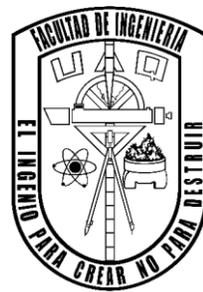


Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología



**Evaluación antimicrobiana de Ag-TiO₂ obtenido a partir de biosíntesis
acoplada a microondas**

TESIS

Que como para los requisitos para obtener el grado de

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta

Jacqueline Torres Limiñana

Dirigida por

Dra. Karen Esquivel Escalante (FIN)

Co-dirigida por

Dr. José Antonio Cervantes Chávez (FCN)



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



**Evaluación antimicrobiana de Ag-TiO₂ obtenido a partir de biosíntesis acoplada
a microondas**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta

Jacqueline Torres Limiñana

Dirigida por

Dra. Karen Esquivel Escalante (FIN)

Co-dirigida por

Dr. José Antonio Cervantes Chávez (FCN)

Dra. Karen Esquivel Escalante
Presidente

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Secretario

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Vocal

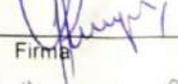
Dr. Rafael Hernández Rangel
Suplente



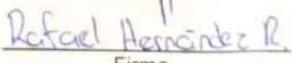
Firma



Firma



Firma



Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2022
México

Tabla de contenido

Resumen	10
Abstract	12
1. Introducción	14
2. Antecedentes.....	16
2.1. Fotocatálisis	16
2.2. TiO ₂	16
2.3. Métodos de síntesis del TiO ₂	18
2.4. Biosíntesis.....	19
2.4.1. Eucalipto.....	21
2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	23
2.5.1. <i>S. aureus</i>	24
2.5.2. <i>E. coli</i>	25
3. Descripción del problema y justificación	26
4. Hipótesis y Objetivos	27
4.1. Hipótesis	27
4.2. Objetivo general	27
4.3. Objetivos específicos	27
5. Metodología.....	29
5.1. Preparación de muestras vegetales.....	29

5.2.	Extracción mediante baño ultrasónico.....	29
5.3.	Caracterización de los extractos vegetales	29
5.3.1.	Determinación de la concentración de fenoles mediante Folin-Ciocalteu 30	
5.3.2.	Determinación de la concentración de flavonoides.....	31
5.3.3.	Caracterización de actividad antioxidante mediante DPPH	32
5.3.4.	Caracterización de actividad antioxidante mediante ABTS	33
5.4.	Síntesis y caracterización de las AgNPs	34
5.5.	Síntesis y caracterización del composito Ag-TiO ₂ mediante sol-gel acoplado a microondas	35
5.6.	Pruebas antimicrobianas.....	36
6.	Resultados.....	38
6.1.	Caracterización del extracto de eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> L.)	38
6.1.1.	UV-Vis	38
6.1.2.	FT-IR	38
6.1.3.	Metabolitos secundarios	40
6.2.	Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)	48
6.2.1.	Espectroscopía UV-Vis.....	48
6.3.	Caracterización del composito Ag-TiO ₂	51
6.3.1.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	51
6.3.2.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	55

6.3.3.	Difracción de rayos X (XRD).....	58
6.3.4.	Espectroscopía Raman	61
6.3.5.	Espectroscopía de reflectancia difusa (DRS)	62
6.4.	Evaluación antimicrobiana del composito Ag-TiO ₂	64
7.	Conclusiones	67
8.	Perspectivas	69
9.	Referencias bibliográficas	70
10.	Anexos.....	79
10.1.	Metabolitos secundarios	79
10.1.1.	Fenoles.....	79
10.1.2.	Flavonoides	79
10.2.	Pruebas antimicrobianas.....	79

Índice de ilustraciones

Figura 1: <i>E. coli</i> en agar LB, a) control y b) tratamiento	37
Figura 2: UV-Vis de extractos de eucalipto	38
Figura 3: FT-IR del extracto de eucalipto preparado con a) alcoholes, b) alcoholes/agua, c) etanol y etanol/agua y d) metanol y metanol/agua	39
Figura 4: Curva de calibración fenoles	41
Figura 5: Contenido total de polifenoles en miligramos de equivalentes de ácido gálico sobre gramos de muestra	42
Figura 6: Curva de calibración flavonoides	43
Figura 7: Contenido total de flavonoides en miligramos de equivalentes de rutina sobre gramos de muestra	44
Figura 8: Curva de calibración DPPH.....	45
Figura 9: Capacidad antioxidante por DPPH en porcentaje de inhibición del radical	45
Figura 10: Curva de calibración ABTS	47
Figura 11: Capacidad antioxidante por ABTS en porcentaje de inhibición del radical	47
Figura 12: Cambio de color en la formación de las nanopartículas de plata a) al agregar el extracto y b) al finalizar el tiempo de síntesis	49
Figura 13: UV-Vis nanopartículas de plata	50
Figura 14: micrografía SEM de Ag-TiO ₂ sintetizado convencionalmente observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x	52

Figura 15: micrografía SEM de Ag-TiO ₂ sintetizado convencionalmente asistido por microondas observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x.....	53
Figura 16: micrografía SEM de Ag-TiO ₂ biosintetizado observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x.....	54
Figura 17: micrografía SEM de Ag-TiO ₂ biosintetizado y asistido por microondas observado a a) 2,000x, b) 5,000x, c) 10,000x.....	55
Figura 18: micrografía TEM de TiO ₂ a) sintetizado convencionalmente y b) asistido por microondas.....	56
Figura 19: micrografía TEM de Ag-TiO ₂ sintetizado a) convencionalmente y b) asistido por microondas.....	57
Figura 20: micrografía TEM de Ag-TiO ₂ a) biosintetizado y b) asistido por microondas.....	57
Figura 21: XRD de muestras de Ag-TiO ₂	58
Figura 22: espectro Raman de muestras de Ag-TiO ₂ sintetizado convencionalmente (Ag-TiO ₂ c), asistido por microondas (Ag-TiO ₂ cM), biosintetizado (Ag-TiO ₂ e) y asistido por microondas (Ag-TiO ₂ eM).....	61
Figura 23: DRS y gráficas de Tauc de muestras de Ag-TiO ₂ a) sintetizado convencionalmente, b) asistido por microondas, c) biosintetizado y d) biosintetizado asistido por microondas.....	63
Figura 24: evaluación antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas convencionalmente.....	80
Figura 25: evaluación antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas mediante el extracto de eucalipto.....	81
Figura 26: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio sintetizado convencionalmente.....	81

Figura 27: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio sintetizado convencionalmente asistido por microondas.....	82
Figura 28: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado convencionalmente	82
Figura 29: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado convencionalmente asistido por microondas.....	83
Figura 30: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado mediante el extracto de eucalipto.....	83
Figura 31: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado mediante el extracto de eucalipto asistido por microondas	84

Índice de tablas

Tabla 1. Nanomateriales sintetizados a partir de métodos más amigables con el medio ambiente.....	22
Tabla 2. Soluciones para el método de Folin-Ciocalteu	30
Tabla 3. Soluciones para el método DPPH	32
Tabla 4. Cantidades a usar para incubar control y tratamiento	36
Tabla 5: bandas IR en los extractos de eucalipto [85].....	40
Tabla 6: Porcentaje de inhibición por DPPH	46
Tabla 7: Porcentaje de inhibición por ABTS	48
Tabla 8: Tamaño de cristalito por Debye-Scherrer	59
Tabla 9: Tamaño de cristalito por Williamson-Hall	59
Tabla 10: Parámetros de red.....	60
Tabla 11: Band gap de los materiales obtenidos.....	62
Tabla 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de los materiales sintetizados en el presente trabajo.....	64
Tabla 13: concentración de fenoles en los distintos extractos	79
Tabla 14: concentración de flavonoides en los distintos extractos	79
Tabla 17: resultados de la evaluación antimicrobiana en UFC	79

Resumen

Los problemas de contaminación por sustancias persistentes y microorganismos en cuerpos de agua que se presentan en la actualidad requieren soluciones que materiales fotocatalizadores como el dióxido de titanio pueden proveer debido a sus excelentes propiedades fotocatalíticas y antimicrobianas. Sin embargo, los métodos de síntesis utilizados convencionalmente para la obtención de dichos materiales suelen involucrar reactivos químicos tóxicos que comprometen las aplicaciones y requieren de pasos adicionales de purificación. Derivado de esto, surge la búsqueda de métodos de síntesis alternativos que utilicen sustancias amigables con el medio ambiente que posibiliten de manera más directa sus aplicaciones.

En el presente trabajo se realizó la biosíntesis de dióxido de titanio dopado con plata a través de extracto de *Eucalyptus globulus* L. como agente reductor mediante un proceso sol-gel y sol-gel asistido por microondas. Se realizaron las extracciones a partir de las hojas del eucalipto secas y previo a la síntesis del dióxido de titanio se probaron cuatro solventes distintos para sintetizar nanopartículas de plata con el objetivo de optimizar el proceso y obtener el dióxido de titanio a partir de un solo tipo de extracto. Se realizó la caracterización de metabolitos secundarios y actividad antioxidante de los extractos de eucalipto para conocer su papel en la reducción de las nanopartículas de plata.

Se evaluaron las propiedades antimicrobianas de los materiales obtenidos contra los sintetizados convencionalmente y el dióxido de titanio sin dopar para comprobar una efectividad comparable entre materiales de síntesis distintas. Se analizó su efectividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como representantes de bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente.

También se caracterizaron las propiedades del extracto de eucalipto mediante UV-Vis y FT-IR, UV-Vis para las nanopartículas de plata y SEM, TEM, XRD, espectroscopía Raman y espectroscopía de reflectancia difusa para el compuesto Ag-TiO₂.

Se realizó la biosíntesis de las nanopartículas de plata con eucalipto extraído a partir de etanol de acuerdo con los resultados observados para espectroscopía UV-Visible que indican un tamaño de partícula de entre 2-5 nm. En el análisis por FT-IR se tienen diferencias en la capacidad extractora de los solventes, así mismo, la evaluación de metabolitos secundarios y actividad antioxidante de los distintos extractos sugieren que el etanol recupera compuestos distintos a los evaluados que permiten la reducción del nitrato de plata a nanopartículas de plata. Se obtuvo dióxido de titanio en fase anatasa dopado con plata que no presentó una brecha de banda menor al material sin dopar, sin embargo, los valores de inhibición bacteriana son cercanos al 100% sugiriendo un mecanismo antimicrobiano efectivo relacionado con las propiedades de la plata.

Palabras clave: Biosíntesis; Dióxido de titanio; Plata; Evaluación antimicrobiana

Abstract

Contamination problems related to persistent substances and microorganisms in water bodies nowadays require solutions that can be provided by photocatalysts such as titanium dioxide due to its excellent photocatalytic and antimicrobial properties. Nevertheless, conventional synthesis methods involve hazardous chemicals that compromise the potential applications and require additional purification steps. This way surges the search for alternative synthesis methods that involve non toxic substances and allows a wider range of direct applications.

In the present work the biosynthesis of silver doped titanium dioxide via extract of *Eucalyptus globulus* L. as reducing agent by the sol-gel and microwave coupled sol-gel method. The extracts were prepared with dry eucalyptus leaves and previous to the titanium dioxide synthesis four different solvents to obtain silver nanoparticles for the optimization of the process and proceed with the titanium dioxide synthesis with one type of extract. Secondary metabolites and antioxidant activity characterization was executed to assess their role in the reduction of silver nanoparticles.

The antimicrobial properties of the materials obtained versus the ones conventionally synthesized and non-doped titanium dioxide were assessed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as Gram positive and Gram negative bacteria, respectively, to prove the effectiveness of biosynthesized materials.

The eucalyptus extract was characterized by UV-Vis and FT-IR, silver nanoparticles by UV-Vis and Ag-TiO₂ composite by SEM, TEM, XRD, Raman spectroscopy and DRS.

The biosynthesis of the silver nanoparticles was carried with eucalyptus extracted by ethanol in accordance with the results observed in UV-Vis spectroscopy that indicate a particle size of 2-5 nm. FT-IR analysis showed differences in the extraction capabilities between solvents and the secondary metabolites evaluation with the antioxidant activity suggest ethanol recovers other compounds than the evaluated here, able to form silver nanoparticles from silver nitrate. Anatase silver doped

titanium dioxide was obtained which didn't present a reduction in the band gap in comparison with the non-doped material, although, bacterial inhibition values are close to 100% suggesting an antimicrobial mechanism related to the silver properties.

Keywords: Biosynthesis, Titanium Dioxide, Silver, Antimicrobial evaluation

1. Introducción

La calidad del agua se ve afectada cuando sustancias como compuestos químicos, contaminantes físicos o microorganismos entran con frecuencia en los cuerpos de agua, siendo a largo plazo perjudicial para los seres humanos y para el medio ambiente. Como solvente universal, el agua es especialmente propensa a la contaminación [1].

Existe una amplia gama de bacterias, virus, algas, hongos y protozoos que representan riesgos tanto directos como indirectos para la calidad del agua. La presencia de los contaminantes microbianos en los cuerpos de agua está influenciada por varios factores, como el clima estacional, el flujo de los arroyos, la temperatura del agua, la distancia de la fuente de contaminación, las prácticas de manejo del ganado, la actividad de la vida silvestre, el desbordamiento de las aguas residuales y la lluvia [2].

Además, nuevas formas de contaminantes orgánicos (contaminantes emergentes) han surgido y están muy extendidas en aguas superficiales, planteando un problema para los servicios de agua. El estado regulatorio poco claro de contaminantes derivados de las industrias del carbón, petróleo y las farmacéuticas hace que sean persistentes en el medio ambiente y que su remoción del agua sea complicada [3].

Los tratamientos en general no son efectivos con efluentes que contienen compuestos poco o no biodegradables. Por lo tanto, es necesario utilizar algún tipo de pre-tratamiento para transformar el contaminante en un intermediario con mayor biodegradabilidad. Los Procesos Avanzados de Oxidación (PAOs) se proponen como una alternativa basada en la generación del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el cual es capaz de oxidar completamente contaminantes muy poco reactivos y reacciona de forma no selectiva con los compuestos orgánicos [4].

Dentro de los PAOs se encuentra la Fotocatálisis Heterogénea (FH). Este proceso se lleva a cabo mediante un catalizador semiconductor que puede ser excitado

fácilmente mediante radiación electromagnética para formar sitios donadores y captadores de electrones dando lugar a reacciones de oxidación-reducción [5].

La fotocatalisis es considerada como uno de los mejores métodos para la purificación ambiental, ya que evita la introducción de compuestos químicos oxidantes como el ozono, peróxido de hidrógeno y cloro al ambiente [6].

El dióxido de titanio (TiO_2) es uno de los catalizadores más comercializados y presenta ventajas debido a su relativa baja toxicidad, alta estabilidad fotoquímica, excelente actividad fotocatalítica y bajo costo [5], [7].

La mayor barrera para la aplicación del TiO_2 en la fotocatalisis es su baja actividad catalítica con radiación solar. Entre las diversas maneras de mejorar su desempeño fotocatalítico para inhibir la recombinación de los portadores de carga y extender su capacidad de trabajo a la región de la luz visible, se encuentran la modificación superficial, el dopado y la formación de heterouniones (uniones entre dos semiconductores cuya banda prohibida es distinta) con otros semiconductores; sin embargo, la modificación con metales nobles parece ser la forma más prometedora ya que retarda la recombinación de los portadores de carga y hace que el TiO_2 se active por las propiedades plasmónicas de los metales nobles bajo irradiación de luz visible [8].

Con respecto al método de síntesis, los métodos químicos presentan desventajas que incluyen el uso de sustancias tóxicas como agentes reductores y con ello riesgos biológicos y ambientales. Los métodos físicos requieren altas temperaturas y presiones lo cual genera altos costos de producción. Una alternativa a los métodos ya mencionados son las técnicas de biosíntesis usando extractos de plantas, bacterias y/o hongos. Sus ventajas sobre los otros métodos van desde simplicidad, rentabilidad y compatibilidad para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas [9]. En el presente trabajo se realizó una evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata a través de una biosíntesis usando como agente reductor extracto etanólico de eucalipto.

2. Antecedentes

2.1. Fotocatálisis

En 1972, Fujishima y Honda reportaron por primera vez que la descomposición fotoelectroquímica del agua en hidrógeno (H_2) y oxígeno (O_2) podría lograrse en un contraelectrodo de platino (Pt) y un electrodo de trabajo de dióxido de titanio (TiO_2) monocristalino de fase rutilo “tipo n” (dopados con elementos del grupo V de la tabla periódica) en una celda fotoelectroquímica, bajo irradiación de luz UV y un pequeño voltaje de polarización aplicado [10]. A partir de ese trabajo, la fotocatálisis heterogénea empezó a llamar mucho la atención en los campos de la energía y las ciencias ambientales porque puede aprovechar de manera eficiente la luz solar cuando se dopa, en lugar de otras fuentes de energía [11].

La fotocatálisis es un fenómeno químico sinérgico de fotones y catalizadores donde la luz y un material fotoactivo se utilizan para llevar a cabo o acelerar una reacción química [12].

Se dice que la catálisis es heterogénea cuando el catalizador es sólido y el medio de reacción es líquido o gaseoso mientras que es homogénea cuando el catalizador se disocia completamente en la solución al finalizar la reacción [13].

La fotocatálisis heterogénea es una de las tecnologías más atractivas entre los PAOs debido a ventajas como: la degradación de compuestos complejos en sustancias simples y no peligrosas, no produce residuos ni lodos secundarios, puede ser reutilizada porque el catalizador y la actividad fotocatalítica se mantienen casi iguales a través del proceso de tratamiento, la concentración del fotocatalizador usado es pequeña por la gran área superficial de catalizadores en la nanoescala y es una alternativa de bajo costo y efectiva para remediación medioambiental [14].

2.2. TiO_2

El dióxido de titanio (TiO_2), es un semiconductor “tipo n” (electrones como portadores de carga mayoritarios), sensible a la luz que absorbe radiación

electromagnética, principalmente en la región UV; además es estable químicamente [15].

Los semiconductores actúan como catalizadores debido a su estructura electrónica específica: tienen una banda de valencia (BV) llena y una banda de conducción (BC) vacía con una brecha energética (bandgap) del orden de unos cuantos electron-volts (eV). Un fotón con una energía igual o mayor a la energía de la bandgap puede activar al semiconductor produciendo que un electrón (e^-) de la BV pase a la BC dejando un hueco (h^+) en la BV. Tanto el electrón como el hueco pueden moverse libremente a través de la estructura del semiconductor y están involucrados en las reacciones de oxidación y reducción de la degradación de contaminantes [16].

El TiO_2 existe en distintas formas cristalinas bajo condiciones estándar de presión y temperatura, así como otras formas reportadas bajo altas presiones. Estas incluyen anatasa (tetragonal), rutilo (tetragonal), $TiO_2-\beta$ (monoclínico), brookita (ortorrómbico), TiO_2-R (estructura de ramsdellita), TiO_2-H (estructura de hollandita), TiO_2-II (tipo columbita) y TiO_2-III (tipo baddeleyita) [17].

Ha sido extensamente estudiado como fotocatalizador en los PAOs, debido a su disponibilidad y bajo costo, aunado a características como su estabilidad física y química, estabilidad a la fotocorrosión y no toxicidad [18]–[23].

Entre los semiconductores, es considerado como referencia en relación con su actividad fotocatalítica, y como agente antibacteriano, mostrando ser efectivo en la inactivación de bacterias [24], [25]. El mecanismo tras estas propiedades se atribuye a la formación de especies reactivas de oxígeno en la superficie del dióxido de titanio, induciendo estrés oxidativo en las bacterias que termina por dañar el material genético y comprometer la viabilidad celular [24]. También se ha visto efectos biocidas en experimentos realizados en oscuridad que se atribuyen a la adsorción de las bacterias en la superficie del dióxido de titanio bloqueando el proceso de nutrición y excreción de desechos, conduciendo a la muerte celular [24].

2.3. Métodos de síntesis del TiO₂

Desde 1972, el TiO₂ se ha usado de forma regular como fotocatalizador y se han desarrollado varios métodos de fabricación, clasificados en físicos (como sputtering, deposición física de vapor y por ablación laser) y químicos (por ejemplo, hidrotermal, sol-gel, sonoquímica, electrodeposición, microondas y deposición química de vapor) [23].

Algunas ventajas de los métodos de síntesis químicos es que son técnicas simples, presentan bajos costos, se necesita menos instrumentación (a comparación de muchos métodos físicos), bajas temperaturas de síntesis (<350°C), opción de dopado durante la síntesis, es posible obtener una variedad de tamaños y formas, y los materiales se obtienen en forma líquida, pero pueden ser convertidos fácilmente en polvos o películas delgadas. [26].

El método de sol-gel es un proceso ampliamente conocido en la síntesis de polvos de óxidos metálicos debido a sus bajas temperaturas y bajos costos, al menor uso de material de los precursores para preparar la solución del sol, se puede distribuir uniformemente en un sustrato, es posible sintetizar sustancias altamente volátiles y varias formas de estructuras [27].

El sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas en escala nanométrica en una fase líquida. Cuando estas partículas se atraen entre ellas, bajo las correctas condiciones, se unen formando una red tridimensional llamada gel [28].

La formación de nanopartículas coloidales e independientes de óxidos metálicos consiste brevemente en:

- 1) Hidrólisis de los iones metálicos (M^{+y}) para formar M(OH)_x.
- 2) Condensación de M(OH)_x para formar clústeres moleculares estables con puentes oxo (M-O-M) o hidroxilo (M-OH-M) y la generación de H₂O como subproducto.

- 3) Crecimiento del núcleo mediante la adición de especies reactivas ($M(OH)_x$ y clústeres) disponibles en la solución de la superficie del núcleo, formando el sol de NPs coloidales.
- 4) Coagulación del sol de NPs de MO_x mediante una reacción de condensación, formando una red porosa e inorgánica que encierra una fase continua de agua (el gel).
- 5) La evaporación del solvente y el secado del gel mediante un tratamiento térmico [29].

Los acercamientos convencionales para llevar a cabo las reacciones de síntesis suelen tener inconvenientes relacionados con los tiempos de reacción, bajos rendimientos, grandes cantidades de reactivos tóxicos y/o caros y altas temperaturas en algunos casos, convirtiéndolos en poco seguros y algunas veces no económicos [30].

Sin embargo, la mayoría de los materiales semiconductores no poseen las propiedades ópticas necesarias para iniciar la inactivación microbiana sin la excitación apropiada; además de que las eficiencias fotocatalíticas de un material de un solo componente no son ideales debido a la alta tasa de recombinación de los portadores de carga fotoinducidos. Para resolver este inconveniente, se han realizado modificaciones de dichos materiales [31].

2.4. Biosíntesis

Una de las mayores desventajas del TiO_2 es que su brecha de banda (3.2 eV) requiere fotoactivación con longitudes de onda menores a los 387 nm, por lo tanto, sólo es ópticamente activo bajo la región ultravioleta del espectro solar que representa entre un 4% y 6% de la luz solar, en contraste con la luz visible que representa un 45% [21], [23], [32]. Entre los métodos para mejorar la respuesta fotocatalítica del TiO_2 , así como reducir la recombinación de los electrones y huecos fotogenerados, se encuentra el dopaje [33].

El dopaje es la inclusión de elementos metálicos o no metálicos en la red cristalina de un semiconductor y pueden ser de “tipo n” si el dopante tiene una valencia mayor que el dopado o “tipo p” si la valencia del dopante es menor. Se puede dar al sustituir el catión o el anión en el semiconductor o al ocupar una posición intersticial en la red. Algunas de las técnicas usadas para preparar semiconductores dopados son: coprecipitación seguida de calcinación, síntesis hidrotermal, síntesis solvotermal y sol-gel [34].

Los tipos de dopantes usados pueden ser aniónicos como nitrógeno, carbono y azufre o catiónicos como hierro, platino, paladio, oro y plata [35], [36]. El dopado con metales puede reducir la energía de banda y mejorar el uso de la luz para procesos de degradación al introducir estados por debajo de la banda de conducción y al evitar la recombinación electrón/hueco funcionando como trampa de electrones [37], [38].

Entre los dopantes catiónicos, los metales nobles como la plata metálica y el oro han sido extensamente estudiados por sus propiedades y su contribución hacia la absorción de luz visible [39].

La plata (Ag) es un conocido agente antibacteriano cuyas propiedades se pueden manifestar sin la irradiación de luz; los nanocompositos fotocatalizadores de Ag con TiO₂ han resultado en un amplio rango de nanomateriales con actividad en la luz visible [40]. Además, han demostrado un efecto bactericida en pruebas con bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, entre otras) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otras) [25], [41].

Con respecto a los métodos de síntesis, las estrategias convencionales fisicoquímicas para la fabricación de nanomateriales implican la participación de materiales peligrosos y volátiles. Hay varias rutas amigables con el medio ambiente y biológicas para la fabricación biogénica de nanomateriales usando plantas y microorganismos como algas, bacterias, hongos, virus, levaduras y materiales de desecho o la fusión de alguno de los métodos biogénicos anteriormente

mencionados con una activación alternativa con microondas o ultrasonido [42]. El método biosintético ha demostrado ser un acercamiento exitoso para la síntesis verde de nanopartículas y nanocompositos en un sólo paso, bajo en costos, rápido y ecológico [43].

Se ha reportado la biosíntesis de diversos tipos de nanomateriales utilizando extractos producidos a partir de plantas, microorganismos, microalgas, hongos, bacterias y otras biomoléculas [44]–[49] produciendo formas y tamaños variados.

Los procesos que usan extractos de plantas parecen tener ventajas sobre otros métodos con respecto al escalamiento y producción industrial en cuanto a facilidad y seguridad [50].

Para la síntesis biogénica de nanomateriales se ha evaluado una gran cantidad de plantas. Entre ellas se encuentran el *Aloe vera* L., *Jacaranda mimosifolia* L., *Tamarindus indica* L., *Moringa oleífera* L., *Zingiber officinale* L. y *Eucaliptus globulus* L. [46].

2.4.1. Eucalipto

El eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) es un miembro de la familia Myrtaceae y es un árbol alto de hoja viva que permanece a lo largo de todo el año [51].

Eucalyptus es un género muy diverso con más de 700 especies nativas de Australia y regiones adyacentes que ha sido introducido a todos los continentes excepto la Antártica, siendo la especie de madera dura más plantada en el mundo [52].

Las hojas de *E. globulus* L. son un componente importante del género *Eucalyptus* y tienen aplicaciones importantes dentro de la industria de los saborizantes, desinfectantes de aire y fragancias [53]. Las plantaciones de eucalipto ocupan más de 20 millones de hectáreas globalmente [54] y las hojas de *E. globulus* L. presentan un amplio rango de compuestos incluyendo monoterpenos como 1,8-cineole, flavonoides, taninos y polifenoles relacionados [55].

Estudios realizados hacen énfasis en el potencial de diversas especies de eucalipto como fuente de compuestos fenólicos y flavonoides con buenas propiedades antioxidantes para aplicaciones biomédicas y relacionadas al estrés oxidativo haciendo posible su uso en la síntesis de materiales [56].

La obtención del extracto de eucalipto se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas con variaciones importantes en los tiempos de extracción, temperaturas y solventes. Algunas de las técnicas más utilizadas son la extracción Soxhlet, extracción por microondas, mediante agitador orbital, extracción supercrítica de fluido, extracción asistida por sonoquímica (directa e indirecta), entre otros [57]–[60]

Existen varios trabajos reportados sobre síntesis de NPs de AgTiO₂ con base en extracto de eucalipto como agente reductor, tal y como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Nanomateriales sintetizados a partir de métodos más amigables con el medio ambiente.

Tipo de nanomaterial	Descripción	Referencia
Nanocompositos de Ag/TiO ₂	Usando extracto de hojas de <i>Euphorbia heterophylla</i> como solvente en vez de solventes orgánicos.	[9]
NPs TiO ₂	Mediante biosíntesis usando un extracto acuoso de hojas de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	[61]
NPs Ag/TiO ₂	Fabricación verde usando el extracto acuoso de <i>Acacia nilótica</i> L. como bioreductor.	[62]
Nanocompositos de Ag/TiO ₂ .	Usando extracto de <i>Padina tetrastromatica</i> L. para la síntesis.	[63]

NPs Ag/TiO ₂	Mediante un acercamiento verde usando gel de <i>Aloe vera</i> L. como agente reductor.	[64]
NPs Ag	Optimización de parámetros de biosíntesis mediante extracto acuoso de <i>Eucalyptus oleosa</i> L.	[65]
NPs Ag	Síntesis verde utilizando extractos acuosos de <i>Eucalyptus urophylla</i> L., <i>Eucalyptus citriodora</i> L. y <i>Eucalyptus robusta</i> L.	[66]
NPs Ag	Síntesis, evaluación antimicrobiana y de citotoxicidad mediante extractos acuosos de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> L.	[67]
NPs Ag	Síntesis y actividad contra el cáncer mediante extractos acuosos de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> L.	[68]

Por lo que se ha mostrado un alto interés en el uso de procesos de síntesis amigables con el medio ambiente por sus implicaciones económicas y técnicas, principalmente Khalaj (2020) [69], teniendo resultados prometedores reportados por Chelli (2018), Hariharan (2019), Kumar (2016), Rao (2016) y Shen (2017) [70]–[74].

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Además de sus aplicaciones para degradación de contaminantes, el dióxido de titanio exhibe propiedades antimicrobianas que se ven mejoradas cuando se dopa con elementos probados efectivos contra microorganismos, como la plata [24].

Bacterias como *S. aureus*, *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa*, *Clostridium difficile*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *M. tuberculosis* y *Neisseria*

gonorrhoeae causan enfermedades severas en humanos todos los años. La principal solución a este problema son los agentes antibióticos, antimicrobianos y antifúngicos, sin embargo, la resistencia de algunas cepas bacterianas ha ido en aumento y con ello el interés en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos [75].

El término “agente antimicrobiano” se aplica mayormente a sustancias que funcionan para bacterias (antibacteriano) pero también se puede utilizar en agentes que funcionan contra hongos, virus y parásitos. Hoy en día hay aproximadamente 4000 compuestos identificados con propiedades antibióticas derivadas de 3 fuentes principales: moho y hongos, bacterias y compuestos sintéticos o semisintéticos. Los antibióticos se pueden clasificar según su habilidad para atacar bacterias Gram positivas o Gram negativas (antibióticos de amplio y reducido espectro) y actúan de manera selectiva en funciones bacterianas vitales con afectación mínima a la célula huésped; se dividen en bacteriostáticos o bactericidas dependiendo de si impiden la reproducción de las bacterias o provocan su muerte, respectivamente [76].

Los agentes antimicrobianos actúan en formas distintas y comprender estos mecanismos, así como la naturaleza química de los agentes antimicrobianos es vital para comprender la forma en la que las bacterias desarrollan resistencia contra ellos [76].

2.5.1. *S. aureus*

S. aureus es una bacteria Gram positiva que reside normalmente en la piel y mucosas. Su capacidad para provocar infecciones proviene de su habilidad para secretar exotoxinas causando enfermedades que pueden ser de evolución benigna hasta potencialmente mortales. La toxicidad sistémica grave es provocada por la enterotoxina B, clasificada como superantígeno que genera una gran respuesta inmune al unirse a ciertas proteínas en las células presentadoras de antígenos. Varios factores de virulencia son expresados por *S. aureus* que ayudan a su supervivencia en el cuerpo y daño del tejido huésped, por ejemplo, proteínas para

la colonización, invasinas para la dispersión de bacterias, inhibidores superficiales de fagocitosis y enzimas que provocan daño a la membrana [77].

2.5.2. *E. coli*

La bacteria *E. coli* es un organismo Gram negativo, en forma de bastón, anaeróbico facultativo que vive en el intestino de los animales de sangre caliente. La mayoría de sus cepas no son dañinas, sin embargo, algunas son patógenas para los seres humanos y animales causando infecciones gastrointestinales y extraintestinales como infecciones en el tracto urinario. Las enfermedades causadas por *E. coli* están relacionadas al consumo de comida y agua contaminadas denominadas de forma global como enfermedades transmitidas por alimentos [78].

La mayoría de los estudios muestra que las bacterias Gram positivas son más resistentes a la desinfección fotocatalítica que las bacterias Gram negativas. Esta situación se atribuye a la diferencia en la estructura de la pared celular entre bacterias Gram positivas y negativas, estas últimas que tienen una pared celular tricapa (membrana interna, capa de peptidoglicano y membrana externa) mientras que las positivas tienen una capa de peptidoglicano más gruesa, y carecen de membrana externa. [79].

3. Descripción del problema y justificación

Hoy en día, la contaminación microbiana se ha convertido en una preocupación ambiental creciente, ya que los patógenos como bacterias, virus y protozoos amenazan la salud humana y causan enfermedades infecciosas potencialmente peligrosas [80]. Aunado a que la contaminación de cuerpos de agua se ha convertido en un problema mundial crítico, la biosíntesis de nanomateriales surge como una solución prometedora y sustentable para la remoción de contaminantes en efluentes acuosos [42].

El dióxido de titanio ha demostrado una alta actividad fotocatalítica al doparse con metales y no metales, lo cual incrementa su sensibilidad espectral para poder usarlo con la luz del sol de forma más eficiente. La plata mejora la actividad fotocatalítica al actuar como trampa de electrones [81], además de ser un agente bactericida debido a su alta eficiencia de desinfección y actividad antibacteriana de amplio espectro [82]. Dicho material es obtenido por procesos convencionales de síntesis como el método sol-gel y con reducción química mediante agentes químicos como el borohidruro de sodio (NaBH_4), lo cual representa un problema ambiental por uso de dichos compuestos, como se ha expuesto en párrafos anteriores [83].

El extracto de eucalipto como agente reductor representa una alternativa amigable con el ambiente, además de ser fácil de encontrar en México. Trabajos previos de Mo (2015), Mohammed (2015) y Pourmortazavi (2015) [65]–[67] indican que dicho extracto puede ser aplicado para este tipo de procesos de síntesis, ya que las hojas del eucalipto contienen un amplio rango de compuestos activos que juegan papeles importantes en la reducción de los iones de plata.

La síntesis verde de nanomateriales es sustentable, relativamente económica, puede ser producida de una manera energéticamente eficiente y viable ecológicamente (en vista de su naturaleza biorenovable) y podría desempeñar un papel importante en los procesos de descontaminación de agua [42].

4. Hipótesis y Objetivos

4.1. Hipótesis

El uso de extracto de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) como agente reductor en la síntesis de nanopartículas de Ag como dopante de TiO₂, generará materiales con bajo impacto ambiental y con actividad antimicrobiana comparable a los materiales sintetizados con NaBH₄.

4.2. Objetivo general

Sintetizar mediante el método de sol-gel asistido por microondas, nanopartículas de Ag-TiO₂, usando como agente reductor el extracto de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.).

4.3. Objetivos específicos

- 1) Obtener extractos a partir de las hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) mediante extracción por sonoquímica indirecta (baño ultrasónico) y caracterizar mediante espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para identificar las transiciones en los enlaces de las moléculas presentes e identificar los grupos funcionales mediante la técnica de espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR).
- 2) Evaluar los metabolitos secundarios responsables de la capacidad reductora del extracto, mediante las determinaciones de fenoles y flavonoides totales por el método de Folin-Ciocalteu y la técnica del ácido 2-amino-etil éster difenil borato y actividad antioxidante por los ensayos de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).
- 3) Obtener mediante bio-reducción, nanopartículas de Ag evaluando diferentes concentraciones de extracto y caracterizar mediante espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para cálculo de tamaño promedio de partícula mediante el análisis de la señal plasmón.

- 4) Obtener Ag-TiO₂ mediante la biosíntesis acoplada al proceso de sol-gel y microondas y caracterizar a través de las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para observar la morfología, Difracción de Rayos X (XRD) para observar la estructura cristalina, Espectroscopía de Reflectancia Difusa (DRS) para determinar las propiedades de fotoabsorción y espectroscopía Raman para obtener información de la estructura cristalina.
- 5) Evaluar actividad antimicrobiana del composito en *S. aureus* y *E. coli* como representantes de bacterias Gram positivas y negativas respectivamente, para determinar su efectividad.

5. Metodología

5.1. Preparación de muestras vegetales

Las hojas de eucalipto fueron recolectadas de tres zonas: 19.668892, -101.541664; 19.668892, -101.541667; 20.217938, -100.896177 que corresponden a dos locaciones de Quiroga, Michoacán y una de Salvatierra, Guanajuato, respectivamente. Se pesaron y secaron en un horno de convección Dynamica Air Performance a 35°C hasta que dejaron de haber modificaciones en su peso, indicando que estaban completamente secas. Posteriormente se eliminaron las ramas y los frutos para reducir el tamaño de las hojas y almacenarlas en obscuridad y refrigeración. Finalmente se trituraron en una licuadora industrial con hielo seco con el propósito de obtener un polvo y conservarlo en congelación (-81°C) y obscuridad.

5.2. Extracción mediante baño ultrasónico

La extracción se realizó en proporción sólido/líquido de 1/10 (w/v) [60] en un baño ultrasónico marca Branson modelo 1510, siendo el sólido, previamente tratado como se menciona en la sección 5.1. Se realizaron las extracciones probando cuatro mezclas de solventes distintas: etanol, metanol, etanol/agua 50/50 y metanol/agua 50/50 [57], [60]. Las condiciones de operación del baño ultrasónico fueron 50°C por 30 minutos [53], [55].

Posteriormente se separó la parte sólida del extracto mediante filtración con ayuda de una bomba de vacío y matraz Kitasato manteniendo las condiciones de obscuridad para evitar la fotodegradación de las moléculas presentes en el extracto.

Finalmente se sometió el extracto a tres ciclos de centrifugación por 20 minutos y 8500 rpm con el fin de eliminar lo más posible los restos sólidos.

5.3. Caracterización de los extractos vegetales

Previo a la síntesis de las nanopartículas de plata, se realizó la caracterización del extracto obtenido mediante las técnicas de espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para determinar la presencia de los compuestos antioxidantes [9], [84] y espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR) para un análisis químico del extracto [57] que confirme la presencia de constituyentes fitoquímicos en el eucalipto con grupos funcionales [85].

La determinación de la concentración de fenoles y flavonoides se llevó a cabo mediante la técnica de Folin-Ciocalteu y la técnica de reacción del ácido 2-aminoetil éster difenil borato, respectivamente [86]–[88].

5.3.1. Determinación de la concentración de fenoles mediante Folin-Ciocalteu

Para el método de Folin-Ciocalteu primero se realizó una curva de calibración de ocho soluciones, más la solución blanco, a diferentes concentraciones de ácido gálico, tal y como se muestra en la Tabla 2, en el orden de izquierda a derecha en microtubos de 1.5 mL [86], [89]:

Tabla 2. Soluciones para el método de Folin-Ciocalteu

Tubo	Solución de ácido gálico (μL)	Agua destilada (μL)	Folin (μL)	Na ₂ CO ₃ al 20% (μL)
Blanco	0	0	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250

7	140	360	250	1250
8	160	340	250	1250

Posteriormente se agitaron las soluciones en un vortex y se dejaron reaccionar por dos horas en obscuridad. Transcurrido este tiempo, se colocaron triplicados de 200 μL para cada muestra en una placa de 64 pozos y se analizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific modelo Multiskan GO a 760 nm.

Una vez obtenida la curva de calibración, se llevó a cabo el análisis de las muestras preparadas, tomando 40 μL del extracto que se colocó en microtubos de 1.5 mL junto con 460 μL de agua destilada, 250 μL de reactivo Folin-Ciocalteu y 1250 μL de Na_2CO_3 . Se agitaron en un vortex y se dejaron reaccionar en obscuridad por dos horas. Transcurrido este tiempo se colocaron triplicados de 200 μL para cada muestra en una placa de 64 pozos y se analizaron a 760 nm.

Los resultados se reportan como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra orgánica.

5.3.2. Determinación de la concentración de flavonoides

Para la determinación de flavonoides se realizó una curva de calibración a partir de una solución stock de rutina 0.025 g en 10 mL de metanol a concentraciones de 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 y 2 $\mu\text{g/mL}$ con una solución de ácido 2-aminoetildifenil borato a 1% (0.01 g/mL). Se colocaron 50 μL de las diluciones por triplicado en una bandeja de 64 pozos con 180 μL de metanol, según corresponda con el solvente de extracción y 20 μL del ácido 2-aminoetildifenil borato. El blanco consistió en 230 μL de metanol y 20 μL de ácido 2-amino-etil éster difenil borato. Posteriormente se analizaron a 404 nm [86], [89].

Una vez realizada la curva de calibración, para el análisis de flavonoides en las muestras, se colocaron en una bandeja de 64 pozos 50 μL del extracto, 180 μL de metanol y 20 μL de la solución de ácido 2-aminoetildifenil borato. El blanco se preparó también por triplicado adicionando 50 μL del extracto y 200 μL de metanol.

Finalmente se analizó a 404 nm. Los resultados se reportan como mg equivalentes de rutina/g de muestra orgánica.

La caracterización de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el análisis de la neutralización del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), así como la decoloración del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

5.3.3. Caracterización de actividad antioxidante mediante DPPH

Para el método DPPH se realizó una curva de calibración utilizando Trolox como reactivo patrón.

La solución de DPPH se preparó con 0.0015 g de DPPH y 20 mL de metanol, se sonicó por 10 minutos, y se aforó a 25 mL con agua destilada.

La solución stock de Trolox consiste en 0.0025 g de Trolox aforados a 10 mL con metanol. Posteriormente se realizó la preparación de las distintas concentraciones de Trolox partiendo de la solución stock y se colocaron en viales ámbar [89] como se presenta en la Tabla 3:

Tabla 3. Soluciones para el método DPPH

Tubo	Trolox stock (μL)	Metanol concentrado (μL)
1	50	950
2	100	900
3	200	800
4	300	700
5	400	600
6	500	500
7	600	400
8	700	300

9	800	200
---	-----	-----

A continuación, se agregaron a los pozos 220 μL por triplicado del blanco, el control y las distintas concentraciones de Trolox de la siguiente manera, respectivamente: 20 μL de metanol y 200 μL de agua destilada HPLC; 20 μL de metanol y 200 μL de la solución DPPH; 20 μL de cada concentración de Trolox y 200 μL de DPPH. El DPPH se agregó en menos de 1 minuto y la placa se midió a 520 nm en distintos periodos de tiempo (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 min) contados a partir de que se colocó el DPPH.

La cinética se realizó a los 120 minutos ya que, a este tiempo, el radical DPPH ya es estable.

El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación (1):

$$\%IBH = 100 - \left[\frac{Abs\ t_0 - Abs\ t_{120}}{Abs\ t_0} \right] \quad (1)$$

Donde t_0 se refiere a la primera lectura y t_{120} a la lectura pasados 120 minutos de reacción.

Para el análisis de las muestras se colocarán 20 μL del extracto en una placa de 64 pozos y 200 μL de DDPH. Una vez transcurrido el tiempo, la lectura se analizó a 520 nm [87], [88].

5.3.4. Caracterización de actividad antioxidante mediante ABTS

Para el ensayo ABTS, la solución de trabajo se obtuvo dejando reaccionar en obscuridad una solución stock 7mM de ABTS con una solución de 2.45 mM de persulfato de potasio en cantidades iguales por 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una dilución mezclando 1 mL de la solución de trabajo con buffer salino de fosfato (PBS pH 7.4) hasta obtener una absorbancia de 0.70 en 734 nm. Se añadieron 2 μL de la solución de trabajo a 20 μL de los extractos o estándares Trolox (en concentraciones de 0, 3, 5, 10 y 16 μM) y se midió la

absorción pasados seis minutos de reacción. Soluciones blanco de etanol y metanol fueron utilizadas y las determinaciones se realizaron por triplicado [87], [88].

El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación (2):

$$\%IBH = 1 - \left[\frac{Abs\ de\ la\ muestra - Abs\ de\ la\ blanco}{Abs\ del\ control} \right] 100 \quad (2)$$

5.4. Síntesis y caracterización de las AgNPs

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron obtenidas mediante la reducción del nitrato de plata ($AgNO_3$) 1mM y el extracto vegetal en una relación volumétrica 1:10 de extracto: $AgNO_3$ y se dejaron reaccionar durante 24 horas en obscuridad, de las cuales 4 horas se llevaron a cabo con agitación y temperatura de 40°C y las 20 horas restantes únicamente en obscuridad.

Posteriormente las AgNPs fueron sometidas a un proceso de lavado para remover los restos del extracto y el exceso de iones. Cada ciclo de lavado consistió en una centrifugación a 8500 rpm durante 20 minutos y la sustitución del solvente de lavado por agua destilada. Finalmente, se resuspendieron en agua destilada para su caracterización o en etanol para dejarse secar y utilizarse en las pruebas antimicrobianas [84]. Para la síntesis convencional se utilizó nitrato de plata como precursor y borohidruro de sodio ($NaBH_4$) 0.01M como agente reductor en una proporción volumétrica 1:2 de $NaBH_4:AgNO_3$. Se dejó reaccionar por 75 minutos en obscuridad [90].

Para ambos métodos de síntesis, se llevó a cabo la caracterización de las AgNPs mediante la técnica de UV-Vis para evaluar la formación de las nanopartículas y realizar un análisis cualitativo de sus características físicas como tamaño y forma [91].

5.5. Síntesis y caracterización del composito Ag-TiO₂ mediante sol-gel acoplado a microondas

Tomando en cuenta una relación molar 0.04:1.3:160:0.0025 tetraisopropóxido de titanio (TTIP), isopropanol, agua y nitrato de plata, respectivamente; se colocó alcohol isopropílico bajo atmósfera de nitrógeno y se burbujeó para desplazar el oxígeno disuelto. Posteriormente se añadió al alcohol el TTIP manteniendo la solución en agitación de manera continua. Como siguiente paso, se llevó a cabo el dopado y la hidrólisis al añadir gota a gota una solución acuosa del dopante a la solución del alcohol/TTIP. La solución acuosa del dopante se preparó al 1 mM añadiendo 0.16 g de nitrato de plata por cada litro de solución. Finalmente se agregó el agente reductor (extracto de eucalipto o NaBH₄) en las relaciones mencionadas anteriormente, se mantuvo en oscuridad con agitación y temperatura de 40°C por cuatro horas y se dejó reaccionar durante 24 horas en oscuridad, de las cuales 4 horas se llevaron a cabo con agitación y temperatura de 40°C y las 20 horas restantes únicamente en oscuridad. La síntesis convencional se dejó reaccionar en oscuridad por una hora. Cuando finalizó el tiempo de reacción de ambas síntesis, se lavó, filtró y se dejó secar a temperatura ambiente para someterla a un proceso de calcinación en una mufla marca Thermo Scientific modelo Lindberg Blue M de 450°C por media hora [90], [92], [93].

Con respecto a la síntesis asistida por microondas, antes del proceso de lavado y filtrado, se sometió a 210°C por 30 minutos la suspensión usando un microondas marca Milestone modelo Flexiwave.

Una vez obtenido el material, se procedió a la caracterización de sus propiedades mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés), espectroscopía Raman y Difracción de Rayos X (XRD por sus siglas en inglés) para estudiar la morfología, para analizar los cambios en la red cristalina y para documentar las fases cristalinas junto con la determinación del tamaño promedio de cristalito, respectivamente [9], [62]. El análisis por Espectroscopía de Reflectancia Difusa (DRS por sus siglas en inglés) se realizó para evaluar la capacidad de fotoabsorción del composito [6].

5.6. Pruebas antimicrobianas

Se midió la actividad antimicrobiana de los materiales obtenidos usando *E. coli* como bacteria Gram negativa y *S. aureus* como bacteria Gram positiva mediante la incubación de las bacterias con el material a evaluar.

En primer lugar, se preparó 1 mL de bacterias sembradas en medio Luria-Bertani (LB) y ajustadas con 625 nm a una densidad óptica de 0.07. Posteriormente, el material a evaluar se dispersó en agua destilada a una concentración de 100 µg/µL y se sometió a 34 minutos de baño ultrasónico antes de usarse. Se tomaron 200 µL de la solución del material y se colocaron con 300 µL de medio LB en un microtubo nuevo y estéril manteniendo una proporción de 4:10.

Para la incubación de las bacterias con el tratamiento, se colocaron las cantidades indicadas en la Tabla 4, de medio, bacterias y material para tener un volumen de 450 µL que se dispersó en dos tubos de 150 µL; los 150 µL sobrantes se desecharon.

Tabla 4. Cantidades a usar para incubar control y tratamiento

	Control [µL]	Tratamiento [µL]
Medio LB	225	75
Bacterias	225	225
Material	0	150
Volumen total	450	450

Se incubaron a una temperatura de 37°C y agitación de 200 rpm durante 24 horas. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la concentración final del material utilizado para la evaluación antimicrobiana, siendo ésta de 13.33 µg/µL.

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron diluciones en solución fisiológica utilizando una proporción 1:10, tomando 100 µL del material y dispersando en 900 µL de solución fisiológica hasta que la concentración se encontró en el orden de 10⁻⁶ (seis diluciones). La última dilución se sembró por duplicado en cajas Petri con agar LB y se incubó a 37°C por 24 horas.

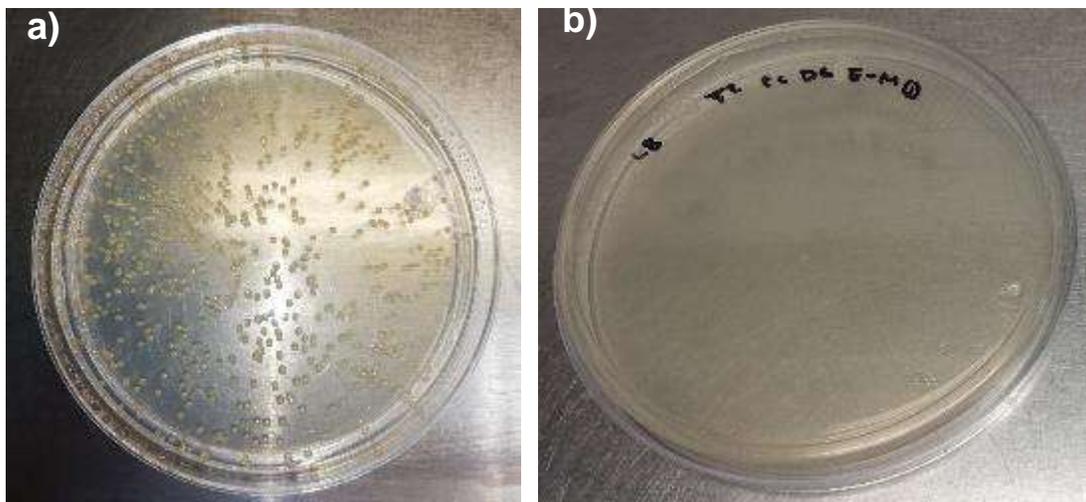


Figura 1: *E. coli* en agar LB, a) control y b) tratamiento

6. Resultados

6.1. Caracterización del extracto de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.)

6.1.1. UV-Vis

La Figura 2 muestra el espectro UV-Vis de los extractos de eucalipto. Se observó un pico de absorción en los 220 nm que está relacionado a la transición π - π^* de los enlaces C=C conjugados. Además, se detectó un pico a los 260 nm que corresponde a la transición π - π^* relacionada con los enlaces C=O [94].

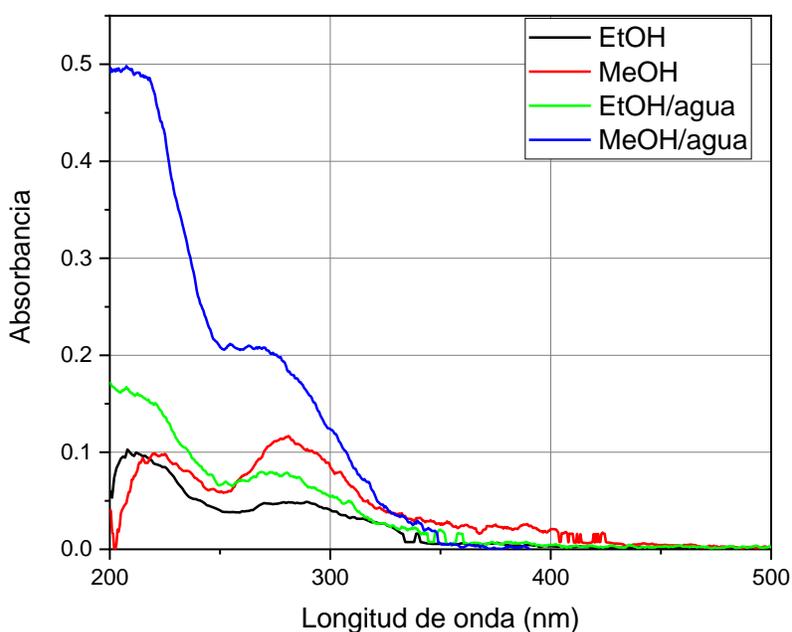


Figura 2: UV-Vis de extractos de eucalipto

La absorbancia del espectro UV-Vis está relacionada con la concentración de los componentes en la solución y, por lo tanto, la efectividad del proceso de extracción. La absorbancia mayor del extracto MeOH/agua indica que es el proceso de extracción que logró mayor concentración de componentes [95].

6.1.2. FT-IR

La espectroscopía FT-IR se llevó a cabo para investigar la estructura química y los grupos funcionales presentes en el extracto de eucalipto. Estos resultados indican la presencia de anillos aromáticos, enlaces O-H, grupos carboxilo y enlaces C=O (Tabla 5); esto es coherente con sus compuestos activos entre los que están el ácido elágico, eucaliptona y macrocarpal A y E [65], [66], [94].

Los espectros obtenidos para los extractos realizados con alcohol y con alcohol/agua (Figura 3 a) y b)) coinciden en gran parte de la gráfica en términos de intensidad y posición debido a las similitudes existentes en los respectivos solventes de extracción:

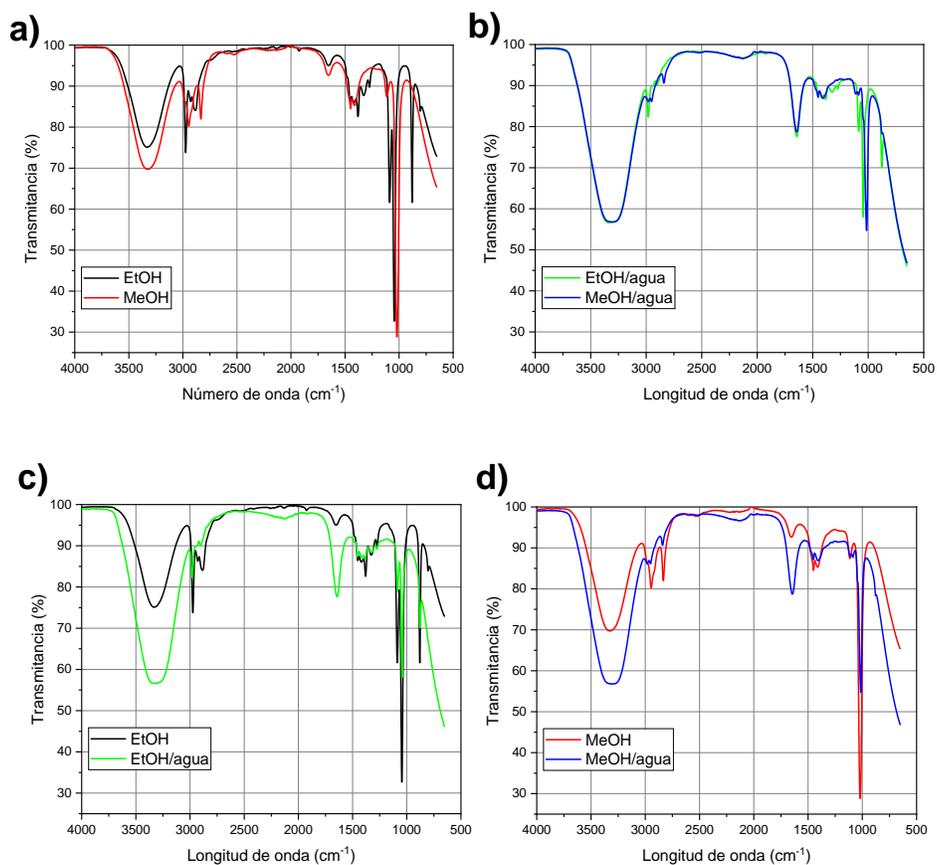


Figura 3: FT-IR del extracto de eucalipto preparado con a) alcoholes, b) alcoholes/agua, c) etanol y etanol/agua y d) metanol y metanol/agua

Se pueden observar algunas diferencias atribuidas a los alcoholes utilizados debido a que, si se comparan los espectros c) y d) de la Figura 3, las señales coinciden la gran mayoría en posición y varían en intensidad.

La presencia del agua aumenta la intensidad de algunas señales, que coinciden con las asociadas al espectro de ésta: 3336 cm^{-1} del estiramiento de enlaces O-H; 2131 cm^{-1} , también llamada banda de combinación y corresponde a la flexión de tipo tijeretero y a una banda amplia de liberación en el IR cercano; 1653 cm^{-1} asociado a flexión de tijereteo del enlace O-H-O [96].

A continuación, se presenta en la Tabla 5 las señales observadas en la Figura 3 y los enlaces a los que corresponden:

Tabla 5: bandas IR en los extractos de eucalipto [85]

Longitud de onda (cm^{-1})	Asignación
3336	Enlace O-H de grupos hidroxilo
2974	Vibración del enlace C-H
2131	Banda de combinación del agua
1653	Vibraciones del esqueleto aromático C=C
1378	Absorción de grupos de ácidos carboxílicos (COOH)
1088	Absorción del enlace C-N (aminas alifáticas de compuestos fenólicos)
1045	
879	Deformación aromática C-H fuera del plano

Las bandas observadas sostienen la presencia de constituyentes fitoquímicos con grupos funcionales como fenoles, aminas, caboxil y carbonil.

6.1.3. Metabolitos secundarios

En primer lugar, se muestran las curvas de calibración realizadas para cada técnica previo a la evaluación de las mismas.

6.1.3.1. Fenoles

Para la evaluación de fenoles se obtuvo una curva de calibración con una R^2 de 0.9965 (Figura 4), adecuada para proceder con las pruebas:

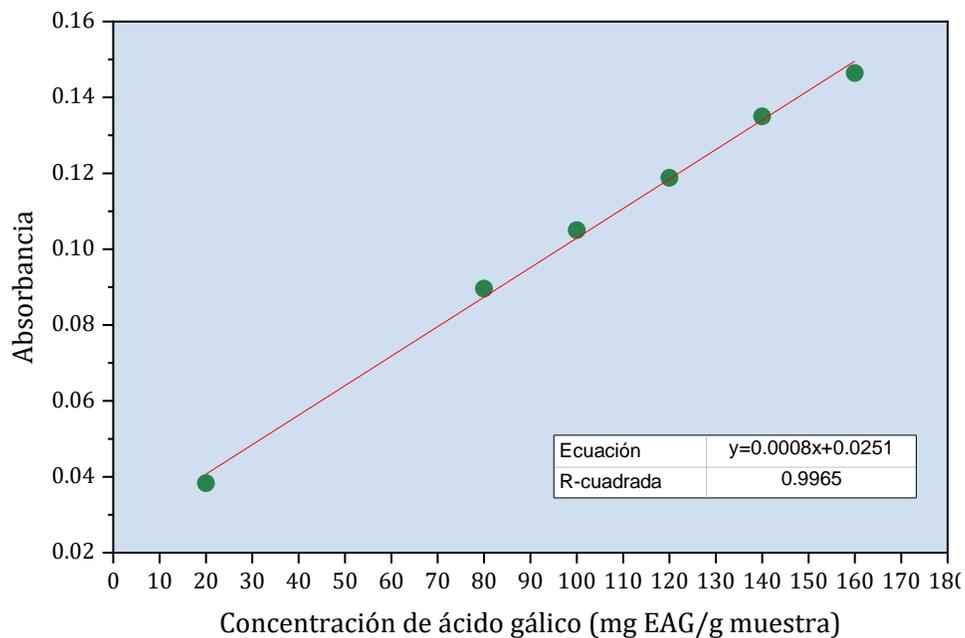


Figura 4: Curva de calibración fenoles

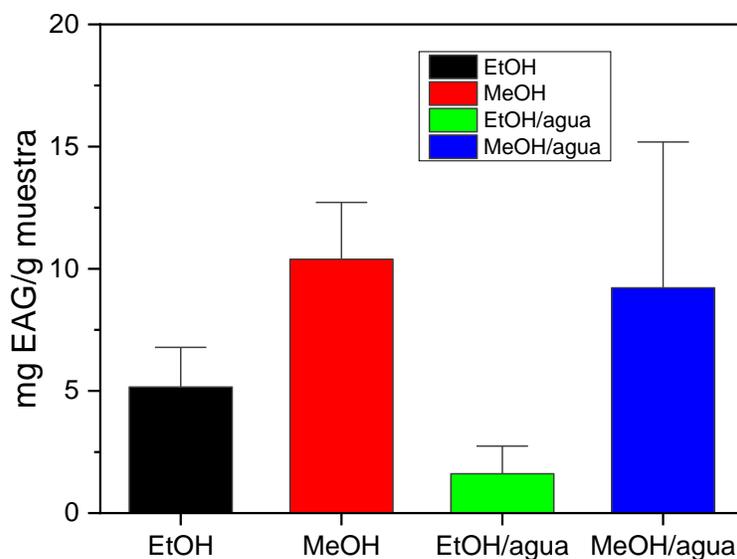


Figura 5: Contenido total de polifenoles en miligramos de equivalentes de ácido gálico sobre gramos de muestra

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos de contenido total de polifenoles con su respectiva desviación estándar. El solvente que extrajo mayor contenido de compuestos fenólicos es el metanol (10.38 mg EAG/g muestra), seguido de metanol/agua (9.22 mg EAG/g muestra), etanol (5.15 mg EAG/g muestra) y etanol/agua (1.60 mg EAG/g muestra). Se observa una disminución importante cuando se utiliza etanol, así como mayor contenido de polifenoles en metanol. Esto sugiere que el metanol tiene menor capacidad para la extracción de estos compuestos, estos resultados presentan el mismo comportamiento al observado por Fernández-Argulló (2018) [60].

Gullón (2017) reporta un mayor contenido de flavonoides y fenoles cuando se utiliza una mezcla de dos solventes (con mayores tiempos de extracción) [85], contrario a lo observado en los resultados de este trabajo para fenoles. Esto se puede deber a que las proporciones utilizadas de alcohol en las mezclas alcohol/agua es menor a la que Gullón (2017) reporta como de máxima eficiencia (60/40 alcohol/agua) para contenido de flavonoides y fenoles o a que el tiempo de extracción utilizado fue muy corto.

6.1.3.2. Flavonoides

La curva de calibración de flavonoides (Figura 6) arrojó una R^2 de 0.9956, es un buen ajuste para proceder con las pruebas:

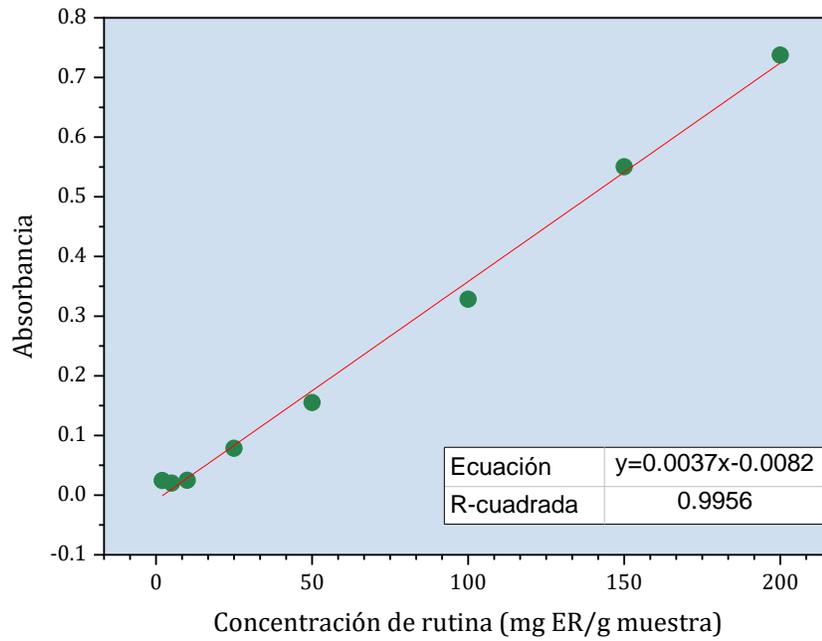


Figura 6: Curva de calibración flavonoides

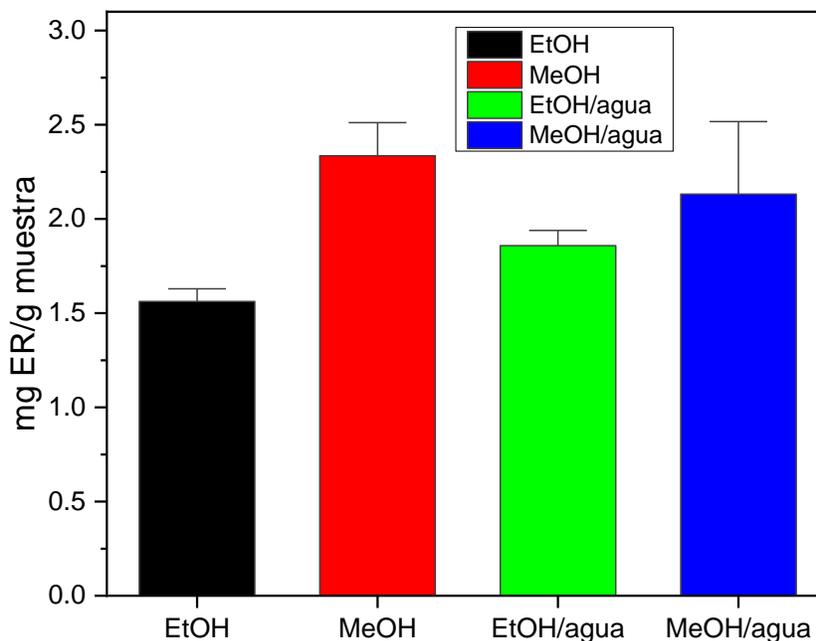


Figura 7: Contenido total de flavonoides en miligramos de equivalentes de rutina sobre gramos de muestra

El solvente más efectivo en la extracción de flavonoides es el metanol, seguido de metanol/agua, etanol/agua y finalmente etanol, como se observa en la Figura 7. Rodrigues (2018) reporta un rendimiento de extracción mayor para el metanol a comparación del etanol y Gullón (2017) menciona que una combinación de alcohol y agua es más efectiva para extraer compuestos a comparación de alcohol solamente, lo cual se puede ver en el caso de flavonoides para etanol/agua [57], [85].

6.1.3.3. DPPH

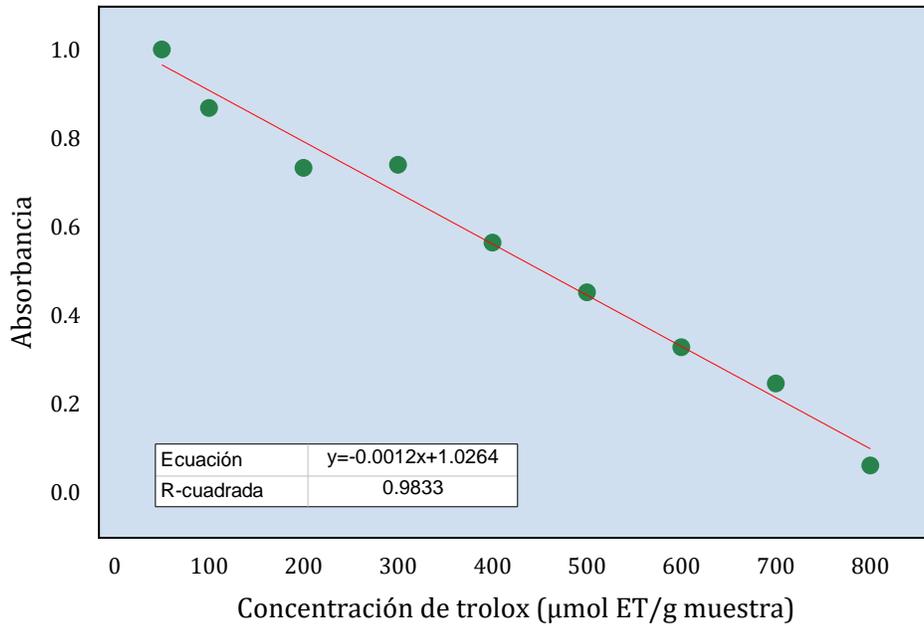


Figura 8: Curva de calibración DPPH

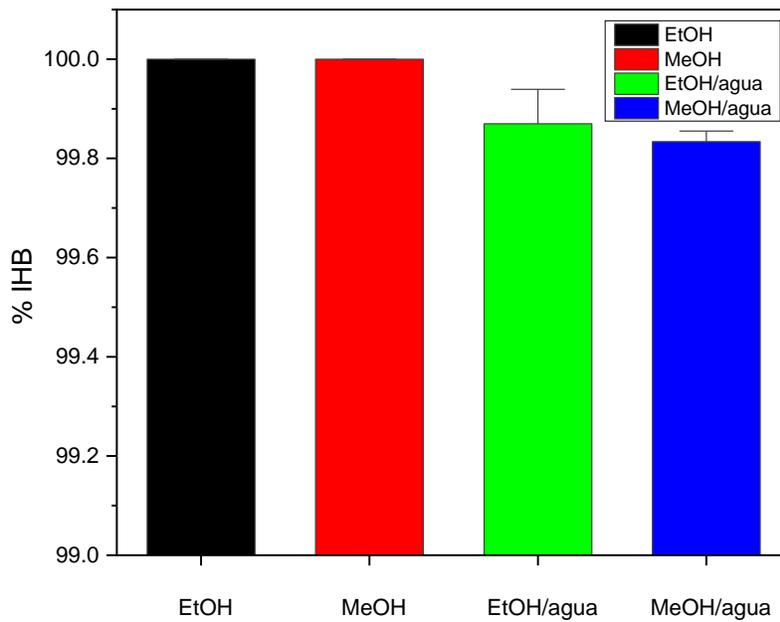


Figura 9: Capacidad antioxidante por DPPH en porcentaje de inhibición del radical

Una vez obtenida la curva de calibración para DPPH (Figura 8) con una R^2 de 0.9833, en la Figura 9 se observó que la mayor capacidad antioxidante de DPPH la presentaron los extractos realizados alcoholes puros, seguido de etanol/agua y por último metanol/agua.

Un valor mayor de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) corresponde a una mayor capacidad de eliminación del radical DPPH [88].

Fernandez-Argulló (2018) compara las propiedades antioxidantes del eucalipto con los mismos solventes y proporciones utilizados en este trabajo y obtuvo los mayores valores para etanol, seguido de metanol, metanol/agua y etanol/agua [60].

Los distintos tipos de compuestos bioactivos extraídos dependiendo del extracto explican las variaciones que hay entre solventes. DPPH y ABTS se basan en la habilidad del compuesto antioxidante (extracto de eucalipto) para neutralizar los radicales libres (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) generados en los ensayos [85].

La Tabla 6 muestra el porcentaje de inhibición obtenido junto a su desviación estándar.

Tabla 6: Porcentaje de inhibición por DPPH

Solvente de extracción	Etanol	Metanol	EtOH/agua	MeOH/agua
% IHB	100 ± 0	100 ± 0	99.86 ± 0.06	99.83 ± 0.01

6.1.3.4. ABTS

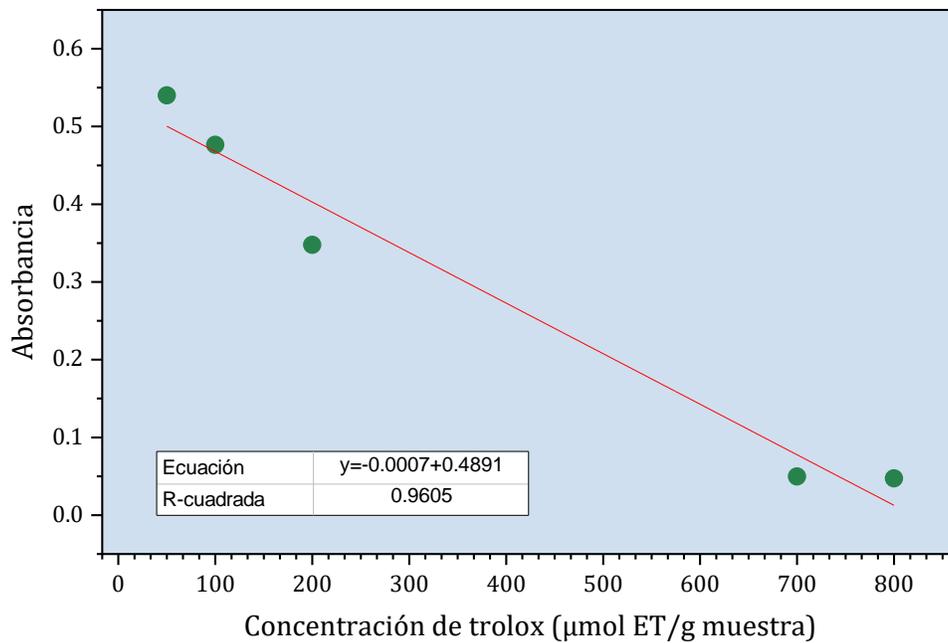


Figura 10: Curva de calibración ABTS

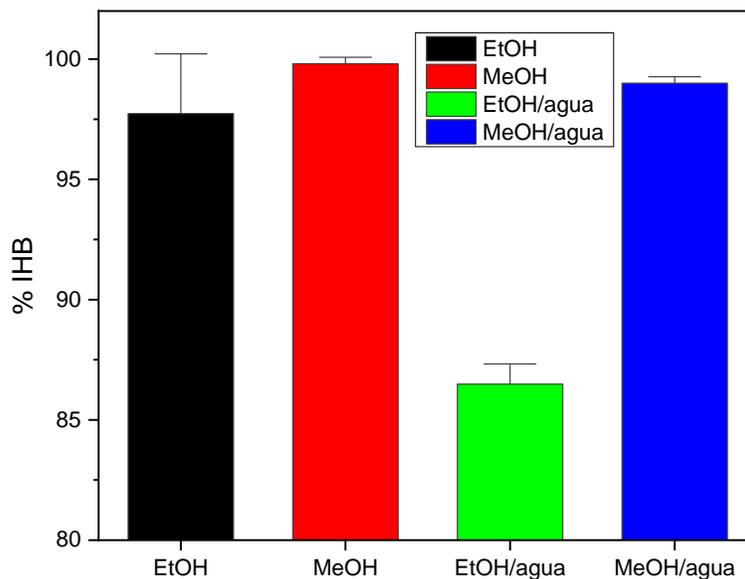


Figura 11: Capacidad antioxidante por ABTS en porcentaje de inhibición del radical

La curva de calibración obtenida para ABTS presentó una R^2 de 0.9605 (Figura 10), con lo que se procedió con las pruebas. Presentó mayor actividad antioxidante por ABTS el metanol, seguido del metanol/agua, etanol y al último etanol/agua, como se observa en la Figura 11. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido para

polifenoles en el orden de mayor a menor extracción de compuestos y se asemejan también a los obtenidos para flavonoides, sugiriendo que estos dos grupos de metabolitos secundarios influyen fuertemente en la neutralización del radical ABTS y siendo los extractos que contienen metanol los que mejor se desempeñan.

Los compuestos presentes en los extractos de eucalipto obtenidos mediante distintos solventes confieren una actividad antioxidante mayor al 80% en todos los casos sugiriendo su posible aplicación en la síntesis de nanomateriales.

La Tabla 7 muestra el porcentaje de inhibición obtenido junto a su desviación estándar.

Tabla 7: Porcentaje de inhibición por ABTS

Solvente de extracción	Etanol	Metanol	EtOH/agua	MeOH/agua
% IHB	97.73 ± 2.48	99.80 ± 0.26	86.48 ± 0.84	98.99 ± 0.26

6.2. Caracterización de las nanopartículas de plata (AgNPs)

6.2.1. Espectroscopía UV-Vis

Como primer indicador de la formación de las nanopartículas de plata, se observó el cambio de color de la solución, de un color verde claro y de aspecto transparente a un verde más oscuro y turbio después de 4 horas de agitación y temperatura de 40°C en oscuridad. Se dejó que terminara la reacción las siguientes 18 horas.

a)

b)

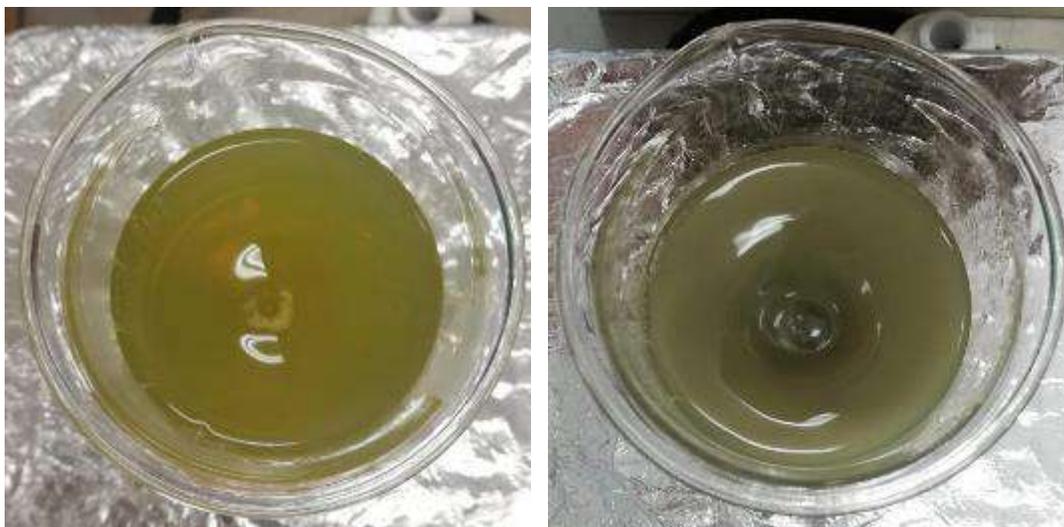


Figura 12: Cambio de color en la formación de las nanopartículas de plata a) al agregar el extracto y b) al finalizar el tiempo de síntesis

En la Figura 13 se presenta el espectro de UV-Vis de las síntesis realizadas con los diferentes extractos de eucalipto. Como se aprecia en el espectro, el único extracto capaz de reducir de manera satisfactoria el nitrato de plata fue el preparado con alcohol etílico, ya que muestra una banda de absorción a los 453 nm. Generalmente el pico de absorción de las nanopartículas de plata se encuentra entre los 400 y los 500 nm [66]. Las señales que se detectan antes de los 400 nm se atribuyen a restos del extracto que no fueron eliminados en su totalidad a pesar del paso de purificación al que fue sometido y el paso de lavado al que fueron sometidas las nanopartículas previas a su caracterización.

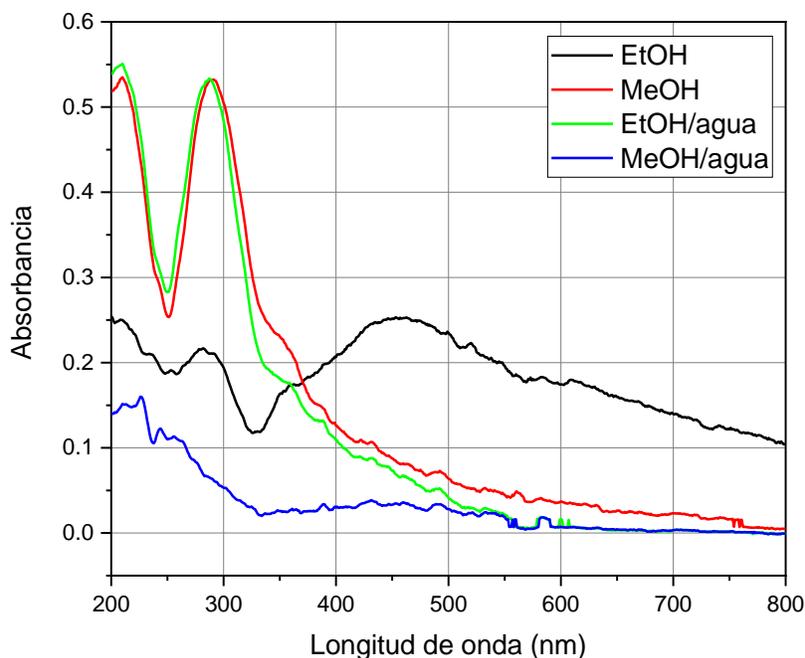


Figura 13: UV-Vis nanopartículas de plata

Estos resultados se atribuyen a que el extracto realizado con etanol extrajo metabolitos secundarios con la capacidad de reducir el nitrato de plata; de la evaluación de metabolitos secundarios se obtuvo que los extractos con metanol y metanol/agua fueron los más eficientes en la extracción de fenoles y flavonoides, sugiriendo entonces que dichos metabolitos no fueron los principales involucrados en la síntesis, pudiendo haber otros tipos de compuestos participando, como los taninos. Las hojas del eucalipto presentan una amplia variedad de compuestos, entre ellos están los monoterpenos, flavonoides, taninos y polifenoles que pudieron haber contribuido a la formación y estabilización de las nanopartículas [55].

Los experimentos realizados para proporciones distintas a 1:10 extracto:AgNO₃ resultaron en espectros muy similares a los del extracto, sin mostrar señal alguna en el intervalo de interés (400-600 nm), por lo que no fueron ya tomados en cuenta en lo que resta del trabajo.

La forma de la señal, alargada y no tan definida sugiere que el tamaño de las nanopartículas de plata se encuentra entre los 2 y 5 nm; esto se debe a que la

absorción del plasmón de resonancia producido por la plata aumenta con el tamaño de partícula, produciendo señales menos definidas para tamaños pequeños [97].

6.3. Caracterización del compuesto Ag-TiO₂

6.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para el compuesto sintetizado convencionalmente (Figura 14) se observa una morfología de cristales sin geometría definida, poco uniformes y con cristales creciendo en la superficie de los más grandes. No se observa una homogeneidad de tamaños.

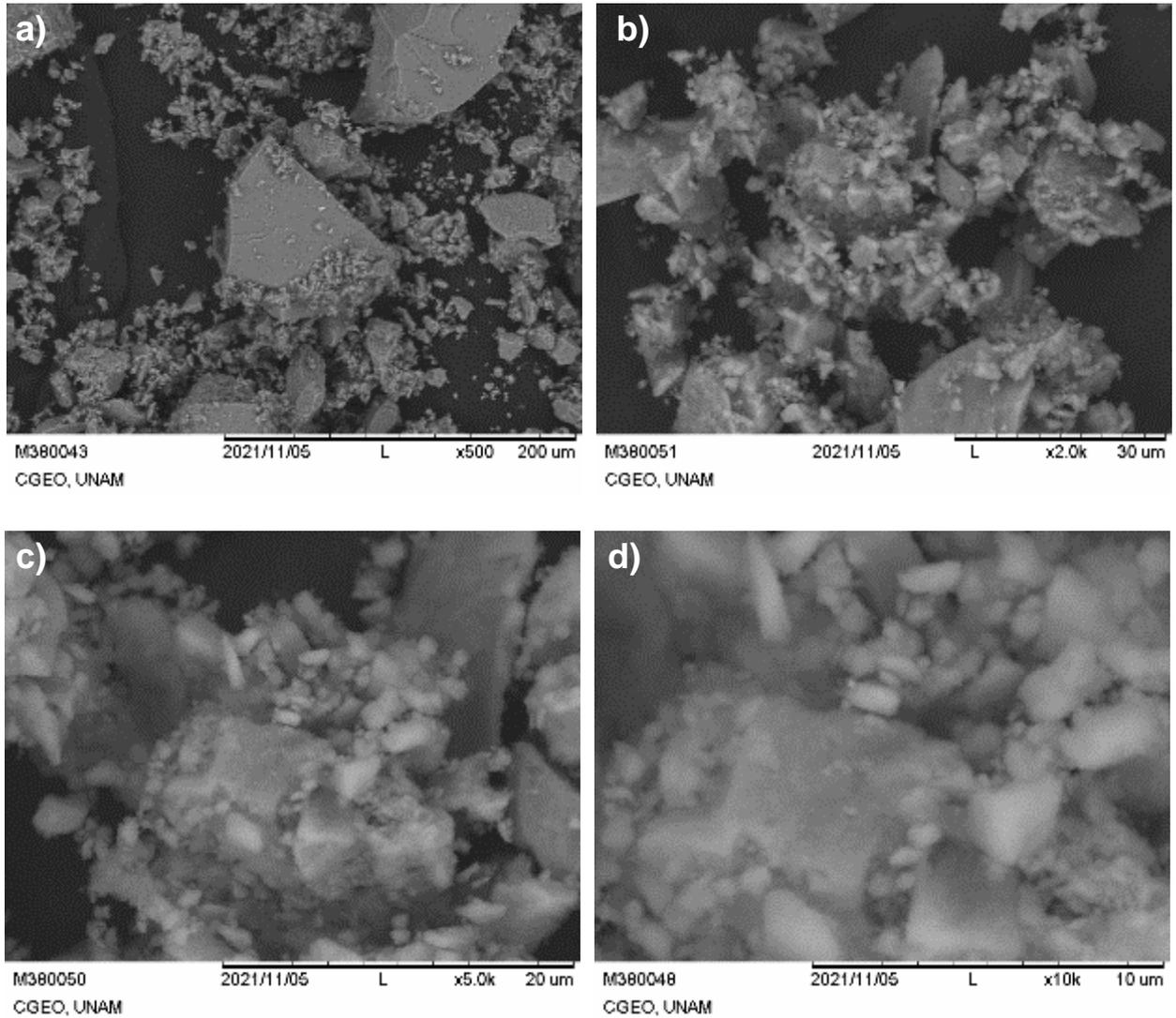


Figura 14: micrografía SEM de Ag-TiO₂ sintetizado convencionalmente observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x

En el caso del compuesto sintetizado convencionalmente y asistido por microondas (*Figura 15*), se observa una morfología amorfa y poco homogénea, similar a partículas agregadas de pequeños tamaños con forma más esférica a comparación de la síntesis asistida por microondas. Estos resultados se asemejan a los obtenidos para la biosíntesis asistida por energía

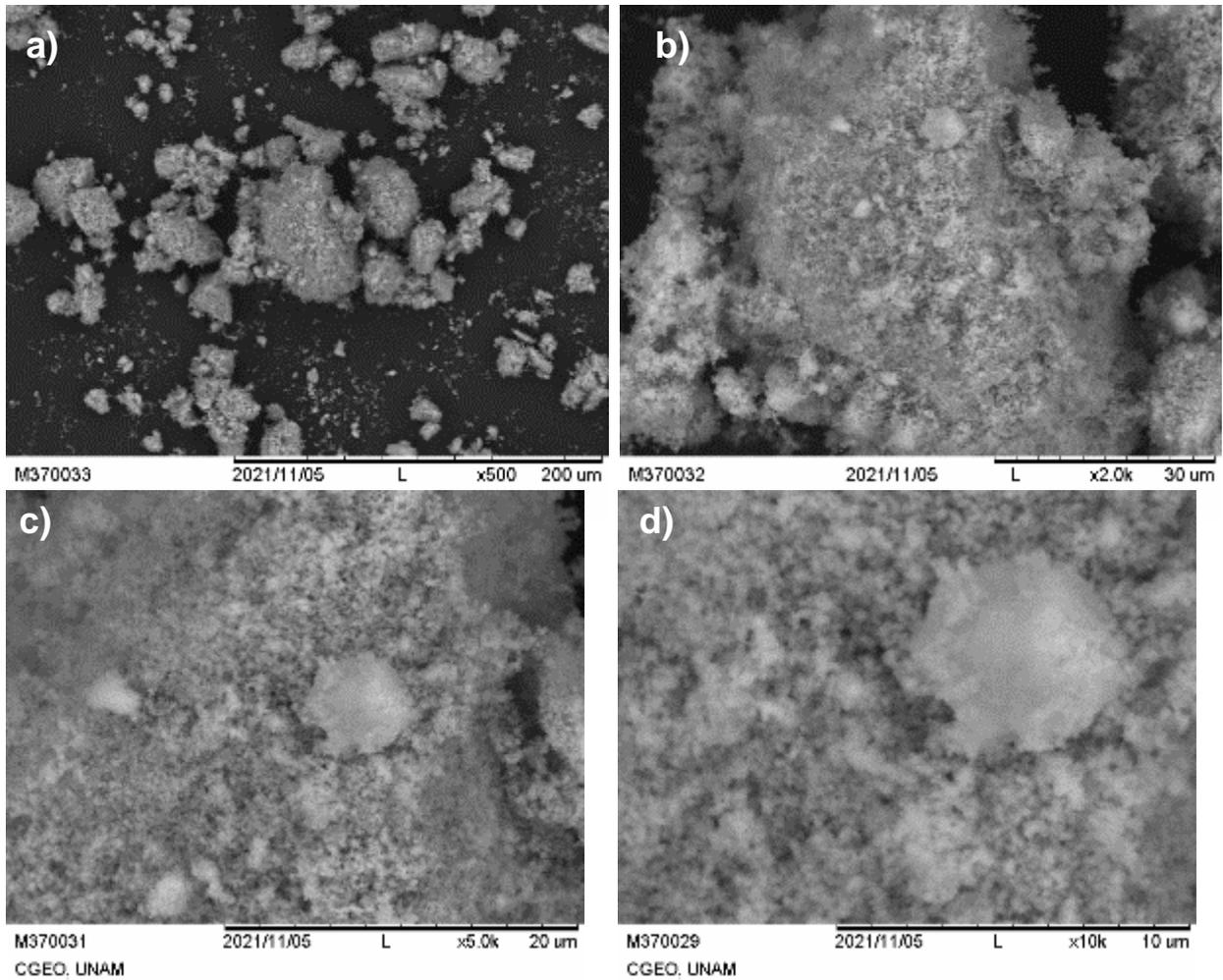


Figura 15: micrografía SEM de Ag-TiO₂ sintetizado convencionalmente asistido por microondas observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x

Para el compuesto biosintetizado (

Figura 16) nuevamente se observa una morfología de cristales de mayor tamaño sin geometría definida, poco uniformes y con cristales más pequeños creciendo en la superficie de los más grandes. El tamaño es menos homogéneo a comparación con las síntesis asistidas por microondas.

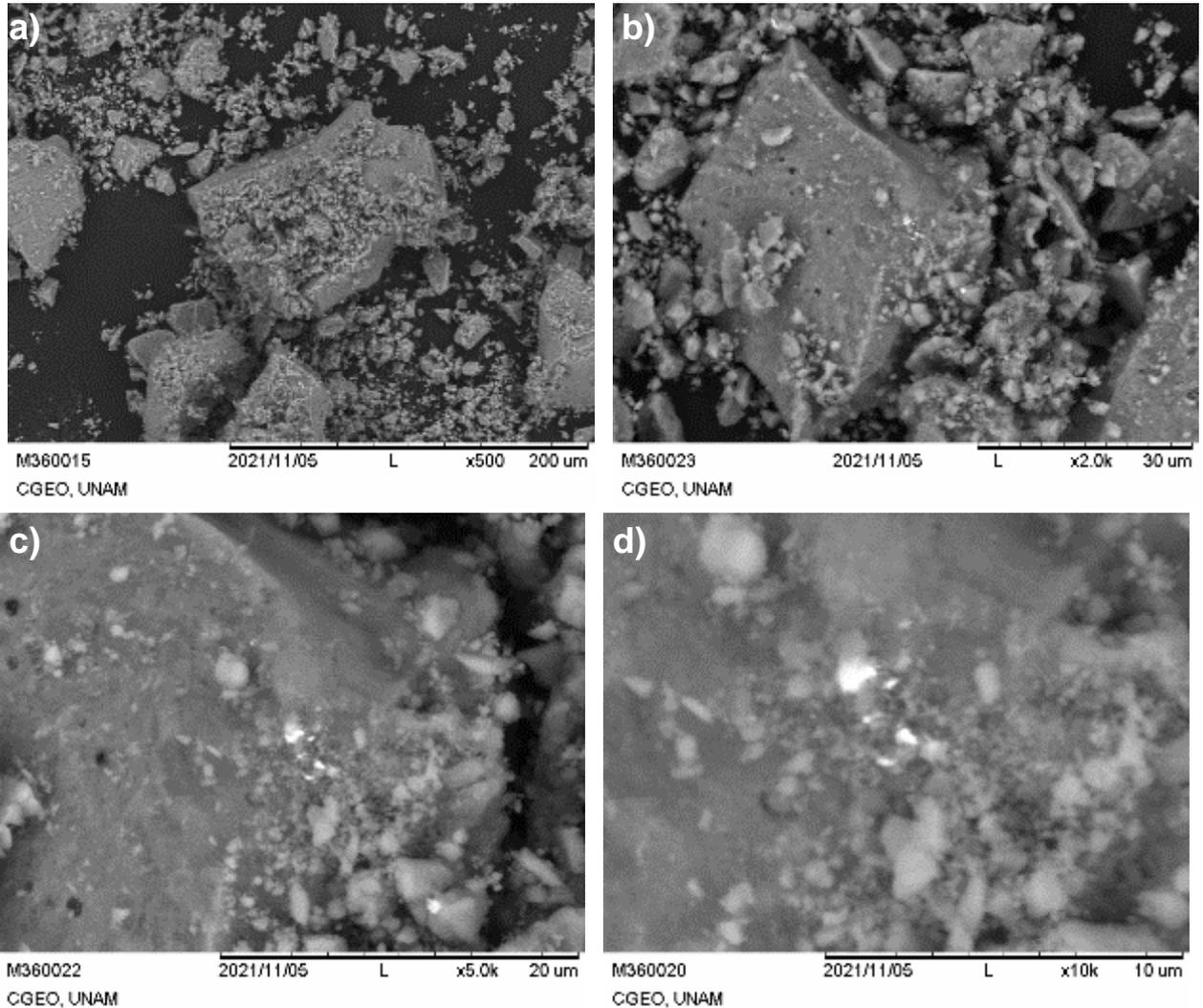


Figura 16: micrografía SEM de Ag-TiO₂ biosintetizado observado a a) 500x, b) 2,000x, c) 5,000x, d) 10,000x

Así como en la síntesis convencional asistida por microondas (Figura 17), para el compuesto biosintetizado asistido por microondas, se puede observar una morfología amorfa, y agregados de partículas pequeñas. La adición del extracto pareciera generar agregados de mayor tamaño que la síntesis convencional. Esto puede deberse a compuestos contenidos en el extracto de eucalipto que ayudan a estabilizar a las partículas [98].

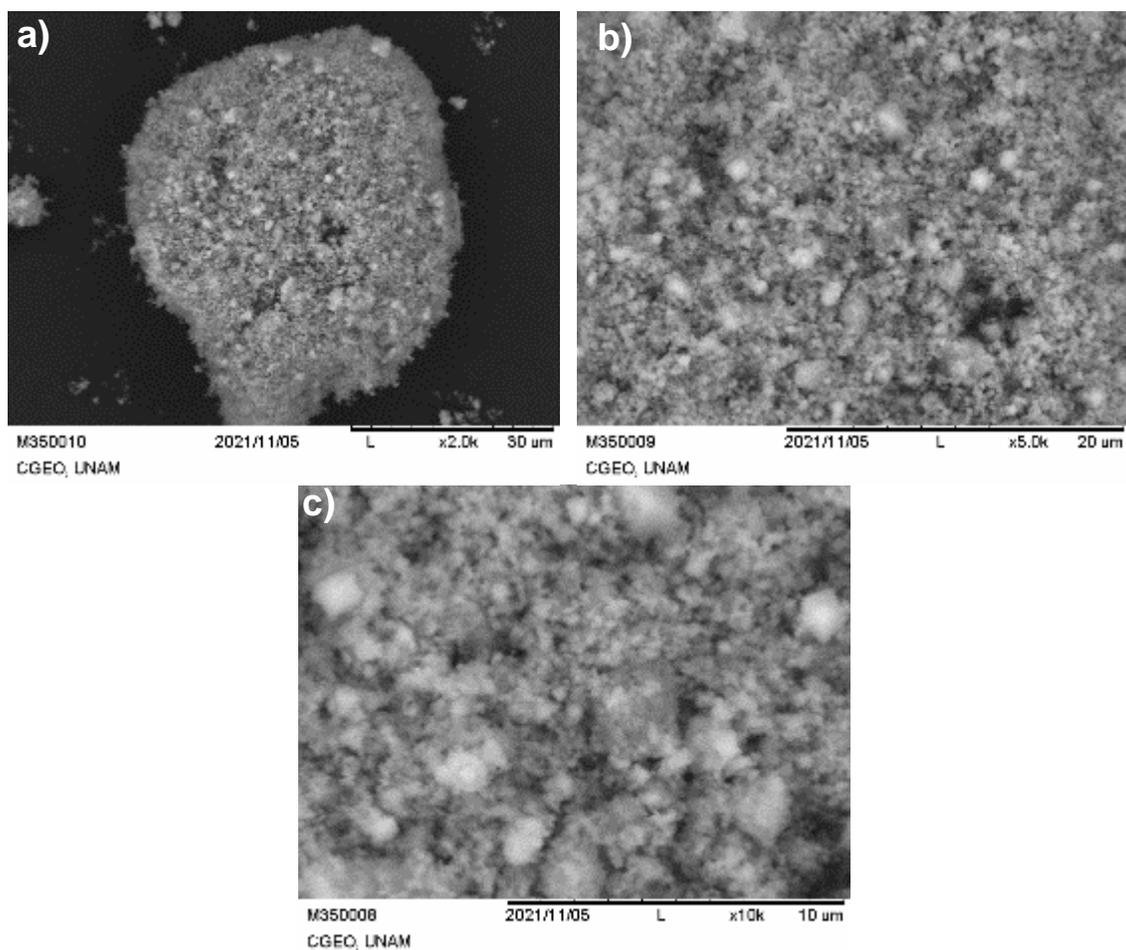


Figura 17: micrografía SEM de Ag-TiO₂ biosintetizado y asistido por microondas observado a a) 2,000x, b) 5,000x, c) 10,000x

6.3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La Figura 18 muestra la micrografía TEM del material TiO₂. Se observan partículas aglomeradas de forma esférica homogéneas que disminuyen ligeramente su tamaño para la síntesis asistida por microondas.

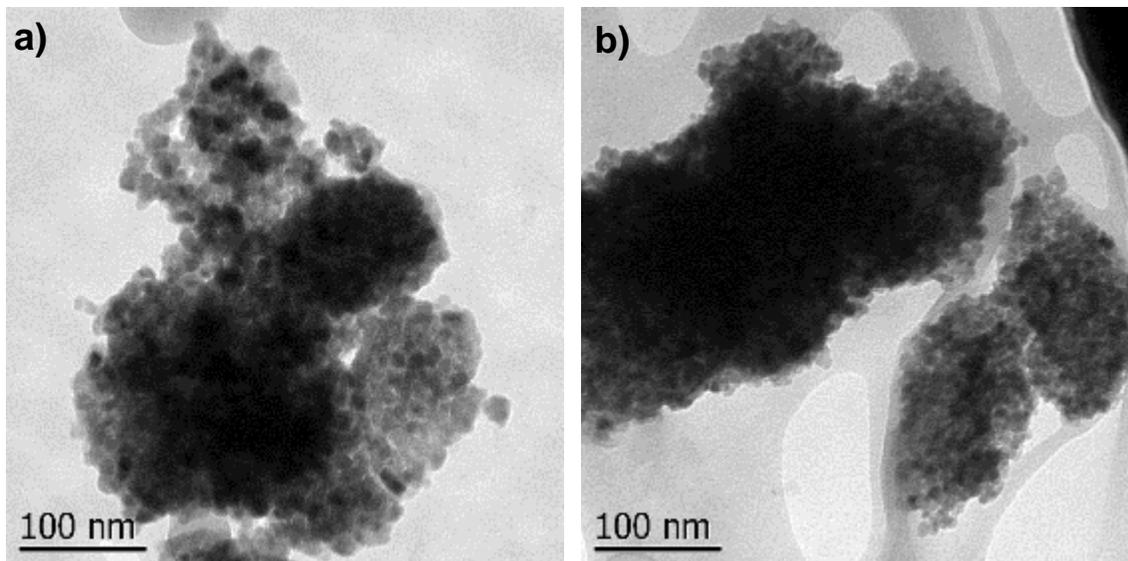


Figura 18: micrografía TEM de TiO_2 a) sintetizado convencionalmente y b) asistido por microondas

La Figura 19 corresponde a la síntesis convencional del compuesto Ag-TiO_2 . De la misma manera, su forma se asemeja a la de una esfera, sin embargo, para la síntesis no asistida por microondas, la forma y tamaño cambia en algunas, presentándose más largas y alargadas que el resto. Con respecto a la síntesis asistida por microondas se ve en los aglomerados más homogeneidad en cuanto a tamaño y forma. También se alcanzan a ver partículas pequeñas y dispersas alrededor de los aglomerados cuyos tamaños se encuentran entre los 2 y los 6 nm.

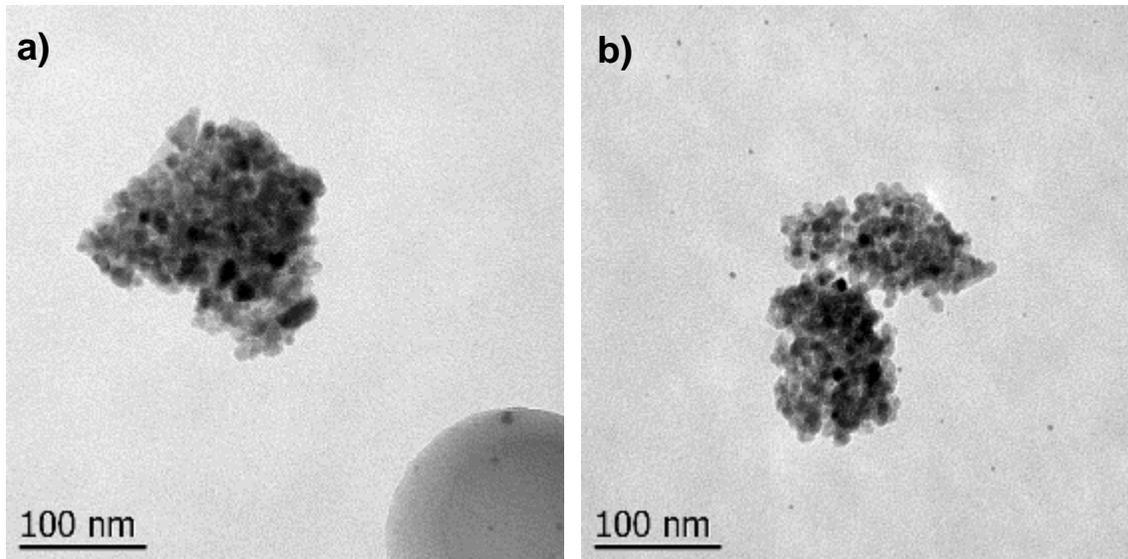


Figura 19: micrografía TEM de Ag-TiO₂ sintetizado a) convencionalmente y b) asistido por microondas

La Figura 20 muestra la micrografía TEM del compuesto biosintetizado para el cual se observan grandes aglomerados en la síntesis no asistida por microondas con una forma de partículas esféricas y ovaladas cuyos tamaños se encuentran en un rango de 10 a 15 nm. En cambio, la síntesis asistida por microondas arrojó partículas esféricas que se aglomeran menos y que presentan mayor homogeneidad entre ellas.

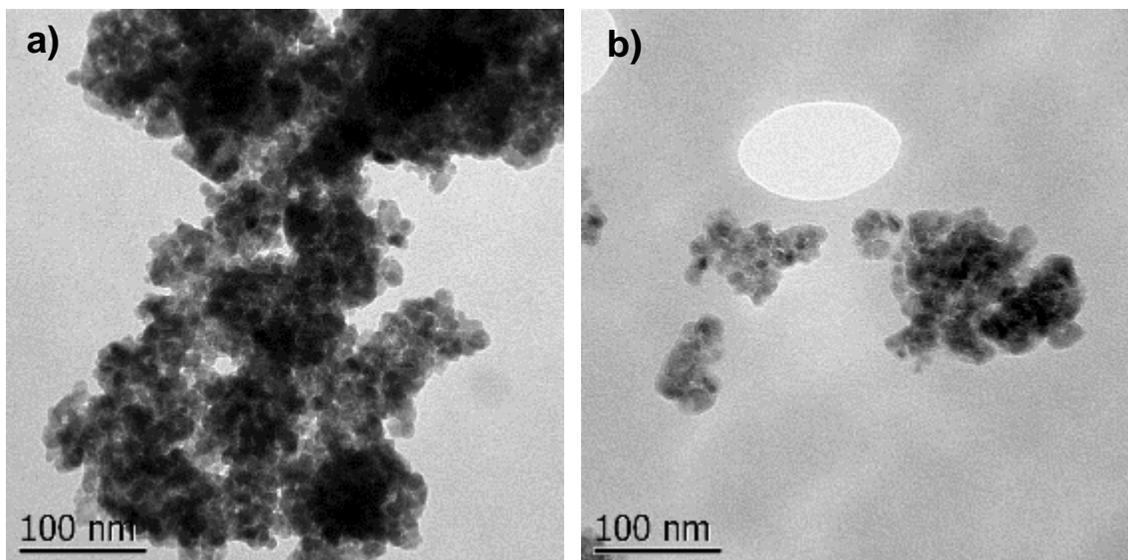


Figura 20: micrografía TEM de Ag-TiO₂ a) biosintetizado y b) asistido por microondas

6.3.3. Difracción de rayos X (XRD)

La Figura 21 corresponde al patrón de difracción de rayos X del material de dióxido de titanio dopado con plata. Se obtuvo un material cristalino y el dióxido de titanio se encuentra en la fase anatasa (JCPDS 21-1272), se aprecian sus nueve difracciones de Bragg en los ángulos 2θ (25° , 37° , 47° , 53° , 54° , 62° , 68° , 70° y 74°) la señal correspondiente al plano [101] con mayor intensidad en la posición de 25.09° en 2θ .

Alrededor de los 30° se observa una pequeña señal en los difractogramas del $\text{AgTiO}_2\text{-c}$, $\text{AgTiO}_2\text{-cM}$, $\text{AgTiO}_2\text{-e}$ y $\text{AgTiO}_2\text{-eM}$ que corresponde a la fase brookita del dióxido de titanio (JCPDS 21-1276) [99].

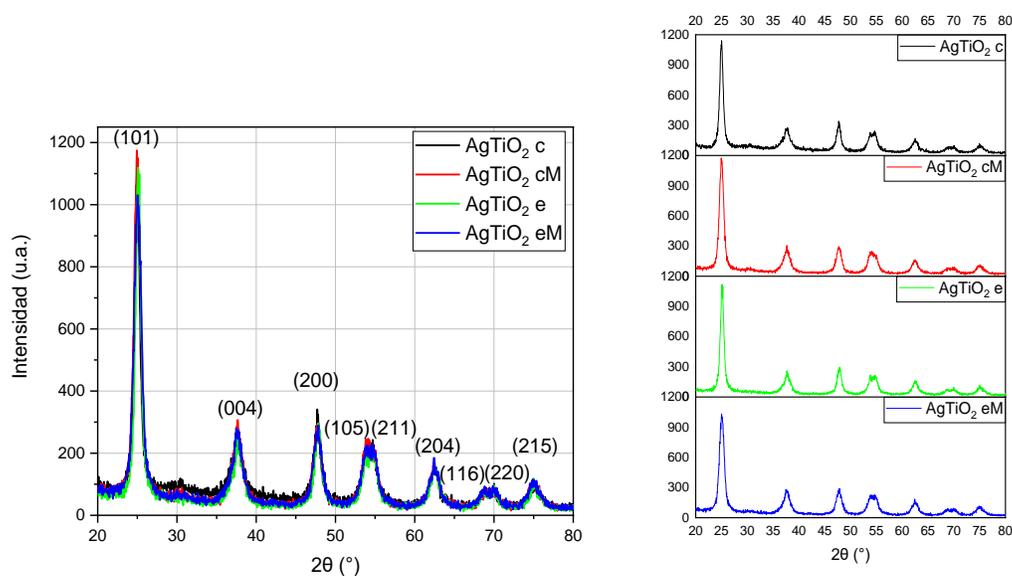


Figura 21: XRD de muestras de Ag-TiO_2

En los difractogramas no se observaron señales atribuibles a alguna especie de plata, lo cual sugiere que los iones de plata fueron incorporados a la red cristalina o que la plata se encuentra altamente dispersa sobre la superficie [99]. La obtención

de los parámetros de red para los distintos materiales se usa para aclarar si la plata se incorporó a la estructura del dióxido de titanio.

Se obtuvieron los valores de tamaño de cristal a partir de la ecuación de Debye-Scherrer (ecuación 2):

$$D = \frac{K\lambda}{d \cos \theta} \quad (2)$$

Donde D corresponde al tamaño de cristal, K al factor de forma tomado como 0.9, λ es la longitud de onda utilizada en el análisis que corresponde a 1.5406 Å (k- α del cobre), d es el ancho completo a la mitad del máximo de la señal en radianes y θ es el ángulo de Bragg al cual se encuentra la señal.

En la Tabla 8 se encuentran los tamaños de cristalito encontrados por Debye-Scherrer para cada material:

Tabla 8: Tamaño de cristalito por Debye-Scherrer

Material	Tamaño de cristalito promedio (nm)	
	Sol-gel	Sol-gel MW
TiO ₂ [100]	12.35	11.76
AgTiO ₂ convencional	8.06	7.74
AgTiO ₂ biosíntesis	10.00	7.21

También se realizaron los cálculos para Williamson-Hall (Tabla 9):

Tabla 9: Tamaño de cristalito por Williamson-Hall

Material	Tamaño de cristalito promedio (nm)	
	Sol-gel	Sol-gel MW

AgTiO ₂ convencional	3.63	5.82
AgTiO ₂ biosíntesis	9.97	4.62

Las síntesis asistidas por microondas exhiben un tamaño de cristalito promedio menor que las síntesis no asistidas, permitiendo utilizar una mayor área superficial del material.

Los tamaños de cristalito obtenidos por Williamson-Hall son menores, en general, y se consideran más precisos ya que toman en cuenta el estrés al que puede estar sometida la red, sobretodo al dopar el material.

Se determinaron los parámetros de red (Tabla 10) mediante la ecuación de la distancia interplanar para un sistema tetraédrico (3):

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2+k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (3)$$

Tabla 10: Parámetros de red

Material	Parámetros de red (Å)			
	Sol-gel		Sol-gel MW	
	a	c	a	c
TiO ₂ [93]	3.77	9.50	-	-
AgTiO ₂ convencional	3.81	9.51	3.80	9.54
AgTiO ₂ biosíntesis	3.79	9.54	3.79	9.59

De los parámetros de red obtenidos, comparando los materiales dopados contra el dióxido de titanio sin dopar, se observa un ligero aumento en ambos parámetros de

red (a y c) para ambos materiales, que no son significativos como para indicar la introducción de la plata a la estructura del dióxido de titanio.

6.3.4. Espectroscopía Raman

La Figura 22, corresponde al espectro Raman de los composites. Es una técnica muy sensible a la presencia de fases cristalinas en menores cantidades que podrían pasar desapercibidas en difracción de rayos X [101].

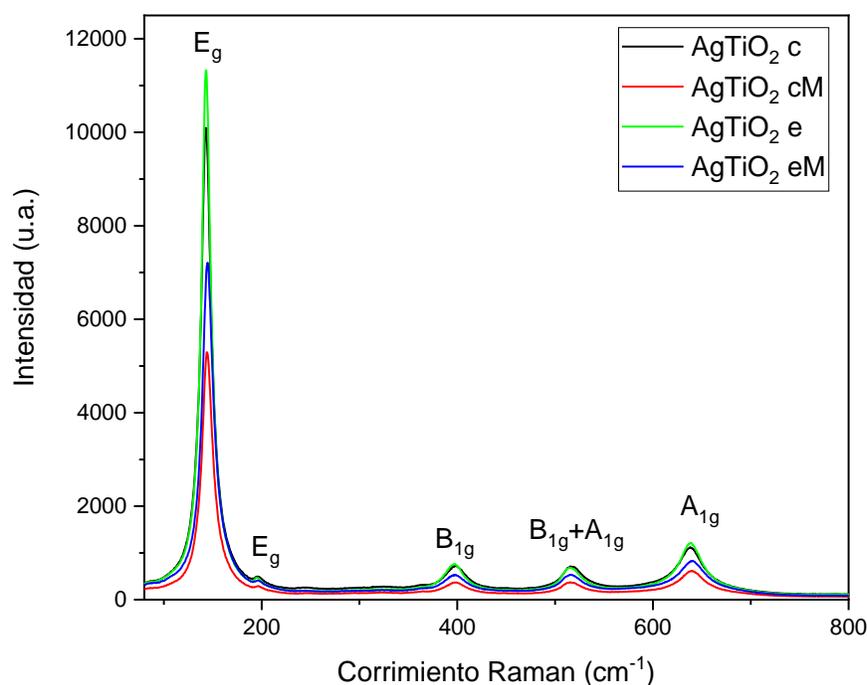


Figura 22: espectro Raman de muestras de Ag-TiO₂ sintetizado convencionalmente (Ag-TiO₂ c), asistido por microondas (Ag-TiO₂ cM), biosintetizado (Ag-TiO₂ e) y asistido por microondas (Ag-TiO₂ eM)

Los modos de vibración observados a 143.10, 195.94, 397.19, 516.50 y 636.57 cm⁻¹ en la Figura 22 corresponden a la fase anatasa del dióxido de titanio y no se observan señales correspondientes a alguna otra fase o a la plata. Esto se debe al bajo porcentaje en el que se encuentra ésta. Se aprecian ligeros corrimientos que concuerdan con los resultados obtenidos para Difracción de Rayos X, el material con tamaño de cristalito más grande fue el biosintetizado y el que se encuentra hacia

el extremo izquierdo del espectro Raman. De ahí, se van corriendo hacia el rojo comenzando por el material sintetizado convencionalmente, el asistido por microondas y finalmente el biosintetizado asistido por microondas, siguiendo la tendencia de XRD. Se ha reportado que a menores tamaños se observa un corrimiento hacia el rojo debido a efectos de presión en los modos vibracionales [102], [103].

6.3.5. Espectroscopía de reflectancia difusa (DRS)

Se obtuvieron los siguientes valores de reflectancia calculados a partir de la ecuación de Kubelka-Munk (ecuación 4):

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{k}{s} \quad (4)$$

Donde R corresponde a la reflectancia, k al coeficiente de absorción y s al factor de dispersión.

En la Tabla 11 se encuentran los valores de band gap obtenidos para cada material:

Tabla 11: Band gap de los materiales obtenidos

Material	Band gap (eV)	
	Sol-gel	Sol-gel MW
TiO ₂ [93]	3.2	3.2
AgTiO ₂ convencional	3.2	3.2
AgTiO ₂ biosíntesis	3.2	3.2

Estos resultados se obtuvieron a partir de las gráficas de Tauc (Figura 23) para cada composito que se muestran en la Figura 23

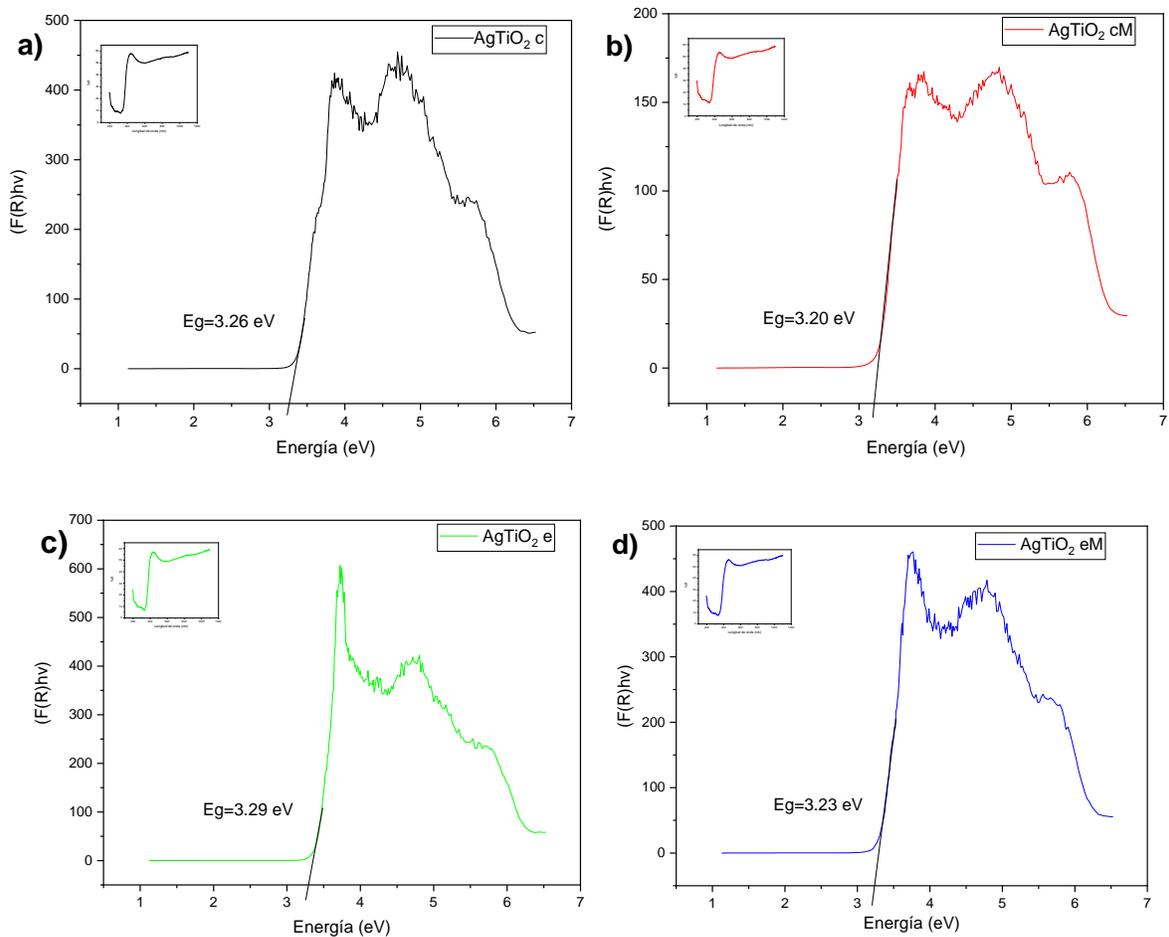


Figura 23: DRS y gráficas de Tauc de muestras de Ag-TiO₂ a) sintetizado convencionalmente, b) asistido por microondas, c) biosintetizado y d) biosintetizado asistido por microondas

Siendo 3.2 eV la brecha de banda para el dióxido de titanio sin dopar, se esperaba que la incorporación de la plata produjera una reducción en la brecha de banda y permitiera la activación con luz visible del dióxido de titanio, sin embargo, se observa un ligero aumento en el valor de brecha de banda de la mayoría de los materiales obtenidos, presentando el mayor aumento el compuesto AgTiO₂ biosintetizado y quedándose en 3.20 eV el compuesto AgTiO₂ convencional asistido por MW. Esto sostiene que la plata no está incorporada en la matriz del dióxido de titanio, junto con los resultados de los parámetros de red observados en difracción de rayos X, al no reducir la brecha de banda de éste.

6.4. Evaluación antimicrobiana del compuesto Ag-TiO₂

En la Tabla 12 se muestran los porcentajes de inhibición de bacterias obtenidos con los distintos materiales. En la sección de anexos se encuentran los valores en unidades formadoras de colonias, así como las gráficas de los resultados.

Tabla 12: Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de los materiales sintetizados en el presente trabajo

Material	Porcentaje de inhibición (%)	
	<i>S. aureus</i> (Gram+)	<i>E. coli</i> (Gram-)
Ag-c	84.74 ± 8.34	100 ± 0
Ag-e	100 ± 0	100 ± 0
TiO ₂	14.36 ± 15.04	30.34 ± 7.72
TiO ₂ -M	65.61 ± 3.92	16.73 ± 7.24
AgTiO ₂ -c	99.82 ± 0.01	100 ± 0
AgTiO ₂ -cM	100 ± 0	100 ± 0
AgTiO ₂ -e	99.12 ± 0.62	96.15 ± 2.75
AgTiO ₂ -eM	100 ± 0	100 ± 0

Se esperaba que las nanopartículas de plata tuvieran un gran porcentaje de inhibición, en concordancia con toda la evidencia existente de su actividad antimicrobiana [98]. La diferencia entre el porcentaje inhibitorio obtenido entre las AgNPs sintetizadas convencionalmente y las biosintetizadas se puede atribuir a que

el extracto de eucalipto también funciona como agente estabilizante, evitando que las NPs se aglomeren entre ellas y permitiendo la liberación de mayores cantidades de iones (Ag^+) que ataquen la bacteria [104]. Ahora, en términos de bacterias Gram positivas y Gram negativas, se ha reportado que el efecto de las AgNPs es mayor para las bacterias Gram negativas debido a que su pared celular es de menor grosor (3-4 nm contra 30 nm para Gram positivas) [104].

Para el dióxido de titanio sin dopar se observaron porcentajes de inhibición bajos debido a que los experimentos se llevaron a cabo sin proporcionar una fuente de luz UV que permitiera activar al material.

Con respecto al material dopado y sintetizado por métodos convencionales observamos porcentajes de inhibición altos (mayores al 95%) que se atribuyen directamente a las propiedades antibacterianas de la plata.

Los materiales sintetizados con eucalipto mostraron porcentajes de inhibición altos llegando al 100% cuando se acopla con microondas. Estos resultados son comparables a los obtenidos por el método convencional y sugieren que la morfología con vértices y bordes pronunciados juega un papel importante al momento de entrar en contacto con las bacterias causando un mayor daño en la membrana y frenando su reproducción [105].

En términos de la afinidad de los materiales para bacterias Gram positivas y Gram negativas, las nanopartículas de plata sintetizadas convencionalmente muestran mayor efectividad en *E. coli* (Gram negativa); el TiO_2 muestra mayor inhibición en *S. aureus* (Gram positiva), en cambio, cuando la síntesis es asistida por microondas muestra mayor inhibición en *S. aureus*; El AgTiO_2 sintetizado convencionalmente muestra ligeramente mayor inhibición para *E. coli*, mientras que el AgTiO_2 biosintetizado inhibe de forma ligeramente mayor a *S. aureus*. En los materiales restantes (Ag-e , $\text{AgTiO}_2\text{-cM}$, $\text{AgTiO}_2\text{-eM}$), se observó un porcentaje de inhibición del 100% tanto para *S. aureus* como *E. coli*. Estos resultados no permiten establecer algún tipo de afinidad de los compositos obtenidos para inhibir bacterias Gram positivas o Gram negativas, se consideran efectivos y no específicos.

El mecanismo principal que siguen las nanopartículas de plata para inhibir bacterias todavía no está completamente claro debido ya que no las ataca a través de una única vía, sin embargo, los microorganismos no parecen adquirir resistencia contra la plata [106]. La acción antimicrobiana de las AgNPs está ligada a cuatro mecanismos bien definidos: 1) adhesión de las nanopartículas a la superficie de la pared y membrana celular; 2) la penetración de las nanopartículas a la célula dañando estructuras intracelulares y biomoléculas; 3) toxicidad celular inducida por las nanopartículas y estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres; 4) modulación de vías de señalización relacionadas con la transducción celular [107].

7. Conclusiones

En primer lugar, se establece que los solventes de extracción utilizados son efectivos en la obtención de compuestos de interés para la biosíntesis de nanomateriales presentes en las hojas de eucalipto, siendo metanol/agua el solvente que más concentración de metabolitos secundarios evaluados extrajo y etanol el que menos, de acuerdo con el UV-Vis realizado. El análisis por FT-IR reveló una diferencia en la capacidad de extracción del alcohol vs alcohol/agua mostrando distintas intensidades de señales relacionadas a los compuestos extraídos en estos dos grupos de solventes de extracción.

Con respecto a los metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante, las extracciones realizadas con metanol destacaron en 3 de las 4 evaluaciones realizadas. Fenoles y flavonoides mostraron una tendencia similar en la cual los solventes de extracción se acomodan de la siguiente forma (de mayor a menor cantidad de metabolitos secundarios extraídos): metanol y metanol/agua > etanol y etanol/agua. Esto sugiere que los metabolitos secundarios evaluados no son los principales responsables de la reducción del nitrato de plata.

La espectroscopía UV-Visible confirmó la formación de nanopartículas de plata y proporcionó una estimación del tamaño de éstas para la síntesis realizada con el extracto etanólico. Con respecto a los demás solventes utilizados, no se observaron señales que indicaran de forma clara la presencia de nanopartículas de plata.

La morfología obtenida de los compositos difiere entre la síntesis no asistida por microondas y la síntesis asistida por microondas. Se aprecian morfologías tipo cristal de formas y tamaños menos homogéneos, así como menos aglomerados en la síntesis no asistida por microondas, mientras que someterla a microondas forma aglomerados de partículas más homogéneas.

La forma y tamaño de las nanopartículas fue evaluada por TEM, obteniendo esferas en la mayoría de los casos, así como aglomerados de partículas. La síntesis convencional asistida por microondas arrojó partículas de tamaños entre 2-6 nm de

diámetro que se encuentran dispersas, al contrario de las partículas más grandes (10-15 nm).

En cuestión de cristalinidad, mediante el análisis por difracción de rayos X se confirmó que el dióxido de titanio se encuentra en fase anatasa y sus parámetros de red no indican una introducción de la plata a la estructura de éste.

El uso de la plata no produjo materiales con una menor brecha de banda y debido a que los experimentos se realizaron sin someter el material a la luz, los resultados de la evaluación antimicrobiana sugieren una inhibición de bacterias debido a la presencia de la plata sin estar incorporada a la estructura del dióxido de titanio.

Finalmente, los valores de inhibición en el crecimiento bacteriano obtenidos para el material de interés son prometedores para su posible aplicación en sistemas donde la presencia de bacterias sea una problemática a atender, como podrían ser las aguas tratadas. La similitud entre los resultados obtenidos para la síntesis convencional y la biosíntesis permite pensar en la sustitución de agentes tóxicos como lo es el borohidruro de sodio por extractos de plantas sin sacrificar las propiedades del material, esto abre la aplicación de materiales ya existentes a campos que involucren el contacto directo con seres vivos eliminando pasos del proceso de purificación o eliminación de restos de agentes tóxicos para la vida en los procesos de síntesis.

8. Perspectivas

Como futuros proyectos se pueden evaluar modificaciones en la síntesis (usar otras plantas, probar distintos solventes, síntesis asistidas con otro tipo de energía), evaluación de la presencia de taninos y otros metabolitos secundarios, así como caracterización cualitativa del extracto, inhibición de hongos u otras bacterias y determinación de concentración mínima inhibitoria, utilizar distintos porcentajes de plata, probar su efectividad con diversos materiales con actividad antimicrobiana asociada y realizar una evaluación fotocatalítica.

9. Referencias bibliográficas

- [1] T. Qureshi, M. Bakhshpour, K. Çetin, A. A. Topçu, and A. Denizli, "Wastewater Treatment: Synthesis of Effective Photocatalysts Through Novel Approaches HF Hydrogen fluoride," in *Photocatalysts in Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment*, 2020, pp. 33–64.
- [2] P. V. Laxma Reddy, B. Kavitha, P. A. Kumar Reddy, and K. H. Kim, "TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review," *Environ. Res.*, vol. 154, pp. 296–303, 2017, doi: 10.1016/j.envres.2017.01.018.
- [3] E. Fosso-Kankeu, *Photocatalysts in Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment*, 1st ed. Wiley, 2020.
- [4] F. Ariganello, E. López-Loveira, R. Candal, and G. Curutchet, "Degradación del plaguicida imazalil acoplado técnicas avanzadas de oxidación y tratamientos biológicos," in *Agua + Humedales*, UNSAM Edit, 2018, pp. 455–461.
- [5] G. Cruz-González, C. Julcor, and U. Jáuregui-Haza, "El Estado actual y perspectivas de la degradación de pesticidas por procesos avanzados de oxidación," *Rev. Cuba. Química*, vol. 29, no. 3, pp. 492–516, 2017.
- [6] Z. Wei *et al.*, "Noble metal-modified octahedral anatase titania particles with enhanced activity for decomposition of chemical and microbiological pollutants," *Chem. Eng. J.*, vol. 318, pp. 121–134, 2017, doi: 10.1016/j.cej.2016.05.138.
- [7] D. Shi, H. Yang, and X. Xue, "Preparation, characterization and antibacterial properties of cobalt doped titania nanomaterials," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 5, pp. 1474–1482, 2020, doi: 10.1016/j.cjche.2020.03.017.
- [8] M. Endo *et al.*, "Noble metal-modified titania with visible-light activity for the decomposition of microorganisms," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 829–841, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.77.
- [9] M. Atarod, M. Nasrollahzadeh, and S. Mohammad Sajadi, "Euphorbia heterophylla leaf extract mediated green synthesis of Ag/TiO₂ nanocomposite and investigation of its excellent catalytic activity for reduction of variety of dyes in water," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 462, pp. 272–279, 2016, doi: 10.1016/j.jcis.2015.09.073.
- [10] X. Li, J. Yu, and C. Jiang, "Principle and surface science of photocatalysis," in *Surface Science of Photocatalysis*, vol. 31, 2020, pp. 1–38.
- [11] B. Liu, X. Zhao, I. P. Parkin, and K. Nakata, "Charge carrier transfer in photocatalysis," in *Surface Science of Photocatalysis*, vol. 31, 2020, pp. 103–159.
- [12] A. Ramchiary, "Metal-oxide semiconductor photocatalysts for the degradation of organic contaminants," in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials*, 2020, pp. 23–38.
- [13] T. H. Pham, H. M. Bui, and T. X. Bui, "Advanced oxidation processes for the removal of pesticides," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier B.V., 2020, pp. 309–330.
- [14] D. N. Nguyen, H. M. Bui, and H. Q. Nguyen, "Heterogeneous photocatalysis for the removal of pharmaceutical compounds," in *Current Developments in Biotechnology*

and Bioengineering, Elsevier B.V., 2020, pp. 161–183.

- [15] E. San Martín Martínez and M. A. Ramírez Salinas, *Avances de investigación en nanociencias, micro y nanotecnologías*. OmniaScience, 2020.
- [16] B. M. Rajbongshi, “Photocatalyst: mechanism, challenges, and strategy for organic contaminant degradation,” in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials*, 2020, pp. 127–149.
- [17] T. Peng and J. A. Lalman, “TiO₂ Nanomaterials for Enhanced Photocatalysis,” in *ACS Symposium Series*, vol. 1317, 2019, pp. 135–165.
- [18] X. Meng, B. Eluagwule, M. Wang, L. Wang, and J. Zhang, “Solar photocatalysis for environmental remediation,” in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials*, 2020, pp. 183–195.
- [19] M. M. Morones Esquivel, J. C. Pantoja Espinoza, J. B. Proal Nájera, I. Cháirez Hernández, J. N. Gurrola Reyes, and M. Ávila Santos, “Uso de un reactor de placa plana (TiO₂/vidrio) para la degradación de 2,5-diclorofenol por fotocátalisis solar,” *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 33, no. 4, pp. 605–616, 2017, doi: 10.20937/RICA.2017.33.04.05.
- [20] X. He *et al.*, “Photocatalytic degradation of microcystin-LR by modified TiO₂ photocatalysis: A review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 743, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140694.
- [21] L. Clarizia, D. Russo, I. Di Somma, R. Andreozzi, and R. Marotta, “Metal-based semiconductor nanomaterials for photocatalysis,” in *Multifunctional Photocatalytic Materials for Energy*, Elsevier, 2018, pp. 187–213.
- [22] S. MiarAlipour, D. Friedmann, J. Scott, and R. Amal, “TiO₂/porous adsorbents: Recent advances and novel applications,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 341, pp. 404–423, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.07.070.
- [23] K. K. Paul and P. K. Giri, *Plasmonic metal and semiconductor nanoparticle decorated TiO₂-based photocatalysts for solar light driven photocatalysis*. Elsevier, 2018.
- [24] D. Dodoo-Arhin *et al.*, “Modified nanostructured titania photocatalysts for aquatic disinfection applications,” *Mater. Today Proc.*, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.07.710.
- [25] T. Ali, A. Ahmed, U. Alam, I. Uddin, P. Tripathi, and M. Muneer, “Enhanced photocatalytic and antibacterial activities of Ag-doped TiO₂ nanoparticles under visible light,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 212, pp. 325–335, 2018, doi: 10.1016/j.matchemphys.2018.03.052.
- [26] S. K. Kulkarni, *Nanotechnology: Principles and Practices*, 3rd ed. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [27] C. H. Voon, K. L. Foo, B. Y. Lim, S. C. B. Gopinath, and Y. Al-Douri, “Synthesis and preparation of metal oxide powders,” in *Metal Oxide Powder Technologies*, 2020, pp. 31–65.
- [28] A. O. Basheer, Y. Al-Douri, and Z. Z. Chowdhury, “Chemical processes of metal oxide powders,” in *Metal Oxide Powder Technologies*, Elsevier, 2020, pp. 189–208.

- [29] A. Karatutlu, A. Barhoum, and A. Sapelkin, "Liquid-phase synthesis of nanoparticles and nanostructured materials," in *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*, no. 5, Elsevier, 2018, pp. 1–28.
- [30] S. V. Sancheti and P. R. Gogate, "A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 36, pp. 527–543, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.08.009.
- [31] J. You, Y. Guo, R. Guo, and X. Liu, "A review of visible light-active photocatalysts for water disinfection: Features and prospects," *Chem. Eng. J.*, vol. 373, pp. 624–641, 2019, doi: 10.1016/j.cej.2019.05.071.
- [32] T. Roques-Carmes, H. Alem, T. Hamieh, J. Toufaily, C. Frochot, and F. Villieras, "Different strategies of surface modification to improve the photocatalysis properties: pollutant adsorption, visible activation, and catalyst recovery," in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials*, 2020, pp. 39–57.
- [33] M. R. D. Khaki, M. S. Shafeeyan, A. A. A. Raman, and W. M. A. W. Daud, "Application of doped photocatalysts for organic pollutant degradation - A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 198, pp. 78–94, 2017, doi: 10.1016/j.jenvman.2017.04.099.
- [34] I. Sinha and A. K. De, "An overview of synthesis techniques for preparing doped photocatalysts," in *Nano-Materials as Photocatalysts for Degradation of Environmental Pollutants*, Elsevier, 2020, pp. 1–13.
- [35] N. Rahimi, R. A. Pax, and E. M. Gray, "Review of functional titanium oxides. I: TiO₂ and its modifications," *Prog. Solid State Chem.*, vol. 44, no. 3, pp. 86–105, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.progsolidstchem.2016.07.002.
- [36] S. Dutta, "Wastewater treatment using TiO₂-based photocatalysts," in *Handbook of Smart Photocatalytic Materials*, 2020, pp. 303–323.
- [37] P. Sun *et al.*, "Controllable synthesis of TiO₂: toward an efficient photocatalyst," *Curr. Dev. Photocatal. Photocatalytic Mater.*, pp. 39–55, 2020, doi: 10.1016/b978-0-12-819000-5.00004-7.
- [38] B. Yadav, B. Sellamuthu, and R. D. Tyagi, "Degradation of organic micro-pollutants by ultraviolet radiation," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier B.V., 2020, pp. 427–455.
- [39] R. Fagan, D. E. McCormack, D. D. Dionysiou, and S. C. Pillai, "A review of solar and visible light active TiO₂ photocatalysis for treating bacteria, cyanotoxins and contaminants of emerging concern," *Mater. Sci. Semicond. Process.*, vol. 42, pp. 2–14, 2016, doi: 10.1016/j.mssp.2015.07.052.
- [40] J. Prakash, S. Sun, H. C. Swart, and R. K. Gupta, "Noble metals-TiO₂ nanocomposites: From fundamental mechanisms to photocatalysis, surface enhanced Raman scattering and antibacterial applications," *Appl. Mater. Today*, vol. 11, pp. 82–135, 2018, doi: 10.1016/j.apmt.2018.02.002.
- [41] F. Petronella, A. Truppi, M. Striccoli, M. L. Curri, and R. Comparelli, "Photocatalytic Application of Ag/TiO₂ Hybrid Nanoparticles," in *Noble Metal-Metal Oxide Hybrid Nanoparticles: Fundamentals and Applications*, 2018, pp. 373–394.
- [42] M. Nasrollahzadeh, M. Sajjadi, S. Irvani, and R. S. Varma, "Green-synthesized nanocatalysts and nanomaterials for water treatment: Current challenges and future

perspectives,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 401, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123401.

- [43] A. Jain and B. K. Banik, “Green synthesis of nanoparticles and nanocomposites: Medicinal aspects,” in *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design*, Elsevier Inc., 2020, pp. 231–242.
- [44] P. D. Shankar *et al.*, “A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 95, pp. 28–44, 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.015.
- [45] R. Khan and M. H. Fulekar, “Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 475, pp. 184–191, 2016, doi: 10.1016/j.jcis.2016.05.001.
- [46] S. Ahmed, Annu, S. A. Chaudhry, and S. Ikram, “A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: A prospect towards green chemistry,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 166, pp. 272–284, 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.12.011.
- [47] P. Singh, Y. J. Kim, D. Zhang, and D. C. Yang, “Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 7, pp. 588–599, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
- [48] E. Marsili and S. K. Das, “Biosynthetic nanoparticles for biotechnological and biomedical applications,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 95, pp. 1–3, 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.017.
- [49] H. Agarwal, S. Venkat Kumar, and S. Rajeshkumar, “A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach,” *Resour. Technol.*, vol. 3, no. 4, pp. 406–413, 2017, doi: 10.1016/j.refit.2017.03.002.
- [50] X. Zhu, K. Pathakoti, and H.-M. Hwang, *Green synthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles and their usage for antimicrobial applications and environmental remediation*. Elsevier Inc., 2019.
- [51] Z. Liu, Z. Chen, F. Han, X. Kang, H. Gu, and L. Yang, “Microwave-assisted method for simultaneous hydrolysis and extraction in obtaining ellagic acid, gallic acid and essential oil from *Eucalyptus globulus* leaves using Brönsted acidic ionic liquid [HO₃S(CH₂)₄mim]HSO₄,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 81, pp. 152–161, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.074.
- [52] M. Calviño-Cancela and E. J. B. van Etten, “Invasive potential of *Eucalyptus globulus* and *Pinus radiata* into native eucalypt forests in Western Australia,” *For. Ecol. Manage.*, vol. 424, pp. 246–258, 2018, doi: 10.1016/j.foreco.2018.05.001.
- [53] M. Pan, Q. Lei, and H. Zhang, “Prediction and confirmation of active ingredients in *Eucalyptus globulus* Labill leaves,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 154, 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112631.
- [54] R. Rubilar *et al.*, “Climate and water availability impacts on early growth and growth efficiency of *Eucalyptus* genotypes: The importance of GxE interactions,” *For. Ecol. Manage.*, vol. 458, 2020, doi: 10.1016/j.foreco.2019.117763.

- [55] B. Gullón, A. Muñiz-Mouro, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes, "Green approaches for the extraction of antioxidants from eucalyptus leaves," *Ind. Crops Prod.*, vol. 138, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111473.
- [56] D. J. Bhuyan, Q. V. Vuong, A. C. Chalmers, I. A. van Altena, M. C. Bowyer, and C. J. Scarlett, "Development of the ultrasonic conditions as an advanced technique for extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus robusta*," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 1, pp. 100–112, 2017, doi: 10.1080/01496395.2016.1250777.
- [57] V. H. Rodrigues, M. M. R. de Melo, I. Portugal, and C. M. Silva, "Extraction of *Eucalyptus* leaves using solvents of distinct polarity. Cluster analysis and extracts characterization," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 135, no. August 2017, pp. 263–274, May 2018, doi: 10.1016/j.supflu.2018.01.010.
- [58] B. Gullón, P. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes, "Optimization of solvent extraction of antioxidants from *Eucalyptus globulus* leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties," *Ind. Crops Prod.*, vol. 108, no. June, pp. 649–659, 2017, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.014.
- [59] D. J. Bhuyan, Q. Van Vuong, A. C. Chalmers, I. A. van Altena, M. C. Bowyer, and C. J. Scarlett, "Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds," *Ind. Crops Prod.*, vol. 69, pp. 290–299, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.044.
- [60] A. Fernández-Agulló, M. S. Freire, and J. González-Álvarez, "Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes," *Ind. Crops Prod.*, vol. 64, pp. 105–113, 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.11.031.
- [61] S. Subhapriya and P. Gomathipriya, "Green synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties," *Microb. Pathog.*, vol. 116, pp. 215–220, 2018, doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.027.
- [62] T. N. Rao *et al.*, "Green synthesis and structural classification of *Acacia nilotica* mediated-silver doped titanium oxide (Ag/TiO₂) spherical nanoparticles: Assessment of its antimicrobial and anticancer activity," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 26, no. 7, pp. 1385–1391, 2019, doi: 10.1016/j.sjbs.2019.09.005.
- [63] P. Jegadeeswaran, P. Rajiv, P. Vanathi, S. Rajeshwari, and R. Venckatesh, "A novel green technology: Synthesis and characterization of Ag/TiO₂ nanocomposites using *Padina tetrastratica* (seaweed) extract," *Mater. Lett.*, vol. 166, pp. 137–139, 2016, doi: 10.1016/j.matlet.2015.12.058.
- [64] D. Hariharan *et al.*, "Enhanced photocatalysis and anticancer activity of green hydrothermal synthesized Ag@TiO₂ nanoparticles," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 202, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111636.
- [65] S. M. Pourmortazavi, M. Taghdiri, V. Makari, and M. Rahimi-Nasrabadi, "Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 136, pp. 1249–1254, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.10.010.
- [66] Y. Y. Mo, Y. K. Tang, S. Y. Wang, J. M. Lin, H. B. Zhang, and D. Y. Luo, "Green synthesis of silver nanoparticles using eucalyptus leaf extract," *Mater. Lett.*, vol. 144,

pp. 165–167, 2015, doi: 10.1016/j.matlet.2015.01.004.

- [67] A. E. Mohammed, “Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles mediated by Eucalyptus camaldulensis leaf extract,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 5, no. 5, pp. 382–386, 2015, doi: 10.1016/S2221-1691(15)30373-7.
- [68] R. Zein, I. Alghoraibi, C. Soukkarieh, A. Salman, and A. Alahmad, “In-vitro anticancer activity against Caco-2 cell line of colloidal nano silver synthesized using aqueous extract of Eucalyptus Camaldulensis leaves,” *Heliyon*, vol. 6, no. 8, p. e04594, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04594.
- [69] M. Khalaj, M. Kamali, M. E. V. Costa, and I. Capela, “Green synthesis of nanomaterials - A scientometric assessment,” *J. Clean. Prod.*, vol. 267, 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122036.
- [70] V. R. Chelli, S. Chakraborty, and A. K. Golder, “Ag-doping on TiO₂ using plant-based glycosidic compounds for high photonic efficiency degradative oxidation under visible light,” *J. Mol. Liq.*, vol. 271, pp. 380–388, 2018, doi: 10.1016/j.molliq.2018.08.140.
- [71] B. Kumar, K. Smita, Y. Angulo, and L. Cumbal, “Valorization of rambutan peel for the synthesis of silver-doped titanium dioxide (Ag/TiO₂) nanoparticles,” *Green Process. Synth.*, vol. 5, no. 4, pp. 371–377, 2016, doi: 10.1515/gps-2016-0003.
- [72] D. Hariharan *et al.*, “Green hydrothermal synthesis of gold and palladium doped titanium dioxide nanoparticles for multifunctional performance,” *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 30, no. 13, 2019, doi: 10.1007/s10854-019-01647-9.
- [73] C. V. Rao and A. K. Golder, “Development of a bio-mediated technique of silver-doping on titania,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 506, pp. 557–565, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.07.031.
- [74] C. Shen, K. Pang, L. Du, and G. Luo, “Green synthesis and enhanced photocatalytic activity of Ce-doped TiO₂ nanoparticles supported on porous glass,” *Particuology*, vol. 34, pp. 103–109, 2017, doi: 10.1016/j.partic.2017.01.007.
- [75] M. Aslam, A. Z. Abdullah, and M. Rafatullah, “Recent development in the green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using plant-based biomolecules for environmental and antimicrobial applications,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 98, pp. 1–16, 2021, doi: 10.1016/j.jiec.2021.04.010.
- [76] M. Sathishkumar, S. Geethalakshmi, M. Saroja, M. Venkatachalam, and P. Gowthaman, *Antimicrobial activities of biosynthesized nanomaterials*, 1st ed., vol. 94. Elsevier B.V., 2021.
- [77] Y. L. Leung, *Staphylococcus aureus*, Third Edit., vol. 4. Elsevier, 2014.
- [78] X. Yang and H. Wang, *Escherichia Coli: Pathogenic E. coli (Introduction)*, Second Edi., vol. 1. Elsevier, 2014.
- [79] H. A. Foster, I. B. Ditta, S. Varghese, and A. Steele, “Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: Spectrum and mechanism of antimicrobial activity,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 6, pp. 1847–1868, 2011, doi: 10.1007/s00253-011-3213-7.
- [80] A. Habibi-Yangjeh, S. Asadzadeh-Khaneghah, S. Feizpoor, and A. Rouhi, “Review on heterogeneous photocatalytic disinfection of waterborne, airborne, and foodborne

viruses: Can we win against pathogenic viruses?," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 580, pp. 503–514, 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2020.07.047.

- [81] M. C. Nevárez-Martínez, P. J. Espinoza-Montero, F. J. Quiroz-Chávez, and B. Ohtani, "Fotocatálisis: inicio, actualidad y perspectivas a través del TiO₂," *Av. en Química*, vol. 12, no. 3, pp. 45–59, 2017, [Online]. Available: www.saber.ula.ve/avancesenquimica.
- [82] J. Xu *et al.*, "Polydopamine coatings embedded with silver nanoparticles on nanostructured titania for long-lasting antibacterial effect," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 320, pp. 608–613, 2017, doi: 10.1016/j.surfcoat.2016.10.065.
- [83] M. Khalaj, M. Kamali, M. E. V. Costa, and I. Capela, "Green synthesis of nanomaterials - A scientometric assessment," *J. Clean. Prod.*, vol. 267, p. 122036, 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122036.
- [84] Y. S. Pontaza-Liconá *et al.*, "Alcoholic extracts from Paulownia tomentosa leaves for silver nanoparticles synthesis," *Results Phys.*, vol. 12, pp. 1670–1679, 2019, doi: 10.1016/j.rinp.2019.01.082.
- [85] B. Gullón, P. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes, "Optimization of solvent extraction of antioxidants from Eucalyptus globulus leaves by response surface methodology: Characterization and assessment of their bioactive properties," *Ind. Crops Prod.*, vol. 108, pp. 649–659, 2017, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.014.
- [86] L. A. Páramo Serrano, "EVALUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y PARÁMETROS BIOLÓGICOS EN EL CRECIMIENTO DE ALFALFA TRATADA CON NANOPARTÍCULAS DE M-TiO₂ M= Fe, Ag, Cu," Universidad Autónoma de Querétaro, 2020.
- [87] A. A. Feregrino-Pérez *et al.*, "Antioxidant and antimutagenic activities of Acacia pennatula pods," *J. Sci. Ind. Res. (India)*, vol. 70, no. 10, pp. 859–864, 2011.
- [88] I. Parola-Contreras *et al.*, "Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*heliopsis longipes*, asteraceae)," *Bot. Sci.*, vol. 99, no. 1, pp. 149–160, 2021, doi: 10.17129/BOTSCI.2671.
- [89] A. Córdoba-Guerrero, "Estudio de metabolitos secundarios en hortalizas crecidas con agua desinfectada por fotocatalisis solar para su potencial consumo humano," Universidad Autónoma de Querétaro, 2018.
- [90] L. A. Martínez-Chávez, "Producción fotoelectroquímica de hidrógeno empleando TiO₂-Pt como catalizador a través de un electrolizador tipo PEM," Universidad Autónoma de Querétaro, 2019.
- [91] J. L. López-Miranda, J. A. Cervantes-Chávez, A. R. Hernández-Martínez, R. Pérez, R. Esparza, and M. Estévez-González, "Study on the photocatalytic and antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by a green approach," *Mater. Res. Express*, vol. 6, no. 6, 2019, doi: 10.1088/2053-1591/ab0ef6.
- [92] R. Hernández, J. R. Hernández-Reséndiz, L. A. Martínez-Chávez, R. Velázquez-Castillo, L. Escobar-Alarcón, and K. Esquivel, "X-ray diffraction Rietveld structural analysis of Au–TiO₂ powders synthesized by sol–gel route coupled to microwave and sonochemistry," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 95, no. 1, pp. 239–252, 2020, doi:

10.1007/s10971-020-05264-5.

- [93] Á. G. Rodríguez Méndez, "Síntesis Y Caracterización De Nanopartículas De TiO₂ Dopadas Con Plata Para Desinfección De Aguas Residuales," Universidad Autónoma de Querétaro, 2016.
- [94] A. Dehghani, G. Bahlakeh, and B. Ramezanzadeh, "Green Eucalyptus leaf extract: A potent source of bio-active corrosion inhibitors for mild steel," *Bioelectrochemistry*, vol. 130, p. 107339, 2019, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107339.
- [95] M. Gomes da Silva *et al.*, "Cleaner production of antimicrobial and anti-UV cotton materials through dyeing with eucalyptus leaves extract," *J. Clean. Prod.*, vol. 199, pp. 807–816, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.221.
- [96] B. L. Mojet, S. D. Ebbesen, and L. Lefferts, "Light at the interface: The potential of attenuated total reflection infrared spectroscopy for understanding heterogeneous catalysis in water," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 12, pp. 4643–4655, 2010, doi: 10.1039/c0cs00014k.
- [97] M. A. Garcia, "Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 28, 2011, doi: 10.1088/0022-3727/44/28/283001.
- [98] S. Anees Ahmad *et al.*, "Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review," *Mater. Sci. Energy Technol.*, vol. 3, pp. 756–769, 2020, doi: 10.1016/j.mset.2020.09.002.
- [99] A. Guilante *et al.*, "Propiedades fisicoquímicas de sistemas La/TiO₂ empleados en la fotodegradación de 2-nitrofenol con luz visible en un simulador solar," *Rev. la Fac. Ing. Univ. Cent. Venez.*, vol. 26, no. 3, 2011, [Online]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-40652011000300013&lng=es&nrm=iso.
- [100] J. R. Hernández-Reséndiz, "SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ -Au PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROCESOS DE REMOCIÓN DE FÁRMACOS," 2019.
- [101] M. Monai, T. Montini, and P. Fornasiero, "Brookite: Nothing new under the sun?," *Catalysts*, vol. 7, no. 10, 2017, doi: 10.3390/catal7100304.
- [102] A. K. P. D. Savio, J. Fletcher, and F. C. Robles Hernández, "Sonosynthesis of nanostructured TiO₂ doped with transition metals having variable bandgap," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 3, pp. 2753–2765, 2013, doi: 10.1016/j.ceramint.2012.09.042.
- [103] P. P. Lottici, D. Bersani, M. Braghini, and A. Montenero, "Raman scattering characterization of gel-derived titania glass," *J. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 177–183, 1993, doi: 10.1007/BF00349049.
- [104] Y. Qing *et al.*, "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3311–3327, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165125.
- [105] D. Acharya, K. M. Singha, P. Pandey, B. Mohanta, J. Rajkumari, and L. P. Singha, "Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018, doi: 10.1038/s41598-017-18590-6.

- [106] A. Abbaszadegan *et al.*, "The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study," *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1155/2015/720654.
- [107] T. C. Dakal, A. Kumar, R. S. Majumdar, and V. Yadav, "Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. NOV, pp. 1–17, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01831.

10. Anexos

10.1. Metabolitos secundarios

Los resultados se reportan \pm su desviación estándar.

10.1.1. Fenoles

Tabla 13: concentración de fenoles en los distintos extractos

Solvente de extracción	Etanol	Metanol	EtOH/agua	MeOH/agua
Conc. ácido gálico [mg EAG/g muestra]	5.15 \pm 1.62	10.38 \pm 2.32	1.60 \pm 1.13	9.22 \pm 5.96

10.1.2. Flavonoides

Tabla 14: concentración de flavonoides en los distintos extractos

Solvente de extracción	Etanol	Metanol	EtOH/agua	MeOH/agua
Conc. rutina [mg ER/g muestra]	1.56 \pm 0.06	2.33 \pm 0.17	1.85 \pm 0.08	2.13 \pm 0.38

10.2. Pruebas antimicrobianas

Tabla 15: resultados de la evaluación antimicrobiana en UFC

Material	Unidades formadoras de colonias (UFC x10 ⁸)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Control	Tratamiento	Control	Tratamiento
Ag-c	4.3575 \pm 0.2675	0.665 \pm 0.363547	4.52 \pm 0.1437	0
Ag-e	4.0425	0	4.2525	0

	± 0.4477		± 0.1488	
TiO ₂	2.3325 ± 0.3347	1.9975 ± 0.3508	3.1225 ± 0.1493	2.175 ± 0.2411
TiO ₂ -M	5.3425 ± 0.4973	1.8375 ± 0.2096	4.08 ± 0.2412	3.3975 ± 0.2954
AgTiO ₂ -c	1.6925 ± 0.2611 ± 0.261199	0.0030 ± 0.0002 ± 0.0002776088375	3.72 ± 0.1230 ± 0.123018	0
AgTiO ₂ -cM	6.07 ± 0.4282	0.00000035 ± 0.0000002121	2.0325 ± 0.188746	0
AgTiO ₂ -e	5.6625 ± 0.1071	0.05000000 ± 0.0316	0.052 ± 0.0163	0.02000000 ± 0.0141
AgTiO ₂ -eM	2.685 ± 0.1343	0	1.8 ± 0.2180	0

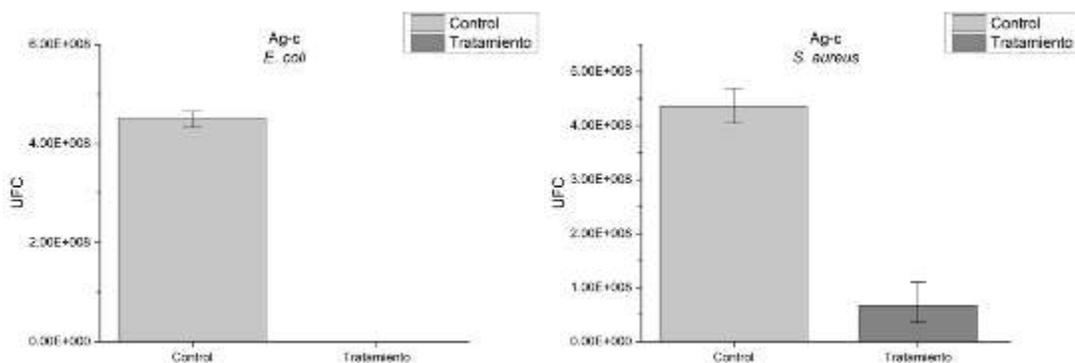


Figura 24: evaluación antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas convencionalmente

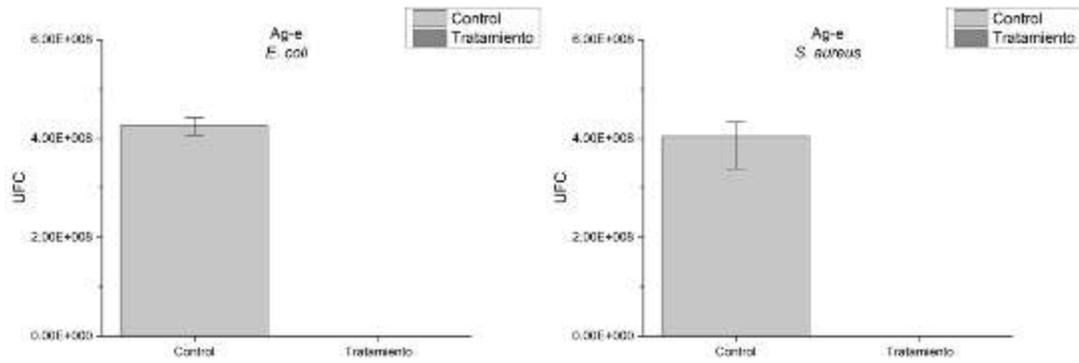


Figura 25: evaluación antimicrobiana de nanopartículas de plata sintetizadas mediante el extracto de eucalipto

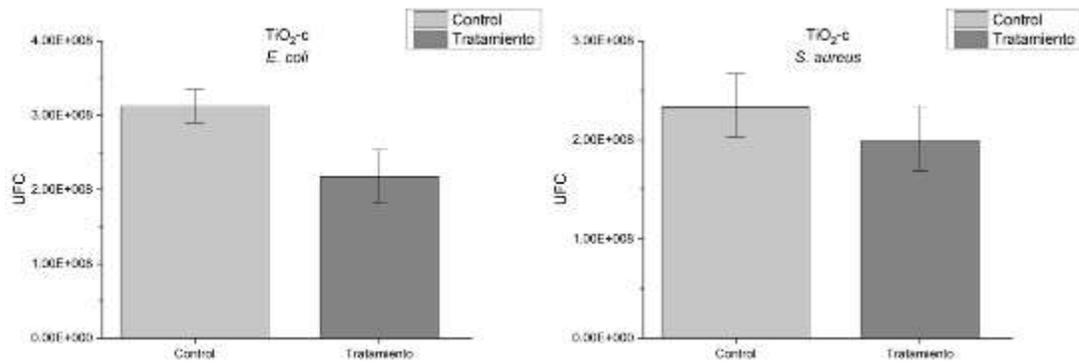


Figura 26: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio sintetizado convencionalmente

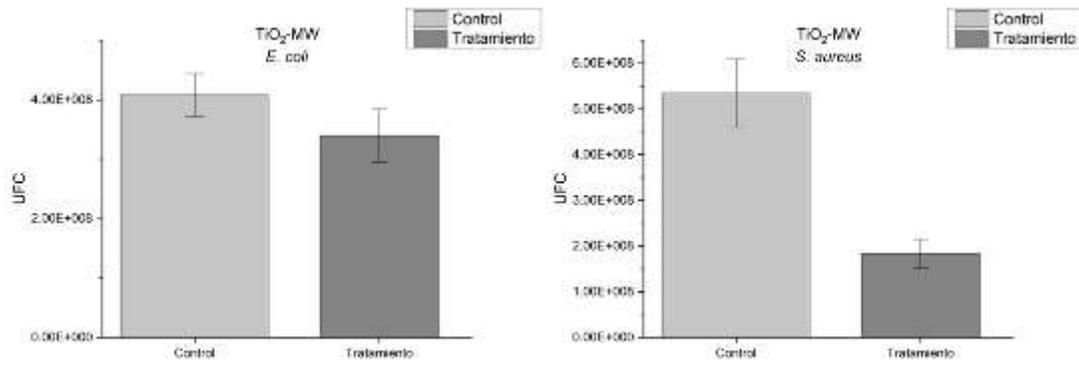


Figura 27: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio sintetizado convencionalmente asistido por microondas

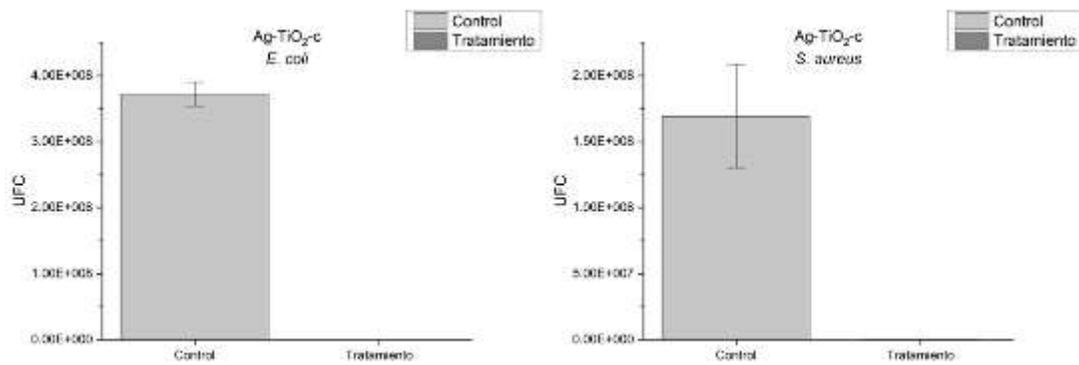


Figura 28: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado convencionalmente

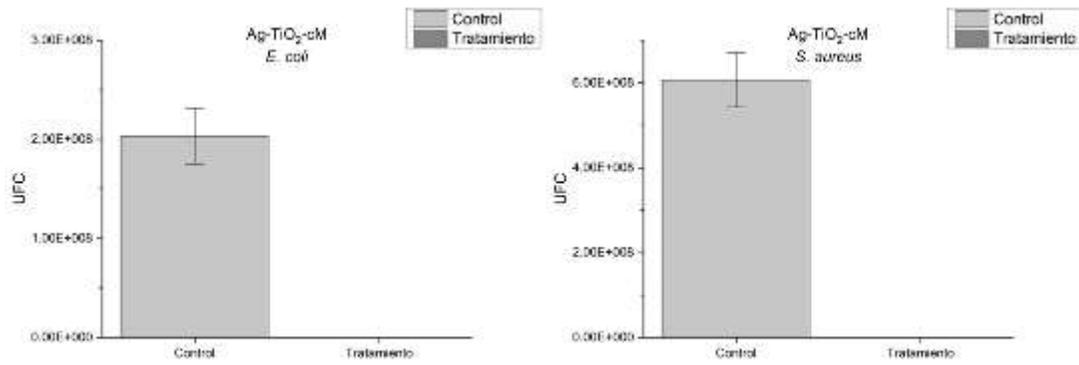


Figura 29: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado convencionalmente asistido por microondas

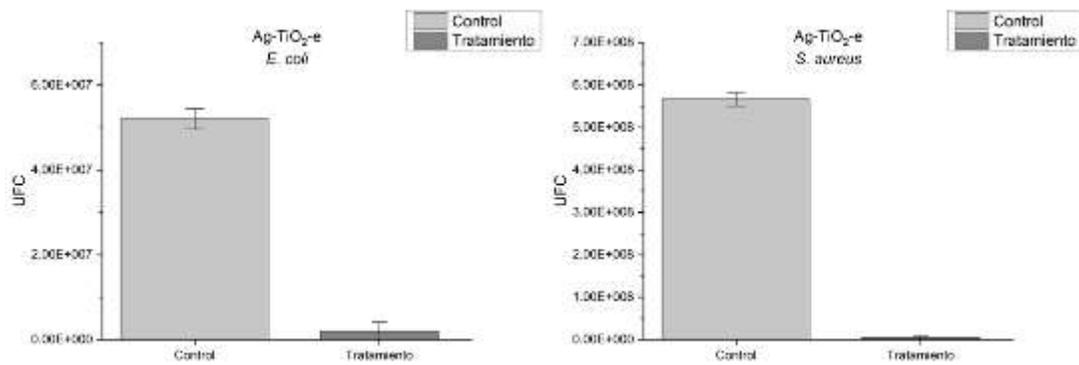


Figura 30: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado mediante el extracto de eucalipto

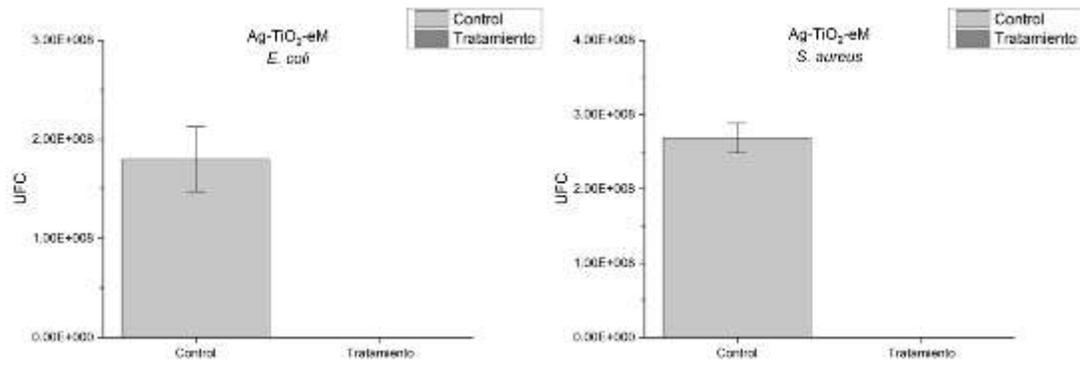


Figura 31: evaluación antimicrobiana de dióxido de titanio dopado con plata sintetizado mediante el extracto de eucalipto asistido por microondas