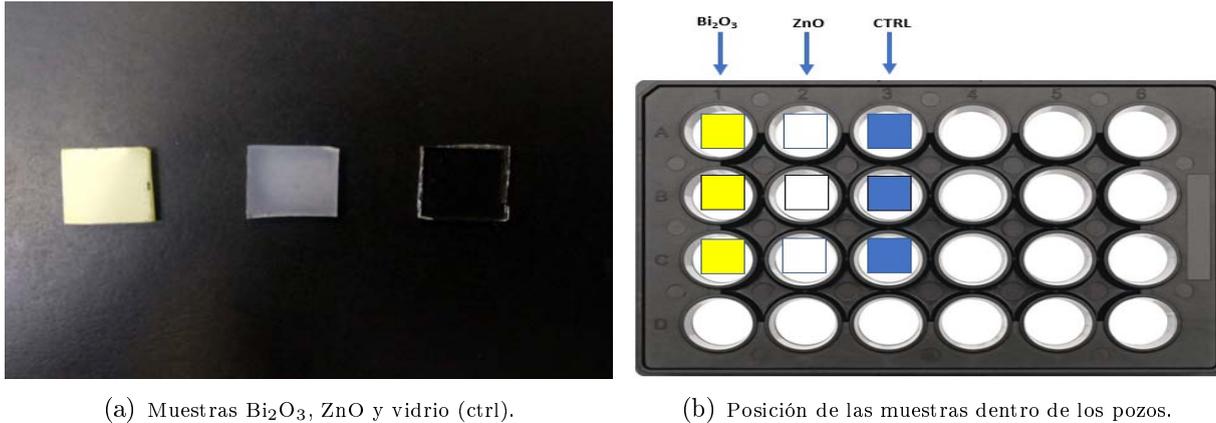
Para los experimentos se usaron dos lámparas diferentes por separado; una lámpara de luz UV (365 nm) y una lámpara de luz blanca ($\lambda > 400$ nm). La intención a futuro es usar un reactor solar, el uso de las dos lámparas mencionadas podría darnos una idea del comportamiento de los materiales bajo la región UV y la región del visible del espectro electromagnético de radiación solar. De esta forma se podrán escalar los resultados y determinar si es posible usar los materiales bajo las condiciones de iluminación del reactor solar. Como ya se mencionó las mediciones se realizaron a las 4 y 24 horas de iniciada la exposición de las muestras a la radiación. Durante las pruebas antibacteriales se contrastarán los resultados entre las muestras con y sin película para garantizar que las bacterias estén bajo los mismo parámetro o posibles errores sistemáticos.

3.1 PRUEBAS ANTIBACTERIALES

3.1.1 MONTAJE EXPERIMENTAL

Una vez que las muestras fueron esterilizadas se colocaron individualmente en placas de 24 pozos con la siguiente configuración que se muestra en la figura [23](#). En los pozos A1, B1

y C1 se colocaron sustratos con depósito de Bi_2O_3 ; en los pozos A2, B2 y C2 se colocaron sustratos con depósito de ZnO ; en los pozos A3, B3, C3 se colocaron sustratos de vidrio sin depósito como control. Esta configuración se utilizó para facilitar la inoculación y se repitió en otras tres placas más para tener un total de 4 con las mismas características.



(a) Muestras Bi_2O_3 , ZnO y vidrio (ctrl).

(b) Posición de las muestras dentro de los pozos.

Figura 23: Disposición de las muestras para las pruebas antibacteriales.

A cada pozo se le adicionaron $200 \mu\text{L}$ de suspensión de bacteria ajustada a una concentración de bacterias de $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$ más $1800 \mu\text{L}$ de medio TSB (Trypticase Soy Broth) para obtener un volumen total de $2000 \mu\text{L}$ con una concentración final de $1 \times 10^4 \text{ cel/mL}$. Dos de las placas se colocaron bajo radiación de la lámpara de luz UV de forma aislada (figura 24(a)) y con agitación constante (240 rpm), las otras dos placas se colocaron bajo radiación de la lámpara de luz blanca también de forma aislada (figura 24(b)) y con agitación constante (240 rpm). La temperatura se mantuvo a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.



(a) Muestras bajo luz UV.

(b) Muestras bajo luz blanca.

Figura 24: Configuración del sistema experimental.

Después de 4 horas se tomó una placa de cada sistema para ser analizado mientras que las otras dos placas restantes se analizaron pasadas 24 horas. Este mismo procedimiento se

repitió pero usando una concentración final de 1×10^8 cel/mL.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD BACTERIANA

Después del tiempo de exposición se tomó 1.8 mL del sobrenadante de cada pozo y se analizó la densidad óptica de cada uno en un biofotómetro como se muestra en la figura [25\(a\)](#).



Figura 25: Diagrama del proceso experimental.

Pensando en que posiblemente existan bacterias adheridas a la superficie de las muestras y que éstas aún sean viables, todas las muestras se sometieron a tres lavados con 1 mL de medio TSB respectivamente. Después de los lavados las muestras se cambiaron a pozos de cultivo nuevos como se muestra en la figura [26](#).

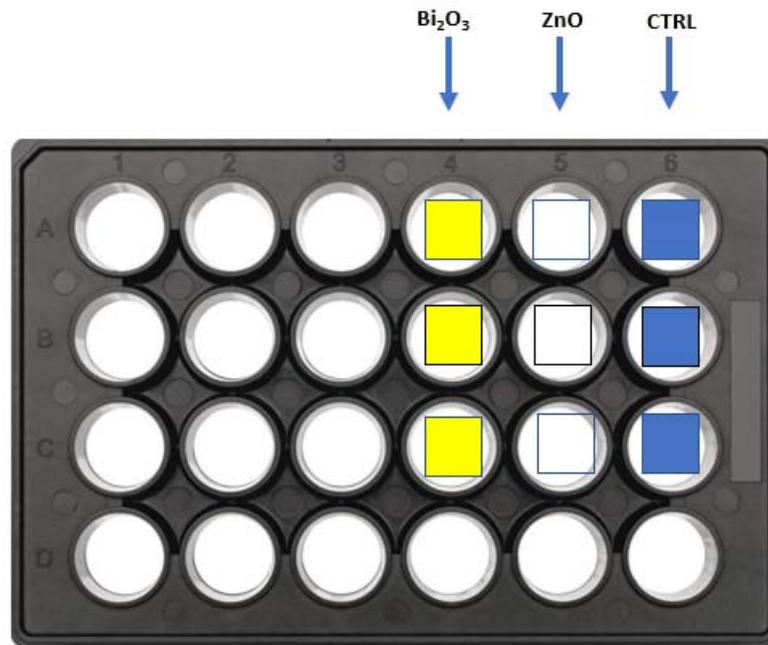


Figura 26: Lavado de películas.

A cada pozo se añadieron 2 mL de medio TSB y cada placa se cubrió (sin tapa) con plástico KleenPack. Cada pozo se sonicó con ayuda de un sonicador ultrasónico (Ultrasonic Processor, 1 watt a pulso continuo) para desprender cualquier bacteria que haya quedado adherida en la superficie de las muestras (figura 25(b)). Se limpió el aparato después de usarse con cada pozo con cloro, alcohol y agua bi-distilada para evitar contaminación de un pozo a otro. Al término de la sonicación se tomó 1.8 mL del sobrenadante de cada pozo para medir la densidad óptica y los 0.2 mL restantes de cada pozo se usaron para medir unidades formadoras de colonias CFU's mediante sembrado en placa agar (Trypticase Soy Agar, TSA) (figura 27).

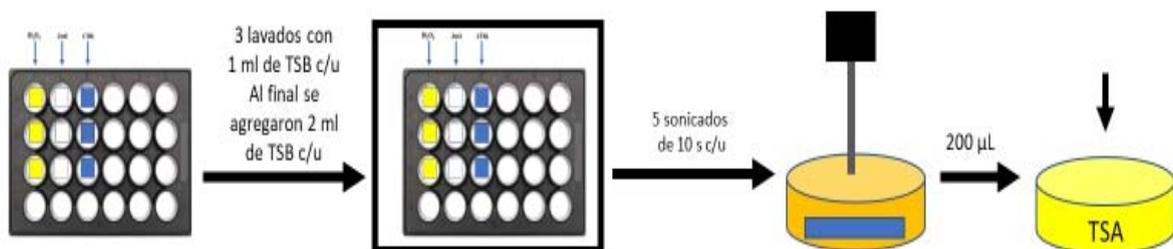


Figura 27: Procedimiento para el sonicado de las muestras.

Previo al sembrado se realizaron diluciones para facilitar el conteo de CFU's y cada una se sembró (figura 28)³. Todas las placas se dejaron incubar por un periodo de 24 horas a

³Cuando se usó la concentración inicial de 1×10^4 cel/mL se realizaron 2 diluciones para al prueba de 4

una temperatura de 35°C antes de realizar los conteos. Todos los resultados se graficaron y se compararon con los resultados de la caracterización de cada material a fin de relacionarlos.

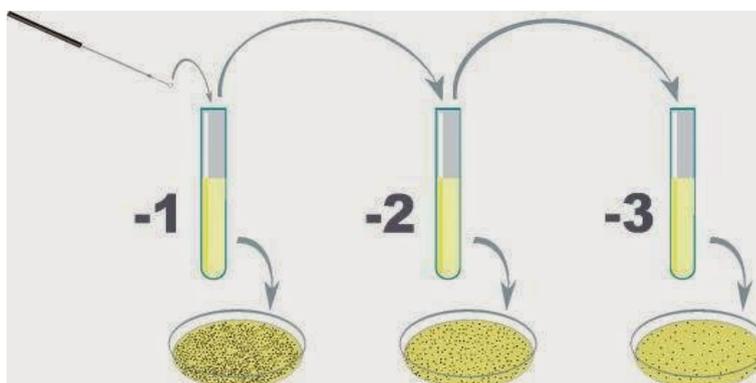


Figura 28: Diluciones para el sembrado en placa TSA.

3.3 PRUEBAS DE ADHESIÓN BACTERIANA

3.3.1 ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA

Por último, se realizó la prueba de fluorescencia para contabilizar el número de bacterias adheridas en las muestras al término de cada tiempo de exposición. Después del lavado de cada muestra se le agregaron 3 μL del reactivo calceína-AM preparado según las especificaciones del fabricante. Las muestras se dejaron reaccionar en completa oscuridad por 15 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua bi-distilada para quitar el exceso de reactivo. Se colocó una gota de aceite de montaje entre la muestra y el cubreobjetos. Las muestras se analizaron con microscopía de fluorescencia (Microscopio Nikon Eclipse Ni) a 40x y 100x. También se analizó una posible reacción entre el reactivo y los depósitos de ZnO y Bi_2O_3 para descartar cualquier efecto de interferencia.

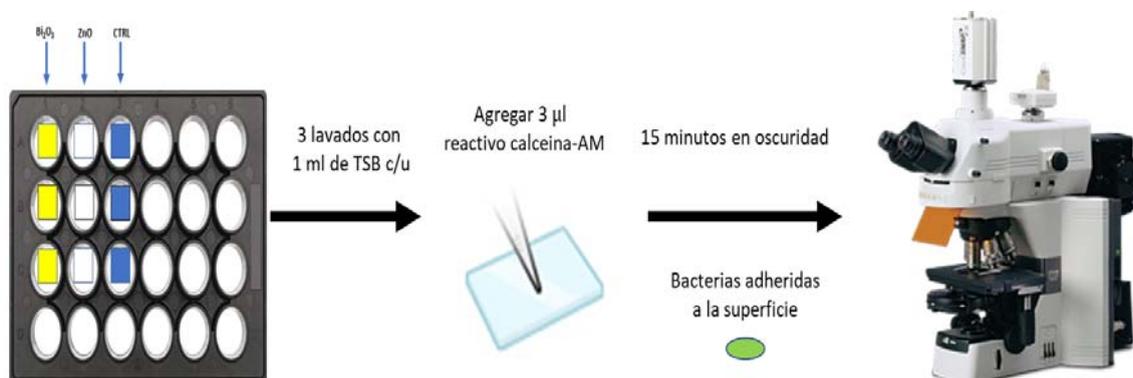


Figura 29: Procedimiento prueba de fluorescencia.

horas y 3 para la de 24 horas. Para la concentración inicial de 1×10^8 cel/mL fueron 5 y 6 respectivamente.

3.3.2 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El análisis del estado de las bacterias que pudieron quedar adheridas a las películas se realizó con un microscopio de barrido (SEM). Para preparar las muestras, las películas se lavaron y se fijaron las posibles bacterias adheridas agregando a cada pozo 1 mL de glutaraldehído al 2%, se selló la placa con parafilm y se mantuvo en refrigeración durante 6 días. Pasado este tiempo, se retiró el glutaraldehído y realizaron 3 lavados de 0.05 mL con una solución buffer de fosfato (7.2 pH y 0.1 M); se deshidrataron con una serie gradual de 2 lavados de etanol a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 por ciento respectivamente). Una vez que las muestras estuvieron deshidratadas se introdujeron al microscopio para su análisis.

3.4 FABRICACIÓN DEL REACTOR

El diseño del reactor se realizó con el programa INVENTOR para poder maquinar las piezas necesarias con un torno CNC.

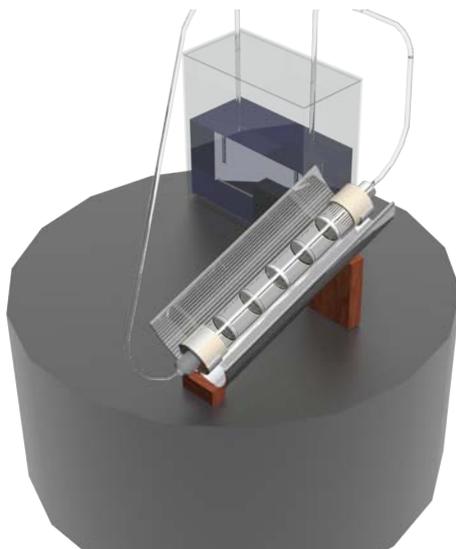


Figura 30: Diseño del reactor con el programa INVENTOR.

Para las piezas de metal se utilizó acero 316 para asegurar que fuera inerte con el agua. La superficie reflejante se fabricó con hierro colado y una capa de aluminio usado para hornos solares. La base se fabricó en madera; los conectores, contenedor y mangueras se eligieron de acuerdo a su grado de resistencia para ser esterilizados con autoclave. El tubo receptor está hecho de vidrio de boro silicato.

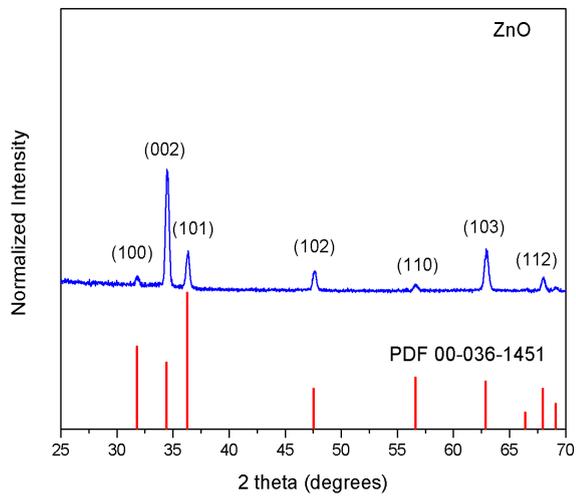
PIEZA	MATERIAL	ESPECIFICACIONES
TAPAS DEL TUBO RECEPTOR	ACERO 316	4 cm de diámetro externo 3 cm de diámetro interno (± 0.01 mm)
SUPERFICIE REFLEJANTE	HIERRO COLADO, ALUMINIO	Superficie parabólica compuesta con un ángulo de aceptación 1
TUBO RECEPTOR	VIDRIO	34 mm de diámetro externo 32 mm de diámetro interno 25 cm de largo (± 0.0001 mm)
BASE	MADERA	Ángulo de inclinación de 19°
CONECTORES	NPTF	Un cuarto de pulgada
BOMBA	PLÁSTICO	120 volts 341 L/hr
MANGUERA	PLÁSTICO	0.8 m de altura 50 cm por tramo
CONTENEDOR	Vidrio	3 litros Hermético Vi-Lab
SOPORTE FILTROS	ACERO 316	Espárrago 25 cm de largo 3 mm de diámetro

Tabla 3: Especificaciones de las piezas del reactor.

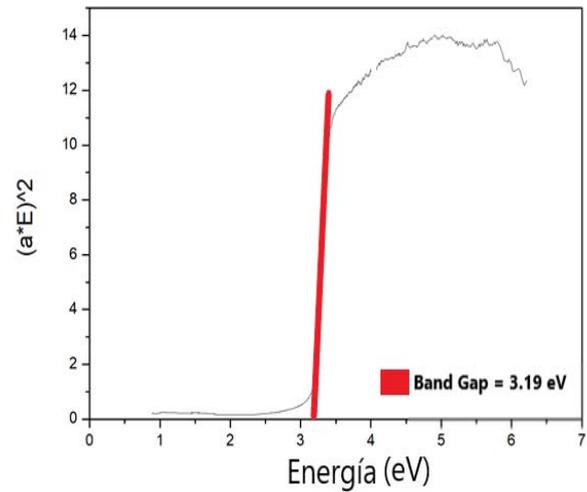
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS DEPÓSITOS

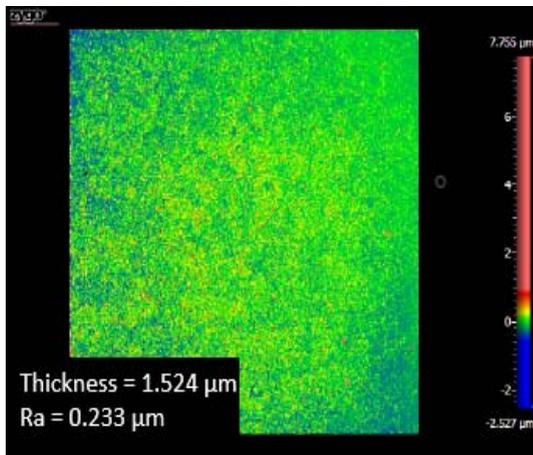
Para las películas de ZnO el patrón de difracción de rayos X (figura 31(a)) muestra reflexiones en los planos (100), (002), (101), (102), (110), (103) y (112) que son características de la fase hexagonal tipo wurtzita del ZnO según la carta cristalográfica PDF 00-036-1451. Se observa que la película de ZnO tiene un crecimiento preferencial a lo largo del plano (002). Así mismo, las películas presentan un ancho de banda prohibida de 3.19 eV (figura 31(b)). La masa promedio de la película de ZnO fue de 23.0 ± 0.1 mg. Las mediciones de perfilometría mostraron que las películas presentan un espesor promedio de 1524 ± 5 nm y una rugosidad (Ra) de 233 ± 5 nm (figura 31(c)) .



(a) XRD



(b) Bang Gap



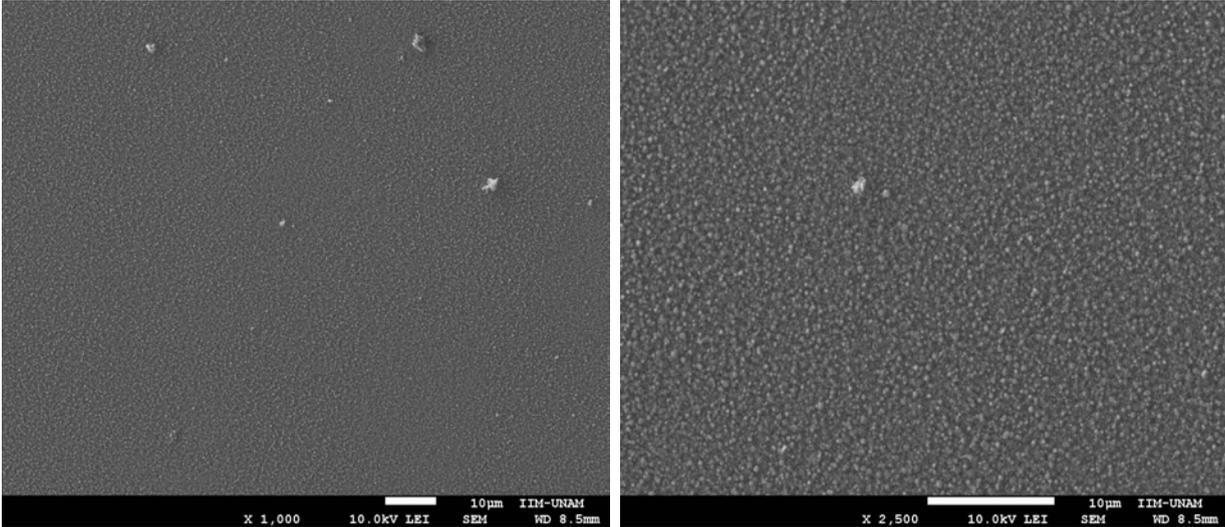
(c) Rugosidad



(d) Película ZnO

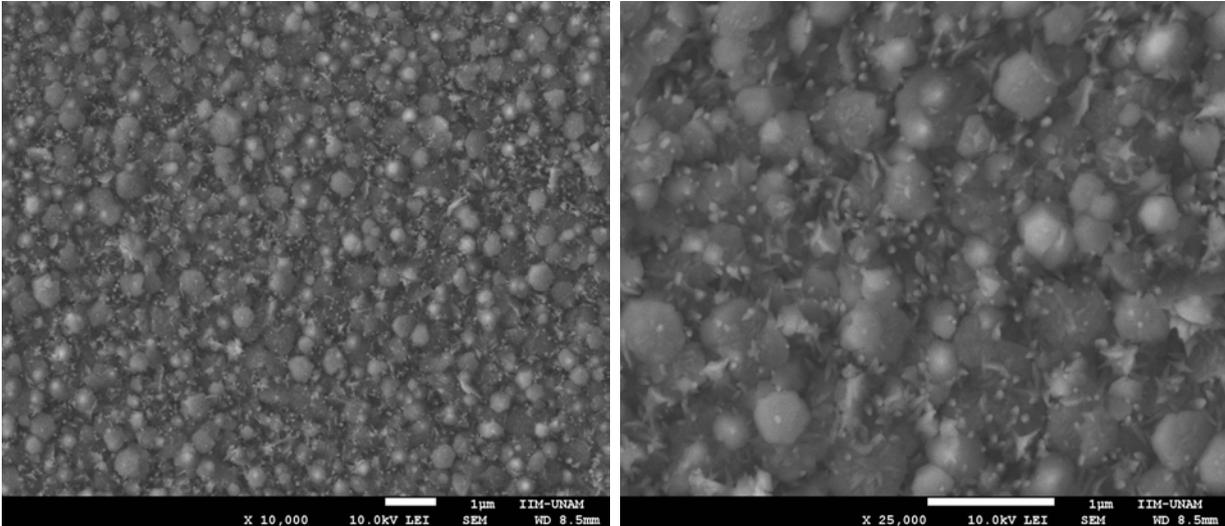
Figura 31: Caracterización de la película de ZnO

Las pruebas de SEM muestran que la topografía de las películas de ZnO no presentan irregularidades significativas y se aprecia que el depósito es bastante homogéneo. Es posible que esto no afecte a la adhesión de las bacterias en la superficie. Un posible comparativo entre el tamaño de las bacterias y la superficie de la película de ZnO se muestra en la figura [32\(f\)](#).



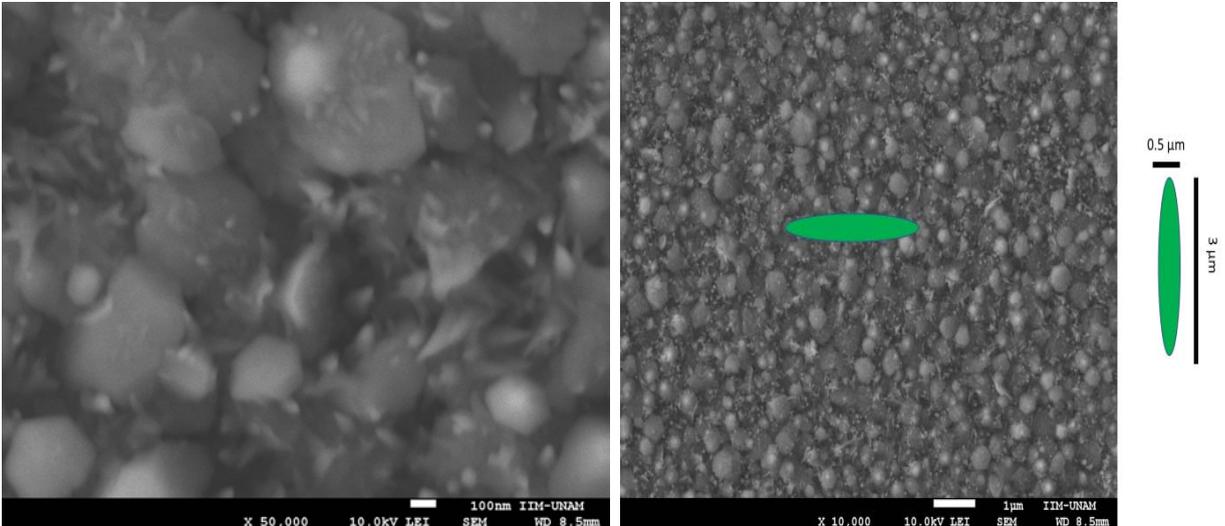
(a) 1000x

(b) 2500x



(c) 10000x

(d) 25000x

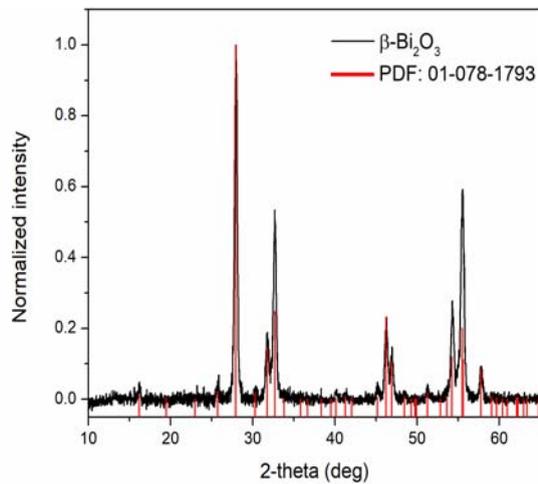


(e) 50000x

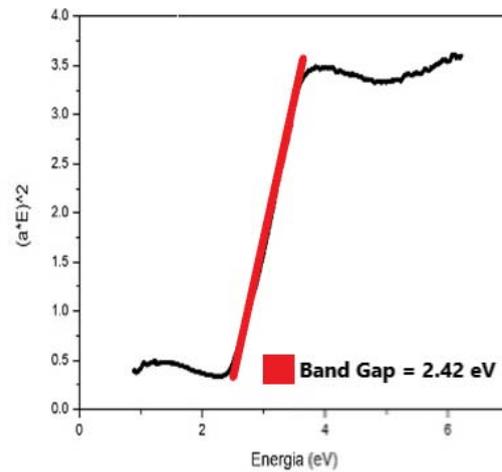
(f) Comparativo entre el tamaño de una bacteria y la superficie de la muestra de ZnO

Figura 32: SEM de la película de ZnO

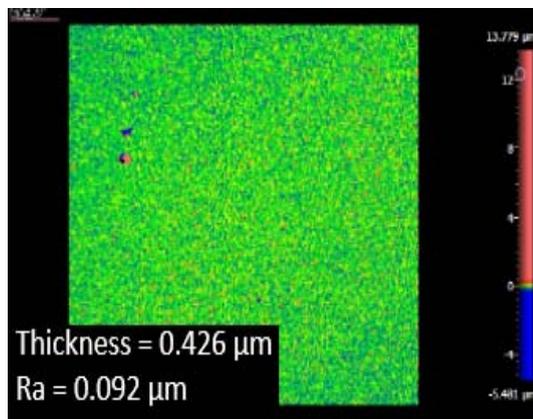
El patrón de difracción de las películas de Bi_2O_3 (figura 33(a)) muestra que el material presenta fase beta con una estructura tetragonal según la carta cristalográfica PDF 01-078-1793. También se encontró que las películas presentan un ancho de banda prohibida de 2.42 eV (figura 33(b)). La masa promedio de la película de Bi_2O_3 fue de 12.4 ± 0.1 mg. Las mediciones de perfilometría mostraron que las películas presentan un espesor promedio de 426 ± 5 nm y una rugosidad (R_a) de 92 ± 5 nm (figura 33(c)).



(a) XRD



(b) Bang Gap



(c) Rugosidad

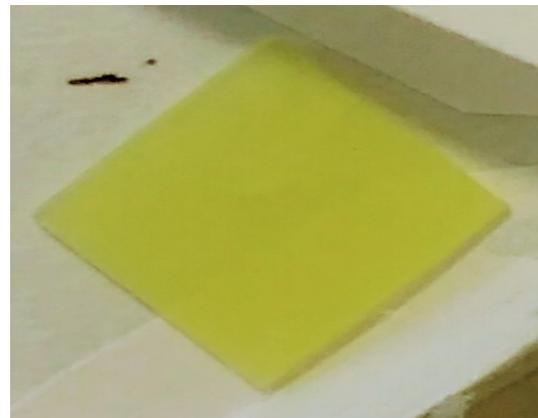
(d) Película Bi_2O_3

Figura 33: Caracterización de la película de Bi_2O_3

Para las películas de Bi_2O_3 las pruebas de SEM muestran que éstas presentan irregularidades en la superficie. Se aprecian pequeños cúmulos formados debido a la técnica de depósito (figuras 34(c) y 34(a)). Si tomamos en cuenta que el tamaño de las bacterias es de $0.5 \mu\text{m}$ de ancho por $3 \mu\text{m}$ de largo, es probable que dichas irregularidades sean significativas en cuanto a una posible adhesión de las bacterias en la superficie. Un posible comparativo entre el tamaño de las bacterias y la superficie de la película de Bi_2O_3 se muestra en la figura 34(f).

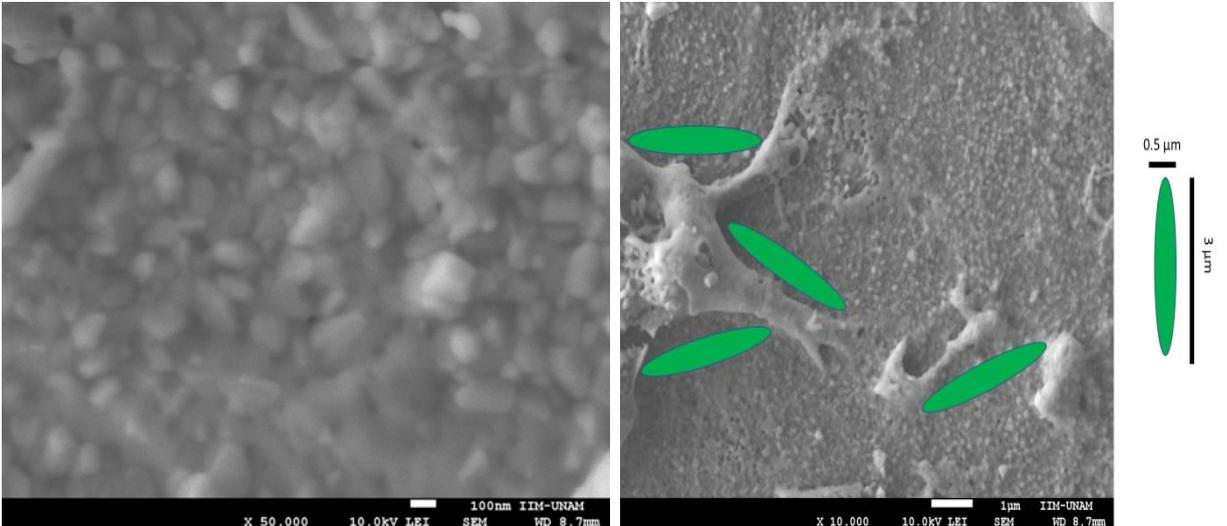
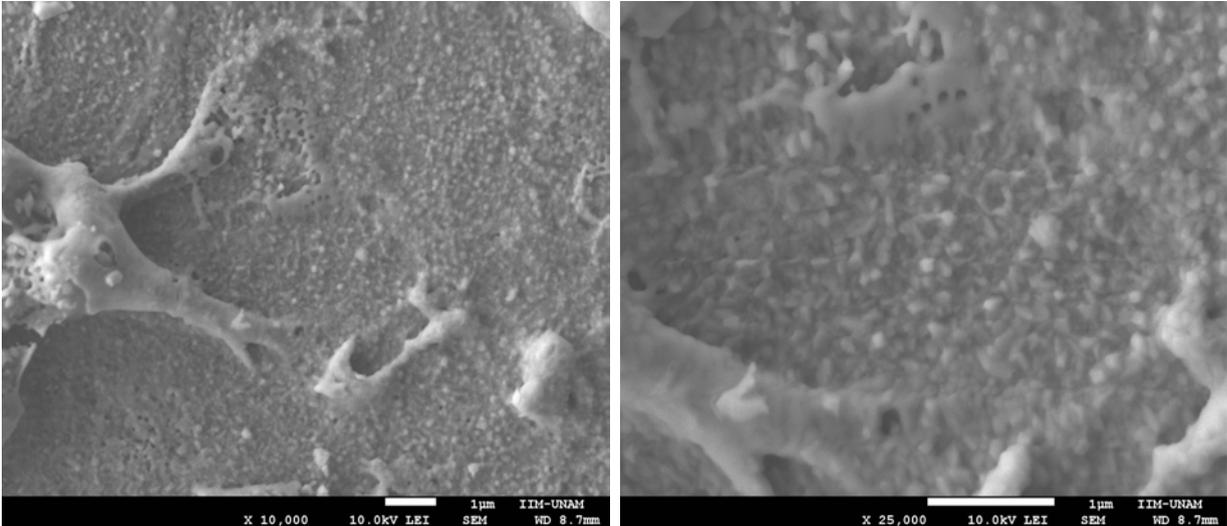
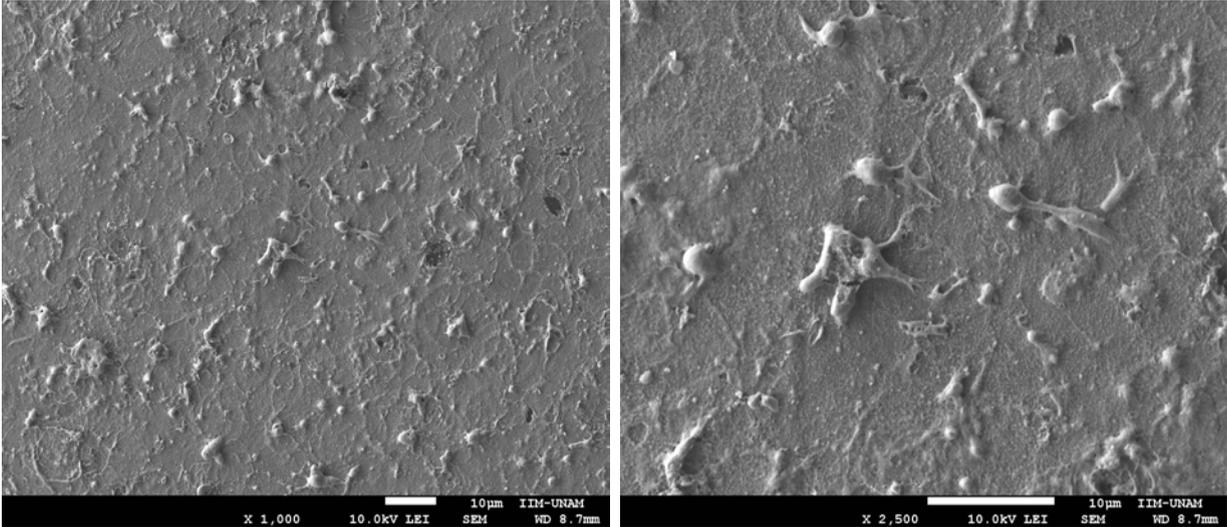


Figura 34: SEM de la película de Bi_2O_3

Los valores del ancho de banda prohibida de cada material indican que las películas de óxido de zinc son capaces de absorber radiación UV (3.19 eV), mientras que las películas de óxido de bismuto lo hacen mejor en la región del visible (2.42 eV). Por lo tanto, el conjunto de ambos materiales permite trabajar en toda la región del UV-Vis, misma que es capaz de proporcionar la radiación solar.

La superficie de la muestra de ZnO se aprecia más homogénea con respecto a la de Bi₂O₃, esta última parece tener elevaciones de forma irregular. Es decir, la topografía es más lisa en las películas de ZnO mientras que en las de Bi₂O₃ el relieve podría ser un factor para su interacción con las bacterias debido a su tamaño (figura 34(f)). Además de que el espesor de las muestras de Bi₂O₃ es mucho menor (un orden de magnitud), la masa depositada también lo es (12.4 mg vs 23.0 mg).

4.1.1 RESULTADOS ÁNGULO DE CONTACTO

Los resultados del ángulo de contacto entre el medio de cultivo (200 μ L) y las películas se muestra en la figura 35 y en la tabla 4.

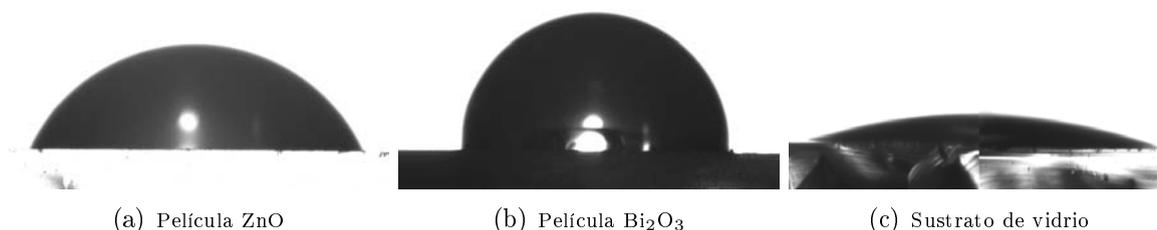


Figura 35: Ángulo de contacto entre medio TSB y las muestras.

PELÍCULA	MEDIO	ÁNGULO $\pm 0.05^\circ$
ZnO	TSB	61.85°
Bi ₂ O ₃	TSB	91.03°
VIDRIO	TSB	16.12°

Tabla 4: Ángulo de contacto.

El ángulo de contacto que forma el medio TSB con la película de Bi₂O₃ es mayor a 90°, mientras que en el vidrio es menor a 30°. Es posible que la morfología de la película de Bi₂O₃ afecte a la fuerza de adhesión aunado a la fuerza de cohesión presente en la gota de medio TSB y esto provoque un mayor ángulo de contacto. Este comportamiento puede afectar al inicio de las pruebas por la metodología que se usa al inocular las bacterias en los pozos. El propósito de colocar 200 μ L de suspensión de bacteria sobre las películas y

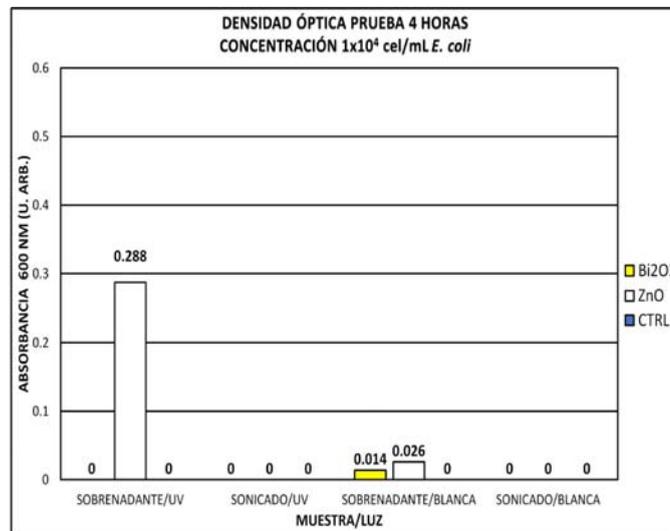
después ajustar el volumen adicionando $1800 \mu\text{L}$ es para asegurar que las bacterias estarán sobre la superficie deseada. Sin embargo, el ángulo de contacto formado sobre la película de Bi_2O_3 podría afectar esta afirmación debido a que el volumen que se adiciona desplazaría a la suspensión de bacterias previamente colocada⁴. Lo contrario sucedería para el vidrio, pues como el ángulo es menor a 30° la interacción entre el volumen adicionando y la suspensión no sería significativa. Puesto que el ZnO presenta un ángulo de 60° podemos esperar que el comportamiento sea intermedio.

⁴Esto debe ser considerado entonces como un error sistemático

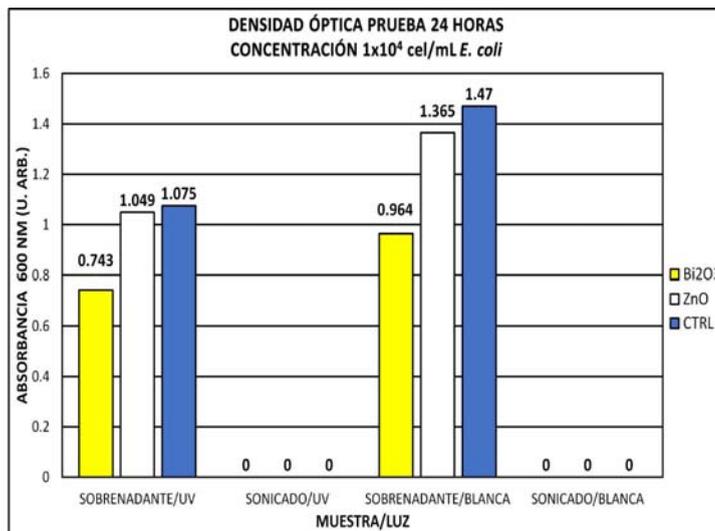
4.2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD BACTERIANA

4.2.1 RESULTADOS DENSIDAD ÓPTICA Y SEMBRADO EN PLACA

Los resultados de la densidad óptica usando una concentración inicial de 1×10^4 cel/mL al término de 4 y 24 horas de exposición y después de sonicar las muestras fueron los siguientes:



(a) Después de 4 horas



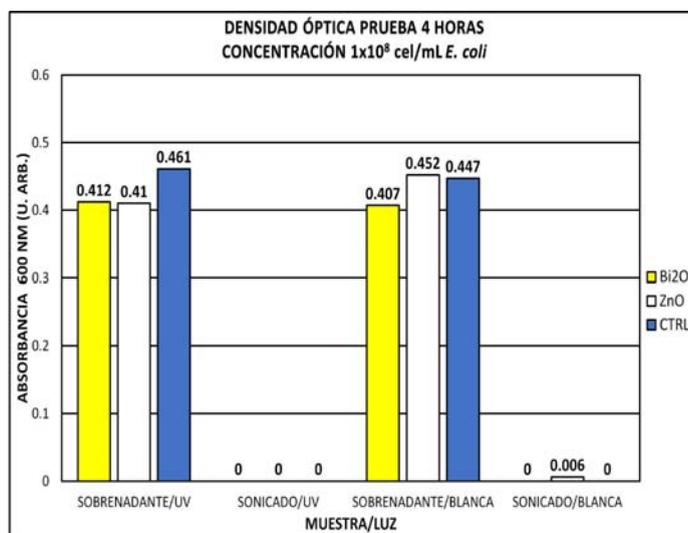
(b) después de 24 horas

Figura 36: Resultados O.D. con una concentración inicial de 1×10^4 cel/mL

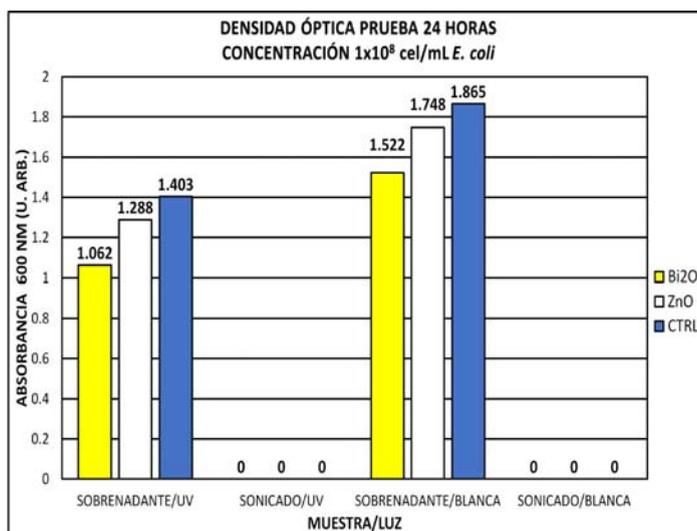
En la figura 36(a) se muestra que la densidad óptica del sobrenadante después de 4 horas es prácticamente cero tanto para luz UV como para luz blanca, con excepción del ZnO

que muestra un valor de 0.288 que es mayor en comparación con la muestra control. Este resultado muestra la sensibilidad del biofotómetro al medir la densidad óptica, pues el valor puede deberse a pequeñas partículas desprendidas de la película. Después de 24 horas de exposición se aprecia que el sobrenadante de las muestras de Bi_2O_3 es menor en comparación con las otras muestras (figura 36(b)). El hecho de que en el vidrio haya una disminución en la medición cuando se usa luz UV implica que ésta tiene un efecto sobre las bacterias.

Los resultados de la densidad óptica usando una concentración inicial de $1 \times 10^8 \text{ cel/mL}$ al término de 4 y 24 horas de exposición y después de sonicar las muestras fueron los siguientes:



(a) OD 1×10^8 células/mL / 4 horas



(b) OD 1×10^8 células/mL / 24 horas

Figura 37: Resultados O.D. con una concentración inicial de $1 \times 10^8 \text{ cel/mL}$

En la figura 37(a) se muestra que la densidad óptica del sobrenadante después de 4 horas es menor para el Bi_2O_3 y el ZnO en comparación con el vidrio. El valor para el ZnO bajo luz

blanca puede ser de nuevo un reflejo de la sensibilidad de la medición. Después de 24 horas, el Bi_2O_3 sigue presentando un valor menor en comparación con las otras dos muestras para ambas luces. De nueva cuenta existe una disminución debido al hecho de usar luz UV.

La densidad óptica ocasionada por las bacterias desprendidas después de sonicar las muestras siempre fue cero para ambas concentraciones iniciales. Eso no necesariamente significa que no haya bacterias adheridas sino que posiblemente no son detectables debido a su cantidad. Es por eso que el sobrenadante después de sonicar las muestras se sembró para su posible conteo en placa.

Los resultados del conteo en placa fueron los siguientes:

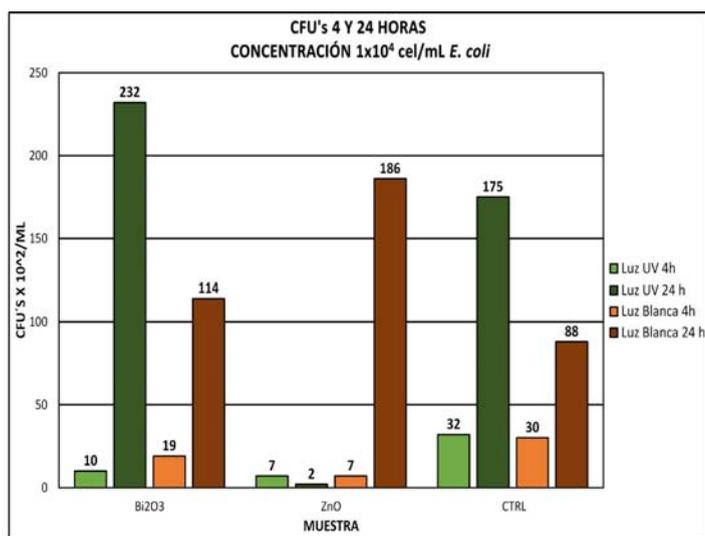


Figura 38: CFU's con una concentración inicial de 1×10^4 cel/mL .

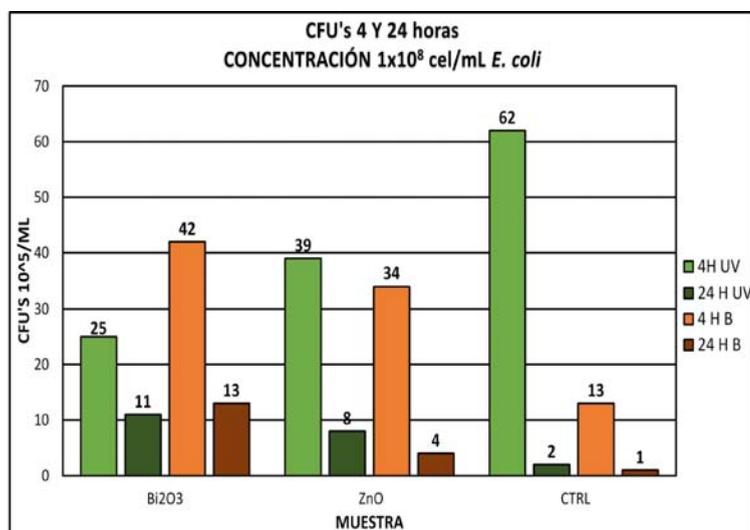


Figura 39: CFU's con una concentración inicial de 1×10^8 cel/mL .

Analizando los resultados para las muestras con Bi_2O_3 (figura 38) se puede observar que al tratar con una concentración inicial de 1×10^4 células/mL después de 4 horas se adhieren muy pocas bacterias viables tanto para luz UV como para luz blanca (10 y 19). Pasadas 24 horas el número aumenta considerablemente a 232 y 114 respectivamente. En presencia de luz UV las bacterias se adhieren más a la superficie del Bi_2O_3 después de 24 horas. Ocurre un fenómeno contrario cuando la concentración inicial de bacterias es 1×10^8 células/ml (figura 39) pues al término de las primeras 4 horas hay más bacterias viables adheridas cuando se usa luz blanca en comparación con la luz UV (42 y 25). Al pasar 24 horas este número disminuye a 13 y 11 respectivamente. Esto puede significar que el número de bacterias viables adheridas a la superficie disminuyen porque existe un límite en la cantidad de posibles bacterias que se pueden adherir.

Para el caso de las muestras con ZnO los resultados son muy distintos. Cuando se trabaja con una concentración inicial de 1×10^4 células/mL la densidad óptica disminuye muy poco en comparación con los sustratos de vidrio después de 4 y 24 horas bajo ambas luces (figura 36(b)). Al contar CFU's el número de posibles bacterias viables adheridas bajo luz UV a las 4 y 24 horas es 7 y 2, mientras que para luz blanca es de 7 y 186 respectivamente (figura 38). Esto implica que hay muy pocas bacterias viables adheridas a estas muestras en comparación con las de Bi_2O_3 . Además, el número disminuye después de 24 horas bajo luz UV. Esta disminución puede significar dos cosas: que las bacterias se adhieren muy poco a la película de ZnO o que sufren algún daño. Hay que recordar que el ancho de banda prohibida del ZnO es de 3.19 eV, que significa que esperamos que estas muestras trabajen mejor bajo luz UV que con luz blanca. Cuando se usa una concentración inicial de 1×10^8 células/ml la tendencia es muy similar a la anterior pero con una mayor cantidad de bacterias; después de 24 horas hay menos que después de 4.

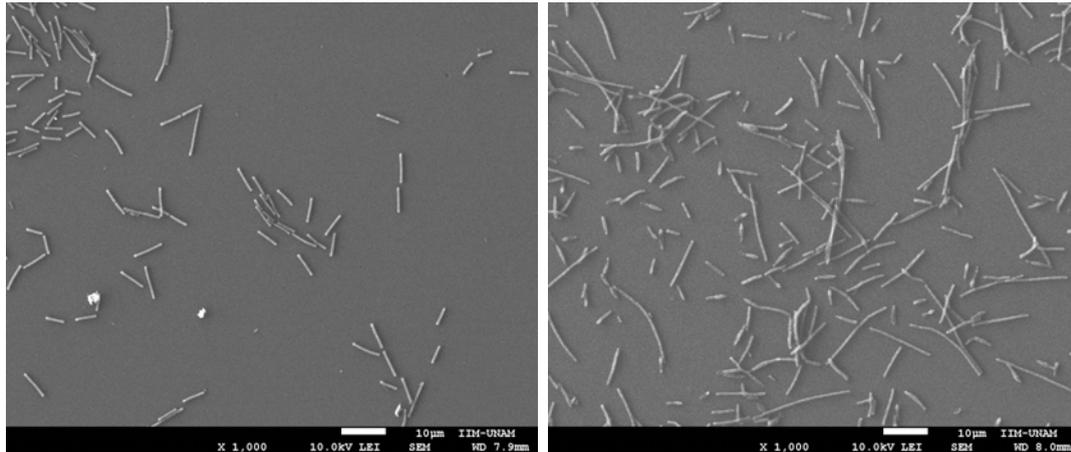
Para los pozos donde sólo se encontraba el sustrato de vidrio las mediciones de densidad óptica siempre tienen valores mayores en comparación con los pozos donde hay muestras con película (figura 37). Eso es algo que se espera pues el vidrio es inerte y no tendría por qué tener algún efecto en la disminución de la cantidad de bacterias sin importar la concentración inicial, el tipo de luz o el tiempo. Cuando se usa una concentración inicial de 1×10^4 células/ml el conteo de CFU's es menor después de 24 horas en comparación con las muestras de Bi_2O_3 para ambas luces (figura 38). La posible respuesta a este fenómeno es que las bacterias se adhieren al sustrato de vidrio al igual que como lo hacen con las muestras de Bi_2O_3 pero al momento de sonicar las muestras las bacterias no se despegan del todo⁵. Para el caso en el que se usa una concentración inicial de 1×10^8 células/ml el conteo de CFU's muestra que a las 4 horas bajo luz UV hay más bacterias viables adheridas con respecto a las demás, mientras que después de 24 horas de nuevo parece haber menos bacterias viables desprendidas (figura 39). De nueva cuenta la posible respuesta es que los sustratos de vidrio atraen a las bacterias o que se cree una biopelícula y éstas no se desprenden después de ser sonicadas.

⁵Esta hipótesis se discutirá mas adelante

4.2.2 RESULTADOS ANÁLISIS SEM

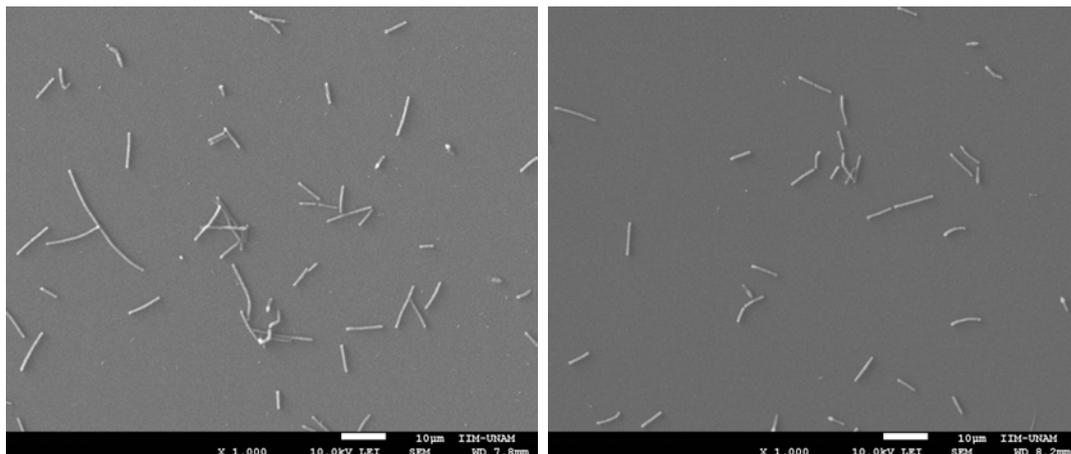
A continuación se muestran las imágenes más representativas del análisis hecho con SEM:

Para los sustratos de vidrio sin depósito.



(a) Luz UV / 24h / 1×10^4 cel/mL

(b) Luz Blanca / 24h / 1×10^4 cel/mL



(c) Luz UV / 24h / 1×10^8 cel/mL

(d) Luz Blanca / 24h / 1×10^8 cel/mL

Figura 40: SEM de sustratos de vidrio sin depósito.

Hay que recordar que para preparar las muestras que serán analizadas en SEM, la muestra se debe lavar tres veces, más, todo el procedimiento para fijar las posibles bacterias adheridas. En la figura 40 se aprecia que sobre los sustratos de vidrio sin depósito existe una cantidad apreciable de bacterias. La forma y medida de cada bacteria es la característica de la especie *E. coli*, es decir, no se ve ninguna variación en su morfología. Se aprecia que hay más bacterias adheridas para la muestra bajo luz blanca con una concentración de 1×10^4 cel/mL (figura 40(b)) que cuando se usa una concentración inicial de 1×10^8 cel/mL (figura 40(d)) después de 24 horas. Es posible que este fenómeno se deba a un posible límite en la cantidad de bacterias adheridas al cual se llega al usar una concentración de 1×10^4 cel/mL. Por otro lado, es posible que al usar una concentración de 1×10^8 cel/mL este límite sea superado y

no sea posible una cantidad mayor de bacterias adheridas. Lo mismo pasa para luz UV. Se esperaría que al sonicar los sustratos de vidrio se desprendan más bacterias después de 24 horas usando una concentración inicial de 1×10^4 células/mL. Esta afirmación confirmaría los resultados obtenidos durante el conteo de CFU's de la sección anterior (figuras 38 y 39).

Para los depósitos de ZnO las imágenes fueron las siguientes:

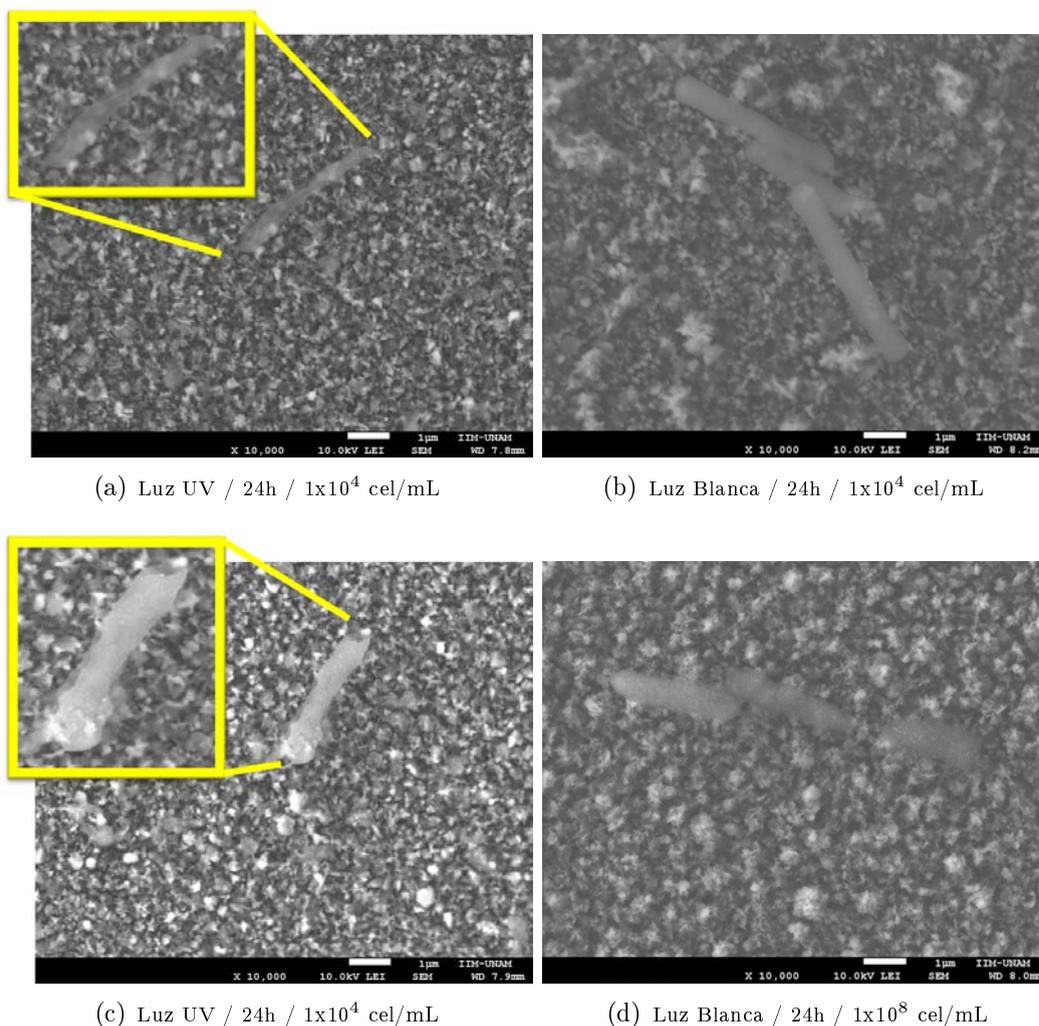


Figura 41: SEM de sustratos con depósito de ZnO.

Para estas imágenes fue más complicado encontrar las bacterias puesto que no había tantas como en las muestras de vidrio. Además, las pocas bacterias encontradas presentan una deformación clara en su estructura cuando se usa luz UV, lo cual puede ser un indicio de un posible daño estructural debido a alguna interacción con el ZnO, la cual esperaríamos que fuera por la activación de este fotocatalizador debido a la luz usada.

Para los depósitos de Bi_2O_3 las imágenes fueron las siguientes:

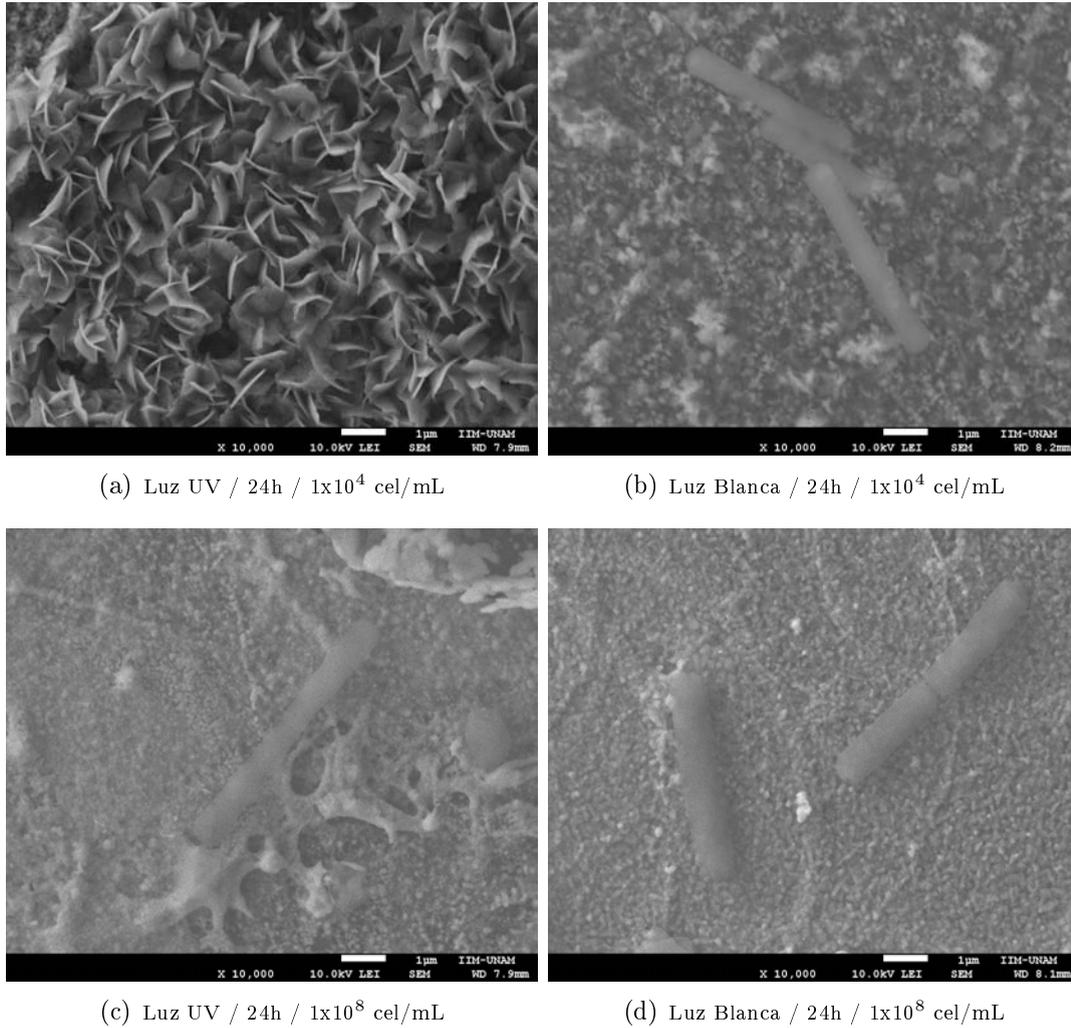


Figura 42: SEM de sustratos con depósito de Bi_2O_3 .

Al igual que con los depósitos de ZnO no fue tan sencillo encontrar las bacterias pero las pocas encontradas no presentaron una deformación considerable como las anteriores. Sin embargo, estas imágenes no son de ayuda para entender el comportamiento de la gráfica de CFU's pues muestra un número mayor de colonias con respecto a las muestras de vidrio sin película después de ser sonicados. Una posible hipótesis puede ser que las bacterias se adhieren fuertemente al vidrio en comparación con las otras muestras; o bien, después de la sonicación las bacterias se vuelven a adherir al vidrio. Es por eso que se decidió analizar nuevamente las muestras pero después de que éstas fueron sonicadas. La intención fue saber si al momento de sonicar despegamos por completo a las bacterias adheridas en la superficie de las muestras. Para esto se usó una muestra de ZnO , una de Bi_2O_3 y un sustrato de vidrio. Se colocaron dentro de pozos diferentes y se inocularon 2 mL de bacteria con una concentración de 1×10^8 cel/mL. La placa se dejó durante 24 horas con agitación constante y a 35°C . Pasado el tiempo las muestras se lavaron y posteriormente se agregaron 2 ml de TSB y se sonicaron. Después, se retiró el TSB y las muestras se fijaron siguiendo el procedimiento para el análisis con SEM.

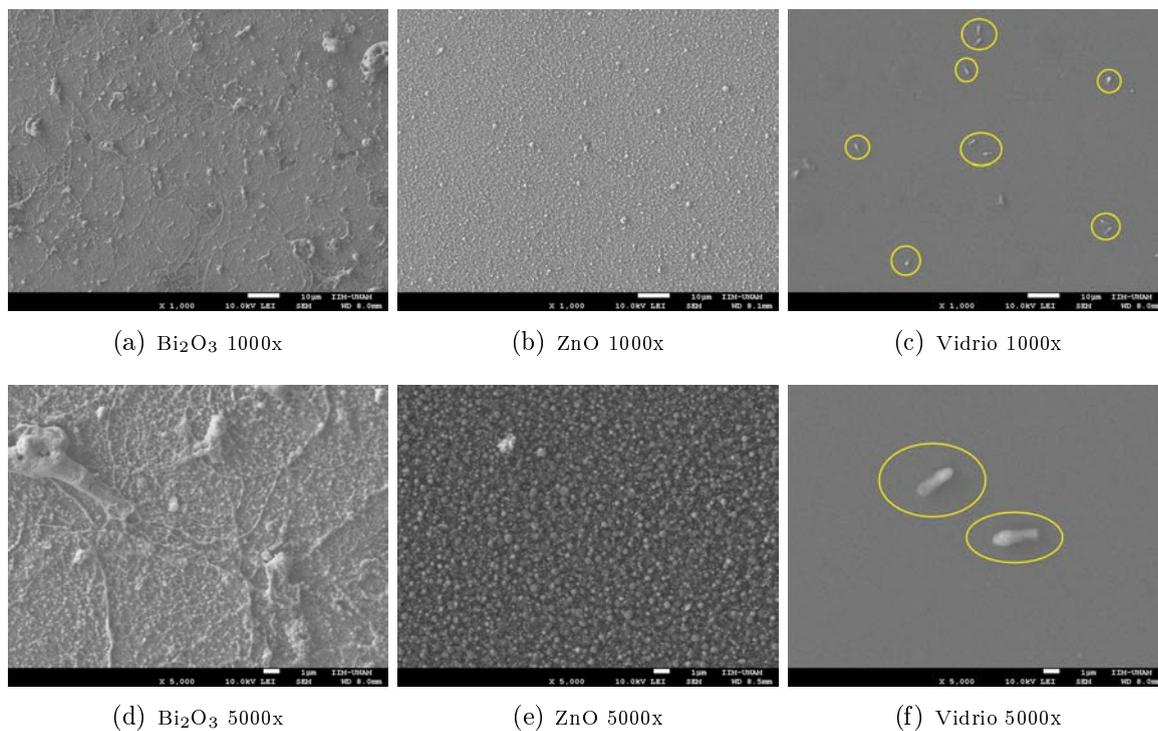


Figura 43: SEM de muestras después de ser sonicadas.

Es posible ver que en las figuras 43(c) y 43(f) que corresponden a los sustratos de vidrio sin depósito aun hay bacterias adheridas después de ser sonicadas. En las muestras de Bi_2O_3 y ZnO no se encontraron bacterias adheridas. Esto puede confirmar que las bacterias se adhieren más fuertemente al vidrio que las muestras con película y por eso al al contar CFU's es posible que el número sea menor en comparación con las demás.

Una cosa más que se puede observar, es que en la figura 43(a) hay zonas donde la película de Bi_2O_3 se desprende después de ser sonicada, cosa que no ocurre con la muestra de ZnO. Eso implica que las películas de Bi_2O_3 no pueden ser sometidas a este tratamiento con la intención, por ejemplo, de limpiarlas de bacterias y posiblemente volver a usarlas.

Además hay un fenómeno que se presenta en las siguientes figuras:

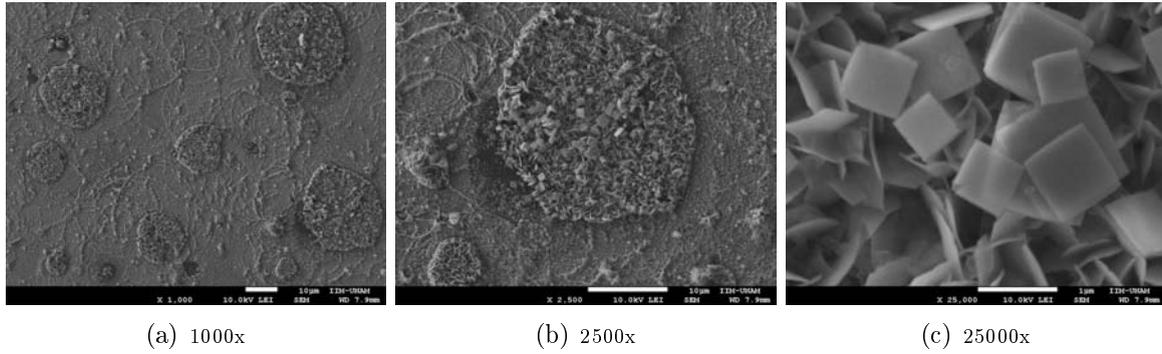


Figura 44: SEM de la película de Bi_2O_3 después de 24 horas con luz UV / 1×10^4 cel/ml

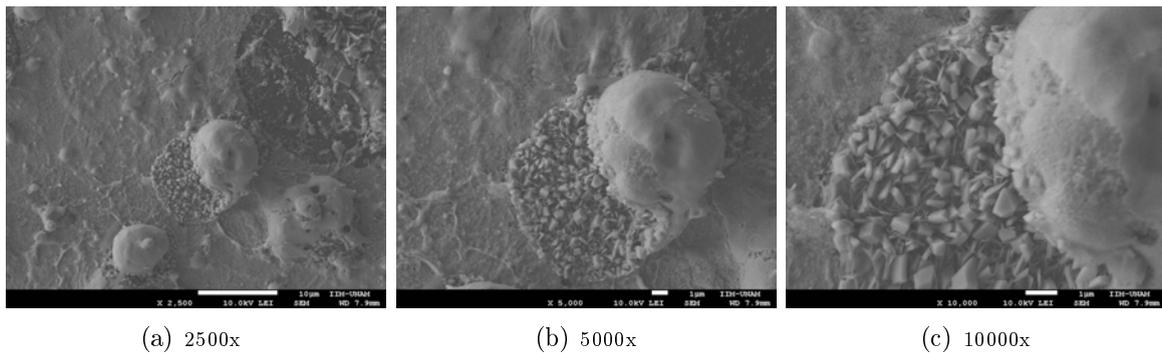


Figura 45: SEM de la película de Bi_2O_3 después de 24 horas con luz UV / 1×10^8 cel/ml

En las figuras 44 y 45 se puede apreciar un cambio en la estructura de la película después de 24 horas. Al parecer existe una reacción entre el Bi_2O_3 y el medio de cultivo TSB. Esta reacción podría impedir que el depósito pueda interactuar con las bacterias de la manera en que se espera, es decir, produciendo daño en ellas. También puede suceder que estos nuevos agregados que aparecen oculten a las bacterias que se adhieren a la superficie y al momento de la sonicación éstas se desprendan y por lo mismo se encuentre un mayor número de unidades formadoras de colonias.

4.2.3 RESULTADOS PRUEBA FLUORESCENCIA

La prueba de fluorescencia se realizó para conocer el número de posibles bacterias adheridas en la superficie de las muestras. A diferencia de las analizadas con SEM éstas no fueron sometidas a ningún tratamiento de fijación y eso podría suponer un aumento en el número de bacterias observables.

Como se mencionó antes, previo a la prueba con bacterias se colocaron $3 \mu\text{L}$ del reactivo sobre una muestra de ZnO y una de Bi_2O_3 para descartar cualquier posible reacción con las muestras que pudiera interferir con la medición. Se encontró que al momento de analizar la muestra de Bi_2O_3 hubo una reacción que emitía en color verde (figura 46(a)). Éste ruido de

fondo puede interferir al momento de ver las bacterias. Para la película de ZnO este efecto no ocurrió (figura 46(b)).

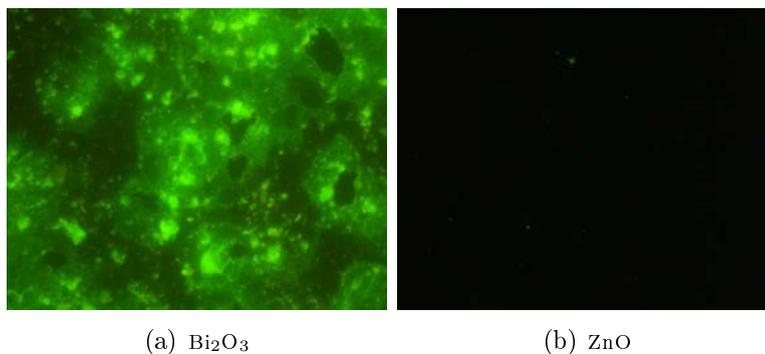


Figura 46: Posible reacción entre el reactivo y las películas Bi_2O_3 y ZnO (100x).

Después de cada prueba las muestras se sometieron al mismo proceso de lavado con medio TSB para eliminar las bacterias adheridas más débilmente a la superficie. Se analizaron varias zonas de las muestras con la finalidad de cuantificar el número de bacterias adheridas. A continuación se muestran los resultados del número promedio observado y una imagen representativa de cada muestra.

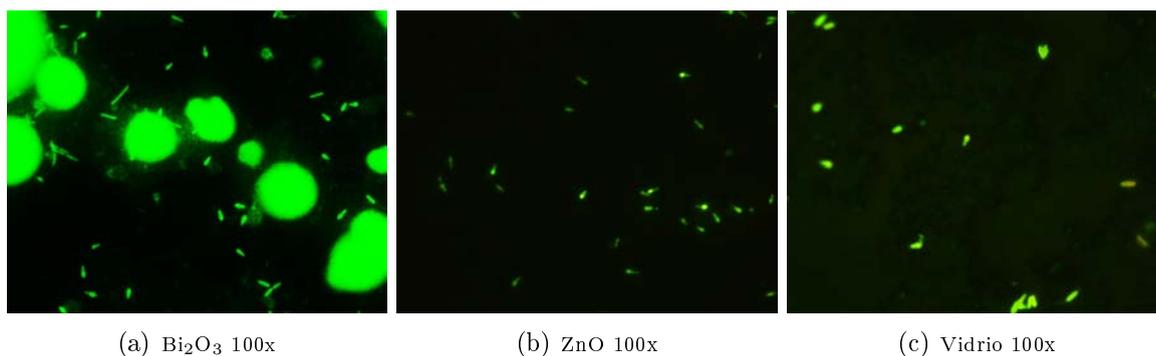


Figura 47: Fluorescencia - Prueba de 4 horas bajo luz blanca

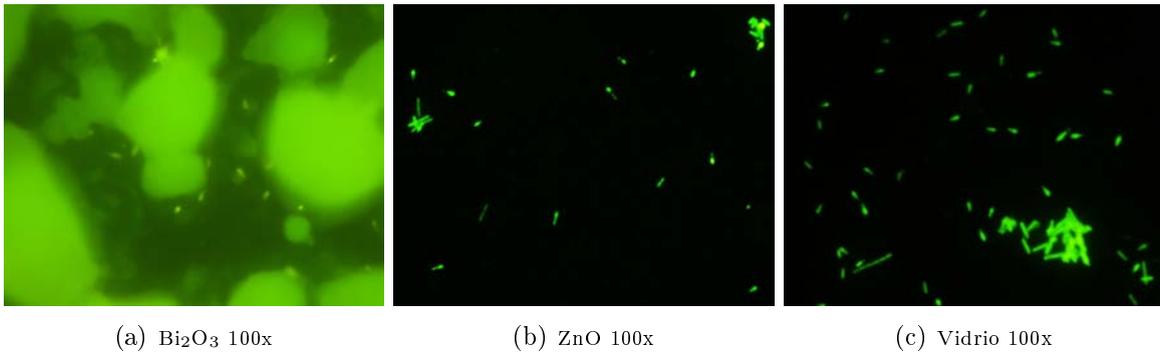


Figura 48: Fluorescencia - Prueba de 4 horas bajo luz UV

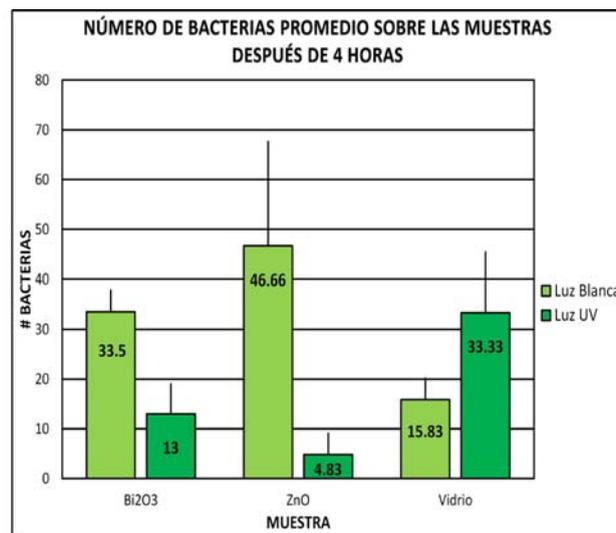


Figura 49: Promedio de bacterias encontradas en cada superficie después de 4 horas.

Como se mencionó antes, en la figura 46(a) se observa una posible reacción entre el reactivo y la película de Bi_2O_3 que provoca un ruido de fondo. Este efecto se observa en todas las imágenes después de 4 y 24 horas.

Pasadas las primeras 4 horas se aprecia que hay más bacterias en los sustratos de vidrio que estuvieron bajo luz UV, seguido de las muestras de Bi_2O_3 y ZnO. Se puede ver en la figura 49 que para algunos valores la incertidumbre es muy grande y esto es porque al hacer los promedios existen zonas de las muestras donde hay más bacterias. Posiblemente por defectos en los depósitos. En las imágenes 47(a) y 48(a) correspondientes a las muestras con Bi_2O_3 se aprecian más bacterias que en las imágenes de SEM lo cual significa que durante el tratamiento de fijación deben desprenderse bacterias. La imagen 48(b) muestra que en la superficie de la película de ZnO existen bacterias adheridas y esto sigue concordando con los resultados de CFU's.

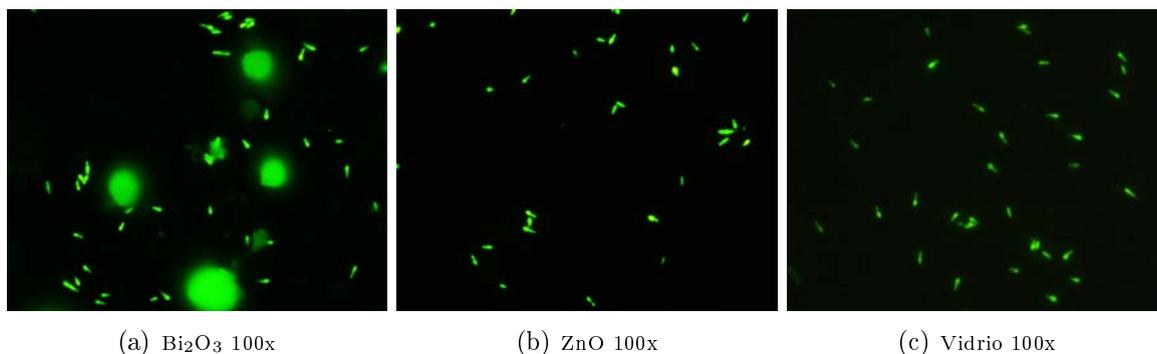


Figura 50: Fluorescencia - Prueba de 24 horas bajo luz blanca

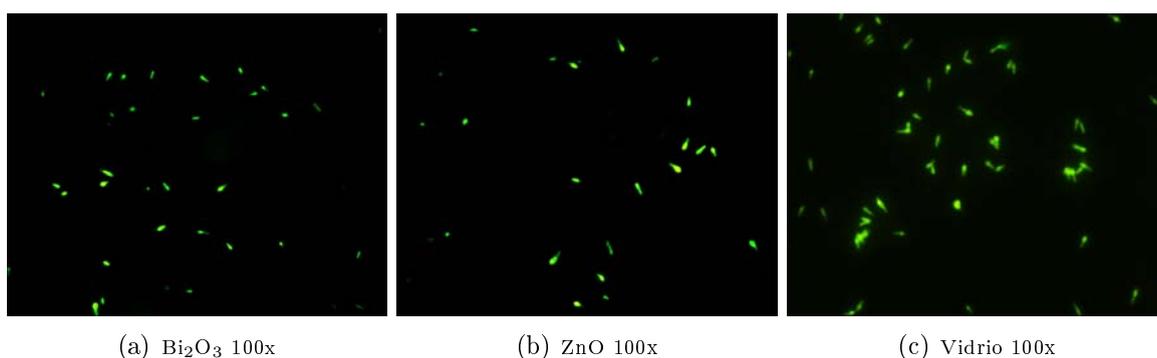


Figura 51: Fluorescencia - Prueba de 24 horas bajo luz UV

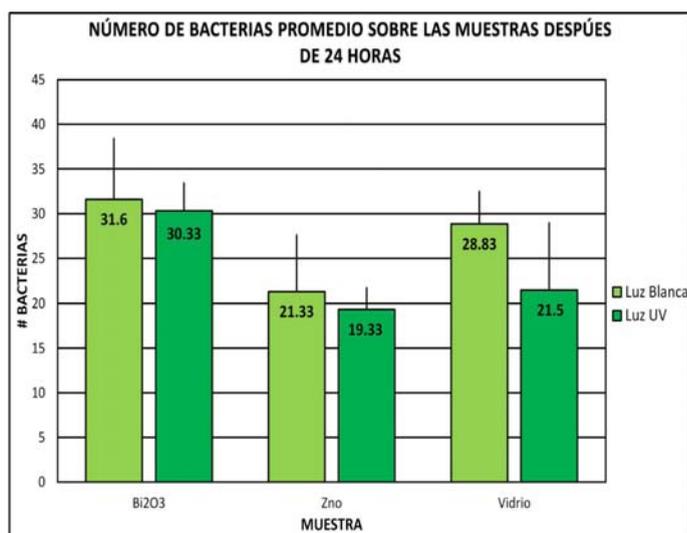


Figura 52: Promedio de bacterias encontradas en cada superficie después de 24 horas.

Para las muestras analizadas después de 24 horas se pudo notar que para ambas luces el Bi₂O₃ presenta una mayor cantidad de bacterias en su superficie, es decir, las atrae más. Parece ser que el Bi₂O₃ sirve como un atractor de bacterias pese a que presenta un ángulo

de contacto grande para el TSB; pero es un fenómeno comprensible si se toma en cuenta la morfología de la superficie de las películas, pues ésta no es homogénea y la topografía que presenta podría ser favorable para la adhesión de bacterias. Además, otro posible parámetro que puede influir es el cambio en la estructura de la superficie del Bi_2O_3 . Por otro lado, se puede notar que en las películas de ZnO hay menos bacterias en comparación con las otras dos y que al hacer el conteo de CFU's el número también es menor. Es más, es posible que exista un daño según lo visto en las imágenes mediante SEM.

En los sustratos de vidrio las bacterias se adhieren en todo momento y lo hacen fuertemente pues a pesar de ser sonicadas éstas siguen estando presentes.

Todos los resultados anteriores hacen ver que una prueba en el reactor implicaría tomar en cuenta diversos factores como el medio donde se encuentran las bacterias, pues se usó medio TSB y lo que se busca es poder hacer pruebas en cuerpos de agua. Es posible que el medio TSB no sea el más indicado para los procesos de fotocátalisis. Un detalle más que se debe añadir es el hecho de una posible influencia entre el medio de cultivo y el Bi_2O_3 . También, es necesario conocer el mecanismo de daño que produce el ZnO sobre *E. coli*; es decir, saber si el daño es debido a la producción de radicales libres en el medio TSB o si es por otro mecanismo propio de la superficie de la película de ZnO [28]. Por otro lado, usar una solución acuosa como medio de cultivo implicaría establecer un protocolo para cuantificar la sobrevivencia de las bacterias con el tiempo. Esto tiene la finalidad de descartar posibles efectos de estrés y por lo tanto, inactivación de las bacterias que se confundan con la actividad de los fotocatalizadores.

Otro parámetro importante que se debe tomar en cuenta es la adherencia de las bacterias con el Bi_2O_3 que en este caso fue depositado en una película delgada. Si ahora tuviéramos un sustrato poroso, es más probable que se adhieran dentro de los poros y que influya en los resultados pues podrían contabilizarse menos bacterias viables de las que realmente existen. Una posible conclusión es que el Bi_2O_3 en película podría provocar su adhesión en la superficie y atraparlas.

4.3 REACTOR SOLAR

En el marco teórico del presente trabajo se hizo mención de cómo la fotocátalisis heterogénea puede ayudar a la degradación de contaminantes presentes en el agua. En este caso, los contaminantes que nos interesan son los microorganismos coliformes, por ejemplo las bacterias *E. coli*. Caracterizar los materiales y su interacción con las bacterias sirve para tener en cuenta los diversos parámetros que intervienen antes de realizar las pruebas en el reactor solar. Es por eso que la aplicación en el reactor será un trabajo futuro dada la complejidad del estudio. Un parámetro más que debe ser considerado, es el de seguridad, pues es necesario establecer mecanismos y protocolos para trabajar con bacterias fuera del laboratorio. Actualmente, me encuentro trabajando en el diseño y adaptación del reactor para ser utilizado dentro del laboratorio y comprobar su funcionalidad en procesos fotocatalíticos. Una forma de comprobar su funcionamiento es realizar pruebas con la finalidad de degradar

colorantes. Esto nos garantizaría que efectivamente podemos activar los fotocatalizadores de manera controlada para posteriormente intentar eliminar microorganismos. Aún así, la intención de usar el reactor bajo radiación solar sigue presente.

4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS FILTROS

Al término del proceso de depósito por baño químico los filtros presentaban una coloración amarillenta para los depósitos de óxido de bismuto (figura 53(b)) y una color blanco grisácea para los depósitos de óxido de zinc (53(c)). Los depósitos se realizaron por ambas caras y se sonicaron con agua desionizada para eliminar excesos del depósito que se adhirieron correctamente al sustrato.

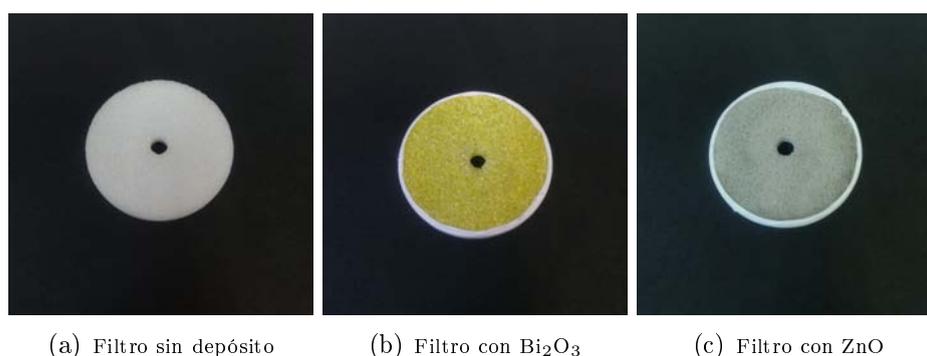


Figura 53: Depósitos sobre filtros de vidrio.

También se caracterizaron los filtros de vidrio para obtener sus anchos de banda prohibida y la topografía del depósito.

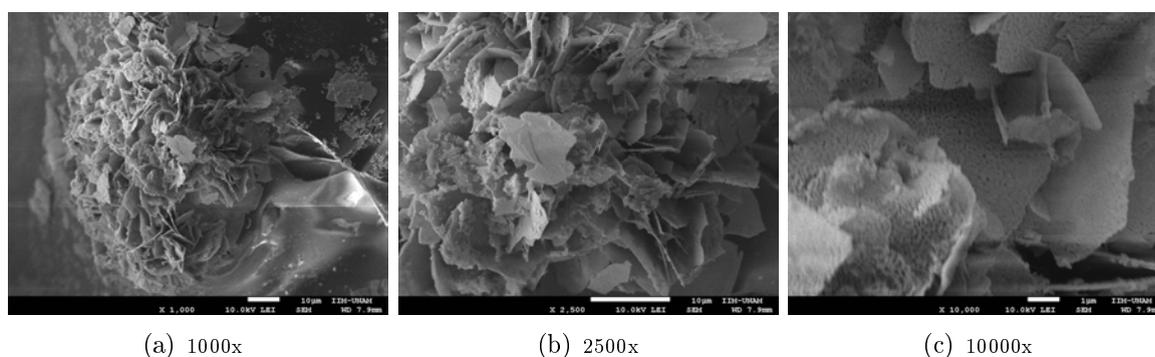


Figura 54: Imágenes de SEM de filtros de vidrio recubiertos con Bi_2O_3 .

Las pruebas de SEM muestran que ambos compuestos se depositan sobre los filtros de vidrio, en ambos casos los depósitos fueron analizados con EDS, con lo cual se confirmó la presencia del Bi_2O_3 y ZnO . Mediante reflectancia difusa se encontró que los materiales presentan un ancho de banda prohibida de 2.62 eV y 3.31 eV respectivamente. De nueva

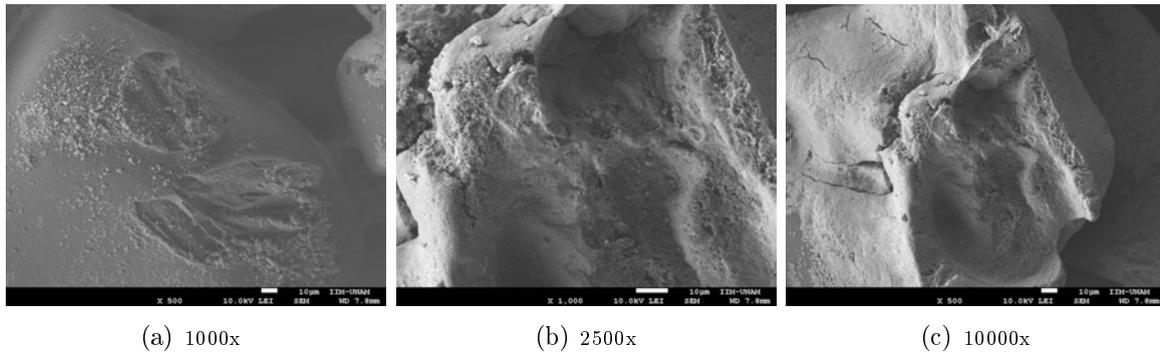


Figura 55: Imágenes de SEM de filtros de vidrio recubiertos con ZnO.

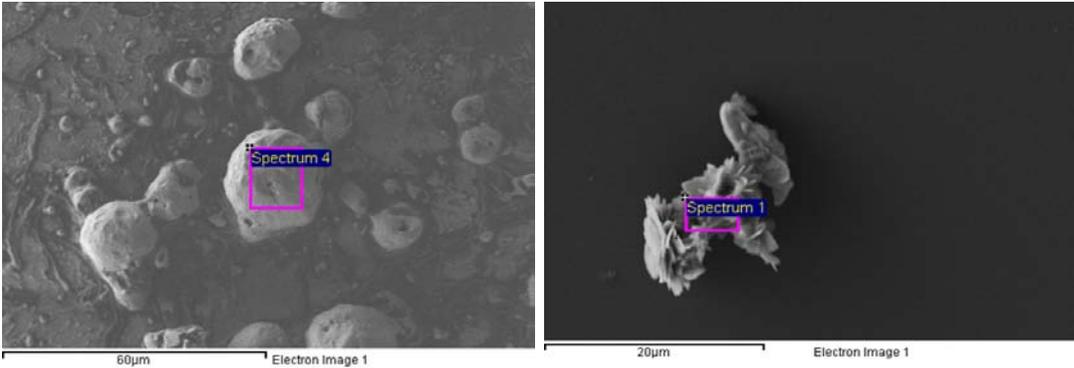
cuenta, esto nos permite utilizar nuestros materiales bajo el espectro UV-Vis solar.

Los filtros de vidrio se perforaron por el centro (previo al depósito) con una broca de diamante de 3 mm de diámetro. Los filtros se colocaron a lo largo del espárrago con una separación de 2.5 cm entre cada uno. De esta forma se logró colocar un total de 6 filtros, 3 por cada compuesto. Dado que existía una separación de 1 mm entre el filtro y la pared del tubo, se cubrió la orilla de cara filtro con cinta teflón. Esto permitió que cada filtro se amoldara a las imperfecciones del tubo sin maltratarse y también, sirvió como empaque. Con esta configuración y las especificaciones mencionadas en la tabla 3, se obtuvo un flujo de $5 \text{ ml} \pm 0.5 \text{ ml}$ por segundo. La inclinación de la base fue de 19° ; se tomó con respecto al piso en dirección al ángulo cenital y tomando en cuenta la ubicación geográfica de Ciudad Universitaria, México. El dispositivo final quedó de la siguiente forma:



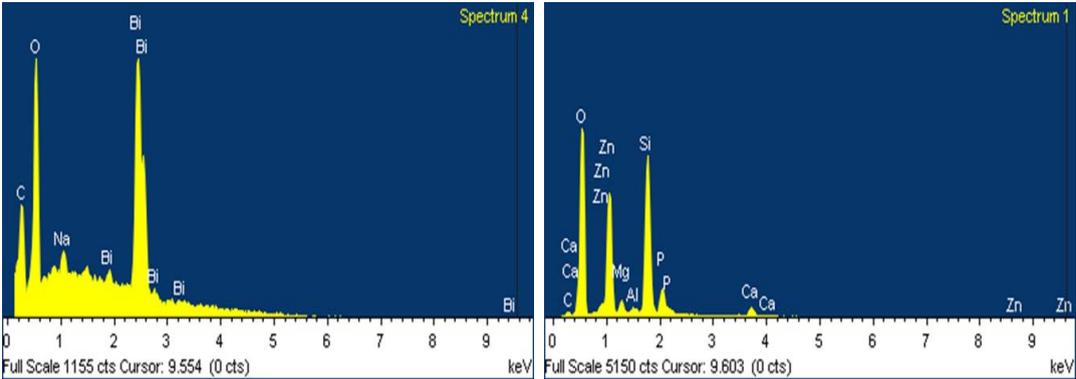
Figura 57: Reactor final.

Como trabajo previo se realizaron pruebas en un reactor similar con las mismas características para limpieza de agua contaminada con colorantes [62]. Para las pruebas se utilizó el colorante índigo carmín (IC) con un pH de 11.66 - 12 y filtros de vidrio recubiertos con óxido de bismuto mediante la técnica de baño químico con una solución precursora de acetato de bismuto con una concentración de 0.025 M. Los resultados mostraron que el dispositivo logró la decoloración de 833.33 mL de IC con una concentración de 30 ppm en menos de dos



(a) Bi₂O₃

(b) ZnO



(c) Bi₂O₃

(d) ZnO

Figura 56: Análisis EDS de los filtros con deposito.

horas bajo radiación solar (figura 58). Las pruebas futuras enfocadas a la caracterización del reactor consistirán en conocer la eficiencia de éste para degradar diferentes colorantes. Para ello se usarán los filtros de vidrio con recubrimiento de Bi_2O_3 y ZnO para conocer su eficiencia de forma conjunta y separada. Todo lo anterior servirá como parámetro fundamental para continuar la investigación de implementar el reactor como un dispositivo útil para la eliminación de microorganismos contaminantes de agua.

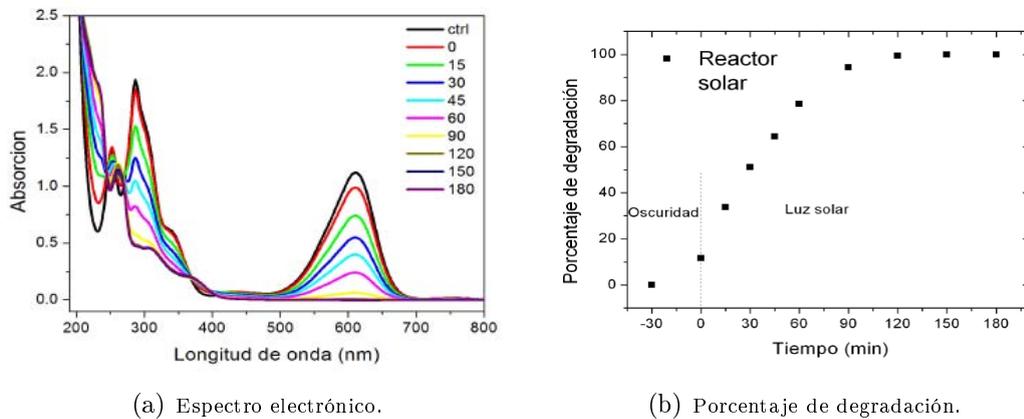


Figura 58: Prueba en el reactor solar con índico carmín.

4.4 TRABAJO A FUTURO

Tomando en cuenta todas las posibles variables a considerar durante todo el trabajo y pensando en la implementación del reactor para la eliminación de microorganismos mediante procesos de fotocatalisis, se propone el siguiente protocolo:

- Trabajar con la bacteria *E. coli* en una solución acuosa.
- Medir viabilidad celular en intervalos de tiempo mediante conteo en placa para conocer el grado de sobrevivencia en la solución.
- Realizar pruebas de fotocatalisis en laboratorio usando los mismos materiales en películas delgadas usando *E. coli* en solución.
- Realizar las pruebas de laboratorio con y sin agitación.
- Medir la adherencia bacteriana a las películas delgadas mediante pruebas de viabilidad y SEM.

- Realizar pruebas en el reactor para conocer el grado de sobrevivencia sin fotocatalizadores.
- Realizar pruebas en el reactor con los fotocatalizadores de Bi_2O_3 y ZnO depositados en filtros de vidrio de manera independiente.
- Realizar pruebas en el reactor con los catalizadores en un sistema mixto, es decir, con filtros intercalados de Bi_2O_3 y ZnO .
- Repetir todas las pruebas anteriores en oscuridad para descartar estrés por la presencia del material.
- Medir la adherencia bacteriana a los filtros mediante pruebas de viabilidad y SEM.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Fue posible obtener Bi_2O_3 y ZnO por las técnicas de rocío pirolítico y baño químico con características semejantes.

- Los depósitos en película sobre vidrio mostraron un ancho de banda prohibida de 3.19 eV para el ZnO y 2.42 eV para el Bi_2O_3 , mientras que para los depósitos en filtro fue de 3.31 eV y 2.62 eV respectivamente. Esto garantiza que los materiales pueden ser activados con radiación del espectro UV-Vis.

- Las pruebas de densidad óptica muestran que las películas de Bi_2O_3 siempre presentan un valor menor en comparación con las otras dos muestras.

- El análisis por microscopia electrónica de barrido a las películas después de las pruebas antibacteriales mostró que:
 - Las bacterias se acumulan en los sustratos de vidrio sin depósito.

 - Se encuentran pocas bacterias sobre las películas de Bi_2O_3 .

 - Sobre las películas de ZnO las bacterias aparecen deformadas, lo cual puede indicar un posible daño estructural a las bacterias.

 - Las bacterias se adhieren fuertemente a los sustratos de vidrio y estas permanecen aún después de sonicarlas.

- Las superficies de las películas de Bi_2O_3 atraen a las bacterias en concentraciones altas de *E. coli*.

- Fue posible ensamblar el reactor solar de tipo parabólico compuesto y colocar los filtros con recubrimiento de Bi_2O_3 y ZnO dentro de él como componente principal.

- Es necesario realizar pruebas de viabilidad bacteriana para conocer el estado de las bacterias adheridas a la superficie.

Bibliografía

- [1] Ae Jung Huh and Young Jik Kwon. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2):128–145, 2011.
- [2] Stuart B. Levy. The Challenge of Antibiotic Resistance. 278:46–53, 1998.
- [3] J. A. Callow and M. E. Callow. *Biofilms*, volume 42. 2006.
- [4] P. Gilbert, D.G. Allison, and A.J. McBain. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1):98S–110S, 2002.
- [5] Philip S. Stewart. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2):107–113, 2002.
- [6] Matthew E. Falagas, Kontantinos N. Fragoulis, and Ioannis Karydis. A comparative study on the cost of new antibiotics and drugs of other therapeutic categories. *PLoS ONE*, 1(1):3–6, 2006.
- [7] Brenda Borbón, Alejandro Medel, Zaira Bedolla, Gabriel Núñez, and Oropeza Guzmán. Nanotecnología, una alternativa para mejorar la calidad del agua. *Nanociencias y Nanotecnología Mundo Nano.*, 8(14):40–53, 2015.
- [8] Xavier Domènech, Wilson F Jardim, and M. Litter. Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. *Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes*, (54):7–34, 2001.
- [9] Leal T. Blanco J., Malato S., Estrada C., Bandala E., Gelover S. Purificación de Aguas por Fotocatálisis Heterogénea: Estado del Arte. *Eliminacion de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*, page 39, 2015.
- [10] Erick R Bandala, Benito Corona-vásquez, Raúl Guisar, and Melesio Uscanga. Aplicación de Procesos Avanzados de Oxidación en la Desactivación Secuencial de Microorganismos Resistentes en Agua . (January):52–63, 2007.
- [11] J M Herrmann. Destrucción de contaminantes orgánicos por fotocatalisis heterogénea. *Solar Safe Water*, pages 153–170, 1918.
- [12] Kazutaka Hirakawa, Masafumi Mori, Mami Yoshida, Shinji Oikawa, and Shosuke Kawanishi. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 38(5):439–447, 2004.

- [13] T. Saito, T. Iwase, J. Horie, and T. Morioka. Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutants streptococci. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 14(4):369–379, 1992.
- [14] Pinggui Wu, James A Imlay, and Jian Ku Shang. Mechanism of Escherichia coli inactivation on palladium- modified nitrogen-doped titanium dioxide. *Biomaterials*, 29(29):997–1003, 2012.
- [15] Tadashi Matsunaga, Ryoza Tomoda, Toshiaki Nakajima, and Hitoshi Wake. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, 29(1):211–214, 1985.
- [16] L. Caballero, K. A. Whitehead, N. S. Allen, and J. Verran. Inactivation of Escherichia coli on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 202(2-3):92–98, 2009.
- [17] Yoshihiko Kikuchi, Kayano Sunada, Tomokazu Iyoda, Kazuhito Hashimoto, and Akira Fujishima. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 106(1-3):51–56, 1997.
- [18] Sihem Helali, Maria Inmaculada Polo-López, Pilar Fernández-Ibáñez, Bunsho Ohtani, Fumiaki Amano, Sixto Malato, and Chantal Guillard. Solar photocatalysis: A green technology for E. coli contaminated water disinfection. Effect of concentration and different types of suspended catalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 276:31–40, 2013.
- [19] Darren Delai Sun, Joo Hwa Tay, and Koh Min Tan. Photocatalytic degradation of E. coliform in water. *Water Research*, 37(14):3452–3462, 2003.
- [20] Jia Ren, Wenzhong Wang, Ling Zhang, Jiang Chang, and Sheng Hu. Photocatalytic inactivation of bacteria by photocatalyst Bi₂WO₆ under visible light. *Catalysis Communications*, 10(14):1940–1943, 2009.
- [21] Danae Venieri, Antonia Fragedaki, Maria Kostadima, Efthalia Chatzisyneon, Vasiliou Binas, Apostolos Zachopoulos, George Kiriakidis, and Dionissios Mantzavinos. Solar light and metal-doped TiO₂ to eliminate water-transmitted bacterial pathogens: Photocatalyst characterization and disinfection performance. *Applied Catalysis B: Environmental*, 154-155:93–101, 2014.
- [22] Dheaya M.A. Alrousan, Patrick S.M. Dunlop, Trudy A. McMurray, and J. Anthony Byrne. Photocatalytic inactivation of E. coli in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ films. *Water Research*, 43(1):47–54, 2009.
- [23] P. Carvalho, P. Sampaio, S. Azevedo, C. Vaz, J. P. Espinós, V. Teixeira, and J. O. Carneiro. Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings. *Applied Surface Science*, 307:548–557, 2014.

- [24] S Contreras, G Mendoza, and J P Ledesma Suarez. Elaboración de pintura con propiedades bactericidas aplicando TiO₂. Elaboration of a paint with bactericidal properties by using TiO₂. *Universidad Tecnológica de Querétaro*, 2016.
- [25] Argelia Almaguer-Flores, Phaedra Silva-Bermudez, Rey Galicia, and Sandra E. Rodil. Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings. *Materials Science and Engineering C*, 57:88–99, 2015.
- [26] Shaun D. Gittard, John R. Perfect, Nancy A. Monteiro-Riviere, Wei Wei, Chunming Jin, and Roger J. Narayan. Assessing the antimicrobial activity of zinc oxide thin films using disk diffusion and biofilm reactor. *Applied Surface Science*, 255(11):5806–5811, 2009.
- [27] Nicole Jones, Binata Ray, Koodali T. Ranjit, and Adhar C. Manna. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1):71–76, 2008.
- [28] Xiaoling Xu, Dan Chen, Zhigang Yi, Man Jiang, Li Wang, Zuowan Zhou, Ximei Fan, Yong Wang, and David Hui. Antimicrobial Mechanism Based on H₂O₂ Generation at Oxygen Vacancies in ZnO Crystals. *Langmuir*, 29(18):5573–5580, 2013.
- [29] Yu Hang Leung, Xiaoying Xu, Angel P. Y. Ma, Fangzhou Liu, Alan M. C. Ng, Zhiyong Shen, Lee A. Gethings, Mu Yao Guo, Aleksandra B. Djurišić, Patrick K. H. Lee, Hung Kay Lee, Wai Kin Chan, and Frederick C. C. Leung. Toxicity of ZnO and TiO₂ to Escherichia coli cells. *Scientific Reports*, 6(1):35243, 2016.
- [30] L. Leontie, M. Caraman, Igor Evtodiev, Elmira Cuculescu, and Ana Mija. Optical properties of bismuth oxide thin films prepared by reactive magnetron sputtering. *Physica Status Solidi (a)*, 8(June):2052–2056, 2008.
- [31] Michael Mehring. From molecules to bismuth oxide-based materials: Potential homo- and heterometallic precursors and model compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(7-8):974–1006, 2007.
- [32] Channah Rock and Berenise Rivera. La Calidad del Agua, E. coli y su Salud. *The University of Arizona - College of Agriculture and Life Sciences - Cooperative Extension*, (March), 2014.
- [33] Janet S. Butel Stephen A. Morse Timothy A. Mietzner Geo F. Brooks, Karen C. Carrol. *Microbiología Médica*, volume 27. 2010.
- [34] Portal agua.org.mx. Contaminación por materia orgánica y microorganismos. *Fondo para la comunicación y la educación ambiental A. C.*
- [35] Martha Guadalupe Rodríguez-Angeles. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Publica de Mexico*, 44(5):464–475, 2002.
- [36] Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. Capítulo 20 INDICADORES DE CONTAMINACION FECAL EN AGUAS. pages 224–229, 2011.

- [37] Pankaj Attri, Yong Hee Kim, Dae Hoon Park, Ji Hoon Park, Young J. Hong, Han Sup Uhm, Kyoung Nam Kim, Alexander Fridman, and Eun Ha Choi. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. *Scientific Reports*, 5:1–8, 2015.
- [38] Quanjun Xiang, Jiaguo Yu, and Po Keung Wong. Quantitative characterization of hydroxyl radicals produced by various photocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(1):163–167, 2011.
- [39] J. P. McKelvey. *Solid-state and semiconductor*, volume 2nd. 1966.
- [40] Callister W. D. *Reveré*. 2002.
- [41] Monserrat Bizarro. Materiales para combatir la contaminación del agua. *Applied Catalysis B: Environmental*, pages 15–21, 2011.
- [42] Aracely Hernández-Ramírez and Iliana Medina-Ramírez. *Photocatalytic Semiconductors*. 2015.
- [43] Yajun Wang, Qisheng Wang, Xueying Zhan, Fengmei Wang, Muhammad Safdar, and Jun He. Visible light driven type II heterostructures and their enhanced photocatalysis properties: A review. *Nanoscale*, 5(18):8326–8339, 2013.
- [44] Mohammad Vaseem, Ahmad Umar, and Yb Hahn. *ZnO Nanoparticles : Growth, Properties, and Applications*, volume 5. 2010.
- [45] Sirachaya Kunjara Na Ayudhya, Parawee Tonto, Okorn Mekasuwandumrong, Varong Pavarajarn, and Piyasan Prasertthdam. Solvothermal Synthesis of ZnO with Various Aspect Ratios Using Organic Solvents. *Crystal Growth & Design*, 6(11):2446–2450, 2006.
- [46] J. M. Herrmann. Heterogeneous photocatalysis: State of the art and present applications. *Topics in Catalysis*, 34(1-4):49–65, 2005.
- [47] S. Rodil. Sintetizan en la UNAM Fotocatalizador de Bismuto que compite con el de Titanio. *Boletín UNAM-DGCS-196*, 2015.
- [48] Karen Barrera-Mota, Monserrat Bizarro, Micaela Castellino, Alberto Tagliaferro, Aracely Hernández, and Sandra E. Rodil. Spray deposited β -Bi₂O₃ nanostructured films with visible photocatalytic activity for solar water treatment. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(6):1110–1119, 2015.
- [49] D. M. Otálora B., J. J. Olaya Flórez, and A. Dussan. Microestructura y propiedades eléctricas de bismuto y óxido de bismuto depositados por magnetron sputtering UBM. *Revista Mexicana de Física*, 61(2):105–111, 2015.
- [50] Ü Özgür, Ya I. Alivov, C. Liu, A. Teke, M. A. Reshchikov, S. Doğan, V. Avrutin, S. J. Cho, and H. Morko. A comprehensive review of ZnO materials and devices. *Journal of Applied Physics*, 98(4):1–103, 2005.

- [51] Monserrat Bizarro. High photocatalytic activity of ZnO and ZnO:Al nanostructured films deposited by spray pyrolysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 97(1-2):198–203, 2010.
- [52] J Blanco, S Malato, P Fernández, A Vidal, A Morales, P Trincado, J.C Oliveira, C Mineiro, M Musci, C Casalle, M Brunotte, S Tratzky, N Dischinger, K. H Funken, C Sattler, M Vincent, M Collares-Pereira, J.F Mendes, and C.M Rangel. Compound parabolic concentrator technology development to commercial solar detoxification applications. *Solar Energy*, 67(4-6):317–330, 1999.
- [53] M. Maldonado P. Fernández D. Alarcón M. Collares J. Farinha J. Correia de Oliveira. S. Malato, J. Blanco. Engineering of Solar Photocatalytic Collectors. *Solar Energy*, 77:513–524, 2004.
- [54] Olga Echeverría Vázquez Nin, Gerardo. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias*, volume 1. 2000.
- [55] C. Ballesteros R. González. R. Pareja. *Microscopía electró*, volume 1. 1991.
- [56] E. S. Mora A. E. Morales and U. Pal. Use of diffuse reflectance spectroscopy for optical characterization of un-supported nanostructures. *Revista Mexicana de Física*, 53:18, 2007.
- [57] J. Vidal Larramendi G. Contreras Puente R. Mendoza Péez O. Vigil Galán, G. Santana Rodríguez and M. Hernández Bojórquez. Influencia del tratamiento térmico con CdCl₂ sobre las características finales de las celdas solares CdS/CdTe procesadas por transporte de vapor en espacio cercano. *Solar Energy*, 50:353–357, 2010.
- [58] M. Boshta, M. O. Abou-Helal, D. Ghoneim, N. A. Mohsen, and R. A. Zaghlool. The photocatalytic activity of sprayed Zn_{1-x}Mg_xO thin films. *Surface and Coatings Technology*, 205(2):271–274, 2010.
- [59] Jesús Ramírez Santos, Gabriel Contreras Ferrat, and M. Carmen Gómez Eichelmann. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4):92–101, 2005.
- [60] Dayana Acebo González Armando T Hernández García. Turbimetría. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 2013.
- [61] A Camacho, M Giles, A Ortegón, M Palao, B Serrano, and O Velázquez. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. *Facultad de Química, UNAM. México.*, pages 1–9, 2009.
- [62] Alberto Bernal Díaz. Optimización de un Reactor Solar Fotocatalítico Basado en Óxido de Bismuto Soportado en Filtros de Vidrio. *UNAM*, 2016.

ANEXOS

ANEXO A: ESPECIFICACIONES APARATOS

RAYOS X (DRX) - Rigaku Ultima IV XRD System.

ESPECTROFOTÓMETRO - Shimadzu UV 2600

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM) - JEOL JSM - 7600F.

PERFILÓMETRO MECÁNICO - Dektak 150.

BIOFOTÓMETRO - BioPhotometer eppendoif D30 (600 nm).

MULTILECTOR DE PLACA F5 - Molecular Devices FilterMax F5, Multi-Mode Microplate Reader.

SONICADOR - Ultrasonic Processor, 1 watt, pulso continuo.

ENTRECRUZADOR UV - BioRad GS GENE LINKER, Sterilization UV Resistant Medical, Str 90 sec.

AUTOCLAVE - Cristófoli, 120°- 21 libras - 300 ml de agua, 1 hora.

INCUBADORA - Felisa a 35°.

AGITADORA - Cleaver Scientifics Lid a 35°y 100 rpm.

VORTEX - Daigger Vortex Genie 2.

MICROSCOPIO - Nikon Eclipse Ni con una cámara adaptada Nikon DS. Ri1 y una lámpara de mercurio de súper alta presión.

TUBOS DE CENTRIFUGADO - Costar de 2.0 mL y Corning CentriStar de 50 ml.

ANEXO B: ESPECIFICACIONES DE LOS COMPUESTOS Y MATERIAL

Fórmulas Buffer

Buffer A (Sodium phosphate monobasic)

0.48g - Sodium phosphate monobasic

20 ml ddH₂O

Buffer B (Sodium phosphate dibasic)

2.84g - Sodium phosphate dibasic

100 ml ddH₂O

Buffer C

19 ml - Buffer A

81 ml - Buffer B

Ajustar pH a 7.4

Buffer para fijar (gutaraldehído 2%)

1 ml - glutaraldehído al 20 %

9 ml - Buffer C

Buffer para lavar

25 ml - ddH₂O

75 ml - Buffer C

AGAR DE SOYA TRIPTICASEINA (TSA) - BD BIOXON, Medio de cultivo deshidratado.

CALDO DE SOYA TRIPTICASEINA (TSB) - BBL, Becton Dickinson suplementado con 0.3 µg/mL de menadiona y 5 µg/mL de hemina.