



“Estudio eléctrico de células híbridas mediante una celda microbiana de combustible (MFC)”.

Escorza Cóndor, Jonathan Lisandro

Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia tecnológica

Centro de Postgrados

Maestría de Investigación en Nanotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Magister en Nanotecnología

Angulo Paredes, Yolanda Del Rocío Ph.D.

11 de septiembre de 2022



Document Information

Analyzed document	TESIS FINAL_JONATHAN_ESCORZA_1.pdf (D112125505)
Submitted	9/6/2021 2:49:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	ilbbiblioteca.GDC@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	TESIS Del Castillo Dennisse URKUND.docx Document TESIS Del Castillo Dennisse URKUND.docx (D53369878)	 24
SA	TESIS ULTIMA.docx Document TESIS ULTIMA.docx (D25467486)	 2
SA	Tesis carrasquilla Arroyo G biblio.docx Document Tesis carrasquilla Arroyo G biblio.docx (D43991350)	 1

Firma:

.....

Angulo Paredes, Yolanda Del Rocío

Director

C.C.: 1715032718



Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “Estudio Eléctrico de células híbridas mediante una Celda Microbiana de Combustible (MFC)” fue realizado por el señor Escorza Córdor, Jonathan Lisandro, el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 11 septiembre de 2021

Firma:

.....

Angulo Paredes, Yolanda Del Rocío

Director

C.C.: 1715032718



Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Responsabilidad de autoría

Yo **Escorza Cóndor, Jonathan Lisandro**, con cédula de ciudadanía n°171642967-3, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Estudio Eléctrico de células híbridas mediante una Celda Microbiana de Combustible (MFC)**” es de mí autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 septiembre de 2021

Firma

.....

Escorza Cóndor, Jonathan Lisandro

C.C.: 1716429673



Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de posgrados

Autorización de publicación

Yo **Escorza Cóndor, Jonathan Lisandro**, con cédula de ciudadanía n°171642967-3, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Estudio Eléctrico de células híbridas mediante una Celda Microbiana de Combustible (MFC)**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 11 septiembre de 2021

Firma

.....

Escorza Cóndor, Jonathan Lisandro

C.C.:171642967-3



Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Agradecimientos

A mi padre, Luis Escorza, quién me ha apoyado de muchas maneras en todas las instancias de mi vida personal y profesional.

A mi madre, Susana Córdor, quién ha cuidado de mí y me ha enseñado el valor del trabajo y el esfuerzo.

A mis hermanos y hermana, Edison, Luis y Micaela que con sus consejos y tiempo me han ayudado a superar muchos problemas.

A la doctora Yolanda Angulo, por tener la confianza y la paciencia para transmitir sus conocimientos y ser una guía primordial en el desarrollo de la tesis y de mi parte profesional.

Al Ingeniero David Carchi, compañero de la maestría y amigo personal, por haber sido un gran apoyo durante la maestría y por compartir sus conocimientos.

A la doctora Marbel Torres, doctor Luis Cumbal y al Centro de Nanociencia y Nanomateriales, doctora Blanca Naranjo, doctor Alexis Debut, ingeniera Karla Vizuite y a todos mis compañeros y amigos del CENCINAT.

Índice de contenido

Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Agradecimientos.....	6
Índice de contenido	7
Índice de tablas.....	9
Índice de figuras.....	10
Abstract.....	14
Capítulo I. Introducción	16
Título del proyecto.....	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
Problema y justificación	18
Antecedentes	20
Capítulo ii. Marco teórico.....	22
Cianobacteria	22
<i>Fischerella musicola</i>	25
<i>Cultivo a nivel de laboratorio</i>	25
Síntesis verde de Nanopartículas	27
<i>Extractos naturales como agentes reductores.</i>	27
<i>Síntesis de Nanopartículas metálicas</i>	31
Técnicas de caracterización	33
<i>Espectrometría UV-Visible</i>	34
<i>Dispersión de Luz Dinámica</i>	35
<i>Microscopía Electrónica</i>	36
<i>Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	37
<i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	38
<i>Microscopía de Fuerza Atómica AFM/EFM</i>	39
<i>Difracción de Rayos X.</i>	40
<i>Voltametría Cíclica</i>	43
<i>Microscopía de Fluorescencia Confocal</i>	44
Celda microbiana de Combustible (MFC) y Sistemas Bio-Fotovoltaicos (BPV)	46
Capítulo III. Metodología.....	49

Cultivo.....	49
Extracción de pigmentos naturales	50
Síntesis de Nanopartículas de plata.	52
Formación del organismo híbrido.	53
Técnicas de Caracterización.....	54
<i>Nanopartículas</i>	54
<i>Cianobacterias y organismo híbrido</i>	58
MFC/BPV	61
<i>Construcción</i>	61
<i>Adquisición de datos y Caracterización</i>	63
Capítulo IV. Análisis de resultados	70
Caracterización de los extractos	70
<i>Pelargonium domesticum</i>	70
<i>Rhamnus myrtifolius</i>	71
Caracterización de las AgNPs	75
<i>Caracterización UVVis y DLS</i>	75
<i>Caracterización por Voltametría Cíclica</i>	89
<i>Caracterización TEM y SEM</i>	92
<i>Caracterización XRD</i>	101
Caracterización del organismo híbrido	105
<i>Caracterización SEM</i>	105
<i>Caracterización por Microscopía Confocal</i>	106
<i>Caracterización EFM</i>	109
<i>Caracterización con la MFC</i>	126
Conclusiones.....	134
Referencias.....	136

Índice de tablas

Tabla 1. Sales para la preparación de Stocks, medio BG11	26
Tabla 2. Descripción de los sistemas experimentales.....	53
Tabla 3. Intervalos de los índices de Polsby – Popper, índice de circularidad.	56
Tabla 4. Tamaño promedio de las AgNPs de <i>P. domesticum</i>, técnica DLS, variación de pH.	76
Tabla 5. Tamaño promedio de las AgNPs de <i>P. domesticum</i>, técnica DLS, variación de concentración.	76
Tabla 6. Tamaño promedio de las AgNPs de <i>R. myrtifolius</i>, técnica DLS, variación de concentración.	81
Tabla 7. Tamaño promedio de las AgNPs de <i>R. myrtifolius</i>, técnica DLS, variación de pH. .	83
Tabla 8. Longitud de onda y E_{gap} de las AgNPs.	88
Tabla 9. Resumen morfológico de las AgNPs sintetizadas.	101
Tabla 10. Resumen de las propiedades eléctricas analizadas con la técnica AFM/EFM....	124
Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos con la caracterización de los sistemas con la MFC.	133

Índice de figuras

Figura 1. Estructura celular general de una cianobacteria.	22
Figura 2. Mecanismo fotosintético en la membrana tilacoide en una cianobacteria.....	23
Figura 3. Ficocianina obtenida de la ruptura celular de la cianobacteria <i>Fischerella muscicola</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Espectro de absorción UV-Vis de la clorofila A.....	24
Figura 5. Tipos de moléculas flavonoides.	28
Figura 6. Espectro de absorción UV-Vis general de una molécula flavonoide.	30
Figura 7. Conjugación de las moléculas flavonoides debido a la modificación del pH.	30
Figura 8. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.	31
Figura 9. Celda de cuarzo típica para la espectrometría UV-Visible.	34
Figura 10. Tipos de interacción con la muestra, del haz de electrones de un microscopio electrónico	37
Figura 11. Energía de los electrones emitidos luego de la interacción del haz con la muestra.....	38
Figura 12. Estructura Básica de un Microscopio de Fuerza Atómica.....	39
Figura 13. Esquema representativo de la ley de Bragg para la difracción de Rayos X.	41
Figura 14. Esquema explicativo del desplazamiento en un espectrograma de Rayos X.....	42
Figura 15. Diagrama de los saltos electrónicos entre niveles de energía.	45
Figura 16. Principios de funcionamiento de una BPV tipo PEM.	48
Figura 17. Protocolo de crecimiento de la cianobacteria <i>Fischerella muscicola</i>	50
Figura 18. Proceso de preparación de los extractos de geranio (<i>Pelargonium domesticum</i>) y carrasquilla (<i>Berberis Halli</i>).	51
Figura 19. Proceso de síntesis de nanopartículas de plata con extracto de <i>P. domesticum</i> y <i>R. myrtifolius</i>	52
Figura 20. Proceso de formación del organismo híbrido.....	53
Figura 21. Muestras de nanopartículas de plata preparadas para el estudio por Dispersión de Rayos X (XRD).	57
Figura 22. Muestras para medición AFM de los organismos híbridos.....	59
Figura 23. Ejemplo de análisis de imágenes obtenidas con AFM.	60
Figura 24. Proceso de formación del puente salino gelificado.	62
Figura 25. Construcción del electrodo de Zn.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 26. Circuito de medición de voltaje y corriente de una MFC en circuito cerrado. ...	63

Figura 27. Esquema de programación para la adquisición de datos desde el software computacional LabVIEW 2019.	65
Figura 28. Curva de Polarización típica de una MFC tipo PEM.	68
Figura 29. Espectro de absorción y análisis de estabilidad, <i>P. domesticum</i> pH original.	70
Figura 30. Espectro de absorción, extracto de <i>P. domesticum</i> con y sin modificación de su pH.	71
Figura 31. Espectro de absorción y análisis de estabilidad, <i>R. myrtifolius</i> pH original.	72
Figura 32. Espectro de absorción, extracto de <i>P. domesticum</i> con y sin modificación de su pH.	73
Figura 33. Comparación de los espectros de absorción de los extractos caracterizados, pH original y modificado.	74
Figura 34. Espectros de absorción, AgNPs con extracto de <i>P. domesticum</i> y AgNO_3 . Variación de pH's.	75
Figura 35. Espectros de absorción, AgNPs con extracto de <i>P. domesticum</i> y AgNO_3 . Variación de concentración.	76
Figura 36. Espectros de absorción, escalamiento de AgNPs con <i>P. domesticum</i>	77
Figura 37. Histogramas del tamaño medido por DLS, escalamiento de AgNPs con <i>P. domesticum</i>	77
Figura 38. Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>P. domesticum</i> . Escala 10mL.	79
Figura 39. Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>P. domesticum</i> . Escala 50mL.	79
Figura 40. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>P. domesticum</i> . Escala 10mL y 50mL.	80
Figura 41. Espectros de absorción, AgNPs con extracto de <i>R. myrtifolius</i> y AgNO_3 . Variación de concentración.	81
Figura 42. Espectros de absorción, AgNPs con extracto de <i>R. myrtifolius</i> y AgNO_3 . Variación de pH's.	82
Figura 43. Espectros de absorción, escalamiento de AgNPs con <i>R. myrtifolius</i>	83
Figura 44. Histogramas del tamaño medido por DLS, escalamiento de AgNPs con <i>R. myrtifolius</i>	84
Figura 45. Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>R. myrtifolius</i> . Escala 10mL.	85

Figura 46. Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>R. myrtifolius</i> . Escala 50mL.	85
Figura 47. Análisis de estabilidad AgNPs con <i>R. myrtifolius</i> . Escala 10mL y 50mL.	86
Figura 48. Comparación de los espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas con el extracto de <i>P. domesticum</i> y <i>R. Myrtifolius</i>	87
Figura 49. Comparación de la primera derivada de los espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas con el extracto de <i>P. domesticum</i> y <i>R. Myrtifolius</i>	88
Figura 50. Voltagrama AgNPs con <i>P. domesticum</i>	89
Figura 51. Comparativos de Voltagramas de AgNPs, AgNO ₃ y el extracto de <i>P. domesticum</i>	90
Figura 52. Voltagrama AgNPs con <i>R. myrtifolius</i>	91
Figura 53. Comparativos de Voltagramas de AgNPs, AgNO ₃ y el extracto de <i>R. myrtifolius</i>	92
Figura 54. Caracterización técnica STEM. AgNPs de <i>P. domesticum</i> . Escala 10mL.	93
Figura 55. Caracterización técnica STEM. AgNPs de <i>P. domesticum</i> . Escala 50mL.....	93
Figura 56. Caracterización técnica TEM. AgNPs de <i>P. domesticum</i>	94
Figura 57. Histogramas del diámetro de feret de las AgNPs sintetizadas con el extracto de <i>P. domesticum</i>	95
Figura 58. Diagrama de barras de la distribución morfológica de las AgNPs con <i>P. domesticum</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 59. Caracterización técnica STEM. AgNPs de <i>R. myrtifolius</i> . Escala 10mL.	97
Figura 60. Caracterización técnica STEM. AgNPs de <i>R. myrtifolius</i> . Escala 50mL.....	97
Figura 61. Histogramas del diámetro de Feret de las AgNPs sintetizadas con el extracto de <i>R. myrtifolius</i>	98
Figura 62. Caracterización técnica TEM. AgNPs de <i>R. myrtifolius</i>	99
Figura 63. Diagrama de barras de la distribución morfológica de las AgNPs con <i>R. myrtifolius</i>	100
Figura 64. Comparación de la distribución morfológica de las AgNPs de <i>P. domesticum</i> y <i>R. myrtifolius</i>	100
Figura 65. Caracterización de Ag ₂ O por XRD.	103
Figura 66. Caracterización de AgNPs de <i>P. domesticum</i> por XRD.	103
Figura 67. Caracterización de AgNPs de <i>R. myrtifolius</i> por XRD.	104
Figura 68. Comparación de espectrogramas de XRD.	104
Figura 69. Imágenes con la técnica SEM del organismo híbrido.	105

Figura 70. Imágenes con Microscopía Confocal del organismo híbrido.	107
Figura 71. Imágenes con Microscopía Confocal de Fischerella muscicola.	108
Figura 72. Análisis de la técnica AFM del Alga.	110
Figura 73. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C1.....	112
Figura 74. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C2.	114
Figura 75. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C3.	116
Figura 76. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C1.	118
Figura 77. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C2.	121
Figura 78. Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C3.	122
Figura 79. Curvas de voltaje vs resistencia de carga. Caracterización con la MFC/BPV....	126
Figura 80. Curvas de polarización y Potencia de los sistemas caracterización con la MFC/BPV.	127

Resumen

En el presente proyecto se estudió eléctricamente un organismo biológico híbrido mediante un prototipo de celda microbiana de combustible (MFC). El organismo híbrido fue desarrollado mediante la adherencia de nanopartículas de plata en la cianobacteria *Fischerella musicola* y la celda MFC fue diseñada y construida en base a dos cámaras separadas por un puente salino. Previo al desarrollo del organismo híbrido se analizó con diferentes técnicas de caracterización el crecimiento celular de la cianobacteria *Fischerella musicola*, para ello se controló los parámetros de fotoperiodo e intercambio gaseoso, y se monitoreó la temperatura y el pH del medio de cultivo. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se sintetizaron con química verde y se utilizó extractos naturales como la flor del geranio (*Pelargonium domesticum*) y del fruto de la carrasquilla (*Rhamnus myrtifolius*), para la reducción del nitrato de plata. En el proceso de síntesis se controló el pH, temperatura y el tiempo para obtener tamaños de nanopartículas de $17,6313 \pm 12,6812 \text{ nm}$ para las AgNPs de geranio y de $24,1294 \pm 7,5146 \text{ nm}$ para las de carrasquilla. Estos estudios mostraron que, dependiendo del agente reductor y las condiciones de síntesis, la forma y tamaño de la nanopartícula difiere. Finalmente, se desarrolló el organismo híbrido mediante la adherencia electrostática de diferentes concentraciones de AgNPs y se caracterizó bajo diferentes técnicas de microscopía. Todos los estudios mostraron que para una concentración de 2,6 mL de AgNPs de *Pelargonium domesticum* en 20 mL de biomasa y 40 mL de medio BG11, se obtuvo la mejor eficiencia de generación energía eléctrica de $0.8043 \pm 0.009 \text{ V}$ y $19,42 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, mediante una celda microbiana de combustible de dos cámaras y puente salino.

Palabras Clave:

- CIANOBACTERIAS
- AgNPs
- MFC
- ORGANISMO HÍBRIDO
- ENERGÍA

Abstract

In this project, hybrid biological organism was electrically studied using microbial fuel cell (MFC) prototype of two chambers separated by a salt bridge. The hybrid organism was developed by adhering silver nanoparticles to cyanobacterium *Fischerella musicola*.

Previously to the development of the hybrid organism, the growth of the *Fischerella musicola* cyanobacteria was analyzed with different characterization techniques, for this, the photoperiod and gas exchange parameters were controlled, and the temperature and pH of the medium were monitored. Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by green chemistry using natural extract such as the geranium flower (*Pelargonium domesticum*) and the carrasquilla fruit (*Rhamnus myrtifolius*) to reduce silver nitrate. In the synthesis process, the pH, temperature and time were controlled to obtain nanoparticle sizes of $17.6313 \pm 12.6812\text{nm}$ for geranium AgNPs and $24.1294 \pm 7.5146\text{nm}$ for carrasquilla ones. These studies showed that, depending on the reducing agent and the synthesis conditions, the shape and size of the nanoparticle differs. Finally, the hybrid organism was developed through the electrostatic adherence of different concentrations of nanoparticles, the AgNPs and the hybrid organisms were characterized by different techniques.

All the studies showed that for a concentration of 2.6mL of AgNPs from *Pelargonium domesticum* in 20mL of biomass and 40mL of BG11 medium, the best electrical energy generation efficiency was of $0.8043 \pm 0.009\text{V}$ and $19.42\mu\text{A} / \text{cm}^2$, using a two-chamber microbial fuel cell and salt bridge.

Keywords:

- **CYANOBACTERIA**
- **AgNPs**
- **MFCs**
- **HYBRID ORGANISM**
- **ENERGY**

Capítulo I. Introducción

El crecimiento poblacional ha generado una necesidad energética urgente a nivel mundial, con miras a una búsqueda de nuevas formas de generación sustentables, renovables y no contaminantes, tratando de reducir el consumo de combustibles fósiles que es un recurso finito y con un alto impacto ambiental. En esta búsqueda se han intentado métodos que utilizan la energía del viento en turbinas eólicas, la energía geo térmica y la del sol en celdas solares o celdas bio foto sintéticas (BPV), que son una adaptación de las celdas microbianas de combustible que utilizan la degradación de compostajes o aguas servidas mediante el uso de bacterias.

El objeto de investigación de este tipo de celdas ha tenido sus variaciones con diferentes enfoques; los electrodos han tenido un gran desarrollo y un amplio uso de materiales como el grafito o el cobre (J. Li et al., 2010) o el uso de nanomateriales para incrementar la eficiencia en la captación de electrones (García Gómez, Garcia-Gutierrez, & Sanchez Cervantes, 2015) o incluso el uso de biocátodos (L. Huang, Regan, & Quan, 2011; Wu et al., 2012), también diferentes elementos que permitan el intercambio de protones entre las celdas utilizando puentes salinos, fibras de vidrio, membranas porosas, membranas aniónicas, membranas catiónicas y las más populares las láminas de Nafion de la compañía Dupont Inc. (Cui, Rashid, Hu, Rehman, & Han, 2014; Garcia, 2004; W.-W. Li, Sheng, Liu, & Yu, 2011; Meng, Savage, & Deng, 2015). Una modificación de una MFC que elimina la necesidad de una membrana de intercambio protónico (Yang, Jia, & Liu, 2009) es la construcción de una sola celda para la parte aniónica en la que se da la degradación del material orgánico, y el segundo electrodo que debería estar colocado en la parte catiónica se lo coloca expuesto directamente al aire (Du, Li, & Gu, 2007), sin embargo no todas estas celdas han suprimido el uso de las membranas como separadores (Liu & Logan, 2004).

Lo más importante en el desarrollo de nuevas tecnologías en MFCs es la medición y cuantificación del desempeño de estas celdas para lo cual se utilizan los indicadores de cualquier generador eléctrico que son la densidad de potencia, la eficiencia coulombica y la resistencia interna.

Las cianobacterias han sido muy utilizadas en diferentes procesos como biomasa para el cultivo de plantas (Hernández-Reyes et al., 2019), debido a que son fuente de nuevos agentes bioactivos naturales (Carmen Alquizar & Chávez Vásquez, 2020), o por su capacidad de fijación del nitrógeno (N_2) en estructuras celulares denominadas heterocitos, que les confiere un especial interés con fines agrícolas. También han sido muy utilizadas en la producción de energía eléctrica (Patel, Matsakas, Rova, & Christakopoulos, 2019), generando potenciales aprovechando el proceso fotosintético en las MFC que utilizan la liberación del O_2 para oxidar el electrodo en su parte aniónica junto con otro agente que realice el efecto de reducción en la parte catiónica y así producir un intercambio de electrones entre los electrodos (Castillo, 2019). Algunas investigaciones han logrado obtener una generación de potencial de 993mV en un circuito abierto para el caso de la cianobacteria *Chlamydomonas reinhardtii* (Shahparnia, Packirisamy, Juneau, & Zazubovich, 2015) y corrientes de hasta 630 nA/cm² con estabilidad a largo plazo (Cevik, Buyukharman, & Yildiz, 2018)

El enfoque de esta investigación es el desarrollo de organismos híbridos entre cianobacterias y nanopartículas de plata, aprovechando el efecto fotosintético de las algas y la resonancia plasmónica propia de las nanopartículas metálicas, con el fin de mejorar la generación de potencial eléctrico. El proceso de síntesis fue desarrollado y caracterizado utilizando extractos naturales, para su posterior hibridación y caracterización eléctrica por diversas técnicas y finalmente el desarrollo de un prototipo de MFC que mida la generación eléctrica de cada uno de estos organismos híbridos.

Título del proyecto

Estudio eléctrico de células híbridas mediante una celda microbiana de combustible (MFC).

Objetivo general

Estudiar eléctricamente las células híbridas mediante una celda microbiana de combustible (MFC).

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNPs) por síntesis verde con dos extractos diferentes.
- Crecer la cianobacterias *Fischerella muscicola* en medio de cultivo BG11 en un ambiente controlado.
- Crecer y caracterizar físico-químicamente las células híbridas vivas obtenidas mediante la absorción de AgNPs en las cianobacterias.
- Desarrollar la celda microbiana de combustible (MFC) para caracterizar la eficiencia eléctrica de las células híbridas vivas.

Problema y justificación

El daño ambiental, producto del consumo de materiales fósiles como principal fuente para satisfacer la demanda energética mundial, ha ocasionado dos problemas graves a los que se enfrenta la humanidad: el calentamiento global y la eminente escasez de los recursos no renovables en un futuro cercano (Energía, 2013). Para contrarrestar el cambio climático, muchos investigadores han estudiado nuevas formas de generación de energía eléctrica que sean amigables con el ambiente y autosustentables, trabajando con energía eólica (Lacal-Aránzaga, 2019), solar (Nayak, Mahesh, Snaith, & Cahen, 2019), geotérmica (Pérez, 2019) e

incluso la producción de energía utilizando procesos fotosintéticos de organismos microbianos como las cianobacterias y microalgas (Bahadar & Bilal Khan, 2013).

Registros muestran que las algas son los organismos más importantes de la vida en el planeta tierra, puesto que aportan entre el 70% y 80% de oxígeno al planeta (McLamb, 2011), y aunque existen muchas variedades de algas, son los organismos más simples, eucariotas (microalgas) y procariotas (cianobacterias), las que tienen mayor abundancia y su crecimiento puede desarrollarse a condiciones que serían muy precarias para otro tipo de organismos (Hall, 2011). Desde la década de los 70 los investigadores han trabajado con estos organismos fotosintéticos para la eliminación de contaminantes, así como la producción de biomasa para la producción de energía eléctrica (Hernández-Pérez & Labbé, 2014), y aunque hasta la actualidad no se ha podido recrear totalmente el fenómeno de la fotosíntesis, si se ha podido utilizar para la producción de energía eléctrica (Shahparnia et al., 2015) mediante las conocidas MFC o BPV (Cevik et al., 2018) y para sistemas de iluminación como la lámpara *Latro* del diseñador industrial *Mike Thomson* ("LATRO," 2019).

En todas las áreas de investigación aplicada, la nanotecnología ha presentado cambios revolucionarios, su gran ventaja son las nuevas propiedades únicas de distintos materiales a tamaño nanométrico y sus posibles aplicaciones en remediación ambiental (Karn, Kuiken, Otto, & Coletiva, 2011), medicina (Safari & Zarnegar, 2014), (Emerich & Thanos, 2003), electrónica (Che et al., 2014), entre muchas otras. Las nanoestructuras por tener tamaños a la escala nanométrica pueden desarrollar toxicidad a nivel celular en los organismos vivos, estudios han demostrado que nanoestructuras con tamaños mayores a los 10nm en adelante no presentan niveles de toxicidad (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007), (Aydın, Sipahi, & Charehsaz, 2012). Otros estudios han logrado introducir estas nanoestructuras en organismos vivos para aumentar las propiedades físico-químicas, mecánicas (Cheng et al., 2017) y

eléctricas (Castillo, 2019) de los biomateriales que estos producen, sin presentar ningún tipo de toxicidad a los organismos vivos, lo que demuestra que al incorporar nanopartículas metálicas en un sistema vivo se genera de manera inmediata un intercambio de energía entre las sustancias del organismo vivo y las NPs metálicas.

Es por estos motivos que este proyecto plantea desarrollar células híbridas vivas con características eléctricas eficientes, renovables, no contaminantes y sustentables; para ser utilizadas en sistemas de iluminación en sectores tanto urbanos como rurales, para ello se utilizará la cianobacteria *Fisherella musicola* como organismo vivo y se mezclará concentraciones diferentes de AgNPs sintetizadas con dos extractos diferentes pero de similar tamaño y así poder comparar cuál de estas células híbridas es la adecuada para la aplicación, aportando a la creciente demanda de energía eléctrica sin afectar al planeta.

Antecedentes

La MFC así como la caracterización eléctrica de organismos (cianobacterias) es un tema muy desarrollado en la actualidad con diferentes enfoques como: el estudio de la diferencia de potencial eléctrico y su densidad de potencia dependiendo de la especie (Rashid, Cui, Saif Ur Rehman, & Han, 2013), aumento de la corriente generada mediante la modificación de electrodos en la CPM (Cevik et al., 2018) o el estudio del agente reductor y la utilizando el CO₂ producido por la reacción química que se produce en un biocátodo para la producción de nuevas microalgas (Cui et al., 2014). Otros estudios han determinado las propiedades eléctricas con microscopía de fuerza atómica (AFM) utilizando nano cables de grafito y controlando el ambiente de CO₂ para la *Shewanella oneidensis MR-1* así como de cianobacterias (Gorby et al., 2006) y con microscopía de fuerza atómica de efecto túnel (Raimondo et al., 2018).

El uso de nanopartículas (NPs) para incrementar la producción de potencial eléctrico y corriente eléctrica, ha tenido poco desarrollo hasta el momento. Un trabajo de tesis de pregrado de la Ing. Dennisse Del Castillo propuso el desarrollo de organismos híbridos al fusionar nanopartículas de plata con la cianobacteria *Fisherella muscicola*, en diferentes concentraciones, para luego medir su potencial eléctrico demostrando un incremento de hasta el 40% según Del Castillo (2019).

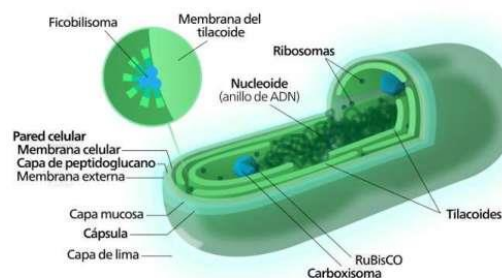
Capítulo ii. Marco teórico

Cianobacteria

Las cianobacterias son microorganismos pertenecientes al dominio “bacteria” que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, y aunque en algunos casos el término es utilizado para organismos microscópicos fotosintéticos en general, se debe hacer una diferenciación entre organismos procariontes y eucariotes. Las microalgas son organismos fotosintéticos eucariotes capaces de transformar la energía luminosa en energía química, generalmente multicelulares y fotoautótrofos que necesitan ambientes nitrogenados (Gomes, Fernandes, Lima, Mira, & Corvo, 2008; Luna & Carmenate, 2000), mientras que las cianobacterias (también llamadas algas verde-azules), son fotoautótrofos, esto quiere decir, que son organismos procariontes generalmente unicelulares (aunque pueden formar colonias) capaces de efectuar la fijación del nitrógeno en ambientes aerobios (Luna & Carmenate, 2000; Mora, 2018). Carecen de organelos como mitocondrias, aparato de Golgi, núcleo o retículo endoplasmático, posee una envoltura externa denominada vaina o membrana mucilaginosa que le da una ventaja adaptativa que le permite la supervivencia en ambientes extremos a altas temperaturas (Walsby, 1974), (Walsby, 1974) está rodeada a su vez por una pared celular característica de las bacterias Gram negativas con la presencia de pequeños poros (Castenholz, 2015) (Figura 1).

Figura 1.

Estructura celular general de una cianobacteria.

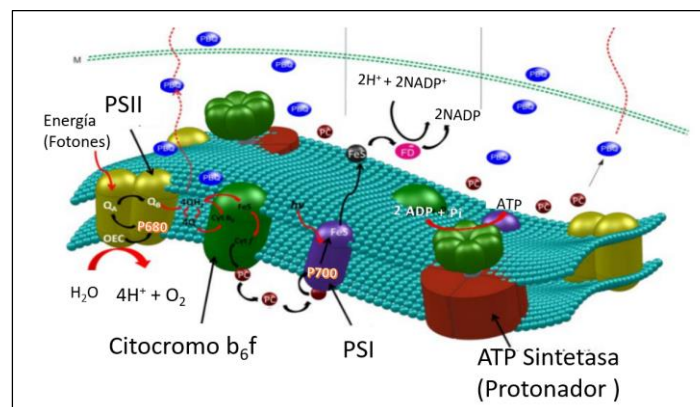


Tomado de ("Cianobacterias, características, reproducción, nutrición y ejemplos," 2020)

Existen también estructuras denominadas carboxisomas que acumulan ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa, enzima conocida normalmente como RuBisCO, que permite la fijación del carbono en el ciclo de Calvin (Smith) y la membrana tilacoidales que permite la fotosíntesis y respiración por medio del mecanismo de transporte de electrones, que está compuesto por dos fotosistemas (PSI y PSII), en el que se destaca como colector de energía el fotosistema I que obtiene moléculas de energía celular denominadas ATP (adenosín trifosfato) como resultado del proceso anabólico (Figura 2) (Stanier, Kunisawa, Mandel, & Cohen-Bazire, 1971).

Figura 2.

Mecanismo fotosintético en la membrana tilacoide en una cianobacteria



Tomado de (Cevik et al., 2018)

Las cianobacterias se conocen como algas verdes azuladas debido a la presencia de una ficobiliproteína denominada ficocianina de coloración azul brillante (Figura 3), esta se encuentra disponible en la célula en una membrana intracelular llamada tilacoides, cuya función es la absorción de luz solar, por lo que son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica semejante a las plantas superiores. Por eso las cianobacterias también se conocen como oxifotobacterias porque son los únicos procariontes que llevan a cabo esta fotosíntesis (Ahmed, Stal, & Hasnain, 2014).

Figura 3.

Ficocianina obtenida de la ruptura celular de la cianobacteria Fischerella muscicola

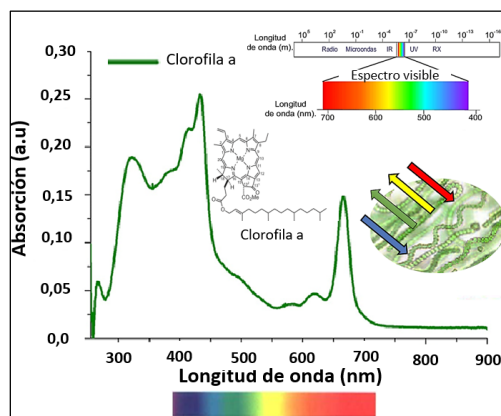


Tomado de (Castillo, 2019)

La ficocianina tiene una alta presencia de clorofila tipo A con absorciones en las regiones del azul y rojo del espectro electromagnético, transmisión en la región del verde (Maestrin, Neri, Oliveira, Serra, & Iamamoto, 2009) y fluorescencia en los 630 nm a 750 nm (Ebenezer, Nancharaiyah, & Venugopalan, 2012) (Figura 4).

Figura 4.

Espectro de absorción UV-Vis de la clorofila A.



Tomado de (Jecks et al., 2009)

En la clorofila, la energía de los electrones en estado excitado es lo que permite la formación de ATP durante la fotosíntesis, energía que se presenta en la región Uv-cercana y visible y solo una pequeña fracción aparece como la fluorescencia de color rojo en las microalgas (Mazel).

La diversidad de cianobacterias es muy grande, así como el tipo de ambiente en el que se desarrollan, pero en esta investigación se estudiará el crecimiento de la cianobacteria *Fischerella muscicola* debido a su fácil cultivo en ambientes controlados y no controlados (McLamb, 2011; Ortiz- Moreno, Cortés - Castillo, Sánchez-Villarraga, Padilla, & Otero-Paternina, 2012; Patel et al., 2019).

Fischerella muscicola

El género *Fischerella* es una cianobacteria perteneciente al orden Stigonematales, con clorofila A (Maestrin et al., 2009), está compuesta de células de bordes redondeados que forman filamentos uniseriados o multiseriados ramificados. El eje principal se forma cuando una célula especializada denominada homogonio, cuya función principal es la reproducción, movilidad y adherencia, se agranda y comienza la división celular en más de un plano (Loza, 2011). Presenta heterocitos alargados y esféricos, encargados de la fijación de la molécula de nitrógeno para reducirlo a amonio durante los periodos de luz donde interviene el fotosistema I ("Fischerella," 2001).

Cultivo a nivel de laboratorio

La recepción de luz para que la fotosíntesis sea capaz de sintetizar todos los compuestos bioquímicos denominados metabolitos secundarios, la oxigenación para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera y el medio de cultivo son los parámetros vitales para el crecimiento de cualquier cianobacteria (Barsanti & Gualtieri, 2014).

Y de manera específica, los parámetros más importantes de controlar para el crecimiento óptimo de la *Fischerella muscicola* son: la intensidad de luz entre 10000 y 20000 lux (Naranjo, 2016), fotoperíodo de 12h con luz y 12h de obscuridad (Sournia, 1975), rango de pH esta entre 7,5 y 8,4 (Naranjo, 2016), el monitoreo de la temperatura y la aplicación del proceso de intercambio gaseoso con agitación (Fábregas et al., 1994).

El Medio de cultivo utilizado es el BG11 que consiste en una solución rica en nitrógeno, fosforo y otros nutrientes esenciales para su desarrollo, con un total de 9 stocks como se muestra en la Tabla 1, pero también existen otros medios de cultivo como BG11₀, BBM y Nitrofoska. Generalmente el pH del medio se eleva como resultado del crecimiento de las algas y el pH del medio después de la esterilización es de 7,5 (Holm-Hansen, 1968).

Tabla 1.

Sales para la preparación de Stocks medio BG11

Reactivos	Cantidad Para 1000 mL
(1) NaNO ₃	15.0 g
Para 500 mL	
(2) K ₂ HPO ₄	2.0 g
(3) MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.75 g
(4) CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.80 g
(5) Citrato ácido	0.30 g
(6) citrato férrico de amonio verde	0.30 g
(7) EDTANa ₂	0.05 g
(8) Na ₂ CO ₃	1.00 g
(9) Solución de metales traza	Para 1000mL
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.05g
Stock	Para 1000 mL
Solución 1	100.0 mL
Solución 2-8	10.0 mL cada uno
Solución 9	1.0 mL

Los resultados del crecimiento presentados por Del Castillo Denisse en la investigación preliminar de esta investigación, concluyen que: “las cianobacterias en el medio BG11 su Fase de Adaptación (FA) es casi inexistente, debido a que se conserva en el medio de cultivo original, teniendo sus puntos de máximo crecimiento a los días 7 y 42 del tratamiento, mientras que el crecimiento máximo en Nitrofoska fue al día 14 y 49” (Castillo, 2019).

También concluye que: “los tratamientos con exposición al ambiente presentan un mayor crecimiento debido a que existe mayor intercambio de CO₂, esto se evidenció en el tratamiento de BG11 donde su curva de crecimiento es aproximadamente el 88% mayor en comparación al estudio sin exposición al ambiente. Por otro lado, el medio BG11 bajo estas condiciones generó una tasa de crecimiento del 11.64% y 6.27% mayor con respecto a los tratamientos con Nitrofoska”. (Castillo, 2019)

Síntesis verde de Nanopartículas

Extractos naturales como agentes reductores.

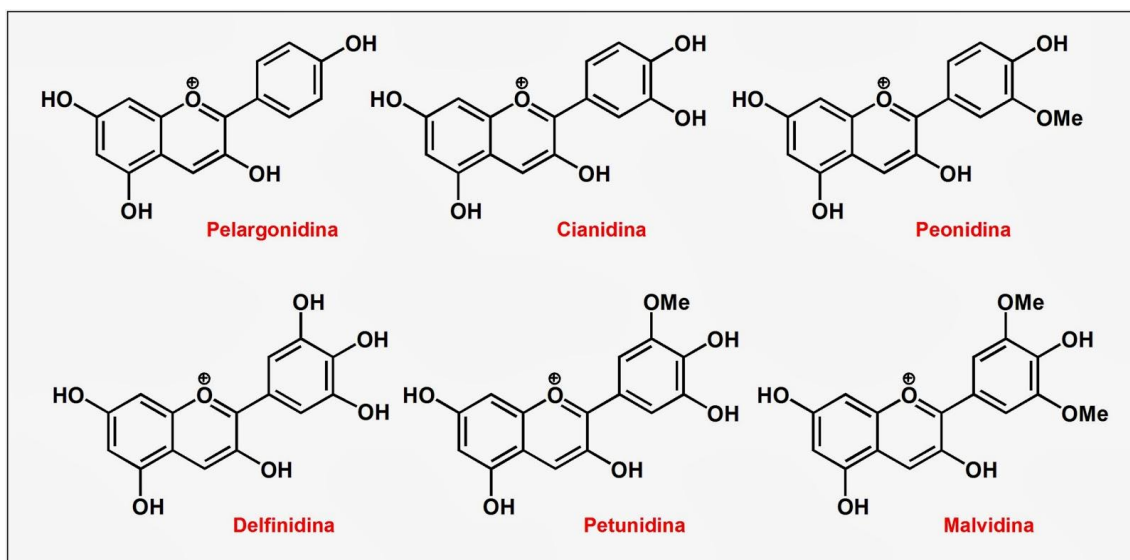
Los extractos de plantas han sido ampliamente utilizados en diversas áreas de la investigación por su contenido de moléculas funcionales, y la nanotecnología encontró en estos extractos una herramienta muy útil para sintetizar nanopartículas metálicas, sustituyendo así sustancias químicas como el borohidruro de sodio, que podrían ser tóxicos en determinadas aplicaciones. Investigaciones previas han estudiado de manera cualitativa y cuantitativa el contenido fenólico en diferentes plantas (Reyes, 2018), estos compuestos también llamados polifenoles, son sustancias que contienen un anillo aromático con varios sustituyentes hidroxilos y debido a su polaridad son solubles en agua, lo cual les da diferentes coloraciones que se ven alteradas por su pH (CreTU, Morlok, & Nechifor; Gomes et al., 2008).

Los polifenoles abarcan sustancias muy sencillas como los ácidos fenólicos o cadenas poliméricas como los taninos y los flavonoides. Los taninos pueden ser condensados (unidos

por enlaces C-C) o hidrolizables (con alto contenido de ácido gálico y azúcares simples) y los flavonoides contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico en un arreglo de la forma C₆-C₃-C₆. (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015; Reyes, 2018). Los flavonoides se clasifican dependiendo del grado de oxidación y del puente de tres carbonos (Figura 5), siendo los más comunes las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas (Ringuelet & Viña, 2013). Las antocianinas son las sustancias que son responsables de los colores de las flores y frutos debido sus pigmentos detectables en la región visible (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015), y en las flores además se encuentran también las leucoantocianinas que son compuestos flavan con un compuesto hidroxilo entre la posición 4 del heterosido C, los terpenoides que tienen una molécula isopreno y finalmente los alcaloides que constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios en las plantas. (Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Zavaleta, 2015)

Figura 5.

Tipos de moléculas flavonoides.



Tomado de ("Antocianinas, los otros pigmentos del reino vegetal," 2021)

El geranio (*Pelargonium domesticum*) es una planta tipo arbusto con hojas simples, y flores generalmente en címulas bifloreas con fruto en esquizocarpo correspondiente a plantas

anuales, bienales y perennes, pudiendo tener coloración en sus flores desde un blanco hasta un rojo intenso. La composición química presenta gran presencia de alcoholes como: geraniol, citronelol, linalol, mirtenol y terpineol; fenoles como las antocianinas y el eugenol; terpenos como el sabineno; formiatos de geranilo, formiato de citonelilo, germageno y tiglato (Tatiana & Híbridas) y en sus flores un alto contenido de pelargonidina, malvidina, cianidina y peonidina (Gonzalez, Fougerousse, & Brouillard, 2001; Rengifo Zevallos, 2018).

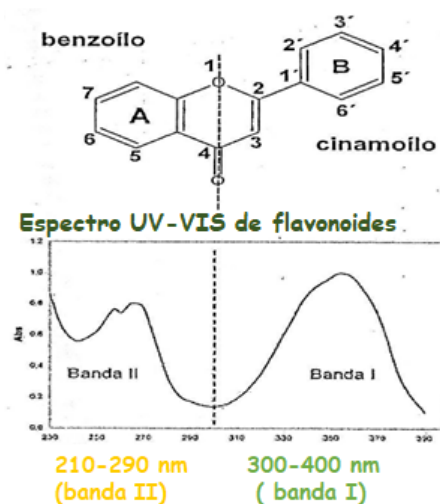
La carrasquilla (*Berberis halii*) es un arbusto de aproximadamente 1,5m de altura con espinas, hojas lisas y elípticas, con flores en racimo de color amarillo o naranja y con frutos tipo baya de 5 a 15mm de diámetro de color rojo o azul oscuro (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015; Sánchez Puertas, 2011; Silva Ponce, 2011). La composición química determinada por cromatografía de capa fina determina la presencia de los alcaloides berberina, lambertina y calafatina (Silva Ponce, 2011), y mediante tamizaje fitoquímico se determinan la elevada existencia de flavonoides, antocianinas y azúcares (Sánchez Puertas, 2011).

La cuantificación de estos grupos funcionales se ha realizado en muchas investigaciones mediante diferentes técnicas de caracterización como, la cromatografías de capa fina (Silva Ponce, 2011), la espectrometría infraroja y espectrometría Raman (Neciosup Zavaleta, 2015; Schulz & Baranska, 2007).

Los espectros de los flavonoides presentan dos bandas específicas que pueden variar según el pH, y este factor provoca en la estructura de las moléculas un movimiento de la conjugación electrónica entre los anillos y sustituyentes. Ese movimiento de electrones provoca desplazamientos batocrómicos (desplazamiento al rojo) de las bandas originales. (Figura 6 y 7)

Figura 6.

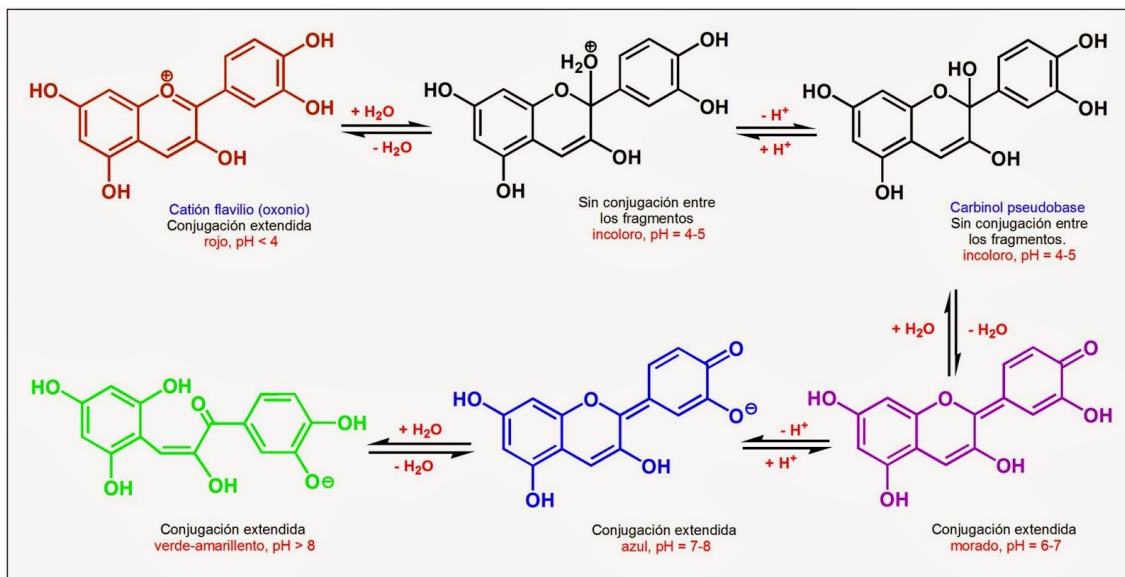
Espectro de absorción UV-Vis general de una molécula flavonoide.



Tomado de (Medina, 2012)

Figura 7.

Conjugación de las moléculas flavonoides debido a la modificación del pH.



Tomado de ("Antocianinas, los otros pigmentos del reino vegetal," 2021)

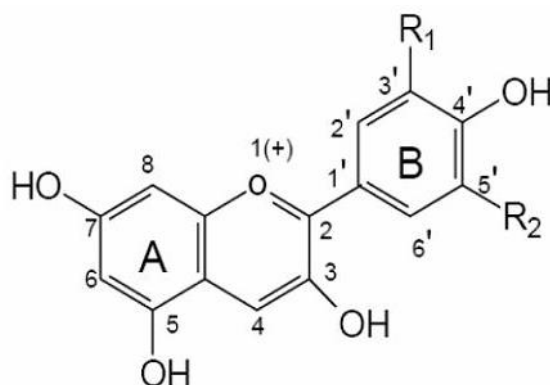
El pH de la molécula es un factor muy importante, no solamente por el cambio de color que ocurre debido al cambio de conjugación de los anillos de la molécula (CreTU et al.; Garzón, 2008; Gomes et al., 2008; Klinar, Chang, Castillo, Quispe, & Lengua), sino que esto es una

consecuencia de la modificación de los grupos que se enlazan a los anillos aromáticos de la molécula. La adición de grupos hidroxilos u carbonilos permiten el enlace de la molécula con otras moléculas metálicas, lo cual facilita su reducción y formación de nanopartículas metálicas (Rengifo Zevallos, 2018; Reyes, 2018).

Al analizar las bandas medidas por el equipo de espectrometría y compararla con la literatura se puede analizar de manera cualitativa la presencia de moléculas antocianinas en los extractos naturales estudiados. (Figura 8)

Figura 8.

Estructura y sustituyentes de las antocianinas.



Aglicona	Substitución		λ_{max} (nm)
	R1	R2	espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Tomado de (Durst & Wrolstad, 2001)

Síntesis de Nanopartículas metálicas

En la actualidad muchos investigadores trabajan en perfeccionar las técnicas de síntesis de NPs, estas sin embargo, se pueden englobar en dos formas comunes de generar materiales nanométricos. La metodología “top-down” en la que se desarrolla las nanoestructuras reduciendo un bloque de material, o la metodología “botom-up” en la que los nanomateriales son sintetizados a partir de átomos o moléculas.

Las NPs de metales preciosos son de gran interés en la comunidad científica debido a sus propiedades ópticas (Bhattacharya & Mukherjee, 2008) (Kelly, Coronado, Zhao, & Schatz, 2003), catalíticas (Jiang, Liu, & Sun, 2005) y conductivas (Wessels et al., 2004), que les dan una gran variedad de aplicaciones en todas las disciplinas de la ciencia. Debido a esto, los investigadores han desarrollado muchas técnicas para sintetizar NPs en medios coloidales como el método de reducción directa (Belmares Perales, Torres-Lopez, L Coparán-Elizondo, Arriaga-Garza, & Elizondo, 2013), (Chushak & Bartell, 2001) y reacciones de transferencia de fase (Vallejo et al., 2010) utilizando agentes reductores químicos (Belmares Perales et al., 2013), que aunque han demostrado una gran eficiencia, presentan una elevada toxicidad residual en el proceso de la síntesis. Por estos motivos a nivel mundial también se encuentran en la búsqueda de extractos orgánicos que contengan agentes reductores capaces de sintetizar NPs de metales preciosos controlando su tamaño y forma y que no tengan ningún impacto ambiental, en lo que se conoce como síntesis verde de NPs. Los métodos por los cuales se fabrican NPs metálicas utilizando fuentes verdes incluyen la síntesis fitológica (plantas y algas), la micológica (hongos) y la bacteriológica (Ramzan & Yousaf, 2018) (Belmares Perales et al., 2013). Algunos ejemplos de agentes reductores obtenidos de plantas y que han sido utilizados para la síntesis de NPs son el ácido ascórbico obtenido de la *Rosa berberifolia*, *Geranio maculatum*, *aloe Barbadensis* (Belmares Perales et al., 2013), extractos obtenidos del ajo (*Allium sativum*) (Calle & Londoño, 2014) y del fruto de carrasquilla (*Berberis hallii*) (Arroyo Pardo, 2018). Extractos que han sido probados en laboratorio y caracterizados utilizando desde técnicas de espectroscopia (UV-Vis, FTIR, DRX, DLS, EDS) (Shukla & Iravani, 2017) hasta técnicas de microscopía electrónica (TEM, STEM).

El uso de plata como material nanométrico ha tenido gran relevancia en el desarrollo moderno por tener propiedades químicas, mecánicas o eléctricas eficientes en comparación de otros metales y de un costo de producción no elevado, y no solamente en la modernidad, sino,

desde la antigüedad en que ya se empleaban las AgNPs como pigmentos decorativos en artesanías, teñido vidrio o cerámica (Blosi et al., 2012) y en la actualidad en distintas áreas industriales y comerciales como: bactericidas (Valero, 2013), sensores (McFarland & Van Duynes, 2003) o incluso en la industria textil (Xue, Chen, Yin, Jia, & Ma, 2012) debido a las diferentes propiedades que puede presentar la plata en función de su forma y tamaño nanométrico (F. M. Martínez, Zuñiga, & Sanchez Lafarga, 2013).

Una de las propiedades más importantes de las nanopartículas metálicas y por lo tanto también de la plata, es la resonancia plasmónica de superficie, que es la interacción de las ondas electromagnéticas de la luz con las nanopartículas aportando propiedades distintas a los materiales sobre los que se utiliza (Hao & Schatz, 2004). Los plasmones de superficie se producen cuando la nanopartícula entra en lo que se conoce como resonancia de plasmón (Tang, Zeng, & Liang, 2010), que es la oscilación de la partícula en la misma frecuencia que la onda irradiada, para que esto suceda, la NP debe ser de un tamaño inferior al de la longitud de la onda irradiada (Pattnaik, 2005; "Surface Plasmon Resonance - an overview | ScienceDirect Topics," 2021).

La resonancia plasmónica ayuda a la absorción o dispersión de determinadas longitudes de onda y dependerá de su forma y tamaño (Cruz et al., 2012), lo cual puede aportar o mejorar otras propiedades del bulk en el que se los utilice, ayudando por ejemplo al transporte de carga (del Rocío Coutiño, Lagunes, & Helguera, 2017) y aportando a las características físico químicas del material sobre el que se internalizó (Avila et al., 2008; C. P. R. Velazquez, 2008).

Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización analizan las propiedades físicas o químicas de las nanopartículas y cada una tiene su fundamento teórico que será tratado en esta sección.

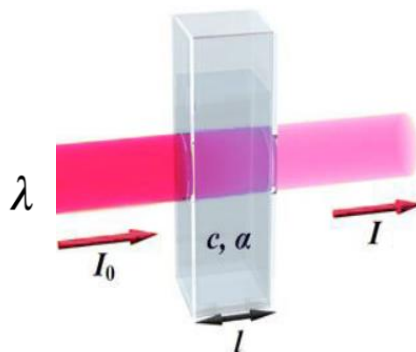
Espectrometría UV-Visible

En la espectrometría UV-Vis se basa en medir la capacidad de absorción de la muestra cuando esta es irradiada longitudes de onda en el espectro electromagnético del UV-Vis. El rango de detección depende del equipo a utilizar que puede ir aproximadamente desde 180 nm a 1100nm.

Los equipos de espectrometría UV-Vis miden la disminución de la potencia irradiada debido a la absorción en la muestra en una celda de cuarzo (Figura 9), esta relación entre la intensidad de entrada y de salida se conoce como transmitancia T (Ecuación 2.1) y utilizando la ley de Lamber y Beer (2.2, 2.3 y 2.4) construyen la relación de respuesta absorbancia en función de la longitud de onda o número de onda.

Figura 9.

Celda de cuarzo típica para la espectrometría UV-Visible.



Tomado de ("Ley de Lambert-Beer | Química Orgánica," 2021)

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.1)$$

$$A = -\log(T) \quad (2.2)$$

$$A = -2\log(\%T) \quad (2.3)$$

$$A = \epsilon * c * l \quad (2.4)$$

Donde:

P_0 : Representa la intensidad de luz incidente.

P : Representa la intensidad de luz que atraviesa la celda

T : Transmitancia del haz de luz.

A : Absorbancia.

ϵ : Coeficiente de excitación.

c : concentración del compuesto

l : longitud de celda.

Dispersión de Luz Dinámica

El fenómeno de la dispersión de la luz se refiere al cambio de la dirección de una onda cuando esta choca con una partícula, sin perder energía. Cuando el sistema es estático y de una sola onda, se puede medir este fenómeno al analizar el cambio del ángulo entre la onda incidente y la dispersada, pero para un sistema dinámico (no estático y de múltiples partículas), la dispersión ocurre en cada partícula, cambiando la dirección y la amplitud de las ondas en varias direcciones.

El movimiento Browniano se refiere a el movimiento aleatorio y desordenado de partículas de tamaño muy pequeño en un ambiente fluido (H. E. G. Velazquez & Canton, 2015), sea líquido o gaseoso, influenciado por las fuerzas propias de cada partícula, así como la energía vibracional aportada por la temperatura del medio y las colisiones con otras partículas (Torral, 2006),

Debido al movimiento Browniano, la interferencia de las ondas dispersadas en las partículas modificará la intensidad medida en un detector, ya que al interferir una onda con otra y dependiendo de su fase, aumentarán o disminuirán su amplitud respecto a la onda

incidente(2014). Estas variaciones son detectadas y medidas para calcular el tamaño promedio y su distribución, ya que mientras más grandes sean las partículas el movimiento vibracional es menor y más lento, esto ocasiona que las ondas se dispersen en menor cantidad y de manera más lenta también y por lo tanto las interacciones entre las ondas dispersadas serán mucho menores que para partículas más pequeñas(Berne & Pecora, 2000; Schmitz, 2012).

Un equipo DLS mide estas interacciones y construye una distribución estadística de las partículas al calcular el tamaño hidrodinámico (Clementi, Gugliotta, & Vega, 2008; Díaz-Urbe & Vallejo, 2015; Rivera Morán, 2019; Schmitz, 2012; Varón, 2011), que es mayor que el de una partícula seca, ya que al estar en un medio, las partículas interactúan con las cargas existentes en el medio formando una corteza eléctrica que recubre a la partícula.

Microscopía Electrónica

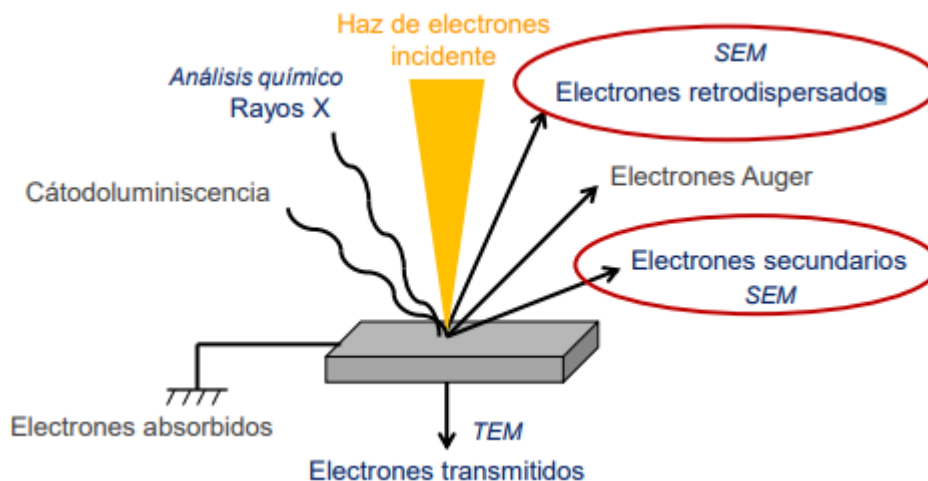
La microscopía óptica utiliza la luz visible como fuente de radiación y mediante arreglos de lentes, enfoca y amplifica una imagen, mostrándola en tiempo real y pudiendo ser visualizada directamente por los ojos con una resolución de hasta 0.2um (Bozzola & Russell, 1999; de nanoobjetos Hitachi Ht). Sin embargo, precisamente la resolución de la imagen está limitada por la fuente de radiación, es decir que con microscopía óptica no se podrá observar objetos cuyo tamaño sea menos que la menor longitud de onda del espectro visible(Egas Ribadeneira, 1998).

Esta limitante puede ser superada al utilizar fuentes de radiación con menores longitudes de onda o un haz de electrones, que si son acelerados, se comportan como una onda de luz que permite tener resoluciones de hasta 0.1nm con amplificaciones de hasta un millón de veces en los microscopios más modernos(Egas Ribadeneira, 1998).

El haz que es disparado por un cañón de electrones se ve afectado por los diferentes campos electromagnéticos producidos, es así que se utiliza un potencial en el orden de los centenares de kilo voltios para acelerar los electrones, y lentes magnéticas para poder dirigir y enfocar el haz. Los electrones que golpean la muestra pueden tener diversas interacciones dependiendo del volumen sobre el cual penetra en la muestra (Figura 10) (Egas Ribadeneira, 1998; Suárez, Martínez, & Cortizas, 2011) (Almanza, 2012).

Figura 10.

Tipos de interacción con la muestra, del haz de electrones de un microscopio electrónico



Tomado de (Almanza, 2012)

Estos electrones producto de la interacción entre el haz emitido y la muestra son los captados por un detector y reconstruidos digitalmente en un computador. Y dependiendo de la imagen que se desea obtener se trabajará sobre un tipo específico de los electrones que fueron emitidos desde la muestra (Egerton, 2005; Goodhew & Humphreys, 2000).

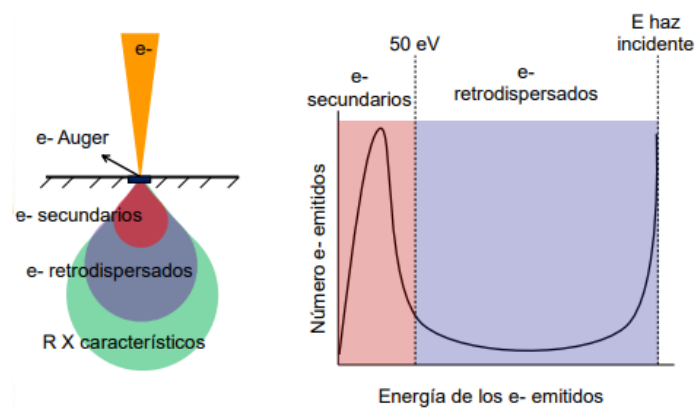
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido o SEM por sus siglas en inglés (Scattering Electronic Microscopy) es la técnica de microscopía que utiliza lentes magnéticas para redireccionar el haz de electrones y realizar un barrido sobre un espacio rectangular de la muestra. Los

electrones que son detectados principalmente son los secundarios y menor cantidad los retrodispersados (Figura 11), los cuales se producen luego de la interacción con los electrones de valencia de los átomos de la muestra, y como son de muy baja energía solo logran salir los electrones más superficiales, por lo que la imagen obtenida tendrá mucha información de la topografía de la muestra (Almanza, 2012; Goodhew & Humphreys, 2000; Martínez-Mejía).

Figura 11.

Energía de los electrones emitidos luego de la interacción del haz con la muestra.



Tomado de (Almanza, 2012)

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

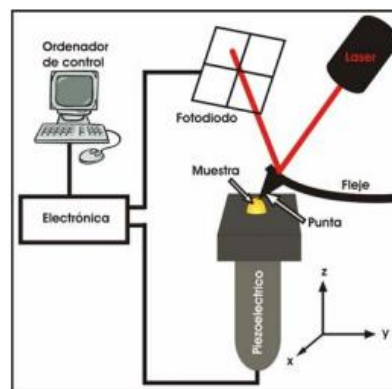
La característica principal de la microscopía de transmisión radica en la detección de los electrones transmitidos, o lo que es lo mismo la detección de los electrones que atravesaron la muestra. El principio de funcionamiento es el mencionado anteriormente, en el que un haz de electrones es generado y acelerado utilizando potenciales eléctricos y luego enfocado hacia la muestra utilizando lentes magnéticas. El detector es colocado en la parte inferior de la muestra y es de un material fluorescente, que al momento de interactuar con los electrones que atravesaron la muestra, generan diferencias de intensidad que son las que serán utilizadas para la posterior reconstrucción en una imagen (Calderón, 2020; Kaiser et al., 2011; Möbus, Phillipp, Gemming, Schweinfest, & Rühle, 1997).

Microscopía de Fuerza Atómica AFM/EFM

En la microscopía AFM la punta se une a un cantilever de 100 a 200 micras de largo, que al acercarse a una distancia muy pequeña interactúa con las fuerzas de Van Der Waals de la muestra. Estas fuerzas deforman el cantilever cuya fuerza es compensada mecánicamente al subir o bajar la punta, esta deformación es sensada por un material piezoeléctrico, un emisor de luz monocromática y un receptor de fotodiodos que junto a un sistema electrónico transforman la medición en una imagen, además que al utilizar un material piezoeléctrico se puede reducir el ruido por vibraciones mecánicas (Figura 12)(Gómez, Ávila, & Massy, 2009).

Figura 12.

Estructura Básica de un Microscopio de Fuerza Atómica.



Tomado de (Sotres Prieto, 2010)

La punta de un microscopio de fuerza atómica puede trabajar en modo de contacto, en el que la punta mantiene un contacto constante con la muestra, permite medir la interacción de diversas fuerzas, pero por el constante contacto, la punta se desgasta rápidamente. En el modo de no contacto, la punta se encuentra a una distancia entre 10 y 100 angstroms y oscila a una frecuencia de 100 a 400KHz, la interacción entre la muestra y la punta afecta la amplitud o la frecuencia de vibración medida. Tiene una menor sensibilidad, pero la punta al no estar en contacto sufre muy poco desgaste. Para solventar estas limitaciones se utiliza el modo de

contacto intermitente que une el modo de contacto y de no contacto a intervalos(J. F. G. Martinez, 2015).

Un modo de microscopía AFM es la microscopía de fuerza electrostática o EFM por sus siglas en inglés, la cual mide las interacciones de las fuerzas de Van Der Waals en modo de contacto, y al colocar un potencial entre la punta y la muestra y en modo de contacto intermitente, podemos medir las interacciones eléctricas entre la punta y la muestra.

Al colocar un potencial entre la muestra y la punta, la muestra se ve afectada por el campo electromagnético, creando dipolos entre la punta y la muestra que nos permite analizar la magnitud de la interacción y también la polaridad. Con esta medición se obtienen tres imágenes, una morfológica que analiza las fuerzas de Van Der Waals, otra que analiza la amplitud de la frecuencia de oscilación de la punta cuando se conecta el potencial eléctrico y una imagen final de la polaridad de los dipolos formados entre la muestra y la punta.

El tratamiento de estas imágenes proporciona información de las propiedades eléctricas de la muestra, ya que la amplitud y la fase de los dipolos formados al incluir un potencial eléctrico entre la muestra y la punta, son efecto directo de la electronegatividad de la muestra y de su capacidad conductora(Sotres Prieto, 2010).

Difracción de Rayos X.

Los rayos X son radiación electromagnética con longitudes de onda entre los 0.1nm y 10nm, y con energía entre 1KeV y 150KeV, su comportamiento es igual que cualquier onda, es decir que puede presentar los fenómenos de transmisión, absorción y dispersión.

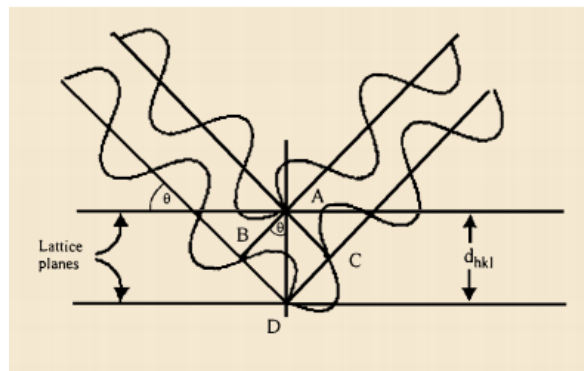
Un equipo de difracción de rayos X emite radiación en una sola longitud de onda, la cual interactúa con los electrones de los átomos de la muestra. La onda al chocar con los electrones puede ser dispersada en muchas direcciones y dependiendo de la diferencia de fase con la

que fueron dispersadas, estas ondas podrían interactuar de manera constructiva o destructiva.

La difracción de una onda es la interacción constructiva de las ondas dispersadas, y es precisamente ese fenómeno el utilizado por los equipos de XRD para la identificación de materiales cristalinos, utilizando la llamada ley de Bragg (Figura 13)(Bertram Eugene Warren, 1990).

Figura 13.

Esquema representativo de la ley de Bragg para la difracción de Rayos X.



Tomado de (B. E. Warren, 1941).

La ley de Bragg establece matemáticamente la condición necesaria para que exista difracción en un material cuya distancia entre planos es conocida, y establece que para que exista difracción, la diferencia de fase (diferencia de distancia recorrida entre la onda del primer plano y la del segundo plano. Segmentos BD + DC de la Figura 11) debe ser igual a un número entero "n" de la longitud de onda incidente, lo cual fue expresado con la ecuación 2.5.(Elton & Jackson, 1966)

$$n\lambda = 2 \text{ Sen } \theta \quad (2.5)$$

Cuando un material es cristalino, los planos observados son totalmente simétricos y con distancias fijas y conocidas, por lo cual al irradiar el material con R-X y conociendo la ley de

Bragg, se puede calcular la fracción de longitud de onda $n\lambda$ característica de un material si se conoce también el ángulo del rayo incidente (Elton & Jackson, 1966).

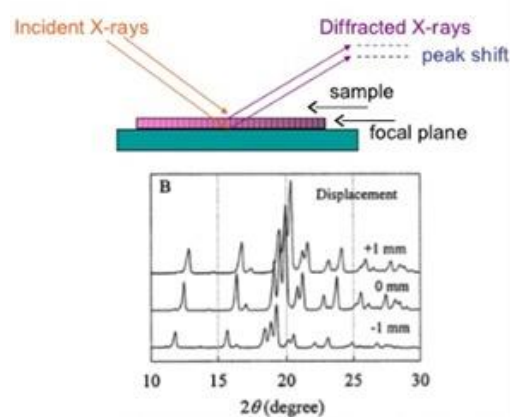
Los equipos XRD utilizan este fundamento y mediante un barrido en una trayectoria circular, en un recorrido de 0 a 360°, irradian a la muestra con diferentes ángulos a la par que un detector que se mueve en los mismos ángulos que la fuente, va midiendo la difracción ocurrida por los planos cristalinos del material. Estos picos suceden en ángulos específicos de acuerdo al material de análisis, por lo que existe ya las bases de datos con las que se compara la medición desarrollada, y así se identifica de manera cualitativa el tipo de material estudiado (Cullity, 1956).

Diversos parámetros pueden afectar en mayor o menor grado a la medición de la muestra, y generar corrimientos o excesivo ruido, para ello es importante verificar la altura de la muestra, su humedad, la orientación y el tamaño del cristal.

En la Figura 14 se observa como la altura de la muestra provoca una difracción desplazada, debido a la difracción entre la onda dispersada de la muestra y del plano. Esa diferencia de altura crea el Peak Shift y posteriormente un corrimiento en el espectrograma generado.

Figura 14.

Esquema explicativo del desplazamiento en un espectrograma de Rayos X.



Tomado de (Whittig & Allardice, 1986).

Voltametría Cíclica

La voltametría es una técnica de caracterización electroquímica que permite analizar procesos oxidativos y reductivos producidos por transferencia electrónica, este proceso se logra al aplicar un voltaje sobre el material a analizar y medir la corriente que circula debido al potencial (Mabbott, 1983).

La caracterización de voltametría cíclica o CV por sus siglas en inglés, permite analizar la capacidad electroquímica de una solución, es decir la capacidad oxidativa o reductiva, se genera un potencial anódico (de potenciales bajos a altos) y otro catódico (de potenciales altos a bajos) y luego se analiza la intensidad de corriente al ser liberados los electrones en la solución.

En este proceso el voltaje inicial se mantiene en un potencial inicial (E_0), donde no se produce ningún proceso de electrolisis, y por lo tanto no existe flujo de corriente farádica, y cuando existe una reacción de oxidación o reducción, se da un proceso de transferencia directa de electrones. La corriente farádica de reducción (catódica) tiene, por convención en electroanálisis, signo positivo y la corriente de oxidación (anódica) signo negativo (Evans, O'Connell, Petersen, & Kelly, 1983; Kissinger & Heineman, 1983).

Cuando vamos aumentando el voltaje, el compuesto que está reducido empieza a recibir electrones, originando que la superficie del electrodo se oxide. A un valor determinado la dirección del barrido cambia de sentido, ocasionando a la superficie oxidada que vuelva a ser reducida. La CV nos permite también analizar los valores energéticos de las bandas HOMO y LUMO, lo que nos da información del orden de llenado de electrones y la configuración electrónica de la muestra. El orbital HOMO se observa en el potencial dónde la molécula

pierde o cede electrones y el LUMO donde la molécula es capaz de absorber electrones (Gosser, 1993; Y. Li, Chen, Ali, & AlHemaid, 2013).

Microscopía de Fluorescencia Confocal

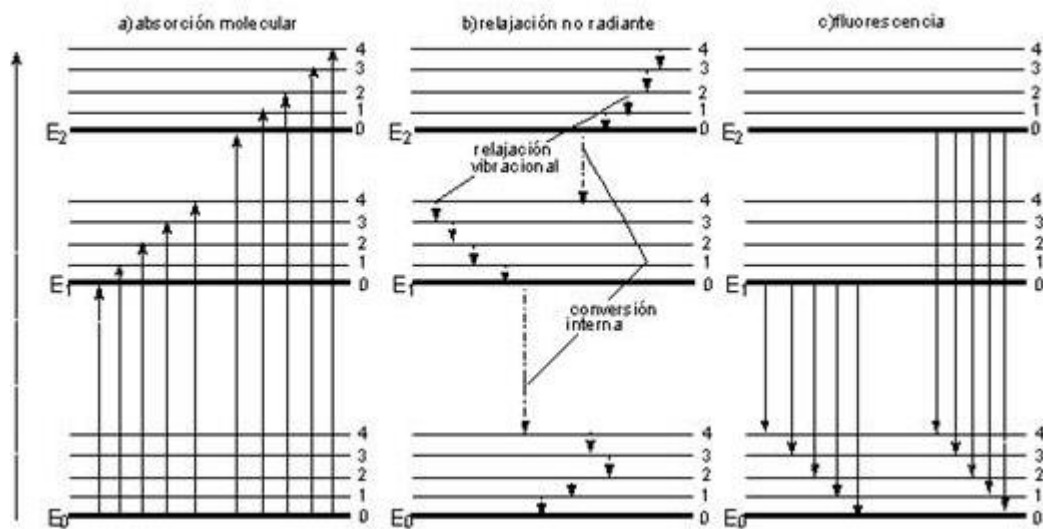
La microscopía óptica permite la observación de objetos muy pequeños al utilizar arreglos de lentes que permitan magnificar la imagen del objetivo, para ello la muestra es irradiada con luz blanca, la cual interactúa y se refleja al estar en contacto con la muestra. Sin embargo, la reflexión no es la única manera de interacción de la luz con la materia.

La fluorescencia es una forma de interacción entre la luz y la materia, en este tipo de interacción la muestra absorbe la radiación electromagnética irradiada lo cual excita a los electrones que saltan de su estado basal a un estado excitado o a un nivel vibracional del estado excitado (depende de la energía de la onda irradiada). Cuando la molécula se relaja, generalmente los electrones vuelven a realizar un salto a su estado basal o de un estado vibracional del estado excitado a otro estado vibracional del mismo estado excitado debido a las colisiones (Figura 15a y 15b), sin embargo, también puede ocurrir que los electrones saltan a un nivel vibracional del estado base (Figura 13c), lo cual implica que la energía que emitirá con este salto, será de un valor diferente al de la energía irradiada, emitiendo fotones en otra longitud de onda diferente por lo que se observa de un color distinto, este fenómeno se conoce como fluorescencia (Lichtman & Conchello, 2005).

En la fluorescencia, cuando la luz irradiada es retirada, la molécula se relaja a sus estados base y deja de emitir fotones en ese instante, a diferencia de la fosforescencia en la que la relajación sucede aun tiempo después de retirar la radiación, es decir que puede seguir emitiendo fotones a pesar de haber retirado la luz incidente.

Figura 15.

Diagrama de los saltos electrónicos entre niveles de energía.



a) Absorción. b) Relajación no radiante debido a las colisiones. c) Relajación radiante o Fluorescencia. Tomado de (Sanchez, 2020)

Este fenómeno de fluorescencia permite tener mejores contrastes entre las distintas partes del objeto observado, y aunque no todos los materiales emiten fluorescencia, es propio de esta técnica el impregnar a la muestra con moléculas que sí lo son (Fluoróforos). De esta manera si se vincula un fluoróforo diferente a cada parte de la muestra, se podrá observar un contraste muy claro entre cada una de las partes del objetivo, este proceso se conoce como tinción (B. Huang, Bates, & Zhuang, 2009).

La microscopía óptica general tiene una gran desventaja ya que irradia toda la muestra al mismo tiempo, permitiéndonos ver una imagen en tiempo real, pero cuyo contraste no nos permite diferenciar sus partes de manera clara y solamente en dos dimensiones. La microscopía de laser confocal de barrido, al utilizar una luz monocromática y al atravesar un pinhole (orificio muy pequeño), focaliza la luz en un solo punto, lo cual incrementa la resolución axial y mejora el contraste.

La microscopía confocal además de focalizar la luz láser, realiza un barrido de la muestra tanto horizontal como vertical, lo cual permite realizar una reconstrucción tridimensional de la muestra(Nwaneshiudu et al., 2012).

Celda microbiana de Combustible (MFC) y Sistemas Bio-Fotovoltaicos (BPV)

Una celda microbiana de combustible o MFC por sus siglas en inglés *Microbial Fuel Cell*, es un dispositivo que utiliza la transferencia de electrones producidos por microorganismos hacia un electrodo para la producción de energía eléctrica durante el proceso de degradación de materia orgánica, estos electrones se desplazan hacia un aceptor a través de una carga. Bajo este concepto, estos dispositivos son considerados una tecnología viable para la producción de energía limpia a la vez que podría depurar aguas servidas y contaminadas, es decir una bioremediación en conjunto a la generación de energía eléctrica (L. Huang et al., 2011; Revelo, Hurtado, & Ruiz, 2013a, 2013b).

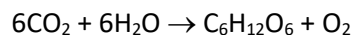
Una MFC generalmente está compuesta por dos secciones transparentes separadas por un material que permite el intercambio de protones entre ellas, una de las secciones debe ser anaerobia que permita la oxidación de la materia orgánica debido a las bacterias contenidas en esta y así la liberación de electrones que serán captados por un electrodo y conducidos hacia la parte catódica del dispositivo a través de un circuito externo, estos electrones son liberados y se combinan con el oxígeno del aire para reducirse a moléculas de agua. En el proceso anaeróbico también se forma CO₂ en bajas cantidades por lo que no necesita un tratamiento y también protones que se transmitirán hacia la parte catódica a través de una membrana o un puente salino (Du et al., 2007).

Una adaptación de las celdas microbianas de combustible, son los sistemas bio – fotovoltaicos o BPV por sus siglas en inglés (Bio-Photo Voltaic), cuya característica principal es utilizar organismos fotosintéticos para la producción de energía, y aprovecha los electrones

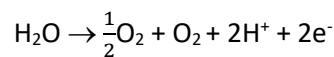
generados, tanto en el proceso de fotosíntesis como en la respiración, para la producción de energía eléctrica, a diferencia de una MFC común, en la que los electrones que se aprovechan para la generación de energía eléctrica son producidos por la degradación del material debido a bacterias.

Los BPV utilizan organismos que realizan procesos fotosintéticos y respiratorios como las plantas, por este motivo se utiliza cianobacterias como organismos fotosintéticos para trabajar en la cámara aniónica. La gran ventaja de estos sistemas, es que puede producir electrones, tanto con luz (por procesos fotosintéticos) como en oscuridad (por procesos respiratorios).

La fotosíntesis consiste en el aprovechamiento del CO₂ y el agua para la formación de carbohidratos y oxígeno, pero en este proceso se da la liberación de electrones tanto en luz como en oscuridad.



Al absorber la energía de la luz, las moléculas de agua son divididas en protones (H⁺) y electrones. Los protones son utilizados para fabricar la molécula de ATP que le supe de energía para desarrollar otros procesos, y los electrones fotosintéticos (PE por sus siglas en inglés) fluyen hacia la membrana tilacoides para formar la molécula NADPH.



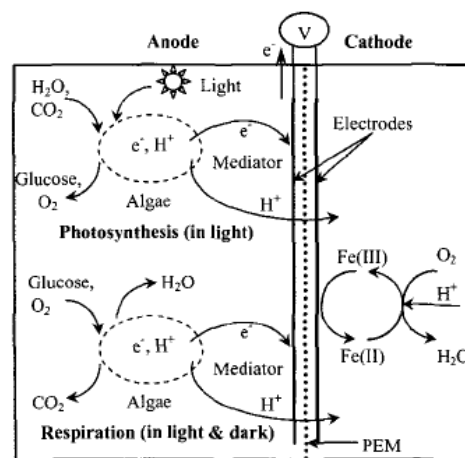
Durante la ausencia de la luz sucede el conocido ciclo Calvin, en el que la cianobacteria construye carbohidratos ayudado por la enzima RuBisCO y absorbiendo energía de la molécula ATP y NADPH que fueron formadas durante la presencia de la luz.



Los electrones liberados en el proceso con luz, antes de la formación del ATP y NADPH, son aprovechados para la producción de energía eléctrica si son absorbidos por un material metálico en contacto con el medio que contiene las cianobacterias, así también en oscuridad, durante la oxidación de la molécula NADPH, se liberan electrones que pueden ser aprovechados para la generación de energía eléctrica (Figura 16).

Figura 16.

Principios de funcionamiento de una BPV tipo PEM.



Tomado de (Lam, Chiao, & Lin)

La caracterización de la generación de energía eléctrica en una MFC o en una BPV no solamente se refiere a la medición de la densidad de corriente o de potencia generada por unidad de área, o al potencial producido. Se requiere conocer el comportamiento y estabilidad de la fuente cuando se coloca una carga externa, además de su resistencia interna sobre la cual existirá una pérdida del potencial generado, para ello es necesario utilizar técnicas de caracterización electroquímica.

Capítulo III. Metodología

Cultivo

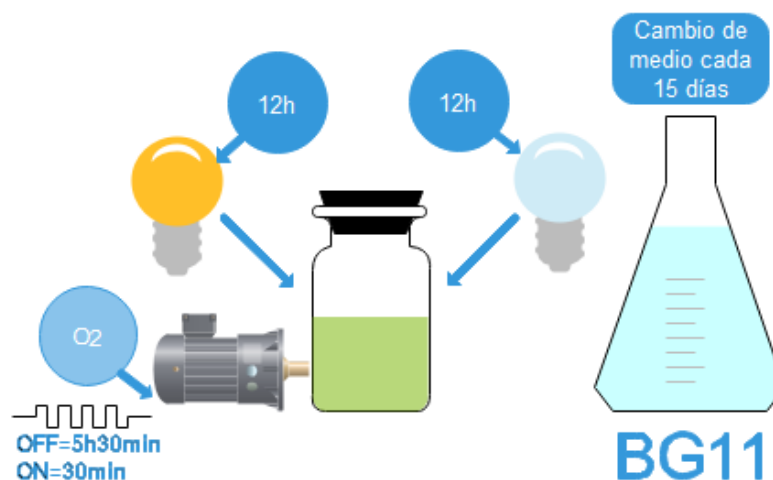
Para el cultivo y crecimiento del alga procariota *Fischerella musicola* se tomó como referencia y punto de partida el estudio desarrollado por la Ingeniera Dennisse Del Castillo realizado en el proyecto de titulación para la obtención del título en Ingeniería en Biotecnología (Castillo, 2019; Maestrin et al., 2009), y se controló el fotoperíodo de luz e intercambio gaseoso, utilizando un temporizador mecánico (YIDONG ELECTRONIC modelo TU-9), con periodos de activación y desactivación de 12 horas, a las 8:00 y 20:00. El control de intercambio gaseoso se lo hizo con otro temporizador de las mismas características al anterior, con 4 períodos ON/OFF e intervalos de activación de 30 minutos y de 6 horas de desactivación. Los dos procesos de control fueron desarrollados en lazo abierto, es decir sin un control monitoreado y respuesta en tiempo real.

Además, se monitoreo otros parámetros como la luminiscencia, utilizando el equipo portátil marca KONICA MINOLTA modelo LS-100 y tomando 10 mediciones en diferentes lugares del área iluminada para obtener un valor promedio, esto con la luz apagada como referencia y luego con la luz encendida para obtener la relación, en porcentaje y en cd/m^2 , entre la luz emitida por las lámparas y la referencia de luz solar que llega al espacio iluminado. Se analizó el pH del medio de cultivo utilizando el equipo marca THERMO SCIENTIFIC modelo ORION STAR A111, y la temperatura con un termómetro de etanol en periodos de 15 días.

El medio de cultivo utilizado para la *Fischerella musicola* fue la formulación BG11, el cual luego de su preparación también debe ser esterilizado. Este medio de cultivo se cambia cada 15 días procurando mantener su esterilidad, esto se logra desinfectando las superficies de trabajo con alcohol al 70% y una solución de sablón, además del manejo del experimento junto a un mechero para evitar la contaminación por partículas del ambiente (Figura 17).

Figura 17.

Protocolo de crecimiento de la cianobacteria *Fischerella musicola*.



Para los experimentos que requieren la observación individual de las células de *Fischerella musicola*, se debe tomar el cultivo y colocar en una plancha de agitación magnética marca THERMO SCIENTIFIC modelo SP131635, con un agitador magnético estéril a 600RPM por 5 minutos. Se toma una alícuota de 1mL y se vierte en un vaso de 10mL para llevarlo a un sonicador vertical (ULTRASONIC PROCESSOR modelo GE 750) con amplitud de 20% por 20 segundos, con intervalos de 10 segundos ON/OFF. Después de la sonicación se toma una alícuota de 5uL y se coloca en el porta muestras correspondiente a cada observación. Con la Cámara de Neubauer y con la ayuda de un microscopio (OLYMPUS modelo C21) se procedió al conteo celular en los cuatro cuadrantes externos de la cámara de Neubauer para su posterior análisis, también en un porta muestras común para su observación en microscopía confocal. Pevio a todos los procesos, los instrumentos fueron previamente esterilizados en un Autoclave (EQUITRON modelo AUTOCLAVE – PAD PORT / MINI).

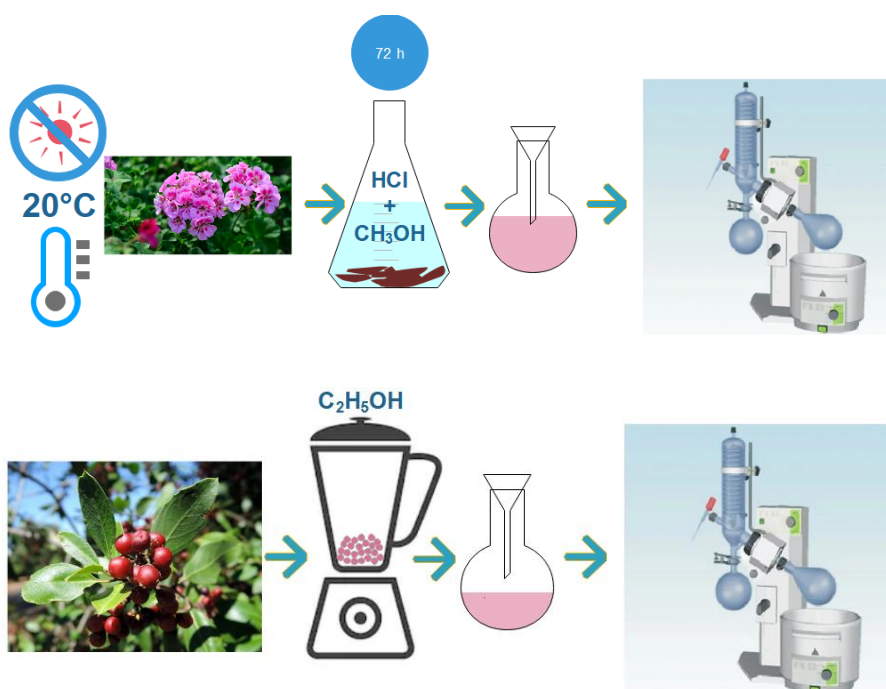
Extracción de pigmentos naturales

Los pétalos de la flor de *Pelargonium domesticum* (Geranio) fueron recogidos en la ciudad de Riobamba-Ecuador (GPS: 1°36'38.8"S 78°38'56.0"W) en distintas épocas del año y la *Rhamnus*

myrtifolius (Carrasquilla) fue cosechada en la ciudad de Sangolquí-Ecuador (GPS: 0°21'34.2"S 78°25'05.0"W) en el mes de junio de 2019. Los pétalos de geranio fueron secados en obscuridad y a temperatura ambiente, luego pulverizados en un molino Universal (Bell-art Micromill W), de estos pétalos de geranio en polvo se pesaron 7.83gr y se lo maceró por 72 horas utilizando 200mL de metanol ligeramente acidificado en solución de ácido clorhídrico 1N en proporción 8:2. Los frutos de la carrasquilla (204.65 gr) fueron licuados con etanol y dejados en maceración por 72 horas utilizando etanol puro. Estas soluciones fueron concentradas en un rotavapor (Buchi R-210) a 40°C, variando la presión hasta valores de 60mBar y posteriormente almacenados en un desecador en un envase ámbar (Figura 18).

Figura 18.

Proceso de preparación de los extractos de geranio (Pelargonium domesticum) y carrasquilla (Berberis Halli).



Para la caracterización de los extractos se midió el espectro de absorción UV-Vis (ANALYTIKJENA modelo SPECORD S600) con diluciones de 3mL de H₂O y 100uL de extracto, mediciones desarrolladas por un período de 30 días.

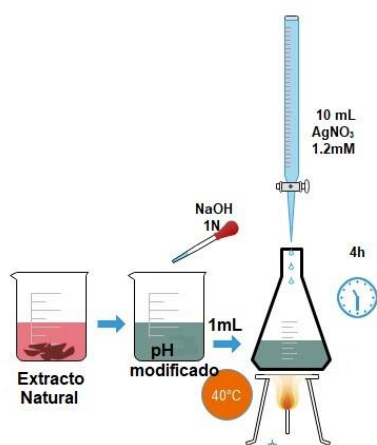
Síntesis de Nanopartículas de plata.

Para el proceso de síntesis de nanopartículas metálicas, se utilizó diferentes concentraciones de un precursor que en este caso fue el nitrato de plata (AgNO_3 : SCHARLAU con 99-100% de pureza) y como agente reductor los extractos de *Pelargonium domesticum* (Geranio) y *Rhamnus myrtifolius* (Carrasquilla) con diferentes pH. Estas variaciones se realizaron para obtener los mejores procesos de síntesis de AgNPs con tamaños entre 20 y 30 nm.

Para obtener las diferentes concentraciones de AgNO_3 se utilizó una balanza (RADWAG modelo AS 220.R2) para su pesaje y se disolvieron en agua Milli-Q. Se preparó la solución reductora pesando 0.1gr de extracto seco y se disolvió en 10mL de agua Milli-Q, se modificó el pH del extracto a un pH alcalino con una solución de NaOH a 1N y se controló con un pHmetro (THERMO SCIENTIFIC modelo ORION STAR A111). En 1mL del extracto se agregó lentamente 10mL de AgNO_3 , y se agitó hasta obtener una solución homogénea. Se incubó en baño maría a 40°C por 4 horas, para ello se utilizó una plancha (DAIGGER) y un vaso de precipitación de 500mL con suficiente agua para cubrir completamente el tubo falcon que contenía la solución homogénea. Se almacenó la muestra en refrigeración a 4°C y en ausencia de luz (Figura 19).

Figura 19.

Proceso de síntesis de nanopartículas de plata con extracto de P. domesticum y R. myrtifolius.

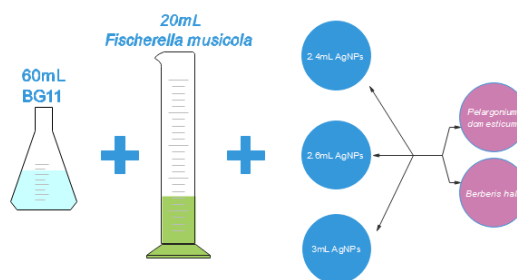


Formación del organismo híbrido.

Para el desarrollo del organismo híbrido se mezclaron 3 diferentes volúmenes (2.4, 2.6 y 3mL) de AgNPs sintetizadas con extracto de geranio y de carrasquilla en 60 mL de cultivo de cianobacteria *Fischerella musicola* que posee una dilución 1:2 (20 mL de biomasa algal + 40 mL de medio) (Tabla 2). Estos organismos fueron analizados utilizando el mismo procedimiento detallado en el punto 3.1 y por un período de 70 días. (Figura 20)

Figura 20.

Proceso de formación del organismo híbrido.



20mL de *Fischerella musicola* en una probeta, 60mL de medio BG11 y 2.4mL, 2.6mL y 3mL de cada una de las AgNPs sintetizadas. Un total de 6 experimentos que se cultivan con el mismo protocolo de la figura 14.

Tabla 2.

Descripción de los sistemas experimentales.

Nombre del sistema MFC	Concentración v/v de AgNPs	Extracto utilizado
Alga	Solo <i>F. musicola</i>	-----
BG11	Solo medio de cultivo BG11	-----
AgNPs-G	Solo nanopartículas de geranio	Geranio
Cys-AgNPs-G-C1	2.4mL AgNPs en 20mL de alga	Geranio
Cys-AgNPs-G-C2	2.6mL AgNPs en 20mL de alga	Geranio
Cys-AgNPs-G-C3	3mL AgNPs en 20mL de alga	Geranio
AgNPs-C	Solo nanopartículas de geranio	Carrasquilla
Cys-AgNPs-C-C1	2.4mL AgNPs en 20mL de alga	Carrasquilla
Cys-AgNPs-C-C2	2.6mL AgNPs en 20mL de alga	Carrasquilla
Cys-AgNPs-C-C3	3mL AgNPs en 20mL de alga	Carrasquilla

Especificación del tipo de sistema utilizado en la cámara aniónica de las MFC's.

Técnicas de Caracterización.

Nanopartículas

Los extractos y las nanopartículas fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-VIS (ANALYTIKJENA modelo SPECORD S600) bajo condiciones de integración y acumulación de 100/80 respectivamente, se utilizó celdas de cuarzo con agua Milli-Q como referencia. La preparación de la muestra consiste en diluir 200uL de la solución a ser analizada en 3mL de agua Milli-Q en una celda de cuarzo de 1cm de ancho y largo y de 4cm de alto, la cantidad puede ser modificada de acuerdo a los resultados obtenidos para evitar la saturación de la medición. Esta caracterización se utilizó para observar la formación nanopartículas de Ag^0 , al analizar la intensidad y la longitud de onda de las bandas de absorbancia formadas. También se analizó la estabilidad de las nanopartículas y del extracto, comparando los valores de intensidad y ancho de banda en un período de 30 días, durante el cual la muestra se almacenó a 4°C y en oscuridad. Finalmente, esta técnica también nos permite analizar la inferencia que tiene la modificación del pH en el extracto, al comparar las bandas formadas para cada valor de pH.

Para los análisis de tamaño y forma de las nanopartículas se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica DLS en el equipo marca HORIBA modelo LB-550, con un volumen de 3mL de cada una de las soluciones de AgNPs. Para la medición se ocupó la celda de cuarzo con las mismas magnitudes que la utilizada en espectrometría UV-Vis, la muestra sin diluir es colocada en la celda y el equipo seteado con los parámetros antes mencionados. Observando el control de temperatura del equipo en todo momento y evitando movimientos externos que afecten al equipo y que puedan incurrir en un error de medición. También se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (TEM) marca FEI-Tecnaí G20 Twin-Spirit , colocando 20uL de la

muestra sobre el mesh de F/C de Cu recubierto de carbón (TEM-grid 300-mesh). Las imágenes fueron obtenidas a 80kV con una cámara Eagle 4K.

Con SEM también podemos obtener imágenes de las nanopartículas pero con una menor resolución, para ello se utilizó el equipo marca FEG- SEM modelo TESCAN MIRA 3 en modo STEM que al igual que un microscopio TEM utiliza los electrones transmitidos. En las imágenes de nanopartículas obtenidas por STEM o SEM podemos observar la morfología de las nanopartículas y también podemos calcular la cantidad de nanopartículas sintetizadas.

El cálculo de la densidad de nanopartículas nos da la información de la cantidad que existe por unidad de área y también con la imagen se puede obtener un promedio del tamaño de las partículas. Para ello se obtiene un mínimo de 5 imágenes por cada medición y mediante el software computacional FIJI se ajusta contrastes y se filtra el ruido de fondo de cada imagen, se ajusta la escala y finalmente mediante las herramientas propias del software, se adquiere el diámetro de Feret (Valera, Morales, & Morfa, 2017) de cada partícula y el conteo total.

Mediante la prueba de Polsby – Popper, que es una media matemática del índice de la circularidad de una partícula, se analizó de manera cuantitativa la morfología de formación de AgNPs en los diferentes procesos de síntesis desarrollados en esta investigación. El índice de Polsby – Popper, o índice PP, se determina multiplicando el área del polígono por 4π y dividiendo para el perímetro al cuadrado (Ecuación 2.5)(Bozeman & Pilling, 2013; Polsby & Popper, 1991). En la tabla 3, se resume los intervalos de los índices de circularidad para cada forma de partícula. (Bozeman & Pilling, 2013; Polsby & Popper, 1991).

$$PP = \frac{A_{Poligono} * 4\pi}{(P_{Poligono})^2} \quad (2.5)$$

Donde:

PP: Índice de circularidad o de Polsby Popper

A_{Polígono}: Área de la partícula a analizar

P_{Polígono}: Perímetro de la partícula a analiza

Tabla 3.

Intervalos de los índices de Polsby – Popper, índice de circularidad.

Morfología	Índice de Circularidad
Circular	0.99 – 1.01
Hexágono	0.898 – 0.916
Cuadrilátero	0.691 – 0.792
Triángulo	0.599 – 0.611

Utilizando el software computacional FIJI se obtiene el índice de circularidad de las partículas analizadas, y mediante un análisis estadístico se calcula el histograma para cada una de las formas de las nanopartículas sintetizadas.

Para analizar los procesos REDOX de las AgNPs se utilizó la técnica de Voltamperometría cíclica en un potenciostato marca METROHM AUTOLAB, una solución electrolítica de KCl a 0.1mM, rango de detección desde -1.2 V hasta 1.2 V, una velocidad de 0.1V/s y 6 repeticiones.

Para poder trabajar con esta técnica, es necesario un lavado adecuado de los electrodos a utilizarse, los de trabajo son de carbono y titanio y el de referencia es un electrodo saturado de calomelanos o SCE por sus siglas en inglés. Para la limpieza de los electrodos de trabajo y la celda de vidrio,: i) con un paño suave se limpia la superficie con agua destilada para quitar la grasa y otras impurezas superficiales, ii) para retirar restos de metales de mediciones previas, se utiliza agua regia en un recipiente en el que se sumergirán los electrodos y se los llevará a un sonicador de agua marca COLE PARMER modelo 08855-10, por un tiempo de 5 minutos, iii) se lava los electrodos sumergiéndolos en agua destilada caliente y llevando el recipiente a sonicación por 5 minutos más, iv) el electrodo de referencia debe ser limpiado con un chorro de agua destilada y luego agitándolo en un vaso con KCl a 0.1mM.

En la celda de vidrio se coloca 50mL de KCl 0.1mM, luego se conectan los electrodos de platino, de carbono y el de referencia y se programan los parámetros mencionados. Se toma una medición de referencia o blanco, y posteriormente se agrega de manera progresiva la muestra a analizar, en la celda de vidrio que contenía KCl. La muestra fue agregada progresivamente (40uL, 80uL, 160uL, ... 1280uL) para evitar la limpieza de los electrodos después de cada medición, pero cuando se realiza un cambio de muestra se debe repetir el proceso de limpieza de los electrodos.

Para confirmar la existencia de Ag^0 se utilizó la técnica de Difracción de Rayos X con el equipo de marca MALVERN PANALYTICAL modelo EMPYREAN, en configuración θ - 2θ (geometría Bragg-Nrentano), equipado con un tubo de rayos X de cobre (radiación $K\alpha$ en $\lambda=1.54056\text{\AA}$) a 45kV y 40mA. Para este análisis se preparó en un porta muestra de vidrio una película gruesa de la solución de AgNPs y se secó a 100°C (Figura 21). El análisis del difractograma se realizó sobre el promedio de 4 mediciones entre los ángulos desde 5° a 90° (θ - 2θ) utilizando el software High Score Plus.

Figura 21.

Muestras de nanopartículas de plata preparadas para el estudio por Dispersión de Rayos X (XRD).



Cianobacterias y organismo híbrido

Para el análisis morfológico de la cianobacteria con y sin nanopartículas se utilizó las técnicas de microscopía electrónica de barrido en modo SEM y STEM (FEG- SEM, TESCAN MIRA 3). En el caso del modo STEM HV a 30kV con magnificación 272 kx campo de visión de 2.54 μ m y detector TE-BF y en el caso del modo SEM a 25kV con magnificación 12.6kx, campo de visión de 55 μ m y detector BSE. Para el análisis se utilizó 1mL de biomasa y se liofilizó a -62°C durante 24 horas, utilizando el equipo marca ILSHIN NIOBASE modelo TFD5503, después se procedió a fijar la muestra con glutaraldehído al 3% por 3 minutos y una post fijación con tetraóxido de osmio (TOO) al 1% por 20 min. Finalmente se aplica concentraciones crecientes de etanol para la deshidratación (50, 70, 90 y 99.9 % v/v). Sobre el porta muestra se coloca un trozo de cinta de carbono y sobre esta cinta se distribuirá la muestra en polvo. Utilizando la técnica de sputtering con el evaporizador de oro marca Sputter Coating Quorum modelo Q105R, se recubre a la muestra con una pequeña capa que hará conductiva a nuestra muestra orgánica, para una mejor observación de la morfología.

Otra técnica utilizada fue la Microscopía Confocal con el equipo marca FLUOVIEW modelo FV1200, para obtener imágenes de fluorescencia de la cianobacteria con y sin AgNPs, y superponerlas con las imágenes obtenidas de las nanopartículas de plata. Para ello se tomó una alícuota de 10 μ L de cada una de las muestras y se colocó sobre un portamuestras, sellando sus bordes con esmalte de uñas transparente para evitar que la muestra se filtre por las hendiduras. La muestra debe ser preparada momentos antes de la medición, para evitar que la muestra se seque y se aglomere, lo cual permitirá observar células individuales y poder diferenciar de mejor manera el contraste de los elementos encontrados en la muestra.

Finalmente se analizó el potencial de la cianobacteria *Fischerella muscicola* con y sin AgNPs con un microscopio de fuerza atómica (AFM: Dimension icon with ScanAsyst de marca Bruker)

en modo EFM (Electrostatic Force Mode), se utilizó un cantiléver modelo MESP de antimonio dopado con silicio y con un revestimiento de CoCr, frecuencia de exploración de 0,537Hz, ganancia proporcional de 10, ganancia integral de 1, amplitud de punto de ajuste de 24nm y con variaciones del potencial -2v a 2v. La preparación de las muestras se realizó sobre sustratos de silicio de 2x2cm, para ello se tomó una alícuota de 1mL de cada uno de los organismos híbridos, se sonicó a una amplitud de 20% con tiempo de 5s en off y 5s en on por un tiempo total de 20s, en un equipo de ultrasonido vertical. Los sustratos fueron colocados sobre una caja Petri limpia y este sobre una plancha a 40°C, se tomó 200uL de muestra, se colocó y distribuyó homogéneamente sobre el sustrato de silicio y se dejó secar por aproximadamente 3 minutos (Figura 22).

Figura 22.

Muestras para medición AFM de los organismos híbridos.



Utilizando obleas de silicio de 2x2cm como sustrato (izquierda). Proceso de secado de las muestras sobre una caja Petri en una plancha a 40°C.

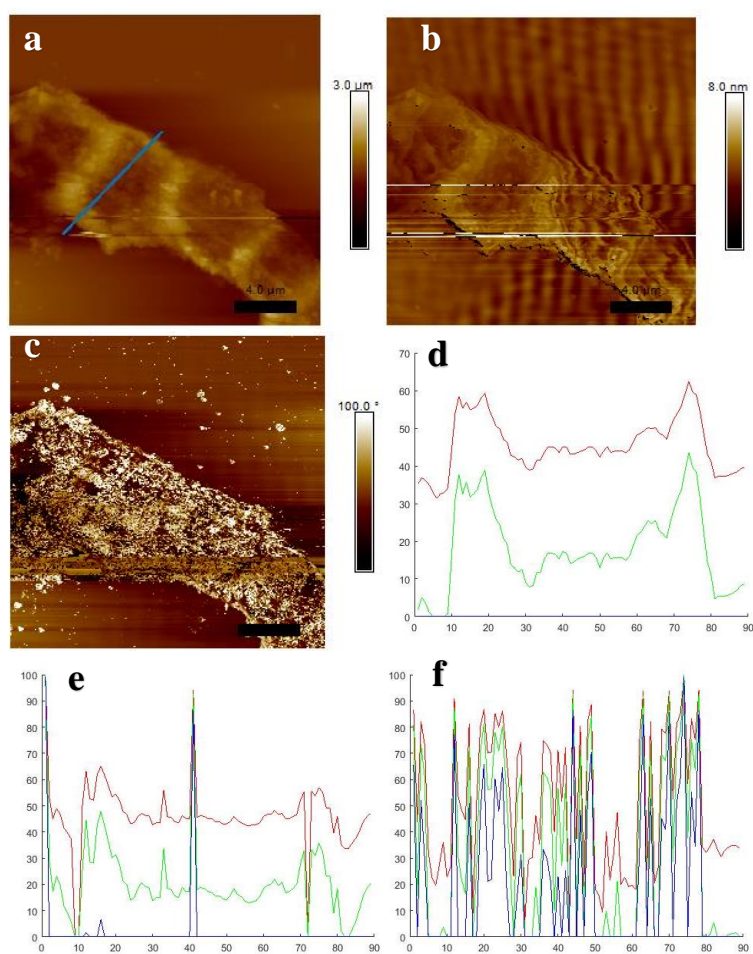
Para el análisis de las muestras se utilizó el software computacional MATLAB, con el que se obtuvo el perfil de intensidad de las muestras, trazando entonces imágenes en dos dimensiones de las imágenes de altura, amplitud y fase de cada imagen.

El código utilizado para este procesamiento se presenta en los ANEXOS.

La Figura 23 presenta imágenes obtenidas por microscopía de fuerza atómica en modo EFM de la cianobacteria *Fischerella musicola* utilizada en el presente proyecto de investigación, junto a los perfiles de intensidad obtenidos con el software Matlab. Proceso propuesto en esta investigación para el análisis de las imágenes obtenidas.

Figura 23.

Ejemplo de análisis de imágenes obtenidas con AFM.



En la imagen "a" se traza el segmento del cual se obtiene un perfil de intensidad para cada una de las imágenes.

a) Adquisición morfológica. b) Adquisición de amplitud. c) Adquisición de fase. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "a". e) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "b". f) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "c".

La Figura 23 es un ejemplo de las imágenes obtenidas en este proyecto de investigación y de su posterior análisis para comprobar el comportamiento eléctrico de la muestra analizada.

En la Figura 23d se presenta el perfil de intensidad correspondiente a la morfología observada en 23a, al medir la intensidad de los picos más altos podemos conocer la altura máxima de la morfología de la muestra.

En la Figura 23e, el perfil de intensidad que corresponde a la amplitud de la fuerza electrostática observada entre la punta y la muestra (Figura 23b), los picos más altos de intensidad corresponden a los espacios en el que la fuerza eléctrica de interacción entre la muestra y la punta es mayor, por eso al estudiar los valores de intensidad y compararlos con otras imágenes obtenidas se puede entender cuáles son las muestras que presentan mayor actividad eléctrica.

Analizar el perfil de intensidad de la Figura 23c de manera visual (Figura 23f) no es factible, por lo que se analiza el promedio de los datos del perfil de intensidad, sabiendo que los valores de intensidad más altos, cercanos a 100, corresponden a una fase de baja electronegatividad y los cercanos a 0, corresponden a una fase de alta electronegatividad.

MFC/BPV

Construcción

La celda microbiana de combustible fue construida utilizando una impresora 3D (CREALITY ENDER 3 PRO), que utiliza el polímero PLA (ácido poliláctico) de color blanco para su impresión. La MFC es de dos cámaras con puente salino que conecta las dos cámaras. Los planos, en los que se establecen las dimensiones, se pueden observar en el ANEXO.

Para el desarrollo del puente salino se utilizó una concentración al 1.5% en peso de agar granulada disuelta en 200mL de agua miliQ, y por cada 15mL de agar se colocó 2mL de KCl saturado. Se almacena esta solución en jeringas de 10mL y se deja secar al ambiente por 48horas para que alcance su gelificación Figura 24.

Figura 24.

Proceso de formación del puente salino gelificado.



Solución de 15mL de Agar granulado al 1.5% en peso con 2mL de KCl 1M.

Para la parte catiónica se utilizó 100mL de $ZnSO_4$ 1M como solución que ayude al intercambio de cargas eléctricas, en la parte aniónica 100mL de los diferentes organismos híbridos desarrollados en esta investigación, así también un experimento que contiene solo medio BG11 y una muestra que contiene cianobacterias sin nanopartículas dando un total de 8 experimentos. Los electrodos utilizados fueron de carbono para la parte aniónica y de Zn para la catiónica. El electrodo de carbono se obtuvo de pilas tipo D de desecho, a las cuales se les retiró toda la estructura externa y se colocó un tornillo en la parte superior para facilitar la conexión eléctrica externa hacia las cargas, el electrodo tiene forma cilíndrica de 8mm de diámetro y 56mm de altura. El electrodo de Zn fue construido en el laboratorio utilizando Zn granulado y un molde de yeso. El molde fue construido modelando en plastilina una estructura rectangular de 56mm de altura, 8mm de ancho y 2mm de profundidad, este molde fue sumergido en yeso humedecido y se lo dejó secar por 3 horas hasta su solidificación. El Zn granulado fue colocado en un mortero y llevado a una mufla a 500°C hasta su fundición, y luego colocado en el molde para obtener la forma del electrodo. Una vez enfriado y solidificado, se lo pulió hasta obtener el resultado de la Figura 25.

Figura 25.

Construcción del electrodo de Zn.



Molde de plastilina para la construcción del electrodo de Zn (izquierda). Electrodo de Zn terminado y pulido.

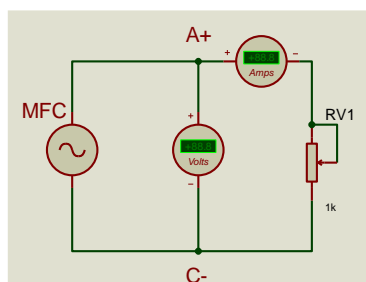
Adquisición de datos y Caracterización

La caracterización con la MFC tuvo como objetivo encontrar la curva de polarización, la curva de potencia, la resistencia interna y el rendimiento eléctrico de cada uno de los experimentos desarrollados para los diferentes organismos híbridos y las referencias.

Para la adquisición de las curvas de polarización se utilizó el experimento de circuito cerrado, que consiste en colocar una carga resistiva en paralelo a la fuente para permitir el paso de la corriente desde el electrodo del ánodo hacia el electrodo del cátodo y medir en tiempo real el voltaje y la corriente del circuito utilizando un voltímetro y un amperímetro como se muestra en la Figura 26.

Figura 26.

Circuito de medición de voltaje y corriente de una MFC en circuito cerrado.



Para la medición de voltaje y corriente se utilizó una Fuente/Medidor KEITHLEY modelo 2410 que se comunica a un computador mediante un protocolo de comunicación serial RS232 con velocidad de transmisión de 9600 baudios. El software de adquisición utilizado fue LABVIEW 2019, en el que se desarrolló la interfaz hombre máquina o HMI (Figura 27a) y la programación gráfica (Figura 27b).

Para la medición I vs V se coloca 10mL de la solución del organismo híbrido en la cámara aniónica y 100mL de $ZnSO_4$ en la catiónica, se coloca la tapa en cada una de las cámaras y mediante una manguera pequeña se vierte nitrógeno gaseoso en las cámaras por 3 minutos, esto para reducir la cantidad de oxígeno en el ambiente evitando que los electrones libres interactúen con el oxígeno y formen moléculas de agua. Se espera un lapso de 30 min para que se establezca la generación de voltaje y luego se inicia la adquisición de datos.

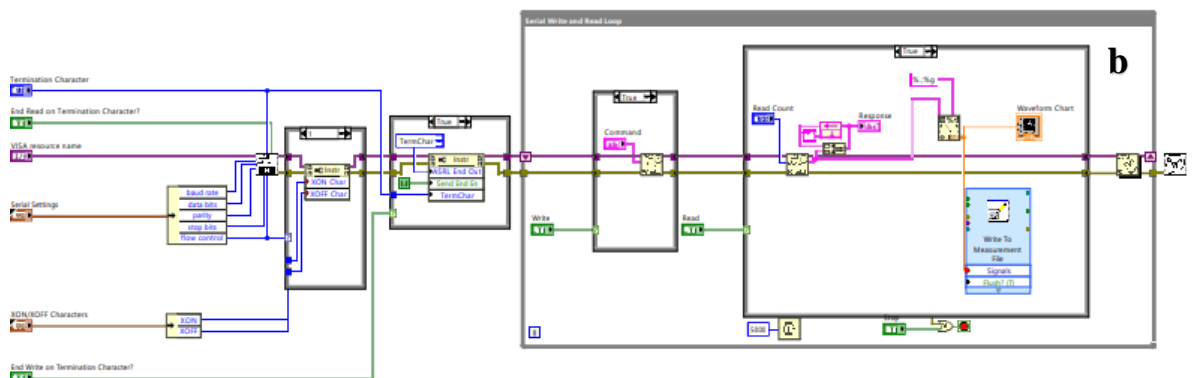
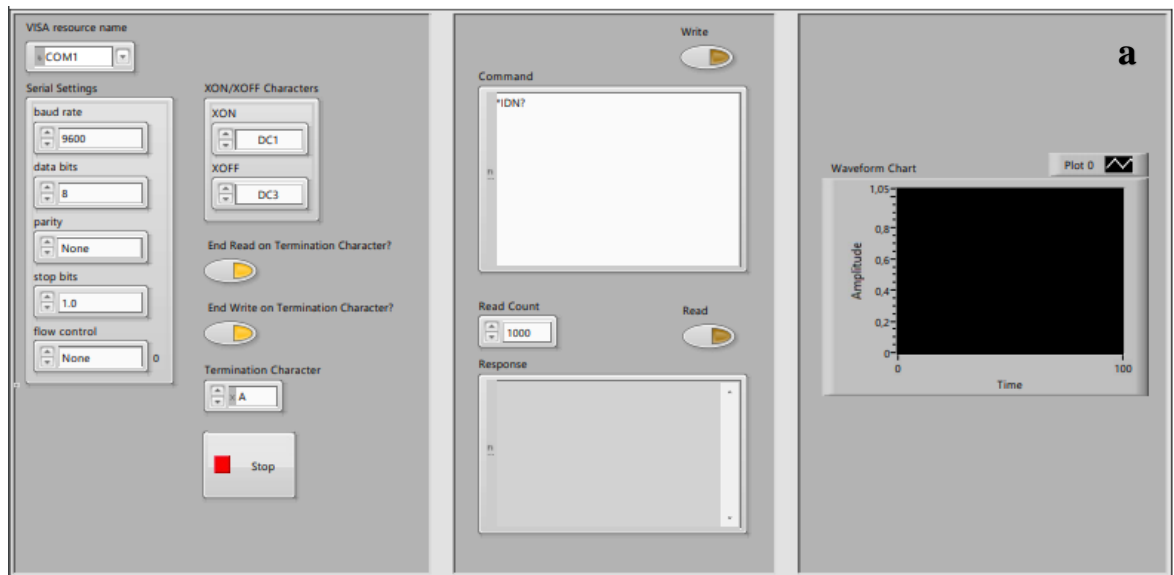
La resistencia de carga fue variada en valores de 100, 1000, 10000, 100000 y 1000000 de Ω y para cada valor de resistencia, la adquisición de datos se realizó de manera automática en intervalos de 5s por un tiempo total de muestreo de 10 minutos, esperando los 30 minutos de estabilización antes de cada medición.

El intervalo fue evaluado de manera experimental para evitar los errores transitorios durante la medición, evitando que el switcheo continuo del equipo de medición genere errores transitorios que introduzcan falsas lecturas en la adquisición.

Los experimentos fueron desarrollados entre las 9:00 y 15:00 horas, las MFC estaban cerradas (no herméticamente) sin exposición a la luz o al ambiente.

Figura 27.

Esquema de programación para la adquisición de datos desde el software computacional LabVIEW 2019.



a) HMI (Interfaz hombre máquina) b) Esquema de programación gráfica

La programación gráfica de la HMI mostrada en la Figura 27b debe ser complementada con programación escrita con los comandos de adquisición requeridos por la consola KEITHLEY. El código utilizado se presenta en los ANEXOS.

Una vez terminada la adquisición de datos, la MFC debe ser lavada con abundante agua y secada al ambiente antes de realizar una nueva medición, los electrodos son lijados superficialmente con una lija de agua #600 y posteriormente lavados con agua destilada.

Por cada carga utilizada, se realizó un filtrado manual de los datos eliminando los 5 primeros valores de cada medición realizada, esto para descartar los datos del estado transitorio de activación, y con estos se graficó la curva de potencial vs resistencia. Con la curva obtenida se utilizó el software OriginLab para la aproximación a una curva sigmoideal característica y mediante una regresión lineal obtener la ecuación de la curva con la que se calcularán los valores máximos de generación de voltaje y la resistencia interna de la MFC.

El experimento inicia con el valor más alto de la resistencia, $1M\Omega$, anotamos el potencial generado a plena carga y vamos variando la resistencia hasta llegar al punto medio del potencial que será cuando la resistencia de la carga sea igual a la resistencia interna de la MFC, por lo cual el potencial de la fuente se divide en partes iguales para la resistencia interna del equipo y la carga externa. Desconectamos el circuito y con un multímetro marca Proskit modelo Mt1232, se mide el valor de la resistencia variable en el punto donde se obtuvo el voltaje medio, este dato es comparado con el valor calculado con la ecuación obtenida de la curva de potencial en función de la resistencia de carga.

Para graficar la curva de polarización se parte de los valores obtenidos de voltaje medio de cada carga y utilizando la ley de ohm calculamos el valor de corriente que circula por el circuito para cada resistencia, y finalmente con este valor de corriente calculamos la potencia generada. La corriente calculada se divide para el área de contacto de los electrodos para obtener la densidad de corriente obtenida, se grafica el potencial generado en función de la densidad de corriente y también la potencia vs la densidad de corriente, obteniendo así la curva de polarización y la curva de potencia respectivamente.

Finalmente, para el rendimiento eléctrico externo calculamos los valores de potencia total, potencia de pérdida y potencia útil, utilizando los valores medidos de potencial en vacío,

potencial a plena carga y el valor de la resistencia interna de la MFC, con las ecuaciones presentadas en las siguientes secciones.

Las curvas de potencial vs tiempo, se obtiene utilizando la MFC como fuente de alimentación en circuito abierto, es decir sin colocar una carga en paralelo a la fuente. Utilizando un multímetro de precisión o equipos de adquisición de datos, se mide en tiempo real el potencial producido en un tiempo mayor a 30 minutos para observar un voltaje estable a la salida de la celda microbiana de combustible. Esta técnica nos permite medir el máximo potencial generado por la MFC o BPV.

La resistencia interna de una MFC o BPV nos permite estudiar el rendimiento eléctrico externo del sistema. Ya que ningún dispositivo electrónico tiene un funcionamiento ideal debido a la caída de tensión en el propio dispositivo, el conocer la resistencia interna nos permite calcular la potencia disipada dentro del equipo, a esta se le llama potencia de pérdida.

El experimento se desarrolla en circuito cerrado, colocando una resistencia variable de precisión en paralelo a la fuente. Se establece el valor de la resistencia en su máximo valor y medimos el potencial generado, luego se varía la resistencia hasta llegar justo a la mitad del potencial medido anteriormente a plena carga.

El potencial generado se divide en dos cuando la resistencia externa se iguala a la resistencia interna del sistema, esto se comprueba con la teoría de divisores de tensión. De esta manera al medir el valor de la resistencia externa, cuando la caída de potencial en esta es justamente la mitad del potencial total generado, obtenemos el valor de la resistencia interna de la fuente.

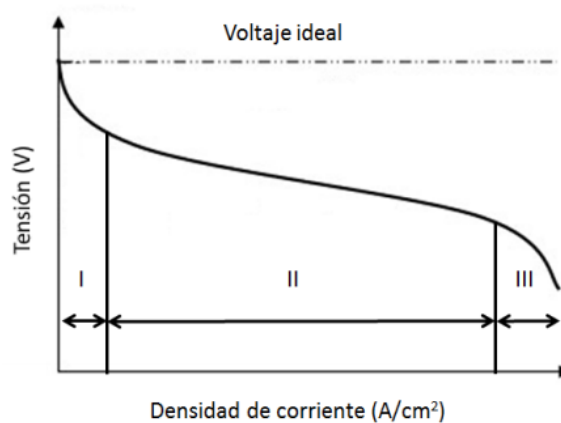
La curva de polarización permite analizar el comportamiento de las pérdidas de una celda microbiana de combustible, en el eje de las ordenadas se presenta el potencial generado y en el de las abscisas la corriente o densidad de corriente medida (Figura 28). Estas mediciones se

obtienen al variar la resistencia de carga desde valores en el orden de los megas ohmios hasta valores en el orden de las decenas de ohmios, y al ser una carga resistiva, el circuito sigue la ley de ohm de la ecuación 3.1

$$I = \frac{V}{R} \quad (3.1)$$

Figura 28.

Curva de Polarización típica de una MFC tipo PEM.



Tomado de (2021).

La Figura 28 nos muestra la curva característica de una celda microbiana de combustible de dos cámaras con puente salino o membrana de intercambio protónico, en ella se observa tres regiones claramente demarcadas, que son características debido al tipo de pérdidas que se observa en esos intervalos. La región I es llamada “Región de pérdidas por activación” y tiene relación con la energía que requiere el sistema para iniciar las reacciones químicas en los electrodos, sucede a bajas densidades de corriente y se observa una rápida caída de tensión en un intervalo corto de tiempo.

La región II se conoce como “Región de pérdidas Ohmicas”, en esta región la MFC trabaja de manera lineal y solamente se observa pérdidas debido a la caída de tensión en la resistencia interna de la MFC. Esta región está limitada por los valores mínimos y máximo de densidad de corriente, que puede entregar el sistema de manera estable y sin producir daños.

La región III tiene el nombre de “Región de Perdidas por Concentración” y se refiere a la zona en la cual el potencial generado cae bruscamente debido a que la abundante producción de agua bloquea los poros de la membrana o puente salino y de los centros activos en el cátodo, impidiendo que el oxígeno alcance el catalizador y se produzca la reacción catódica.

Al analizar los límites de cada región, obtenemos los límites mínimos y máximos de densidad de corriente para asegurar un trabajo estable de la MFC o BPV.

La curva de potencia grafica en el eje de las abscisas la corriente o densidad de corriente medida y en el de las ordenadas, la densidad de potencia calculada con la ecuación 3.2.

$$P = V * I \quad (3.2)$$

Esta gráfica de potencia nos permite determinar la máxima densidad de potencia entregada por el generador, que coincide con el máximo valor de densidad de corriente de la región de pérdidas óhmicas.

Finalmente, con los datos obtenidos se calcula el rendimiento eléctrico externo de la fuente en la región de perdidas ohmicas, calculando la potencia disipada en la resistencia interna de la MFC y restándola de la máxima potencia generada para encontrar la potencia útil, y posteriormente el cálculo del rendimiento, utilizando las ecuaciones 3.3 - 3.5.

$$P_{\text{perdida}} = I^2 * R \quad (3.3)$$

$$P_{\text{útil}} = P_{\text{máxima}} - P_{\text{perdida}} \quad (3.4)$$

$$\eta = \frac{P_{\text{útil}}}{P_{\text{máxima}}} * 100 \quad (3.5)$$

Capítulo IV. Análisis de resultados

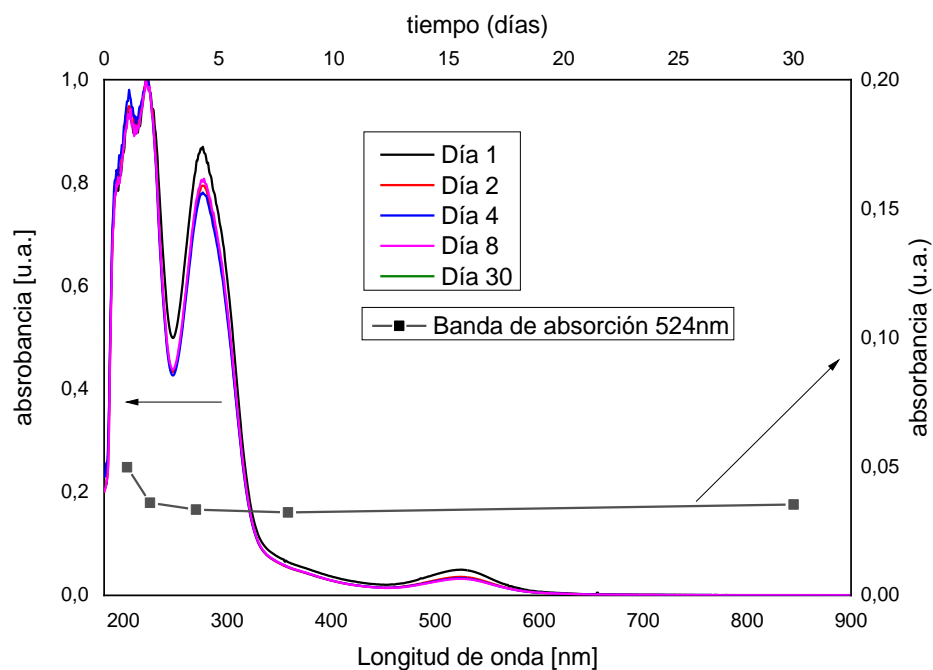
Caracterización de los extractos

Pelargonium domesticum

La Figura 29 muestra el espectro de absorción del extracto de geranio con pH 2.3 y su curva de estabilidad desarrollada por un período de 30 días con almacenamiento en oscuridad y con refrigeración a una temperatura de 4°C.

Figura 29.

Espectro de absorción y análisis de estabilidad, P. domesticum pH original.



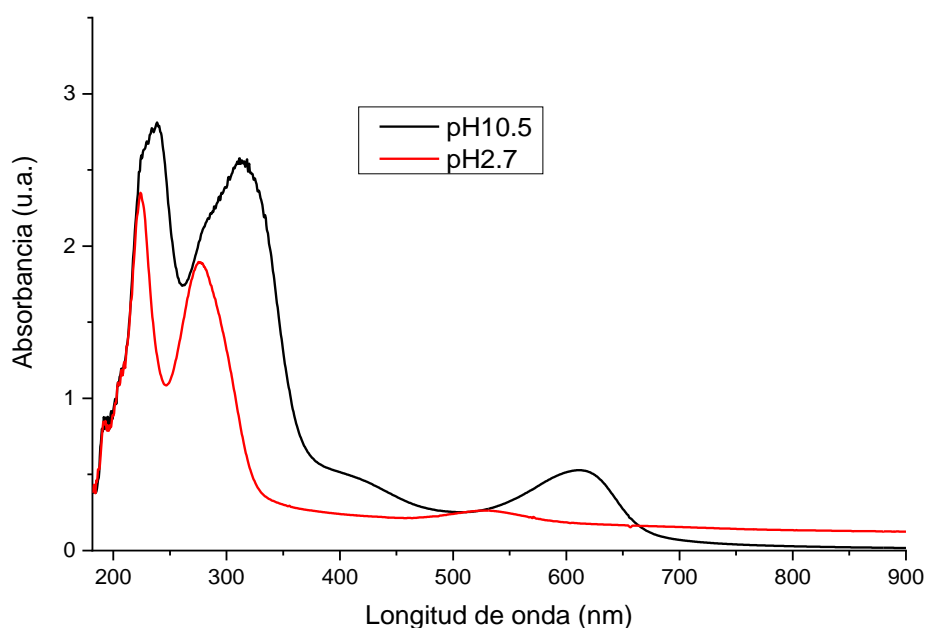
Espectro de absorción del extracto de geranio sin modificación de su pH y curva de análisis de estabilidad de la banda de absorbancia del extracto de geranio en un periodo de 30 días, presentando su intensidad máxima en los 524nm.

Los datos obtenidos muestran dos bandas de absorción características de las antocianinas con un máximo de longitud de onda en los 276,5nm en el ultravioleta cercano y otro a los 524nm en la parte visible del espectro electromagnético, bandas correspondientes a la absorción de luz por las moléculas funcionales pelargonidinas.

En la Figura 30 se puede observar los espectros de absorción del extracto de geranio con y sin variación de su pH.

Figura 30.

*Espectro de absorción, extracto de *P. domesticum* con y sin modificación de su pH.*



Estos resultados muestran que el espectro de absorción del extracto del *P. domesticum* a pH 10.5 tiene un corrimiento en el rojo de 86nm y un ensanchamiento de su banda de 30nm, esto se debe a que al modificar el pH del extracto, las moléculas cianidinas cambian la conjugación del anillo bencénico C de la molécula y se añade un enlace OH en el anillo B, lo cual no solo modifica el color del extracto a un color verde oscuro, sino que también cambia la capacidad de absorción de luz, lo cual se refleja en el incremento de la intensidad y el ensanchamiento de la banda de absorción.

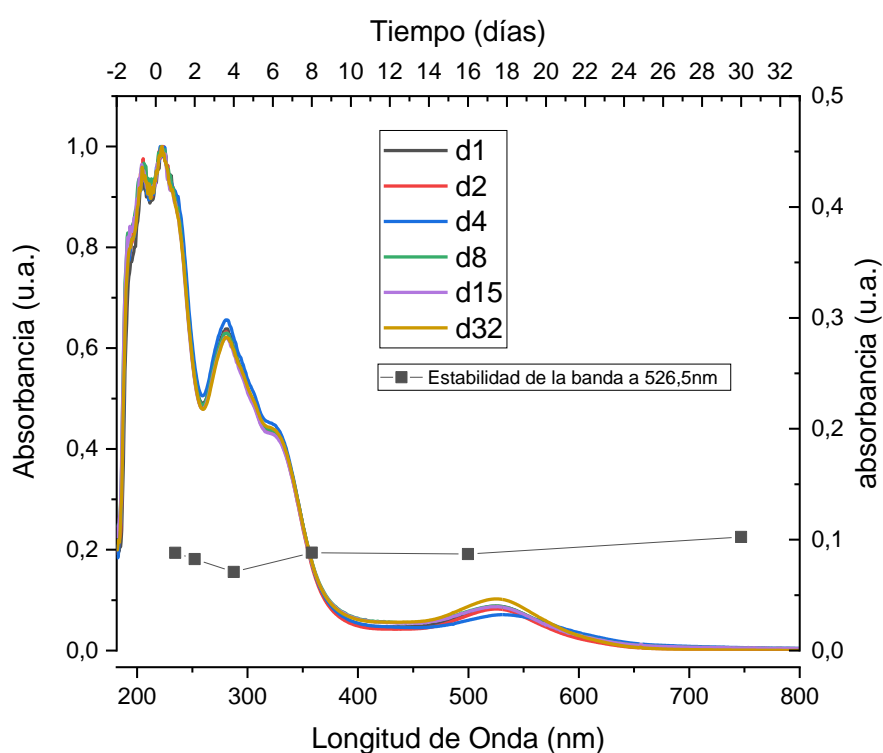
Rhamnus myrtifolius

La Figura 31 muestra el espectro de absorción que analiza la estabilidad del extracto de carrasquilla con su pH natural de 3.4, durante un período de 30 días, almacenado en obscuridad y con refrigeración a una temperatura de 4°C.

El espectrograma muestra dos bandas de absorción características de las antocianinas, para la carrasquilla con un máximo de intensidad en los 280nm en el ultravioleta cercano, un codo en los 324nm y otro a los 526.5nm en la parte visible del espectro electromagnético, analizando la banda de la región visible, se observa una banda en los 526.5nm que corresponde a la presencia de la antocianina pelargonidina.

Figura 31.

Espectro de absorción y análisis de estabilidad, R. myrtifolius pH original.



Espectro de absorción del extracto de carrasquilla sin modificación de su pH. Análisis de estabilidad de la banda de absorción del extracto de carrasquilla en un periodo de 30 días. Curvas de absorbancia vs longitud de onda para cada una de las mediciones tomadas en intervalos de tiempo progresivos, y estudio de estabilidad de máxima intensidad de absorbancia vs el tiempo de análisis en días, verificando una linealidad que indica estabilidad.

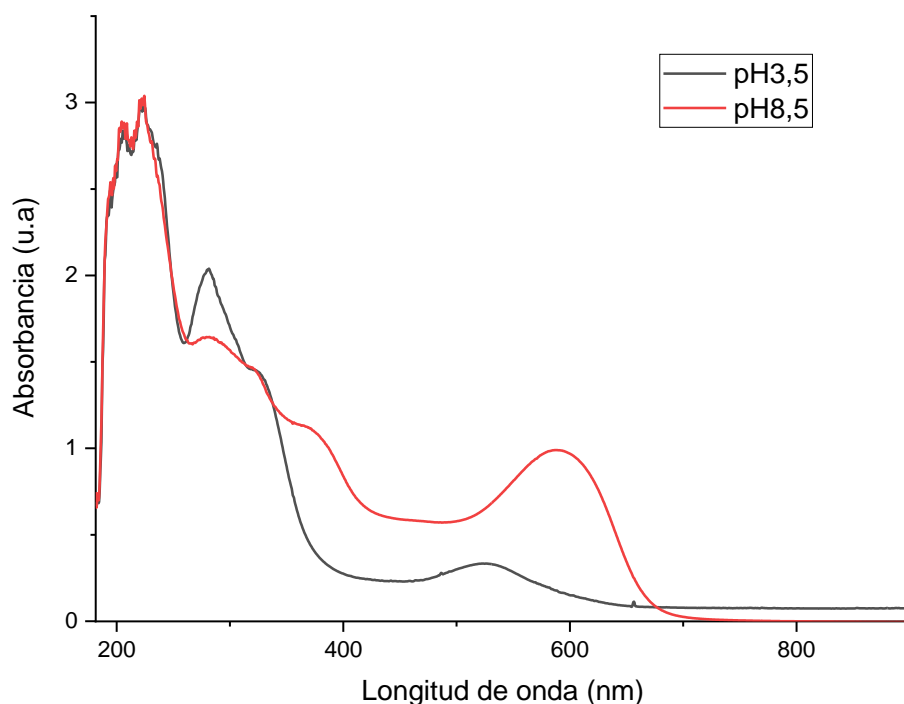
En la Figura 32 se puede observar los espectros de absorción del extracto de carrasquilla con y sin variación de su pH. Estos resultados muestran que el espectro de absorción del extracto del *R. myrtifolius* a pH 8.5 tiene un corrimiento en el rojo de 66nm y un ensanchamiento de

su banda de 40nm, esto se debe a que al modificar el pH del extracto, las moléculas cianidinas cambian la conjugación del anillo bencénico C de la molécula y el aumento de un enlace OH en el anillo B, lo cual no solo modifica el color del extracto a un color violeta oscuro intenso, sino que también cambia la capacidad de absorción de luz lo cual se refleja en el incremento de la intensidad de la banda de absorción, y el ensanchamiento de la banda por los cambios de grupos hidroxilos a grupos carbonilos en los enlaces de los anillos.

Al igual que con el extracto de geranio, se comparó los de carrasquilla con su pH original de 3.75 y con el modificado a 8.5. Partiendo de valores de 0.329u.a. en un valor de longitud de onda de 522nm, se observa un desplazamiento hacia los 590nm y un incremento en la intensidad de absorbancia hasta los 0.99u.a.

Figura 32.

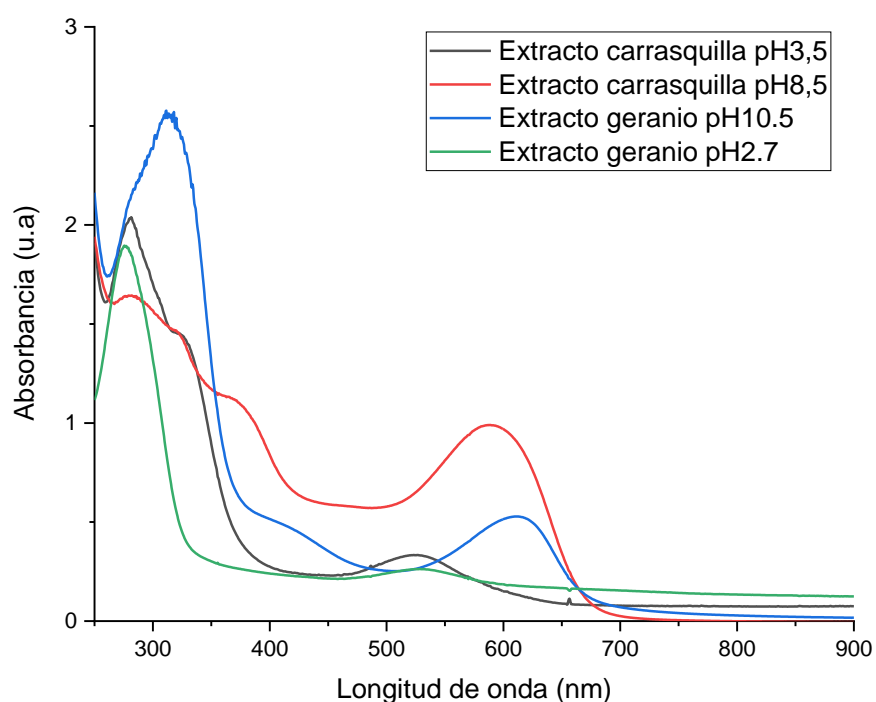
Espectro de absorción, extracto de P. domesticum con y sin modificación de su pH.



La Figura 33 es una comparación de los espectros medidos para cada uno de los extractos utilizados en el desarrollo experimental. De acuerdo a lo explicado, las bandas observadas corresponden a la presencia de antocianinas y su conjugación cuando el pH es modificado.

Figura 33.

Comparación de los espectros de absorción de los extractos caracterizados, pH original y modificado.



Existe una gran diferencia entre el extracto de carrasquilla y de geranio con respecto a su modificación de pH, a pesar de que existe un desplazamiento al rojo del espectro electromagnético en ambos casos y también un incremento de la intensidad de absorbancia, para la carrasquilla estos incrementos son muy superiores llegando a variaciones de 0.66 unidades de absorbancia a diferencia de la de geranio que llega a 0.26 unidades de absorbancia, lo cual soporta los resultados observados posteriormente, de una mayor eficiencia en el proceso de síntesis de nanopartículas de plata utilizando carrasquilla. También se observa que, para el extracto de carrasquilla, el pico de intensidad en la región cercana al

UV disminuyó, mientras que el presente en la región visible aumentó considerablemente, a diferencia del de geranio en el que los dos picos crecieron.

Al modificar el pH de los extractos se da la adición de grupos OH o carbonilos en la molécula, modificando su longitud de onda correspondiente de los extractos de *P. domesticum* (613nm) y *R. myrtifolius* (590 nm) estos cambios son necesarios para la reducción de la plata y la formación de nanopartículas y genera una influencia directa en el tamaño y morfología de la nanopartícula sintetizada.

Caracterización de las AgNPs

Caracterización UVVis y DLS

Los primeros resultados obtenidos de las AgNPs con AgNO_3 1mM y cuatro diferentes valores de pH del extracto arrojaron los espectros de absorbancia presentados en la Figura 34 y los tamaños medidos por DLS de la Tabla 4.

Figura 34.

Espectros de absorción, AgNPs con extracto de *P. domesticum* y AgNO_3 . Variación de pH's.

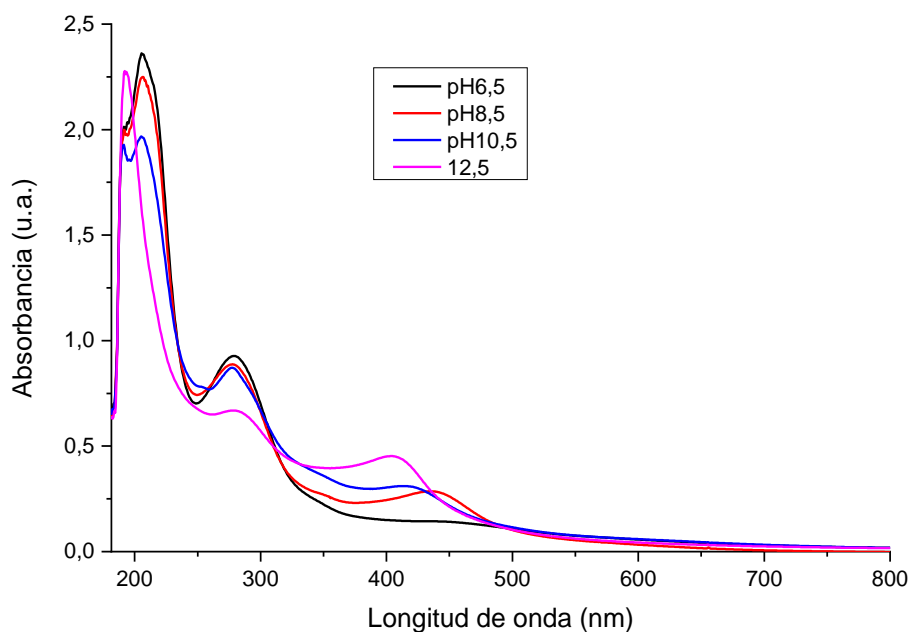


Tabla 4.

Tamaño promedio de las AgNPs de *P. domesticum*, técnica DLS, variación de pH.

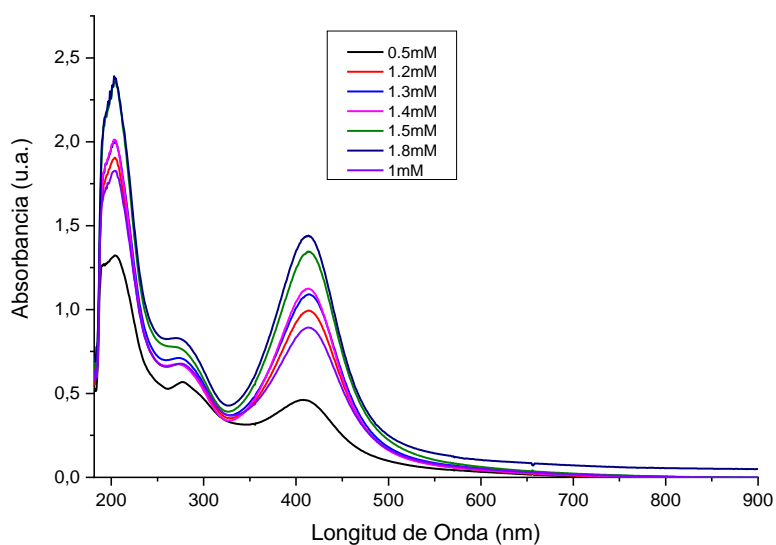
AgNPs	pH6.5	pH8.5	pH10.5	pH12.5
Media [nm]	57.6	40.4	27.8	24.8
Mediana [nm]	60.3	41.5	60.6	68.3
Desviación Estandar [nm]	21.5	12.4	67.8	84.7

Sintetizadas con AgNO_3 1mM y cuatro valores diferentes de pH del extracto.

En el espectrograma se observa que existe una relación directa entre el pH y la intensidad de absorbancia, lo que implica que existe una mayor eficiencia en la reducción de nitrato de plata a plata cero valente cuanto mayor es el pH del extracto. Pero también se observa que para obtener AgNPs de los tamaños propuestos en la investigación se debe utilizar valores de pH mayores o iguales a 10.5.

Figura 35.

Espectros de absorción, AgNPs con extracto de P. domesticum y AgNO₃. Variación de concentración.

**Tabla 5.**

Tamaño promedio de las AgNPs de P. domesticum, técnica DLS, variación de concentración.

AgNPs	0.5mM	1mM	1.2mM	1.3mM	1.4mM	1.5mM	1.8mM
Media [nm]	77.0	66.3	49.0	39.3	42.6	38.6	55.2
Mediana [nm]	145.4	133.1	92.2	94.9	81.1	74.1	113.4
Desviación Estandar [nm]	146.3	138.7	98.9	111.8	90.1	93.1	121.5

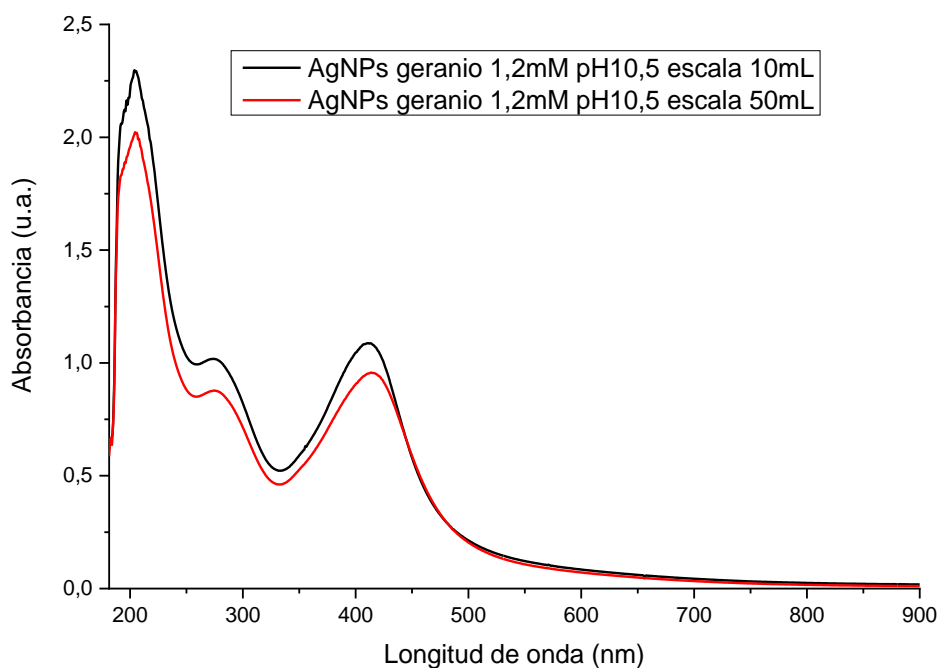
Sintetizadas con AgNO_3 en varias concentraciones y extracto de *P. domesticum* pH 10.5.

Una vez establecido el valor del pH del extracto, se desarrolló experimentos para observar la respuesta en la formación de AgNPs cuando modificamos la concentración del nitrato de plata, estos resultados son resumidos en el espectrograma de absorción de la Figura 35 y la Tabla 5 del tamaño medido con DLS.

De lo observado en los resultados, se concluye que la concentración del nitrato de plata influye directamente en la intensidad de la banda en los 400nm correspondiente a las AgNPs según la literatura, es decir que tiene influencia directa sobre la cantidad de AgNPs que se formaron. En los tamaños se observa que los resultados obtenidos a partir de la concentración 1.2mM son los más cercanos a los propuestos en la investigación.

Figura 36.

Espectros de absorción, escalamiento de AgNPs con P. domesticum.



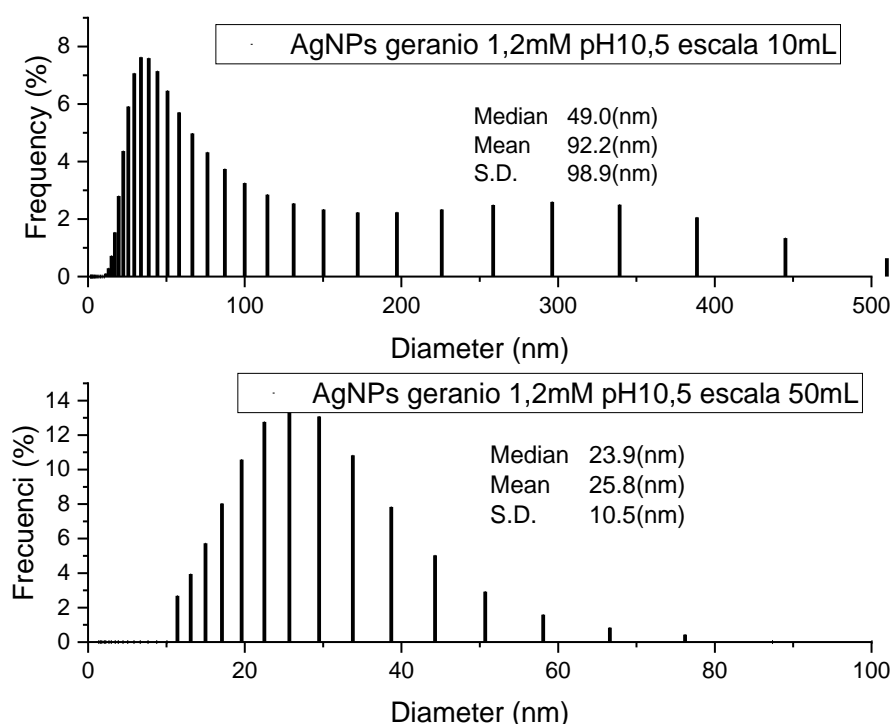
Espectrogramas de absorción de las AgNPs sintetizadas con 1mL de extracto de geranio con pH10.5 y 10 mL y 50mL de nitrato de plata concentración 1.2mM.

En la Figura 36 observamos el espectro de absorción de las nanopartículas de plata sintetizadas utilizando el extracto de geranio con pH 10.5 y una concentración de 1.2mM para la sal de plata, experimento desarrollado tanto para una escala de 1:10 de extracto y sal de

plata y otra a escala 5:50. Se observa que las bandas de absorción son muy similares y con una intensidad máxima de absorción alrededor de los 400nm, lo que demuestra la existencia de AgNPs para los dos experimentos, pero adicionalmente se observa que la escala de 5:50 presenta una mayor intensidad en su banda, lo cual infiere una mayor formación de plata.

Figura 37.

Histogramas del tamaño medido por DLS, escalamiento de AgNPs con P. domesticum.

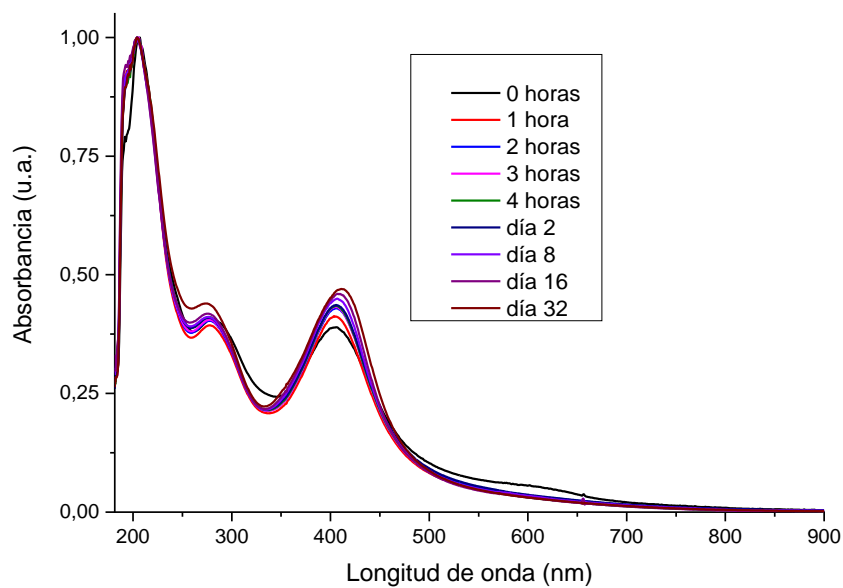


Histogramas del tamaño de las nanopartículas sintetizadas con extracto de geranio, medidas mediante dispersión de luz dinámica (DLS). a) Histograma de las AgNPs sintetizadas a escala 1:10. b) Histograma de las AgNPs sintetizadas a escala 5:50.

Para analizar la estabilidad de las nanopartículas de plata que se formaron con esta síntesis, se tomó mediciones de espectrometría de absorción en un período de 30 días en intervalos de tiempo progresivos. Los espectros observados tanto para la escala 1:10 como para la 5:50 se presentan en la Figura 38 y 39 respectivamente.

Figura 38.

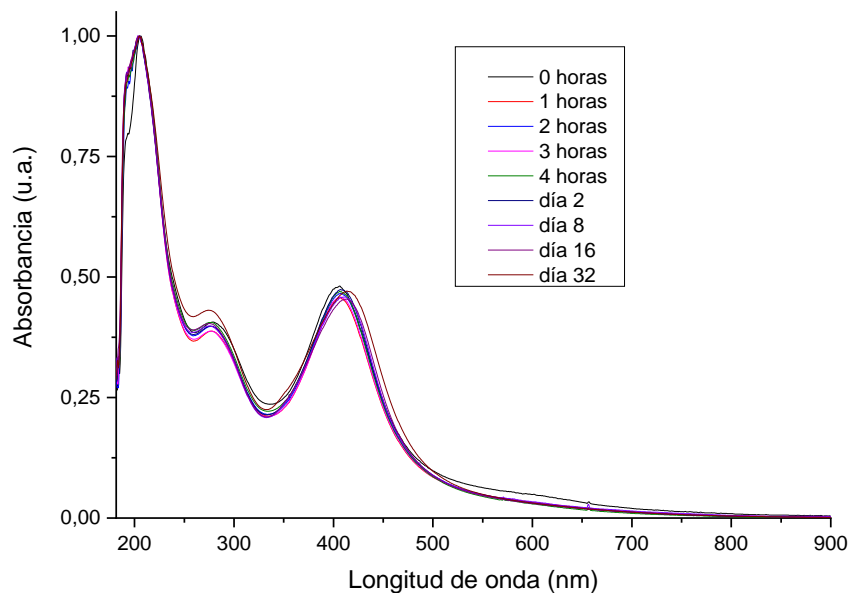
Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con P domesticum. Escala 10mL.



Espectrogramas de absorción de las AgNPs sintetizadas con 1mL de extracto de geranio con pH10.5 y 10 mL de nitrato de plata concentración 1.2mM, mediciones tomadas en un período de 32 días a intervalos progresivos.

Figura 39.

Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con P domesticum. Escala 50mL.



Espectrogramas de absorción de las AgNPs sintetizadas con 5mL de extracto de geranio con pH10.5 y 50 mL de nitrato de plata concentración 1.2mM, mediciones tomadas en un período de 32 días a intervalos progresivos.

La Figura 40 muestra la relación de la absorbancia que presenta la muestra en la longitud de onda de 406.5nm en función del tiempo, tanto para las AgNPs relación 1:10 como las de relación 5:50. Se graficó en una escala logarítmica para el eje del tiempo ya que los periodos de medición fueron establecidos en períodos progresivos de 0, 1, 2 y 4 horas desde el inicio de la síntesis y de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 días a partir del fin de la síntesis. Los puntos observados se encuentran entre los límites 0,9 y 1,1 con su media en 1. Es decir que en un período de 32 días la medición de la banda de absorbancia en los 400 nanómetros, para las dos muestras, se ha mantenido estable alrededor de un valor de 1 en unidades de absorbancia, por lo que se concluye que en el período de tiempo de 30 días las AgNPs sintetizadas con extracto de geranio son estables, tanto en una escala baja como en una escala media.

Figura 40.

Análisis de estabilidad AgNPs con P domesticum. Escala 10mL y 50mL.

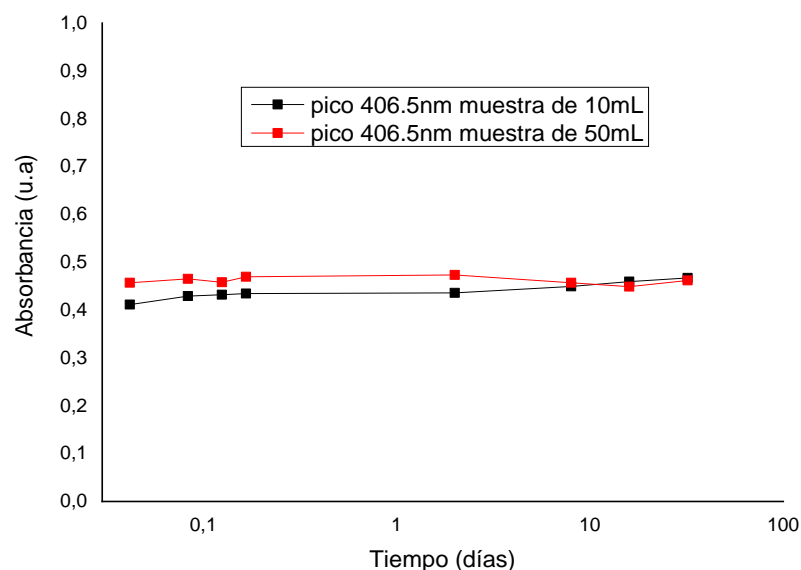


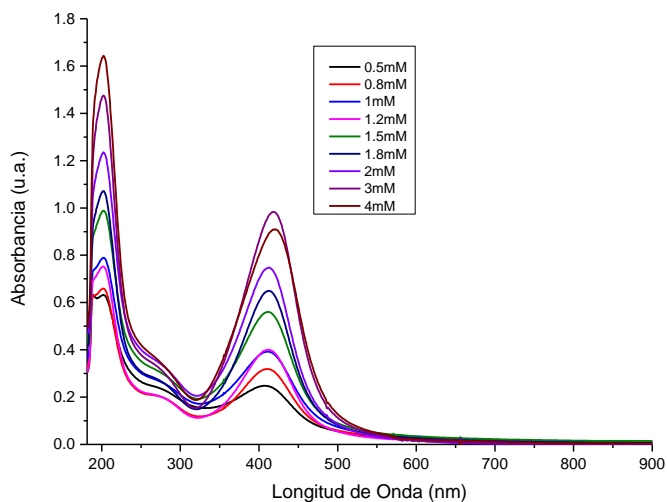
Diagrama de absorbancia en la longitud de onda de 400nm en función del tiempo transcurrido para las muestras de 10mL y 50mL de AgNPs en una escala logarítmica para el eje del tiempo.

Al igual que con el proceso del extracto de *P. domesticum*, se desarrollaron varios experimentos para el extracto de *R. myrtifolius* modificando los parámetros de concentración del nitrato de plata y el pH del extracto.

Los primeros resultados se desarrollan manteniendo el pH del extracto en 11 y variando la concentración del AgNO_3 , estos arrojaron los espectros de absorbanza presentados en la Figura 41 y los tamaños medidos por DLS de la Tabla 6.

Figura 41.

Espectros de absorción, AgNPs con extracto de *R. myrtifolius* y AgNO_3 . Variación de concentración



Espectro de absorbanza de los experimentos desarrollados con el extracto de *R. myrtifolius* para la síntesis de las nanopartículas de plata con extracto de carrasquilla con pH11 y diferentes concentraciones de nitrato de plata.

Tabla 6.

Tamaño promedio de las AgNPs de *R. myrtifolius*, técnica DLS, variación de concentración.

AgNPs	0,5mM	0,8mM	1mM	1,2mM	1,5mM	1,8mM	2mM	3mM	4mM
Media [nm]	112,3	79,6	23,7	21,5	30,2	24,6	21,5	27,3	22,2
Mediana [nm]	184,4	132,3	38,7	20,6	80,6	51,3	22,6	39,5	23,1
Desviación Estandar [nm]	219,3	128,7	43,2	6,1	97,1	62,8	7,4	40,4	7,1

Sintetizadas con AgNO_3 en varias concentraciones y extracto de *R. myrtifolius* pH 11

De lo observado en los resultados, se concluye que la concentración del nitrato de plata influye directamente en la intensidad de la banda alrededor de los 400nm correspondiente a las AgNPs según la literatura, es decir que tiene influencia directa sobre la cantidad de AgNPs

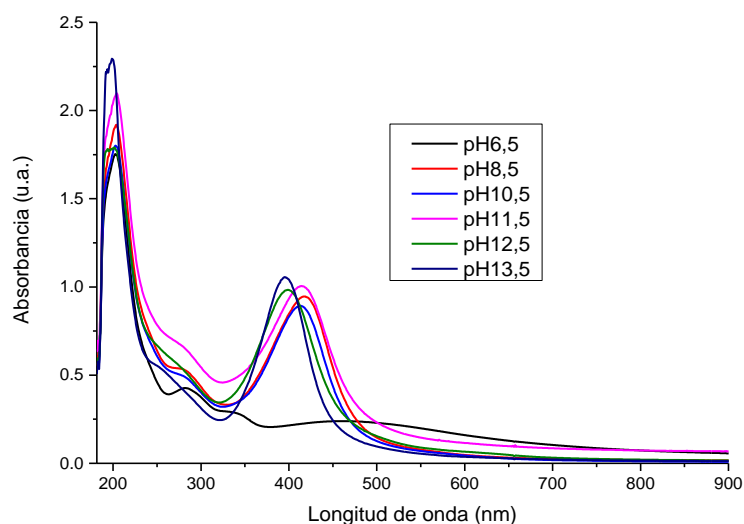
que se formaron. En los tamaños se observa que los resultados obtenidos son similares a los observados para el geranio, descartamos entonces concentraciones inferiores a 1mM y se observa que los resultados para concentraciones mayores son similares, por lo que se toma la concentración 1.2mM al igual que la que se utilizó con el geranio.

Una vez establecido el valor de la concentración del nitrato de plata, se desarrolló experimentos para observar la respuesta en la formación de AgNPs cuando modificamos el pH del extracto, estos resultados son resumidos en el espectrograma de absorción de la Figura 42 y la Tabla 7 del tamaño medido con DLS.

En el espectrograma se observa que existe una relación directa entre el pH y la intensidad de absorbancia y por lo tanto en la forma y ancho de la banda. Al comprobar los tamaños observados, se concluye que el proceso más eficiente para el desarrollo de las AgNPs de esta investigación, es utilizando un pH de 8,5.

Figura 42.

Espectros de absorción, AgNPs con extracto de R. myrtifolius y AgNO₃. Variación de pH's.



Espectro de absorbancia de los experimentos desarrollados con AgNO₃ concentración 1.2mM y extracto de carrasquilla preparado al momento de la síntesis de AgNPs, variando su pH a valores de 6.5, 8.5, 10.5, 11.5, 12.5 y 13.5 con NaOH 1N.

Tabla 7.

Tamaño promedio de las AgNPs de R. myrtifolius, técnica DLS, variación de pH.

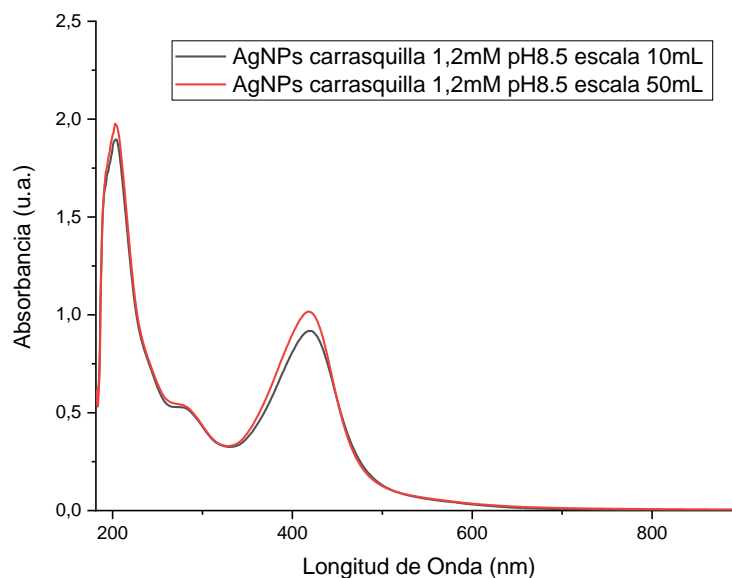
AgNPs	pH6.5	pH8.5	pH10.5	pH11.5	pH12.5	pH13.5
Media [nm]	107,5	30,6	32,2	38,8	28,5	23,6
Mediana [nm]	114,1	31,1	55,2	101,8	38,7	24,0
Desviación Estandar [nm]	41,5	7,6	61,4	96,2	40,1	5,5

Sintetizadas con AgNO₃ concentración 1.2mM y extracto de R. myrtifolius varios pH's

El proceso de síntesis de nanopartículas de plata utilizando extracto de carrasquilla también fue caracterizado con la técnica de espectrometría UVVis y DLS. En un intervalo de tiempo de 30 días se estudió la estabilidad de las AgNPs, midiendo el espectro de absorción en intervalos progresivos de tiempo, estos picos máximos de la banda de absorción se compararon y dibujaron en función del tiempo de estudio, mostrando una linealidad entendida como estabilidad en el tiempo.

Figura 43.

Espectros de absorción, escalamiento de AgNPs con R. myrtifolius.

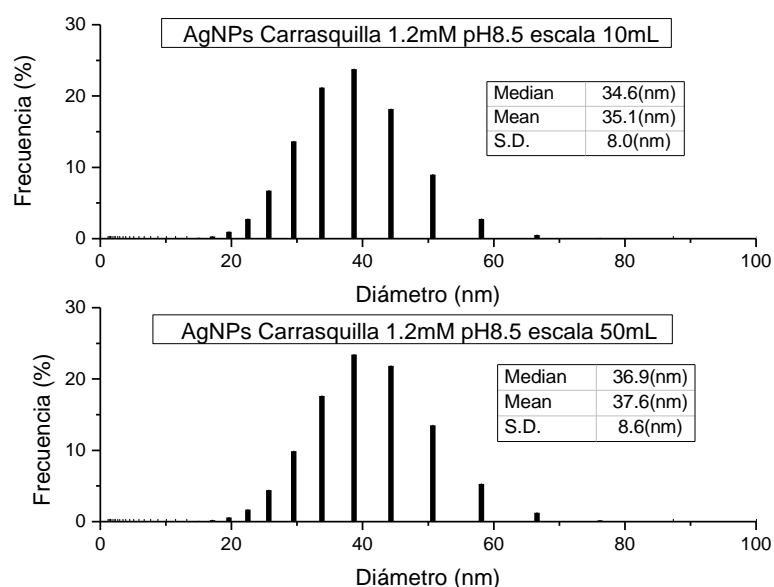


Espectrogramas de absorción de las AgNPs sintetizadas con 1mL de extracto de carrasquilla con pH8.5 y 10 mL y 50mL de nitrato de plata concentración 1.2mM.

La Figura 43 analiza la diferencia entre la banda de absorción para las AgNPs de carrasquilla, en escala 10mL y 50mL presentando valores de máxima intensidad alrededor de los 400nm demostrando la existencia de plata, y una mayor intensidad para la escala de 50mL. La Figura 44 presenta el histograma de los dos experimentos, y a diferencia de lo observado con el geranio, los resultados muestran valores medios y de desviación estándar similar para los dos experimentos.

Figura 44.

Histogramas del tamaño medido por DLS, escalamiento de AgNPs con R. myrtifolius.



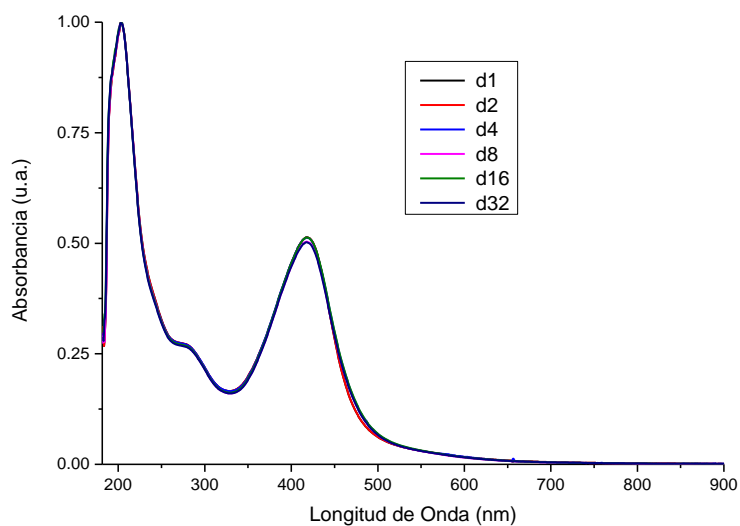
Histogramas del tamaño de las nanopartículas sintetizadas con extracto de carrasquilla, medidas mediante dispersión de luz dinámica (DLS). a) Histograma de las AgNPs sintetizadas a escala 10:1. b) Histograma de las AgNPs sintetizadas a escala 50:5.

Los resultados presentados en las Figuras 45, 46 y 47 demuestran una buena estabilidad en el período analizado, al observar que la forma del espectrograma se mantiene constante tanto en su intensidad como en el ancho de banda durante los 32 días de análisis, esto tanto para las AgNPs sintetizadas a escala 10:1 como la de 50:5. Además se comparan los espectrogramas de absorción y los tamaños observados en DLS de las dos diferentes escalas de nanopartículas

demostrando una gran similitud entre ambos procesos, de esto se puede concluir que el proceso de síntesis es eficiente y replicable.

Figura 45.

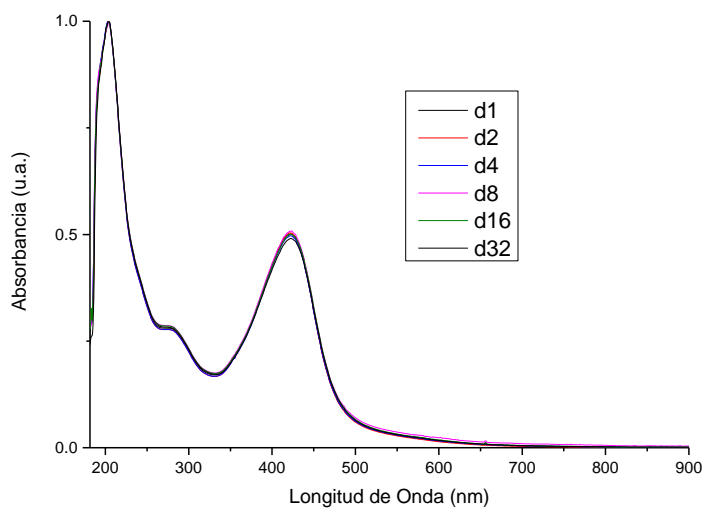
Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con R. myrtifolius. Escala 10mL.



Análisis de estabilidad mediante espectrogramas de absorción (Normalizados) UVVIS de las AgNPs sintetizadas con carrasquilla escala 10:1 en periodos progresivos en un tiempo total de 32 días.

Figura 46.

Espectros de absorción. Análisis de estabilidad AgNPs con R. myrtifolius. Escala 50mL.



Análisis de estabilidad mediante espectrogramas de absorción (Normalizados) UVVIS de las AgNPs sintetizadas con carrasquilla escala 50:5 en periodos progresivos en un tiempo total de 32 días.

Figura 47.

Análisis de estabilidad AgNPs con R. myrtifolius. Escala 10mL y 50mL.

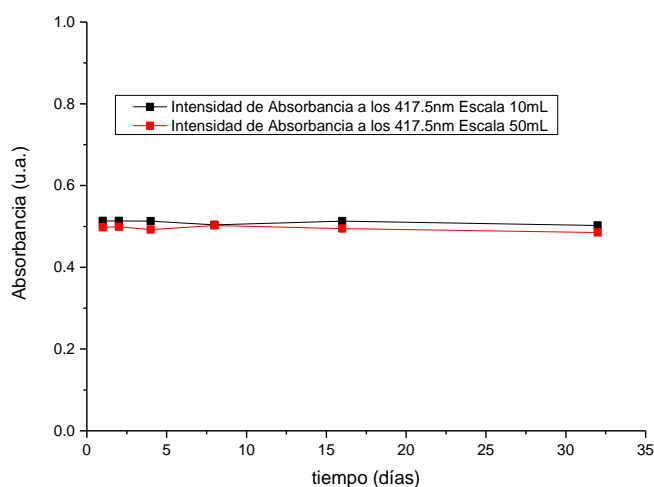


Diagrama de intensidad de absorción en la longitud de onda de 417.5nm en función del tiempo transcurrido para las muestras de 10mL y 50mL de AgNPs.

El objetivo de estos experimentos fue la obtención de un protocolo que permita la síntesis de AgNPs de un tamaño entre los 20 y 30nm y con una desviación estándar baja respecto al promedio de su tamaño. De esto se obtuvo que la mejor concentración de AgNO_3 es de 1,2mM para los dos casos y que la modificación del pH es necesaria y tiene una influencia directa sobre el tamaño de las nanopartículas. Aquí se observa que para la síntesis que utiliza los extractos del pétalo de geranio se requiere un pH más básico, lo cual tiene relación con lo observado en el espectro UV-Vis de los extractos. Debido a que la cantidad de antocianinas es menor en la flor de geranio, se requiere una mayor conjugación y adición de grupos OH y carbonilos para poder desarrollar la reducción de la plata y la formación de las nanopartículas en los tamaños esperados.

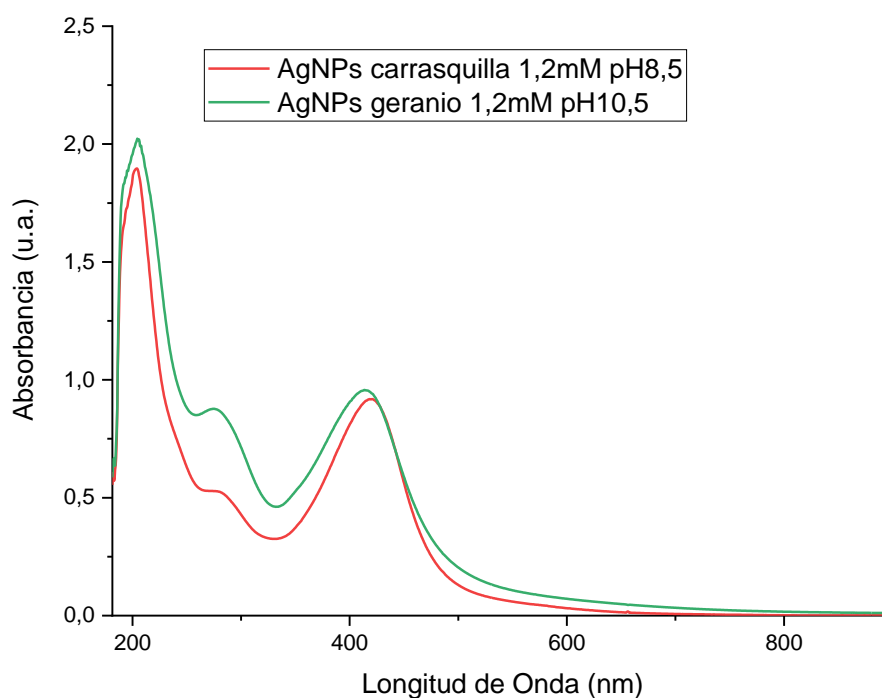
Para comprender las diferencias entre las AgNPs sintetizadas con los dos extractos, en la Figura 48 se presenta los espectros de absorción de cada una. Observando la intensidad de las bandas se comprueba que existe una mayor formación de nanopartículas utilizando el extracto de carrasquilla, lo cual tiene relación con lo concluido respecto a la cantidad de

antocianinas en los extractos. La diferencia que se observó en los extractos, respecto a la posición de la banda principal, se verifica también en la formación de las nanopartículas teniendo un mayor desplazamiento en las sintetizadas con el extracto de geranio.

La presencia de grupos OH debido a la conjugación de la molécula cuando el pH es modificado, cambia la estequiometría de la molécula, lo cual es observado en la absorción de la luz, sin embargo, precisamente la adición de estos grupos a la molécula es lo que permite la reducción del AgNO_3 a Ag_0 , y dependiendo de la cantidad de moléculas antocianinas se puede controlar la morfología y el tamaño de las AgNPs.

Figura 48.

Espectrogramas de absorción AgNPs geranio y carrasquilla



*Comparación de los espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *P domesticum* y *R.**

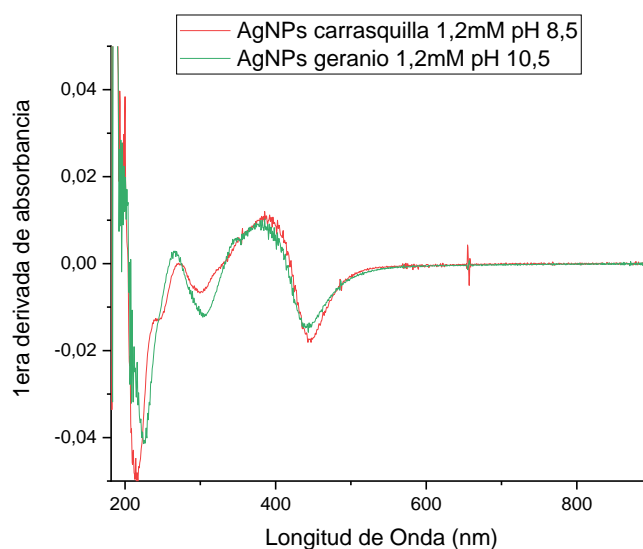
Myrtifolius

En la Figura 49 se presenta un nuevo análisis obtenido a partir de los espectros presentados en la Figura 48, utilizando herramientas de Origin se obtiene las curvas correspondientes a la

primera derivada de los espectros de las AgNPs y observando la longitud de onda en donde se presenta la intensidad máxima de las curvas y la ecuación $E=hc/\lambda$ se puede calcular la energía correspondiente a esa banda de absorción que coincide con la energía de la banda prohibida del material o E_{gap} (Rammah, Abouhaswa, Sayyed, Tekin, & El-Mallawany, 2019). Los resultados correspondientes a la E_{gap} de las AgNPs se presentan en la Tabla 8.

Figura 49.

Espectrogramas de absorción primera derivada AgNPs geranio y carrasquilla



*Comparación de la primera derivada de los espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *P. domesticum* y *R. Myrtifolius**

Tabla 8.

Longitud de onda y E_{gap} de las AgNPs.

	Longitud de onda	E_{Gap}
G-10	380.48	3.2587
G-50	382.65	3.2402
C-10	388.64	3.1902
C-50	387.52	3.1995

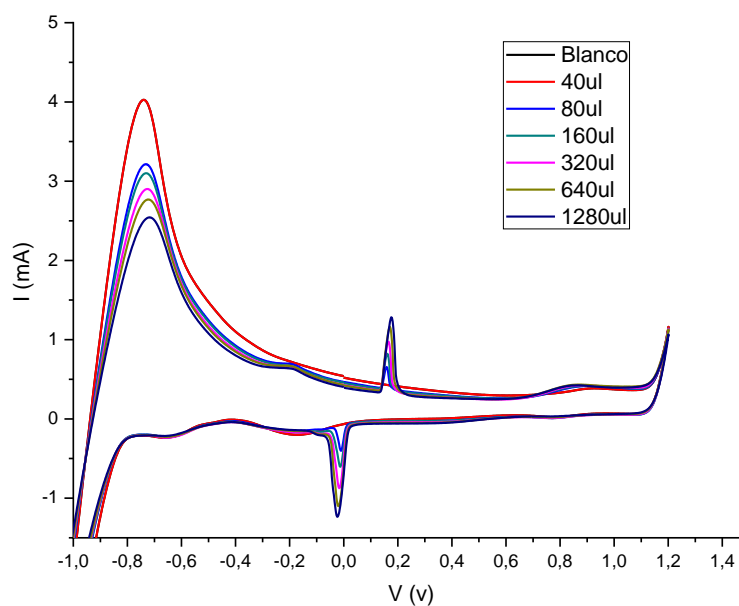
Resumen de la energía calculada para la longitud de onda correspondiente al punto de máxima intensidad de las curvas obtenidas de la primera derivada de los espectros de absorción de las AgNPs sintetizadas.

Caracterización por Voltametría Cíclica

El voltagrama de la Figura 50 muestra la relación que existe entre la intensidad de corriente y la cantidad de alícuota utilizada para la caracterización. Utilizando alícuotas desde 40uL hasta 1280uL de manera progresiva, en estos voltagramas se observa que en la corriente catódica existe un pico en un potencial de 0V característico de la reducción de la plata a plata cero valente o plata catiónica, mientras que en el análisis de la corriente anódica se observa un pico de corriente en el potencial de 0,18V característico del óxido de plata. En esta figura se puede inferir que la intensidad del pico, y por tanto las cantidad de $\text{Ag}(0)$ y Ag_2O , tiene relación directa con la concentración de precursores utilizados.

Figura 50.

Voltagrama AgNPs con P. domesticum



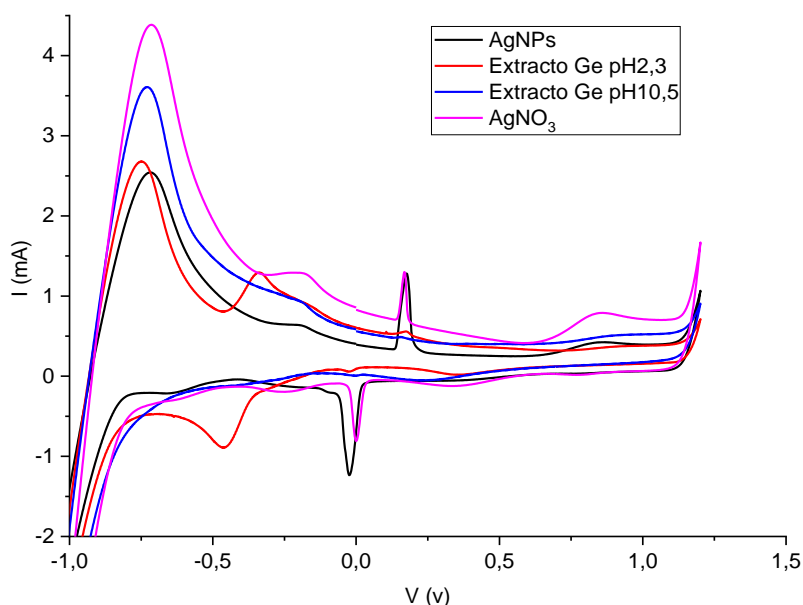
Caracterización mediante voltametría cíclica y comparación de los voltagramas obtenidos para alícuotas de 0, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280ul de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de geranio.

En la Figura 51, se compara los voltagramas de los extractos anteriormente analizados con los de AgNPs y de AgNO_3 . En ellos se puede comprobar que la presencia de plata solamente es observada en su precursor de nitrato de plata y en las nanopartículas, sin embargo, a pesar

de presentar los picos aproximadamente en los mismos potenciales, la intensidad de la muestra de AgNPs es mayor que la del nitrato de plata, esto debido a que por la presencia de Ag en forma catiónica o cero en mayor cantidad, esta tiene una reacción mayor con los electrones liberados en los diferentes potenciales del barrido de voltametría cíclica.

Figura 51.

Comparativos de Voltagramas de AgNPs, AgNO₃ y el extracto de P. domesticum



Caracterización mediante voltametría cíclica y comparación de los voltagramas obtenidos para alícuotas de 1280ul de extracto de geranio con pH2,3 (original), extracto de geranio pH10,5, nanopartículas de plata y nitrato de plata.

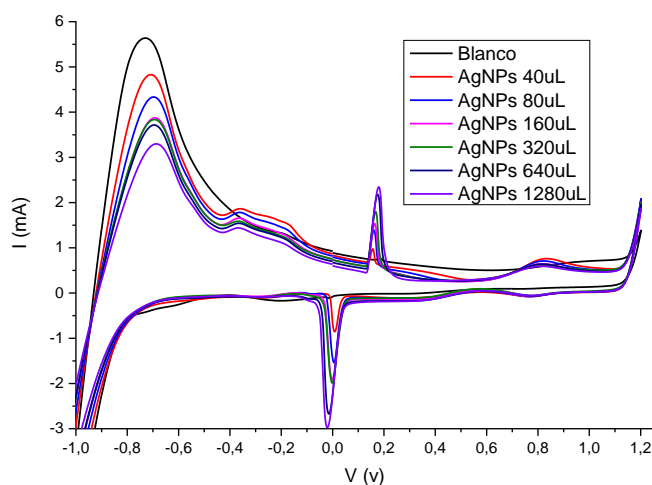
La Figura 51 se muestra también, el voltagrama obtenido para el extracto de geranio con pH original de 2,7 y el voltagrama para el extracto con pH 10,5. En el correspondiente al del extracto con pH 2,3 se observan picos tanto en la parte oxidativa como en la reductiva, mientras que, en el de pH 10,5 se observa un incremento de intensidad en la parte reductiva y se perdieron los de la parte oxidativa, lo cual corrobora la necesidad de modificar el pH del extracto para poder sintetizar nanopartículas de plata.

Al igual que con las nanopartículas sintetizadas con geranio se estudió las AgNPs de carrasquilla mediante voltametría cíclica con alícuotas desde 0 a 1280ul, y la gráfica de la alícuota de 1280ul se comparó con las curvas de sus precursores.

El voltagrama de la Figura 52 muestra la relación que existe entre la intensidad de corriente y la cantidad de alícuota utilizada para la caracterización, presentando un comportamiento similar al del proceso de síntesis con geranio.

Figura 52.

Voltagrama AgNPs con R. myrtifolius

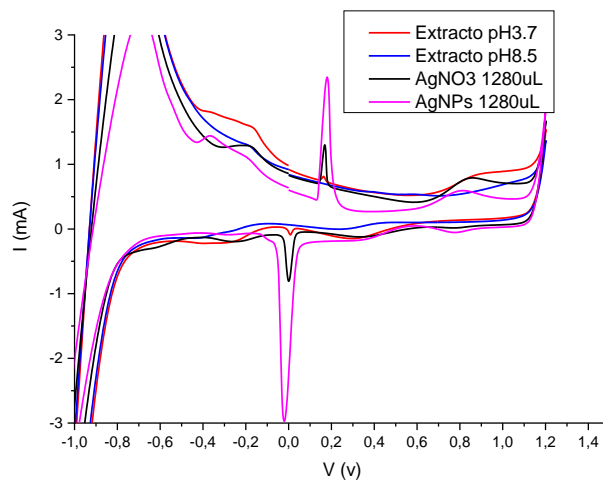


Caracterización mediante voltametría cíclica y comparación de los voltagramas obtenidos para alícuotas de 0, 40, 80, 160, 320, 640 y 1280ul de nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de carrasquilla

En la Figura 53 se compara los voltagramas de los extractos con los de AgNPs y de AgNO_3 . La intensidad de la muestra de AgNPs es mayor que la del nitrato de plata, por la presencia de Ag en forma catiónica o cero, esta tiene una reacción mayor con los electrones liberados en los diferentes potenciales del barrido de voltametría cíclica, sin embargo, el pico de corriente en la parte reductora es mucho más intenso que en la parte oxidativa, de lo cual se puede inferir que al cambiar el pH, la reducción de la plata a valores catiónicos o cero es más intensa que en el extracto de geranio.

Figura 53.

Comparativos de Voltagramas de AgNPs, AgNO₃ y el extracto de R. myrtifolius



Caracterización mediante voltametría cíclica y comparación de los voltamogramas obtenidos para alícuotas de 1280ul de extracto de carrasquilla con pH2,3 (original), extracto de carrasquilla pH10,5, nanopartículas de plata y nitrato de plata.

Caracterización TEM y STEM

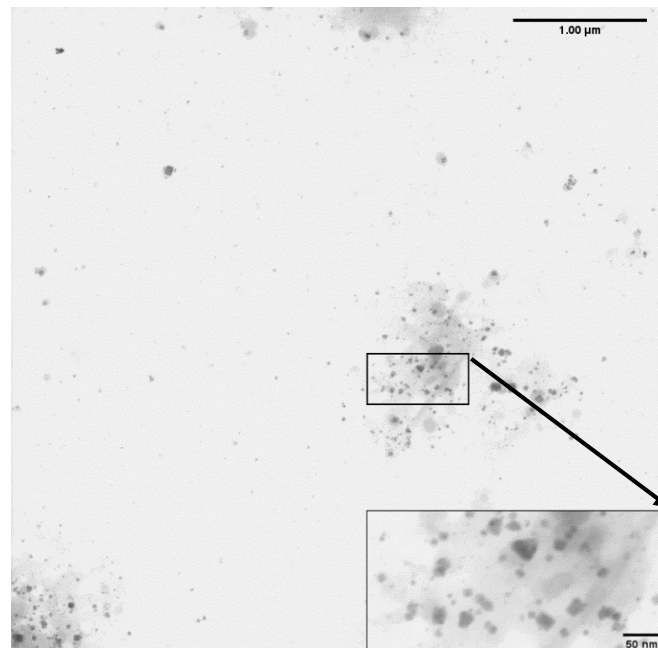
Utilizando la técnica STEM se capturó un total de 5 imágenes para cada una de las escalas (10mL y 50mL) como se observan en las Figuras 54 y 55.

De estas imágenes se obtuvo una estadística del tamaño y la morfología de las nanopartículas utilizando el software computacional Image J FIJI, con el cual se realizó un conteo de NPs y se calculó el tamaño promedio de estas, utilizando la aproximación del diámetro de Feret.

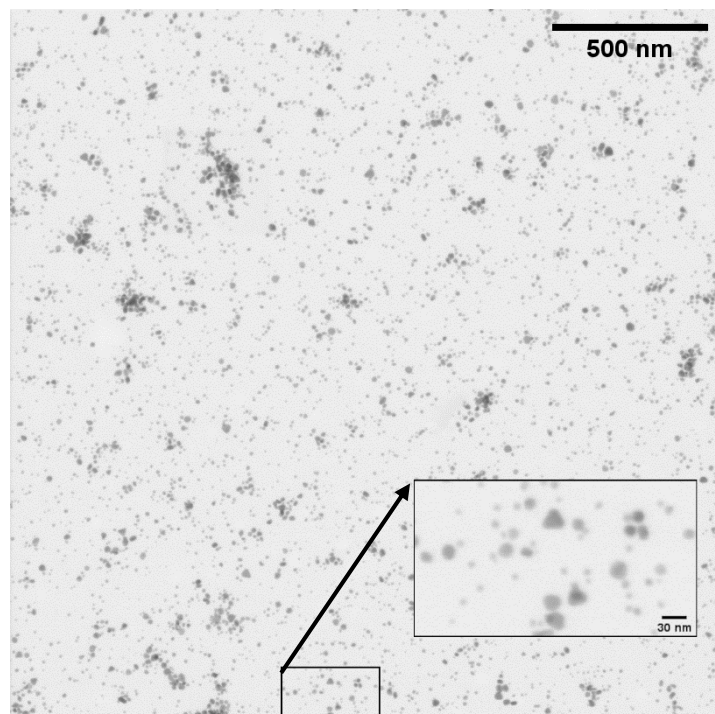
Las fotografías de la Figura 56 demuestran la formación de AgNPs de múltiples formas y tamaños, tanto para la escala de 10mL como para la de 50mL. Del análisis desarrollado con el conteo, se observa que la cantidad de AgNPs sintetizadas, es mucho mayor para el proceso realizado a una escala de 50mL que para la de 10mL. Los histogramas de la Figura 57 presentan el cálculo de AgNPs por unidad de área, con una densidad de 1.02×10^{10} AgNPs/cm² para la escala de 10mL y una densidad de 4.7×10^{10} AgNPs/cm² para la escala de 50mL.

Figura 54.

Caracterización técnica STEM. AgNPs de *P. domesticum*. Escala 10mL.

**Figura 55.**

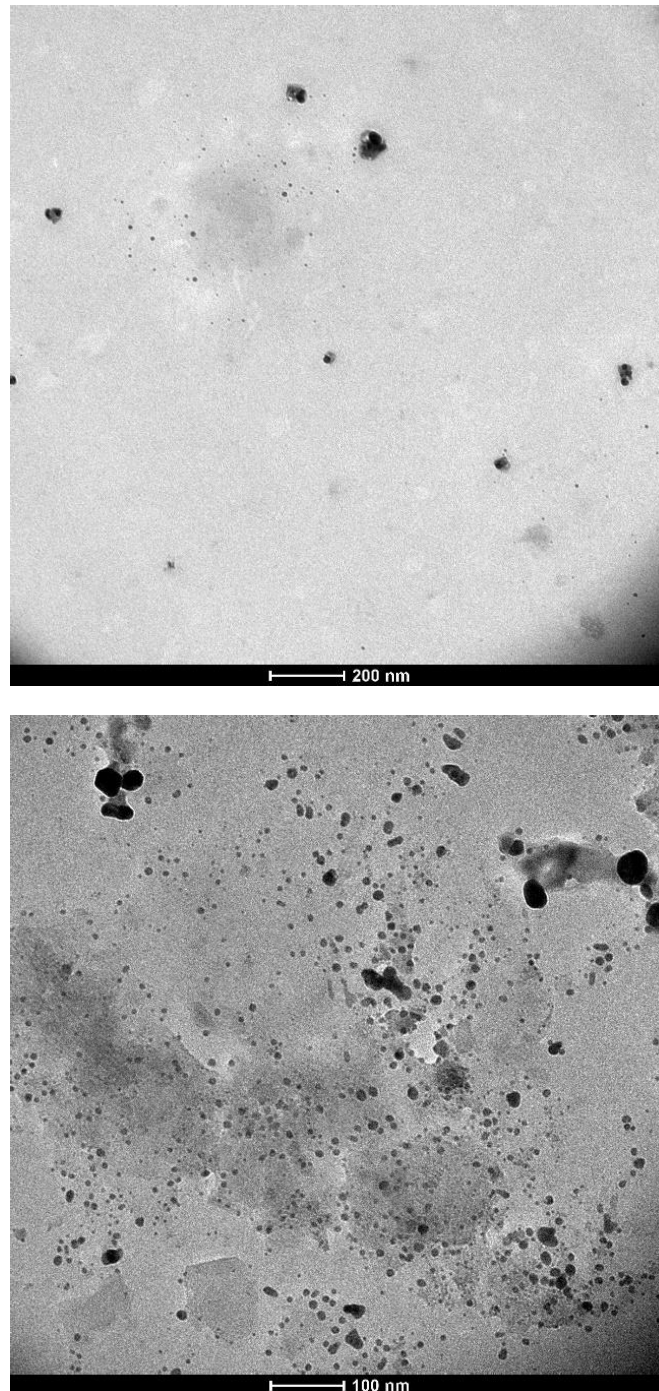
Caracterización técnica STEM. AgNPs de *P. domesticum*. Escala 50mL.



Caracterización mediante técnica STEM. Imágenes obtenidas de la muestra de AgNPs sintetizadas con extracto de geranio a pH10.5 y concentración 1.2mM de nitrato de plata, en escala de 10 y 50mL

Figura 56.

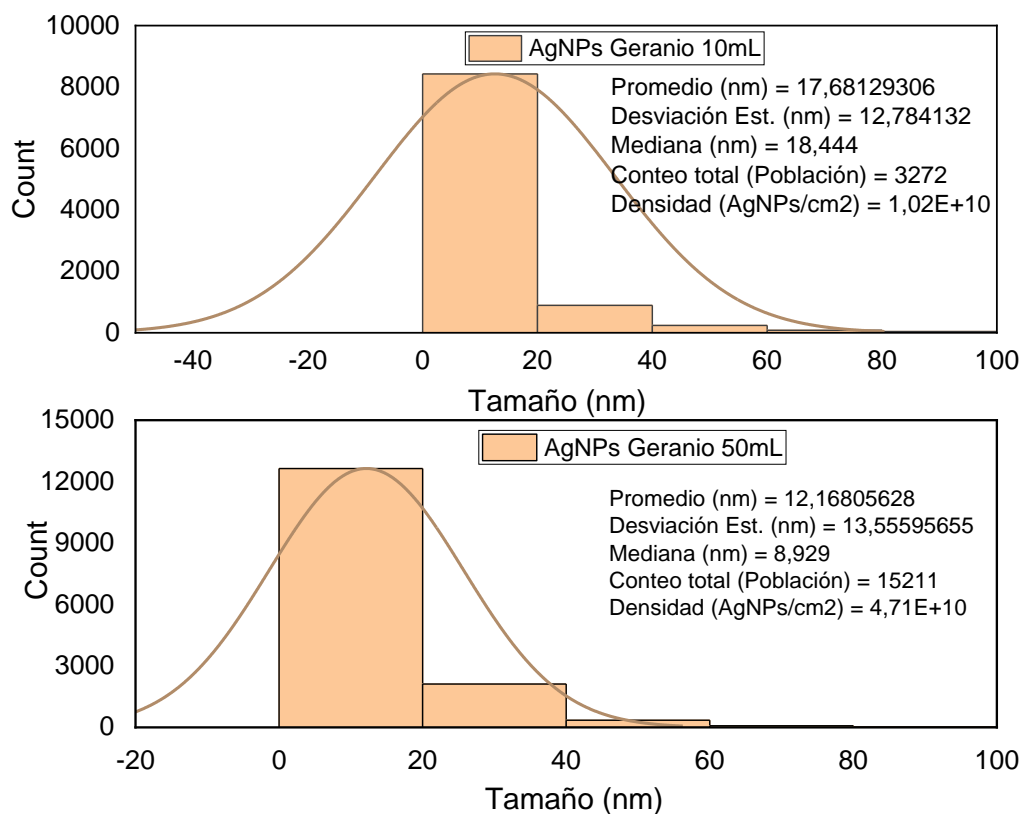
Caracterización técnica TEM. AgNPs de *P. domesticum*.



Imágenes, con microscopía electrónica de transmisión TEM, de las AgNPs sintetizadas con extracto de geranio a escala de 10mL (izquierda) y 50mL (derecha)

Figura 57.

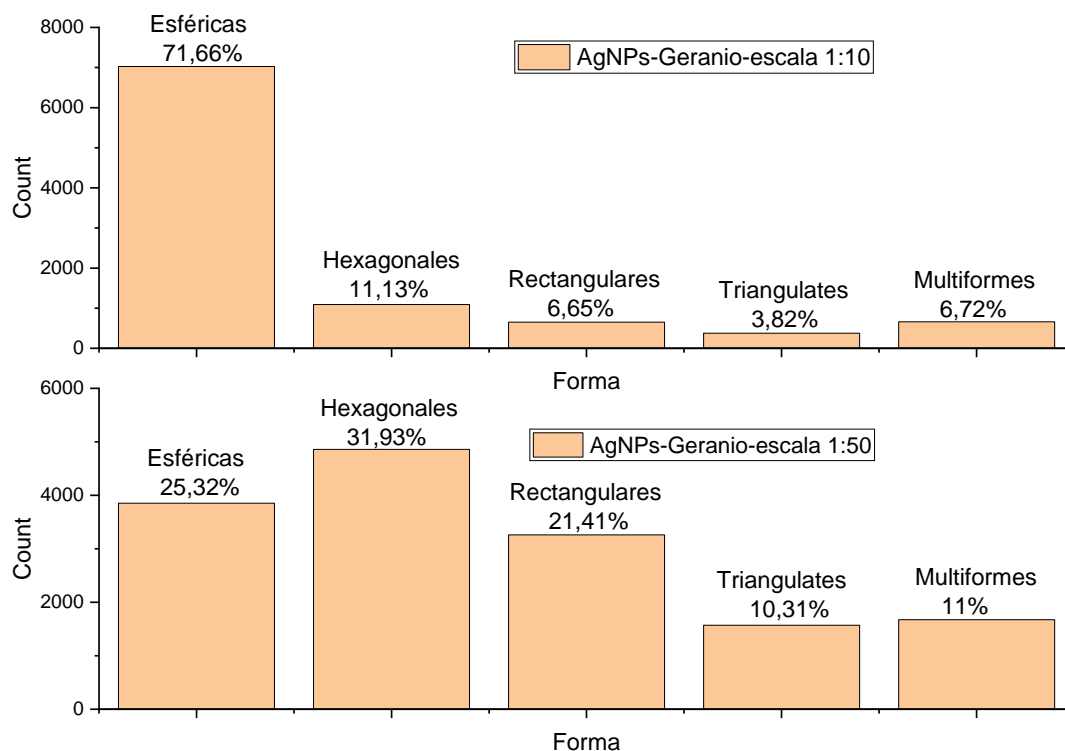
Histogramas del diámetro de feret de las AgNPs sintetizadas con el extracto de P. domesticum.



Finalmente, el estudio morfológico estadístico se desarrolló contando las nanopartículas de acuerdo a 5 tipos de formas definidas que son: esféricas, hexagonales, rectangulares, triangulares y multiformes. De lo observado en las Figuras 54-56 y con el histograma presentado en la Figura 58 se concluye que, para la concentración 5:50 existe una mayor formación de AgNPs de morfología esférica y hexagonal, pero existe un alto índice de formación de nanopartículas con otras morfologías, en especial rectangulares. Esta diversidad de morfología será un factor importante en la generación de energía eléctrica utilizando la MFC, cuyos resultados son analizados más adelante.

Figura 58.

Diagrama de barras de la distribución morfológica de las AgNPs con *P. domesticum*

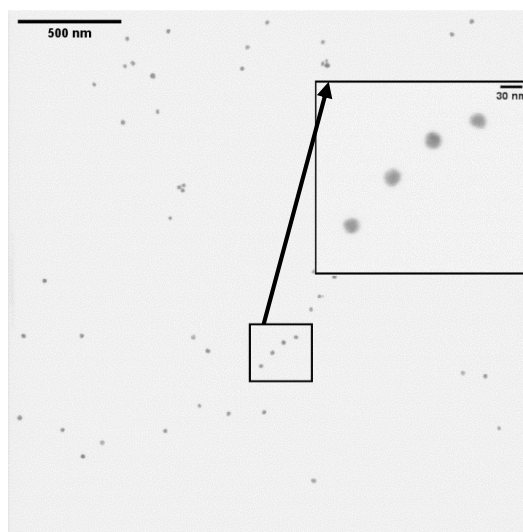


Se analizó también las imágenes obtenidas por STEM de las nanopartículas sintetizadas con extracto de carrasquilla (Figura 59 y 60), y se desarrolló los mismos análisis que para el proceso anterior. Figura 61.

En las imágenes de la Figura 62 se observa la formación de AgNPs homogéneas, es decir de tamaños y formas similares, tanto para la escala de 10mL como para la de 50mL, y a diferencia de las de geranio, el porcentaje de formas distintas a hexagonales o esféricas es mayor. Esta diversidad de morfología será un factor importante en la generación de energía eléctrica utilizando la MFC, cuyos resultados son analizados más adelante. Al igual que en el análisis del proceso anterior, la escala de 50mL presenta mayor cantidad de AgNPs, con una densidad de 1.24×10^{10} AgNPs/cm², mientras que para la de 10mL, una densidad de 6.53×10^8 AgNPs/cm².

Figura 59.

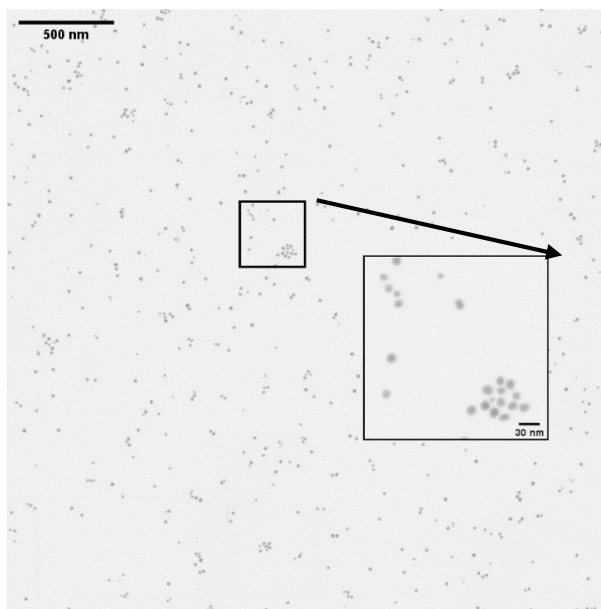
Caracterización técnica STEM. AgNPs de R. myrtifolius. Escala 10mL.



Caracterización mediante técnica STEM. Imagen obtenida de la muestra de AgNPs sintetizadas con extracto de carrasquilla a pH8.5 y concentración 1.2mM de nitrato de plata, en escala de 10mL

Figura 60.

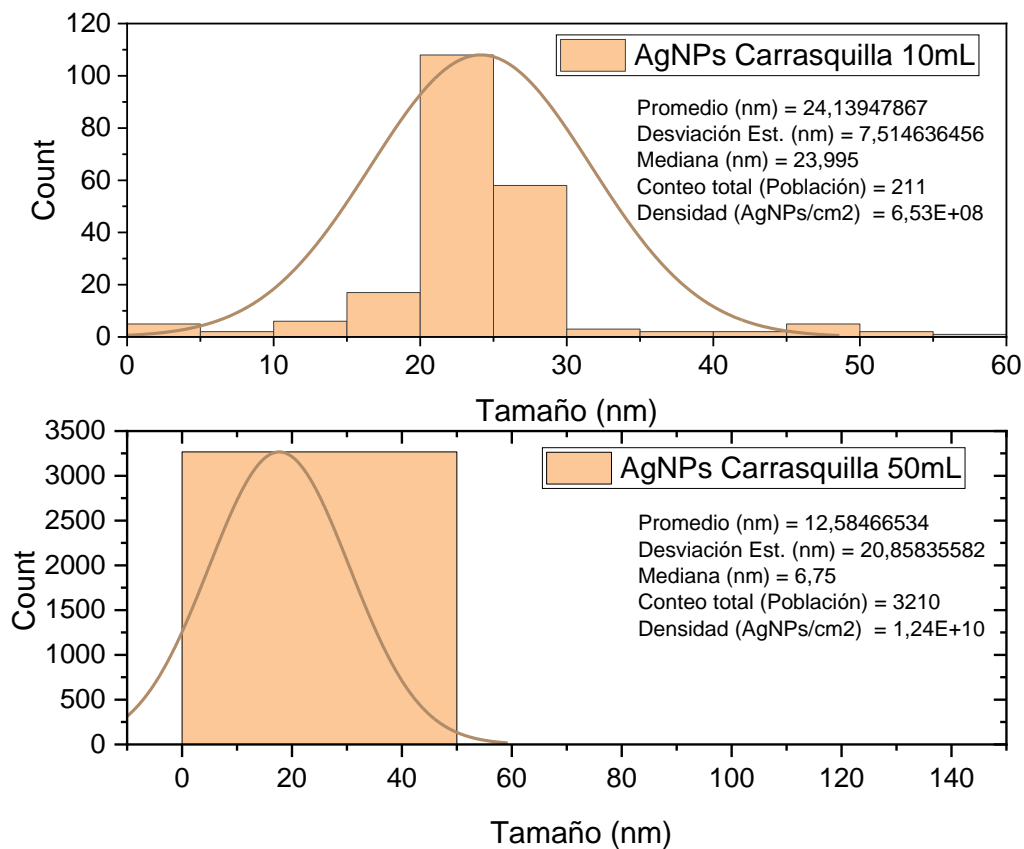
Caracterización técnica STEM. AgNPs de R. myrtifolius. Escala 50mL



Caracterización mediante técnica STEM. Imagen obtenida de la muestra de AgNPs sintetizadas con extracto de carrasquilla a pH8.5 y concentración 1.2mM de nitrato de plata, en escala de 50mL

Figura 61.

Histogramas del diámetro de Feret de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *R. myrtifolius*

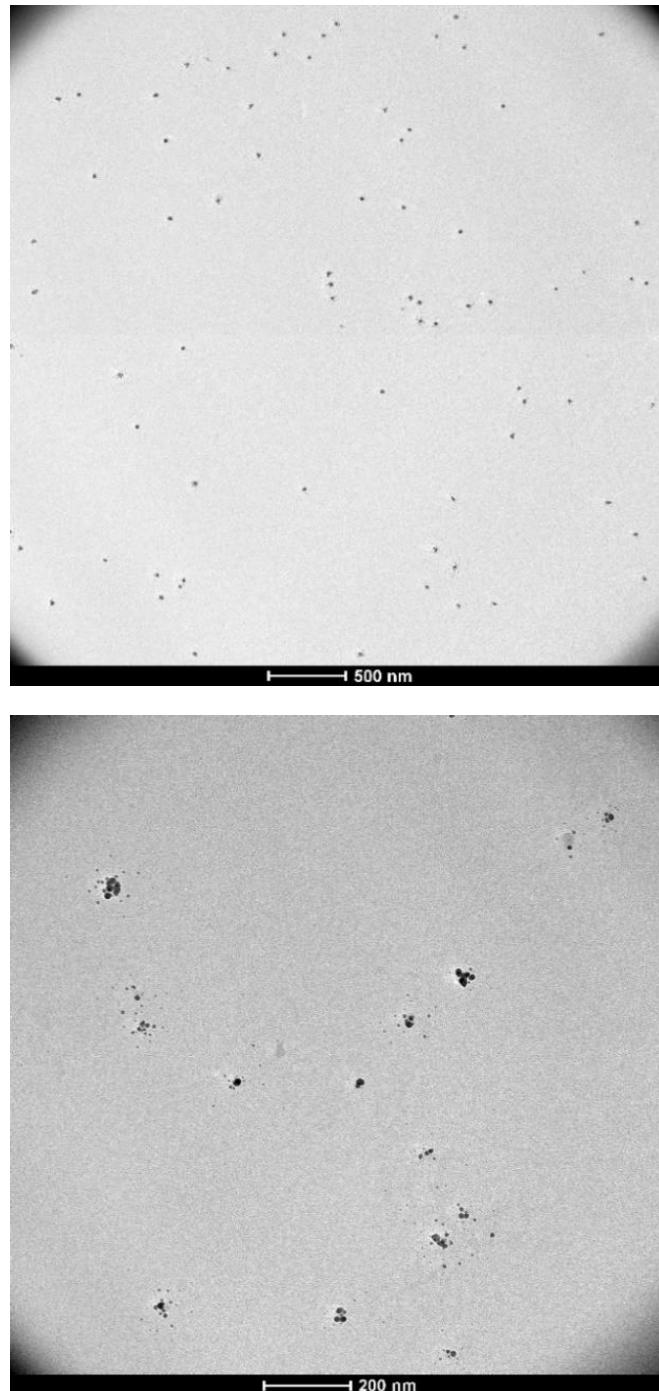


La Figura 63 muestra que, para el proceso de síntesis con carrasquilla, la formación de nanopartículas es más homogénea con una tendencia a la morfología hexagonal – esférica.

En la Figura 64 se compara los datos de morfología de las AgNPs, en ella se observa que las de carrasquilla son más homogéneas, pero con menor densidad por unidad de área. Mientras que, las de geranio tienen mayor diversidad de tamaño, morfología y una mayor densidad por unidad de área.

Figura 62.

Caracterización técnica TEM. AgNPs de *R. myrtifolius*.



Imágenes, con microscopía electrónica de transmisión TEM, de las AgNPs sintetizadas con extracto de carrasquilla a escala de 10mL (izquierda) y 50mL (derecha)

Figura 63.

Diagrama de barras de la distribución morfológica de las AgNPs con *R. myrtifolius*.

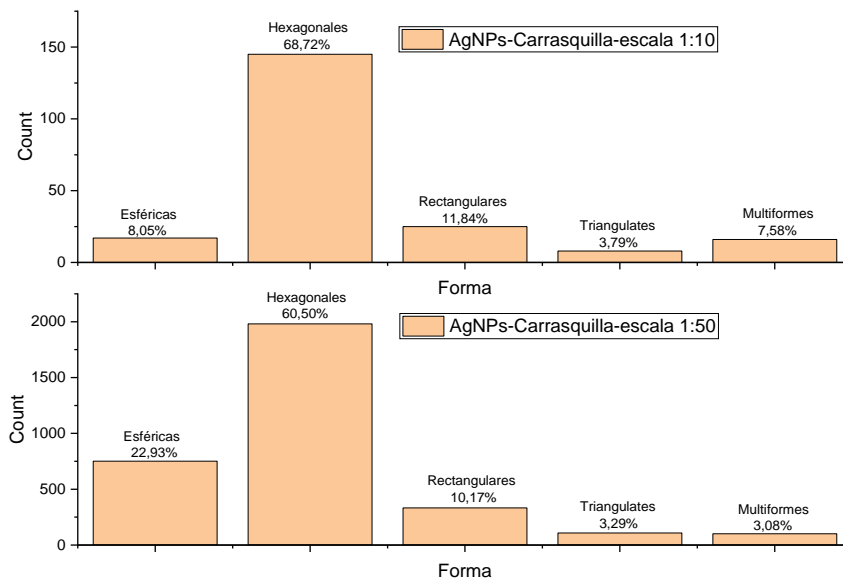


Figura 64.

Comparación de la distribución morfológica de las AgNPs de *P. domesticum* y *R. myrtifolius*.

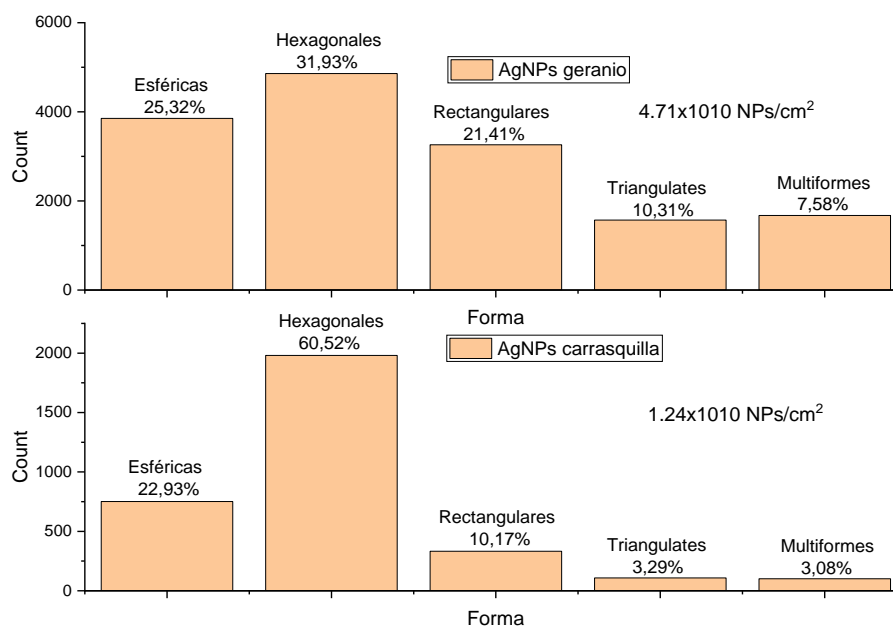


Tabla 9.

Resumen morfológico de las AgNPs sintetizadas.

Extracto Utilizado	Densidad de AgNPs/cm ²	Esféricas	Hexagonales	Rectangulares	Triangulares	Multiformes
<i>P. domesticum</i> (1:10)	1.02x10 ¹⁰	71.66%	11.13%	6.65%	3.82%	6.72%
<i>P. domesticum</i> (5:50)	4.71x10 ¹⁰	25.32%	31.93%	21.41%	10.31%	11%
<i>R. myrtifolius</i> (1:10)	6.53x10 ⁸	8.05%	68.72%	11.64%	3.79%	7.58%
<i>R. myrtifolius</i> (5:50)	1.24x10 ¹⁰	22.93%	60.52%	10.17%	3.29%	3.08%

Tabla de resumen de la morfología y densidad de AgNPs sintetizadas en el desarrollo experimental

Luego del análisis estadístico desarrollado para encontrar la densidad de AgNPs por cm² y su morfología, se concluye que el proceso de síntesis que utiliza el extracto de *P. domesticum* presenta una mayor formación de nanopartículas (4.71x10¹⁰ AgNPs/cm²) respecto a su oponente (1.24x10¹⁰ AgNPs/cm²), pero también una variedad de formas, mientras que el proceso de *R. myrtifolius* tiene una elevada formación de AgNPs circulares y hexagonales.

La intensidad del espectro UV-Vis de las antocianinas del *R. myrtifolius* fue mayor que la del *P. domesticum*, y su efecto barocrómico fue menor, esto es debido a la adición de grupos OH en la molécula. La mayor cantidad de antocianinas conjugadas y por lo tanto de grupos OH es la responsable de que la formación de AgNPs con carrasquilla tengan una mejor distribución en su morfología.

Caracterización XRD

Los espectrogramas de difracción de rayos X muestran la intensidad de absorción de la muestra en un barrido de la muestra, este barrido medido en grados es el que se muestra en el eje de las ordenadas en los espectros. Las Figuras 65 – 68, analizan las mediciones obtenidas de las muestras de nanopartículas de plata sintetizadas para comprobar cualitativamente la formación de plata cero y no de algún compuesto de plata.

Para la Figura 65 se grafica el espectro de una muestra de óxido de plata (Ag_2O), que fue sintetizada utilizando nitrato de plata (AgNO_3) e hidróxido de sodio (NaOH) formando precipitados de óxido de plata y agua.

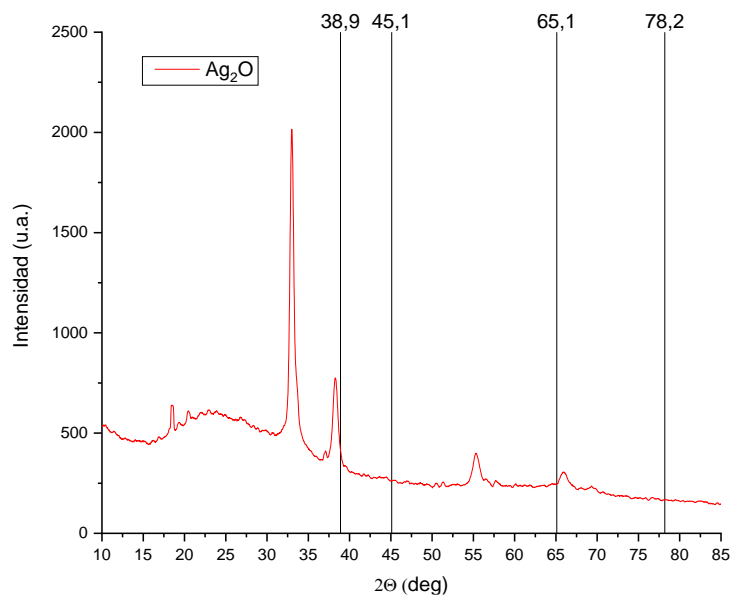


El espectro obtenido se compara con los planos cristalográficos de plata cero obtenida de base de datos del equipo de XRD, y se observa que solamente coincide en el plano $\langle 111 \rangle$ a los 38.9° mientras que los demás planos no tienen coincidencia con los picos observados en el espectrograma.

En las Figuras 66 y 67 se muestran los espectrogramas de las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de geranio y carrasquilla respectivamente, y al igual que en la figura anterior se compara con los planos de la base de datos. Los picos se observan en los ángulos 38.01° , 44.2° , 64.4° y 77.43° para las AgNPs de Geranio y en 38.08° , 44.1° , 64.4° y 77.4° para las AgNPs de carrasquilla. Comparando estos ángulos con los mostrados en las bases de datos del equipo que están en los 38.9° , 45.1° , 65.1° y 78.2° y corresponden a los planos $\langle 111 \rangle$, $\langle 200 \rangle$, $\langle 220 \rangle$ y $\langle 311 \rangle$ de la fase fcc de plata cero (Ag^0), se observa que los picos están desplazados, esto se debe a que la preparación de la muestra fue hecha en un porta muestras y no en un holder por la cantidad de muestra lograda, la diferencia de altura entre el porta muestra y la muestra genera este desplazamiento. El análisis desarrollado con el equipo presenta un porcentaje de aceptación de 72% y 80% para las AgNPs de geranio y carrasquilla respectivamente. En la Figura 68 se presentan las gráficas analizadas en un mismo eje para comprobar la posición de los picos y de los ángulos de las mediciones.

Figura 65.

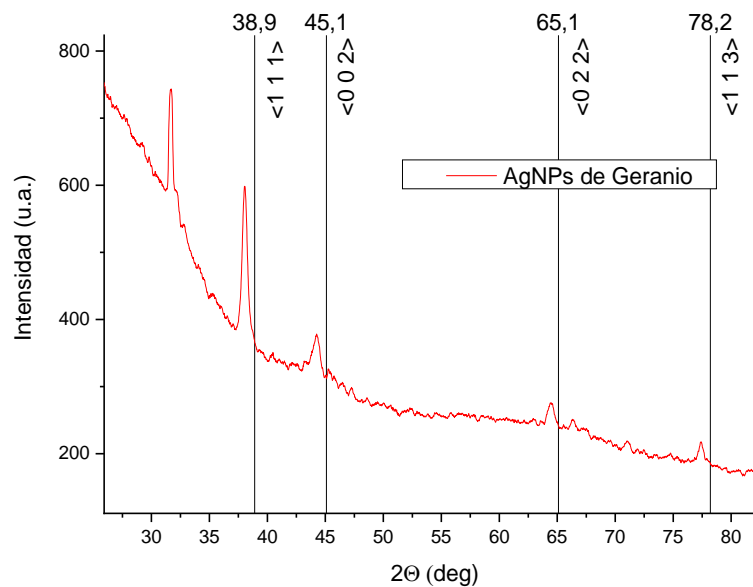
Caracterización de Ag_2O por XRD.



Espectrograma de absorción de rayos X de una muestra de óxido de plata (Ag_2O) y en negro los ángulos correspondientes a los planos cristalográficos de plata pura.

Figura 66.

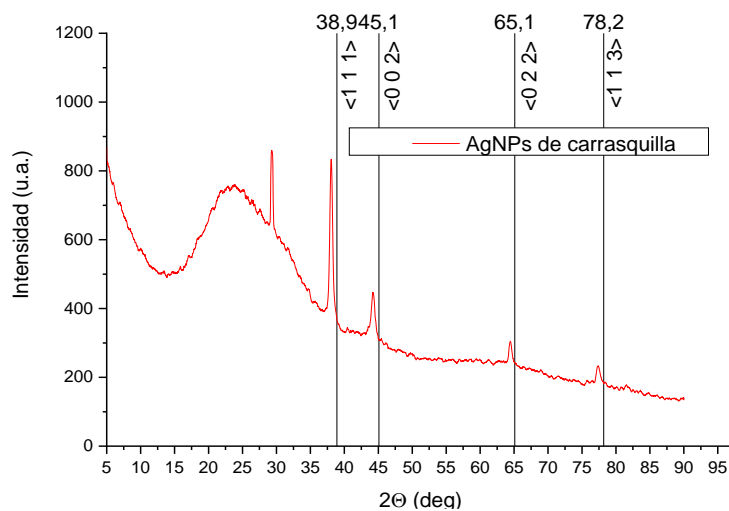
Caracterización de AgNPs de *P. domesticum* por XRD.



Caracterización mediante técnica XRD, espectrograma de absorción de rayos X de una muestra de AgNPs sintetizadas con extracto de geranio y en azul los ángulos correspondientes a los planos cristalográficos de plata pura.

Figura 67.

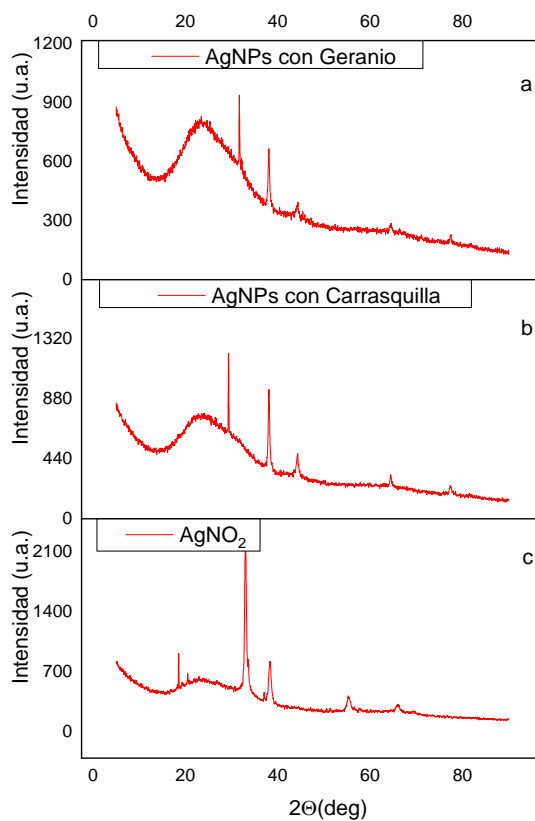
Caracterización de AgNPs de *R. myrtifolius* por XRD.



Espectrograma de absorción de rayos X de una muestra de AgNPs sintetizadas con extracto de carrasquilla y en azul los ángulos correspondientes a los planos cristalográficos de plata.

Figura 68.

Comparación de espectrogramas de XRD.



a) AgNPs de geranio, b) AgNPs de carrasquilla, y c) óxido de plata.

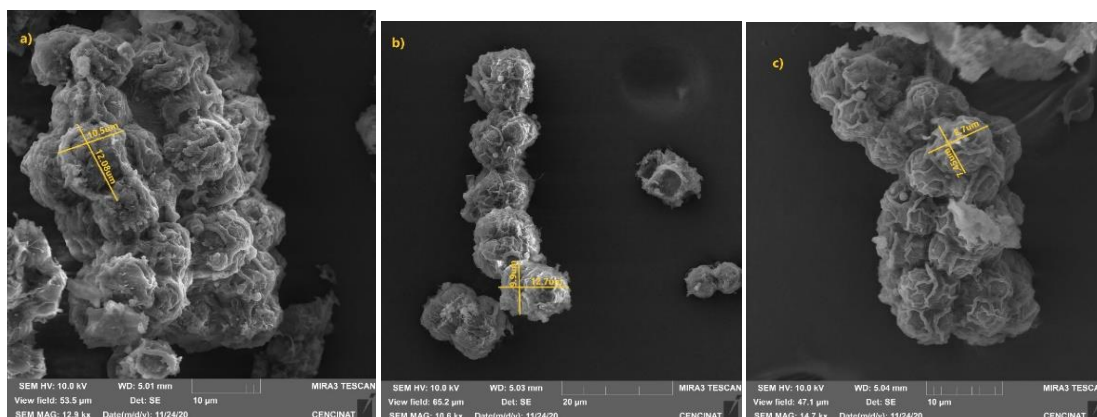
Caracterización del organismo híbrido

Caracterización SEM

La caracterización por SEM fue utilizada para analizar el material híbrido, primero un análisis de la cianobacteria identificando su forma, tamaño y estructura. Así también el análisis de contraste de luz de la imagen para observar la presencia de materiales no orgánicos en los alrededores o en las paredes de la *Fischerella musicola*.

Figura 69.

Imágenes con la técnica SEM del organismo híbrido.



Imágenes obtenidas con la técnica SEM de las muestras de material híbrido de nanopartículas y cianobacterias. a) Imagen de la *F. musicola* sin nanopartículas, morfología rugosa en la que se observa la membrana mucilaginosa que permite la formación de colonias de microalgas. b) Híbrido de *F musicola* con AgNPs de carrasquilla. c) Híbrido de *F musicola* con AgNPs de geranio.

La Figura 69a analiza la cianobacteria sin AgNPs, observamos la morfología esférica o elipsoidal rugosa y se observa la membrana mucilaginosa que permite formar colonias de microalgas, el tamaño medido tiene valores de 10.5μm de ancho y 12μm de largo. La Figura 69b, la cianobacteria con AgNPs de carrasquilla, morfología esférica o elipsoidal rugosa con valores de 9.9μm de ancho y 12.7μm de largo, además, en la imagen se observa pequeñas aglomeraciones que contrastan en luz con el resto de la fotografía, estas aglomeraciones

podrían ser materiales ajenos a la cianobacteria, sea del medio de cultivo o las AgNPs. En la Figura 69c se observa las cianobacterias con AgNPs de geranio con 7.54um de ancho y 8.7um de largo.

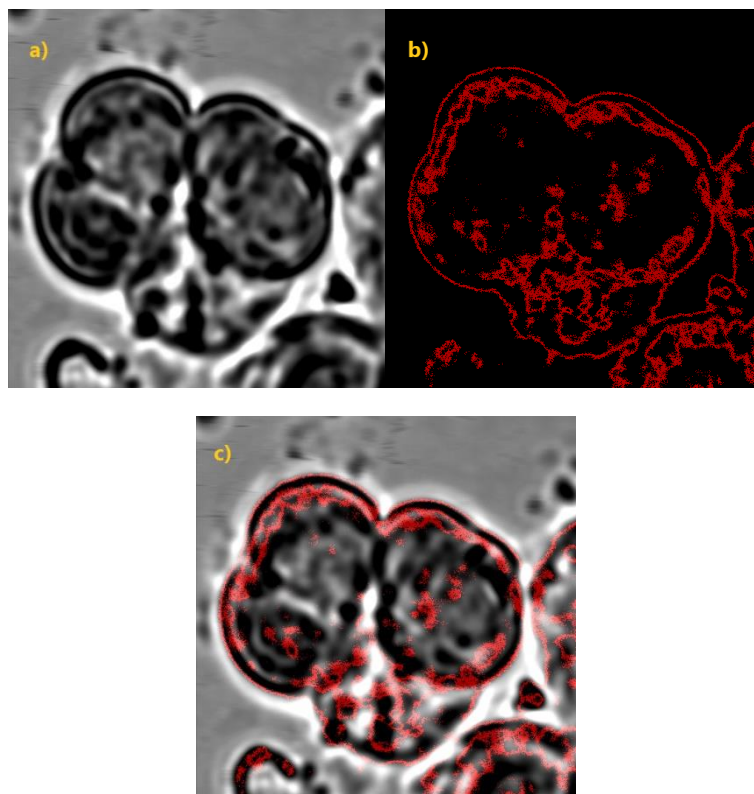
Caracterización por Microscopía Confocal

La adquisición de datos por microscopía confocal del material híbrido se realizó para identificar aglomeraciones de nanopartículas en las fronteras o en espacios de la membrana de las micro algas, para ello se capturó imágenes de auto fluorescencia de las algas e imágenes adquiridas de la difracción de la luz de las nanopartículas. Las imágenes fueron tratadas en el programa IMAGE J FIJI.

La Figura 70 muestra la adquisición de imágenes con el microscopio confocal del organismo híbrido Cys-AgNPs-G-C2, formado de AgNPs de geranio y *F. musicola*, el enfoque de adquisición fue puesto de tal manera que pueda observar el centro del organismo híbrido. La Figura 70a es una imagen obtenida en campo claro, donde observamos la morfología del organismo híbrido debido a la reflexión de la luz, la figura 70b adquiere la difracción presentada sobre las diferentes partes de la cianobacteria, logrando observar diferencias entre las barreras y el centro del organismo, lo cual indica la presencia de material no orgánico capas de dispersar la luz en la membrana del alga. Finalmente, la figura 70c es una superposición de las imágenes a y b para observar la ubicación de las aglomeraciones en el organismo híbrido.

Figura 70.

Imágenes con Microscopía Confocal del organismo híbrido.



Imágenes obtenidas con microscopía confocal. a) Imagen de la *F. musicola* con nanopartículas de geranio, adquisición realizada con campo claro a una magnitud de 100x. b) Imagen del organismo híbrido, adquisición realizada con adquisición de la dispersión de luz a una magnitud de 100x. Se observa la difracción de material no orgánico ubicado en la membrana de la cianobacteria. c) Superposición de imágenes para observar la posición de las aglomeraciones en la micro alga.

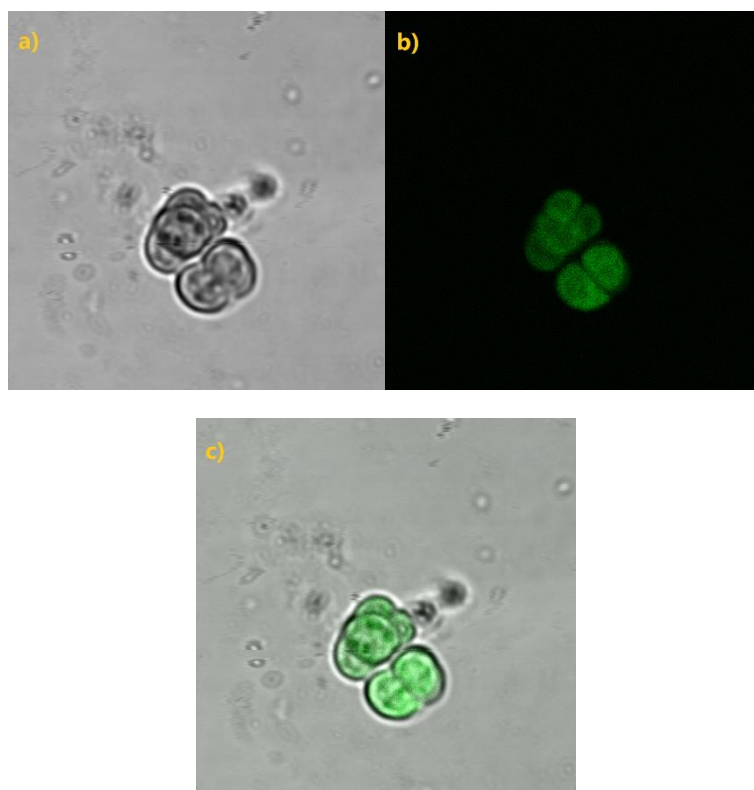
La Figura 71a obtenida con campo claro, la Figura 71b adquiere la auto fluorescencia de la *F. musicola*, mostrando la morfología completa del alga sin que se observe un contraste entre la membrana y su interior, a diferencia de la Figura 70b en la que si se observa una diferencia entre la membrana y el cuerpo de la cianobacteria y en la Figura 71c la superposición de las imágenes a y b.

Esta diferencia observada radica en la forma de adquisición, ya que, al adquirir la dispersión de la luz irradiada, medimos la misma energía pero que ha modificado su dirección debido a

la presencia de distintos elementos dentro del organismo (Figura 70b), lo cual infiere que existe no solo material orgánico en la célula. Mientras que cuando medimos la autofluorescencia medimos la radiación producto de la fluorescencia del alga, por este motivo observaremos solamente la fluorescencia emitida por la clorofila del alga, es decir material orgánico (Figura 71b).

Figura 71.

Imágenes con Microscopía Confocal de Fischerella muscicola.



Imágenes obtenidas con microscopía confocal. A) Imagen de la *F. muscicola* sin nanopartículas, adquisición realizada con campo claro a una magnitud de 60x. b) Imagen de la *F. muscicola* sin nanopartículas, adquisición realizada con adquisición de la dispersión de luz a una magnitud de 60x. Se observa la difracción de material no orgánico ubicado en la membrana de la cianobacteria. C) Superposición de imágenes para observar la posición de las aglomeraciones en la micro alga.

Caracterización EFM

La caracterización por AFM se desarrolló utilizando el modo EFM o de fuerza electrostática, por lo cual se obtuvo 3 imágenes por muestra, que corresponde a las imágenes de morfología o altura de la muestra, a la amplitud de la fuerza electrostática del perfil de la muestra y a la fase de la fuerza electrostática. Estas imágenes fueron obtenidas aplicando un potencial de -2v a 2v para la adquisición de las imágenes de amplitud y fase.

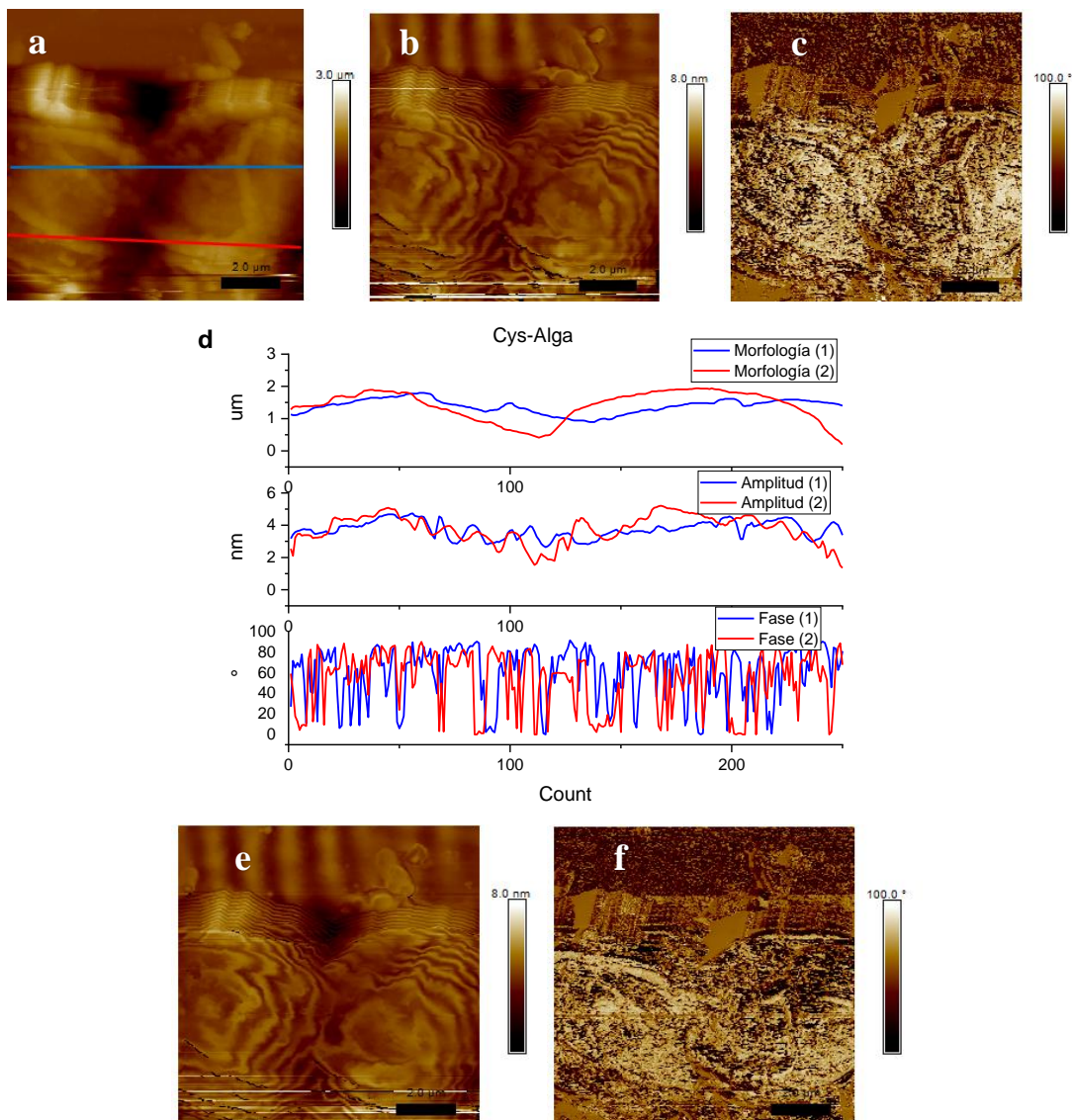
Para cada imagen se analizó dos segmentos de recta trazados sobre la imagen (Figura 72a) uno superior y otro inferior, que contenían la trayectoria con mayores cambios de contraste de la imagen, luego como se explicó en la sección 3.5.2 se obtuvo el perfil de intensidad que se analiza para cada imagen, luego estos datos fueron comparados en 3 aspectos importantes que se resumen en la Tabla 10. Estos parámetros de análisis son la amplitud de los picos más representativos, es decir se mide la diferencia entre el punto máximo alcanzado y un punto que corresponde a la curva de morfología medida, la altura máxima medida y el promedio de los datos adquiridos de la curva de fase.

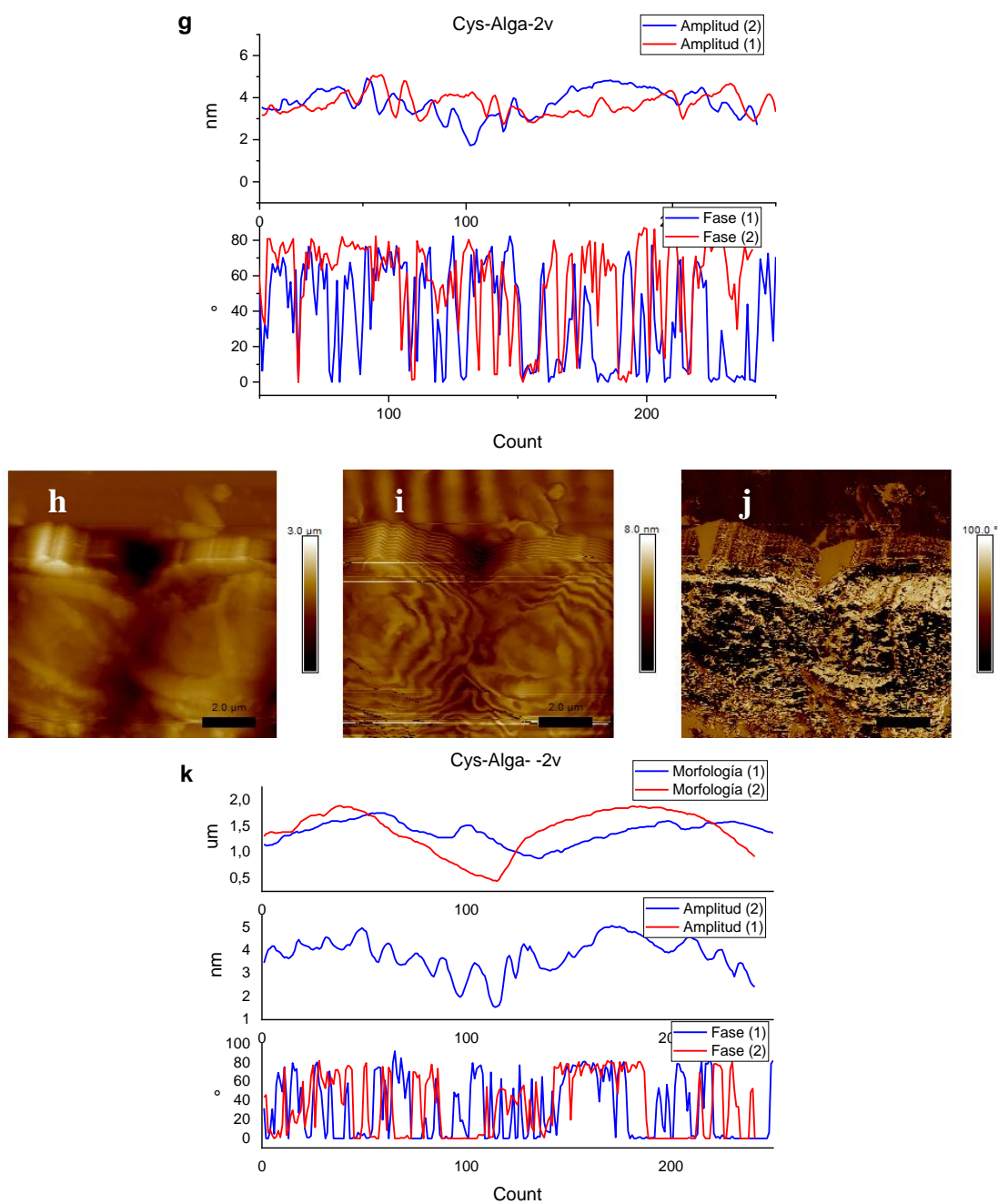
El primer análisis corresponde al sistema Cys-Alga, donde se observa las imágenes para los potenciales de 0v (Figura 72a, 72b y 72c), 2v (Figura 72e, y 72f) y -2v (Figura 72h, 72i y 72j), y los perfiles de intensidad para cada uno de los segmentos (72d y 72g). Se analizó el parámetro “diferencia de amplitud” (medida desde el punto más bajo al más alto de los picos más representativos de las curvas de amplitud) que presenta valores más altos al utilizar el potencial de -2v, además el promedio de los datos de amplitud de fase presenta valores menores a 50 es decir que presenta una tendencia a una fase negativa, en especial la medida a -2v. De las imágenes por su contraste se concluye que existen elementos que producen fuerzas electrostáticas negativas dentro de las algas o en su superficie.

Análisis similares fueron desarrollados para los demás sistemas de estudio, para comparar el comportamiento de las señales de amplitud y fase de manera cualitativa y también cuantitativa, resultados resumidos en la tabla 10.

Figura 72.

Análisis de la técnica AFM del Alga.

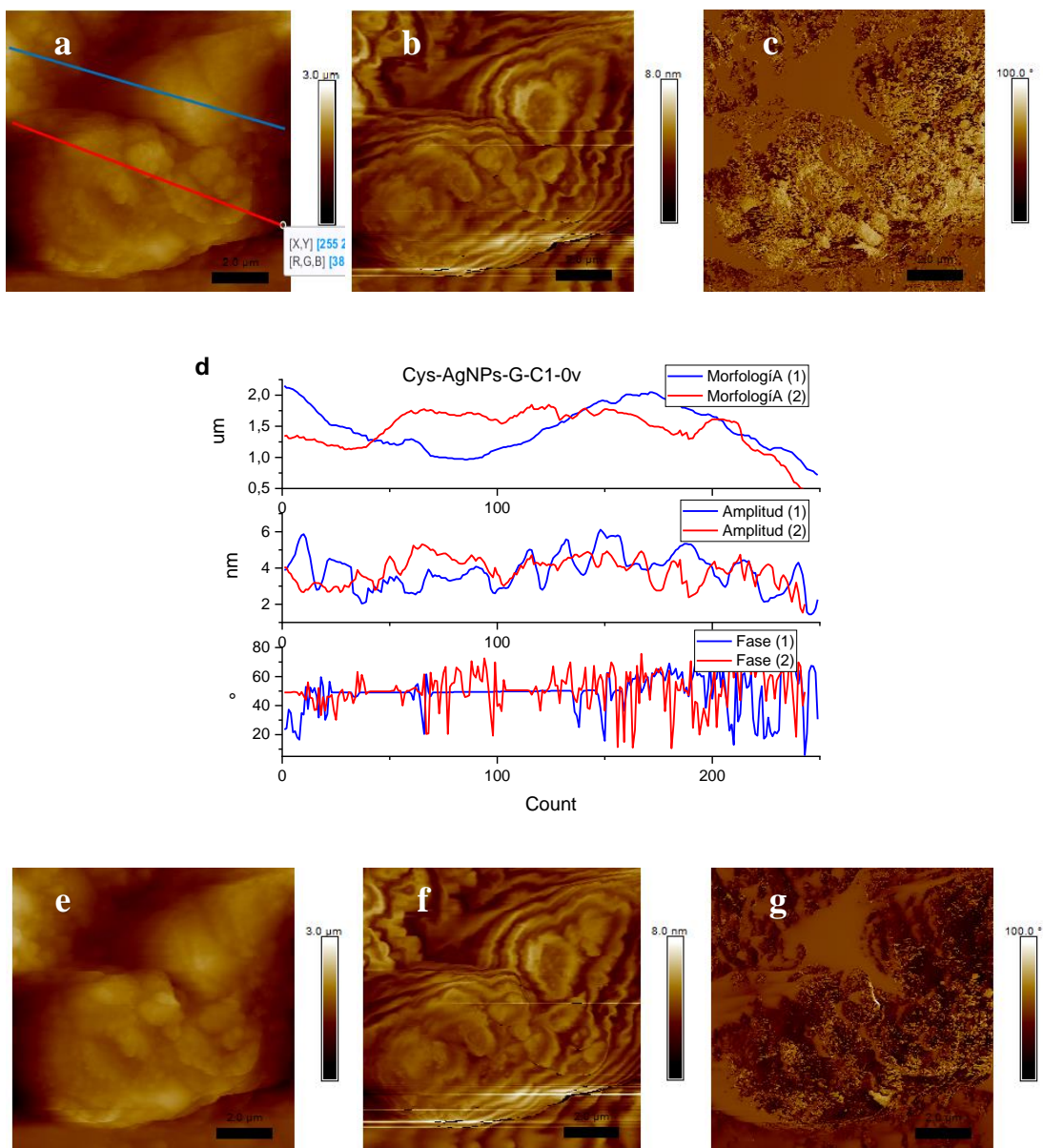


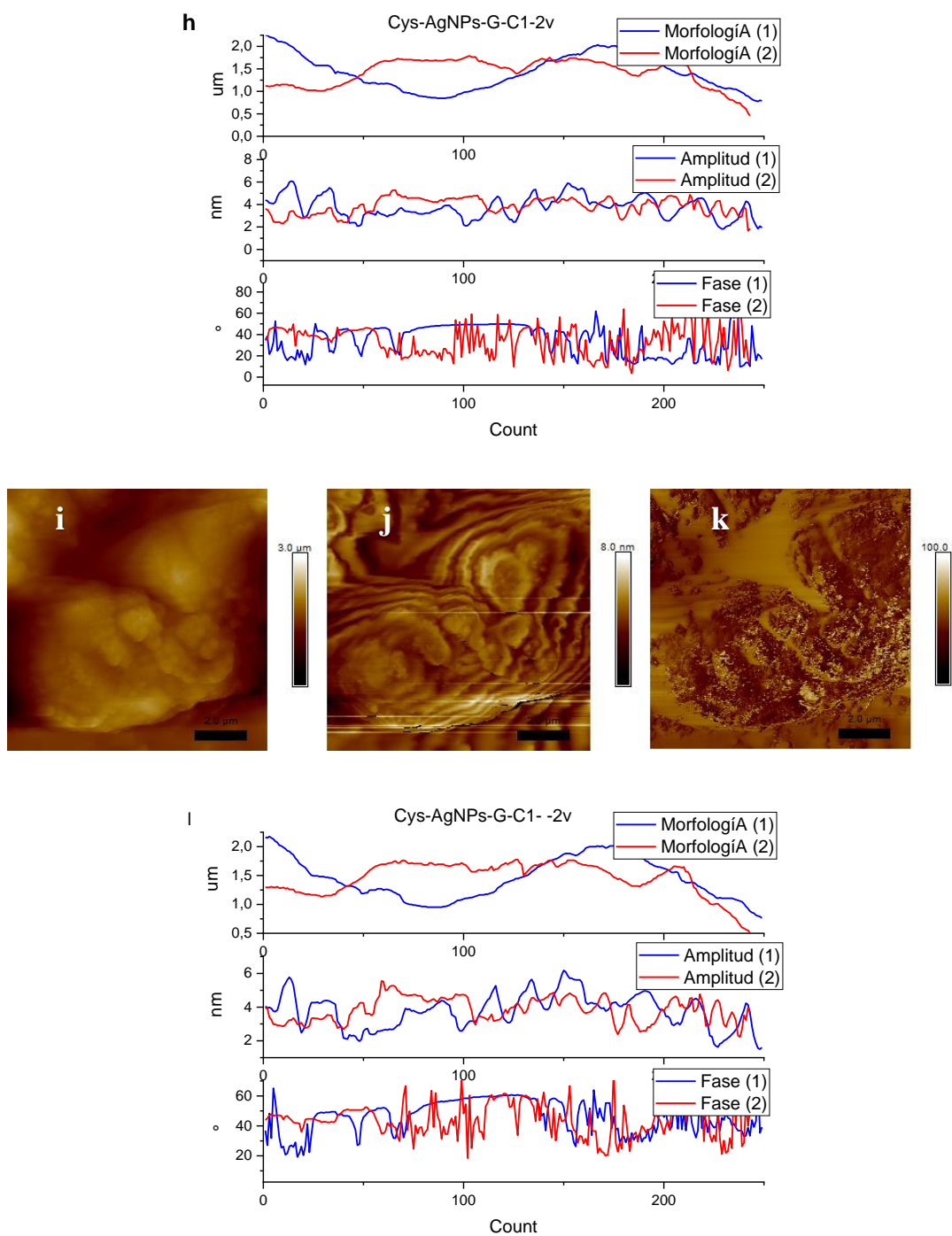


En la imagen “a” se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen “a”, “b” y “c”. e) Adquisición de amplitud a 2v. f) Adquisición de fase a 2v. g) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes “e” y “f”. h) Adquisición morfológica a -2v. i) Adquisición de amplitud a -2v. j) Adquisición de fase a 0v. k) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes “h”, “i” y “j”.

Figura 73.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C1.

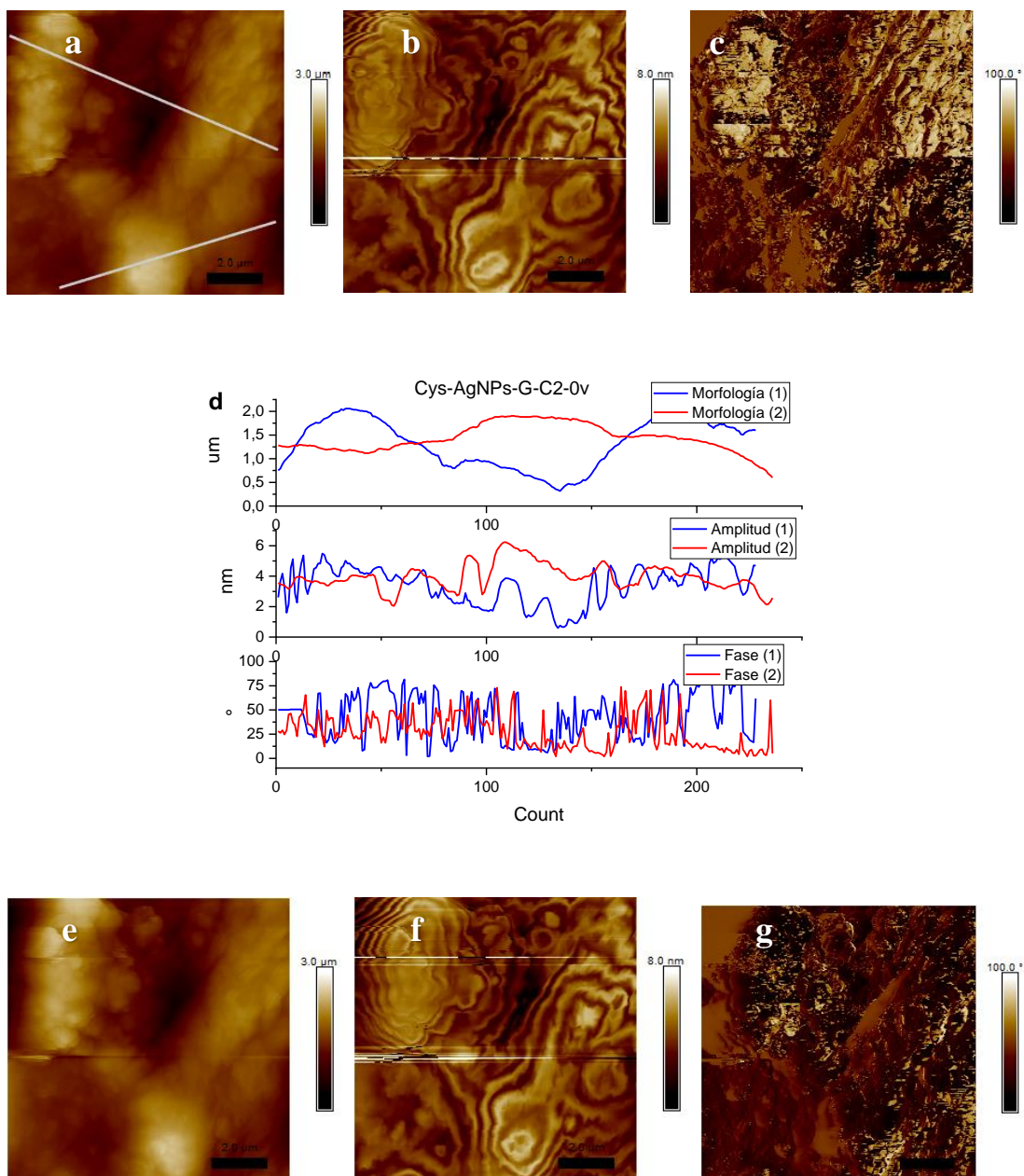


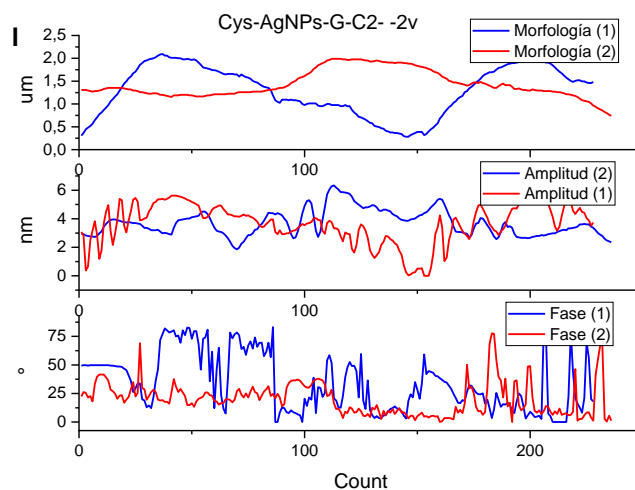
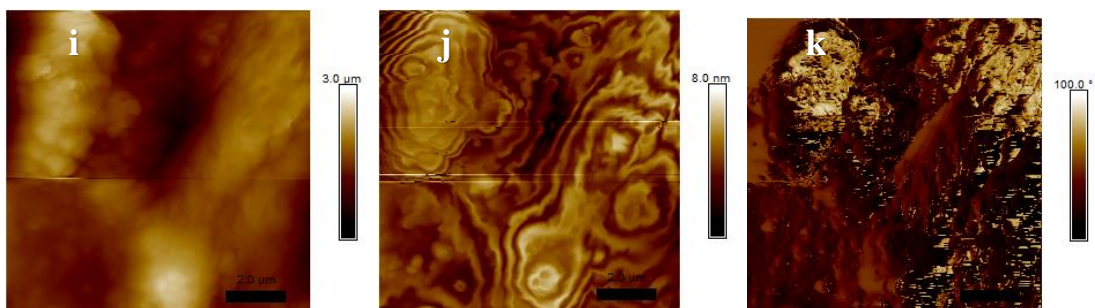
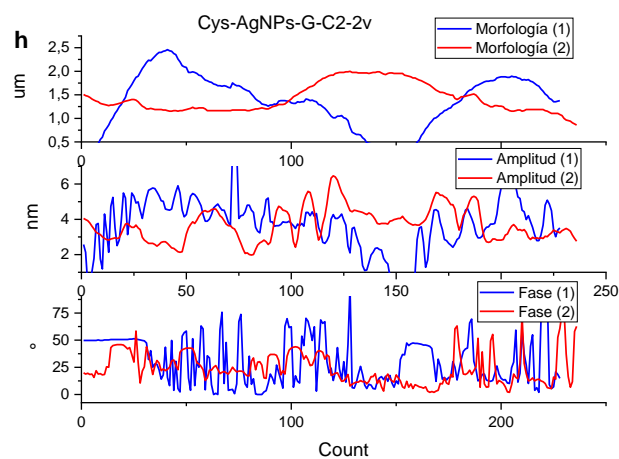


En la imagen "a" se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "a", "b" y "c". e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes "e", "f" y "g". i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes "h", "i" y "j".

Figura 74.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C2.

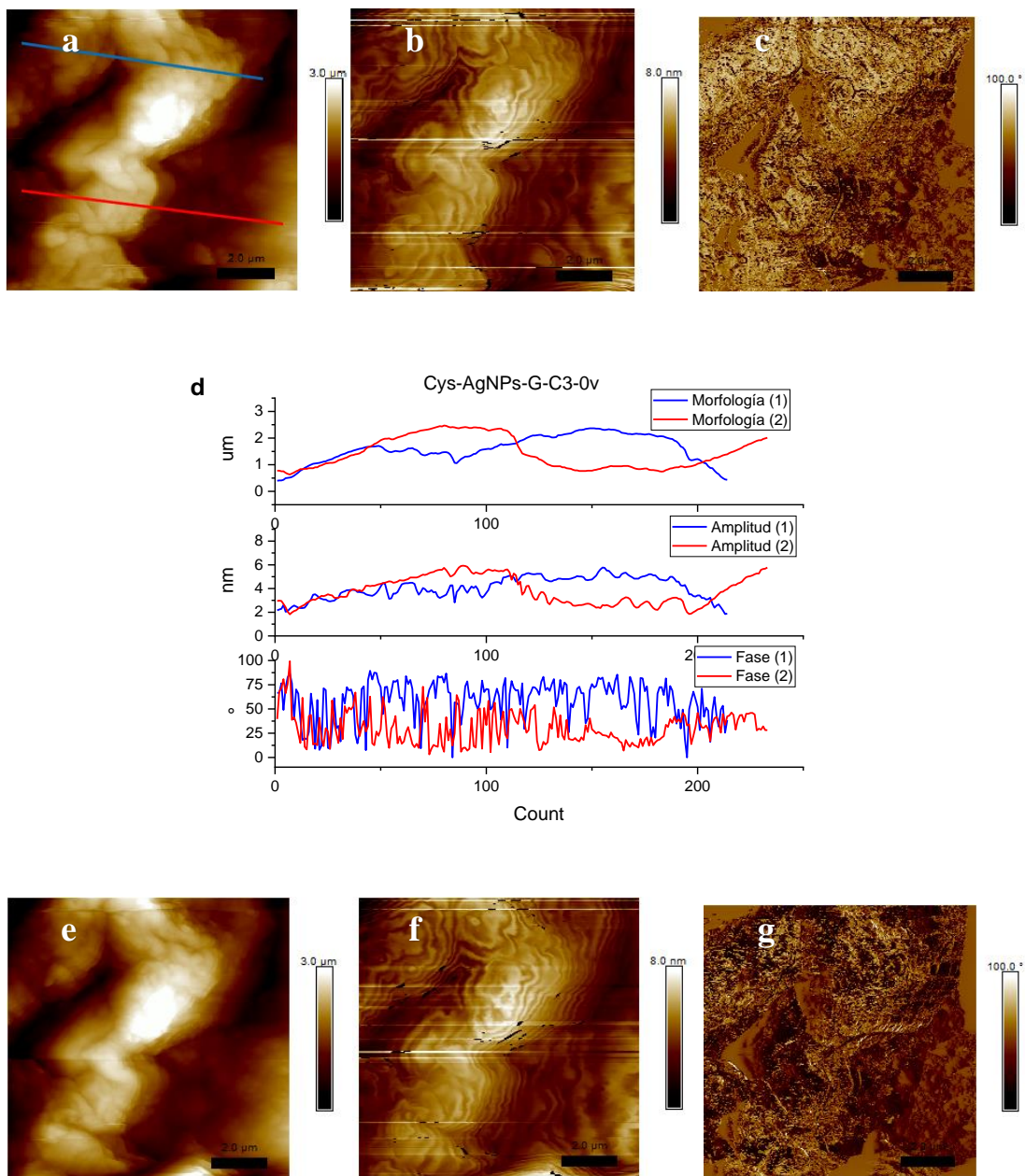


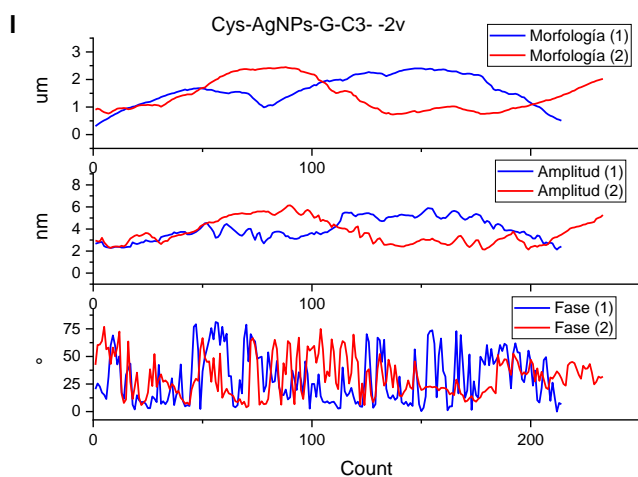
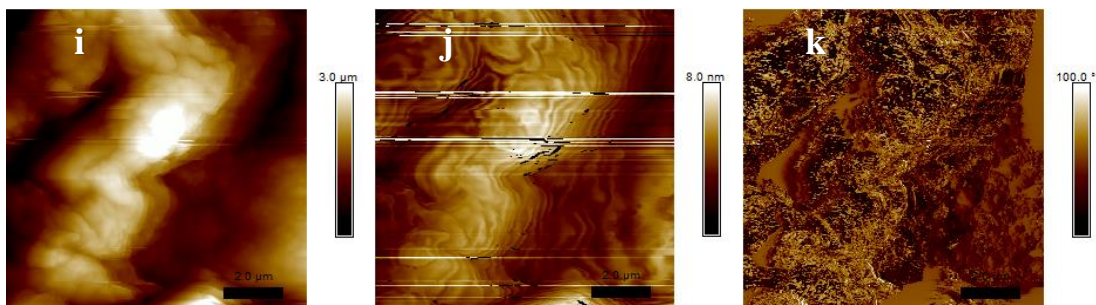
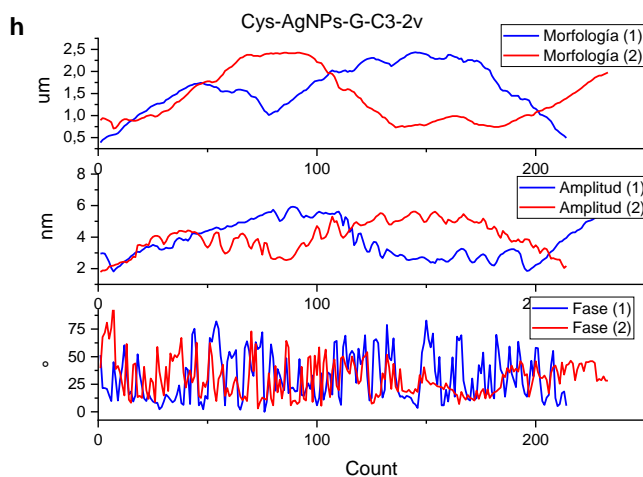


En la imagen "a" se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "a", "b" y "c". e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes "e", "f" y "g". i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes "h", "i" y "j".

Figura 75.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-G-C3.

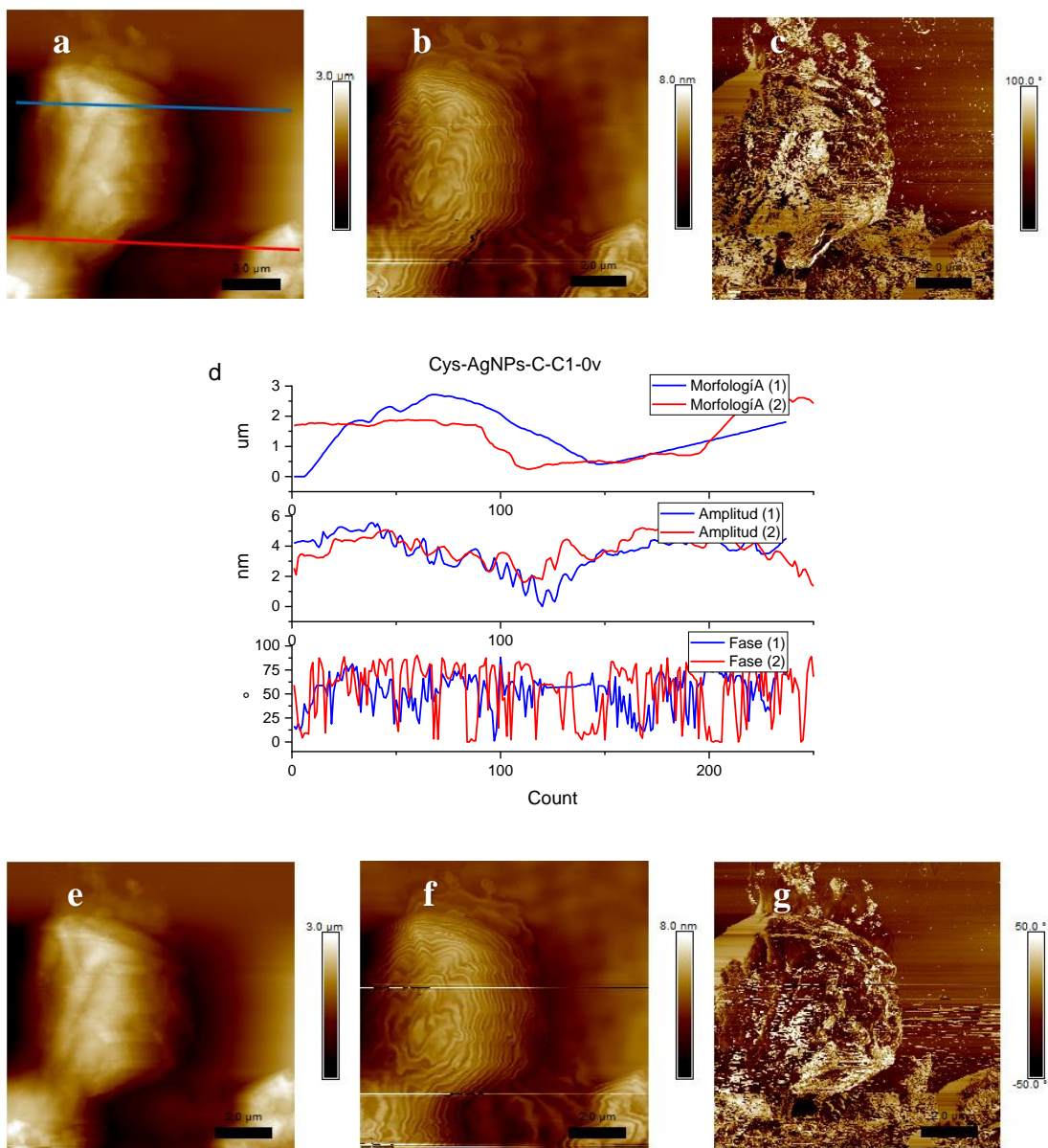


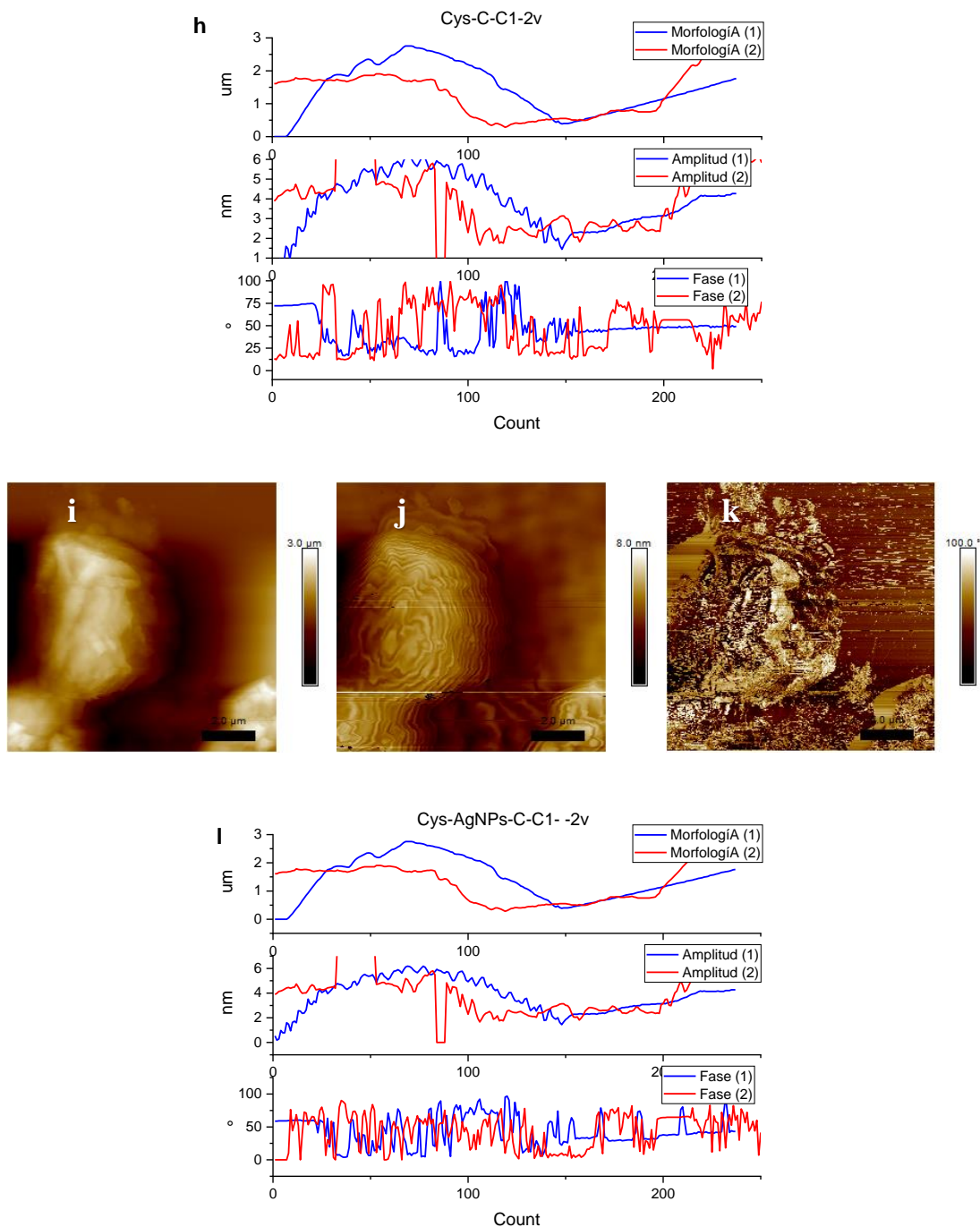


En la imagen "a" se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "a", "b" y "c". e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes "e", "f" y "g". i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes "h", "i" y "j".

Figura 76.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C1.

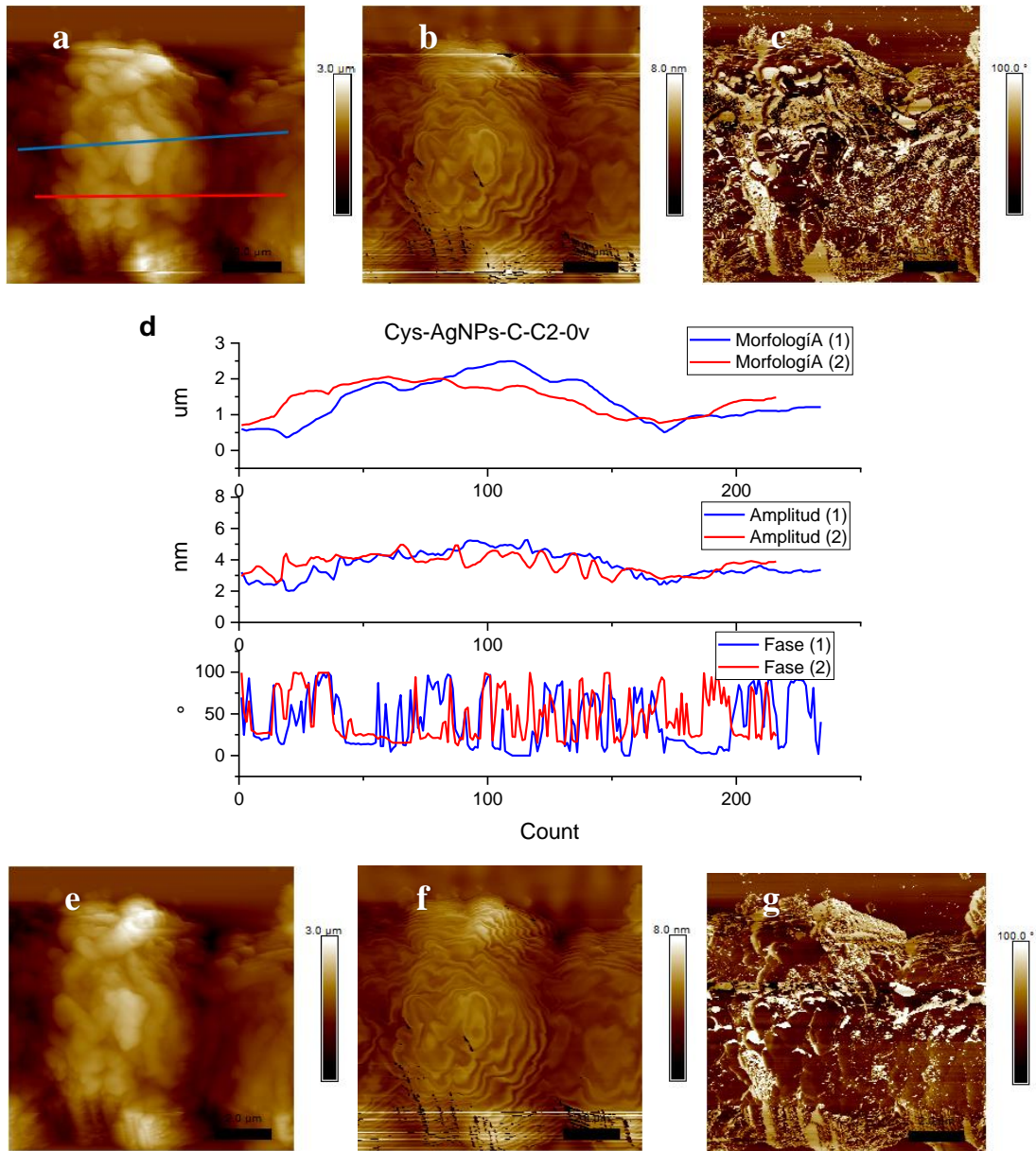


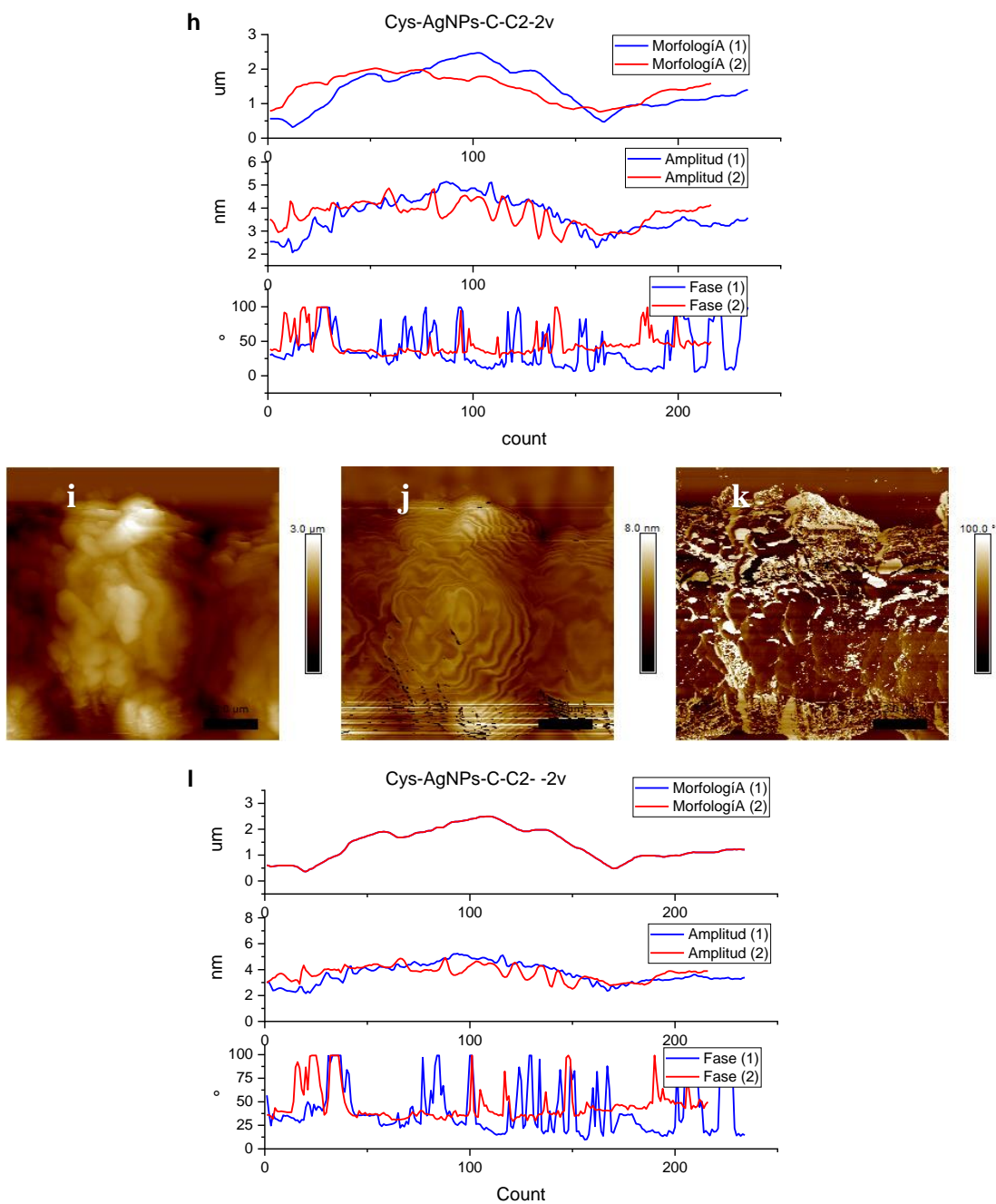


En la imagen “a” se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen “a”, “b” y “c”. e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes “e”, “f” y “g”. i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes “h”, “i” y “j”.

Figura 77.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C2

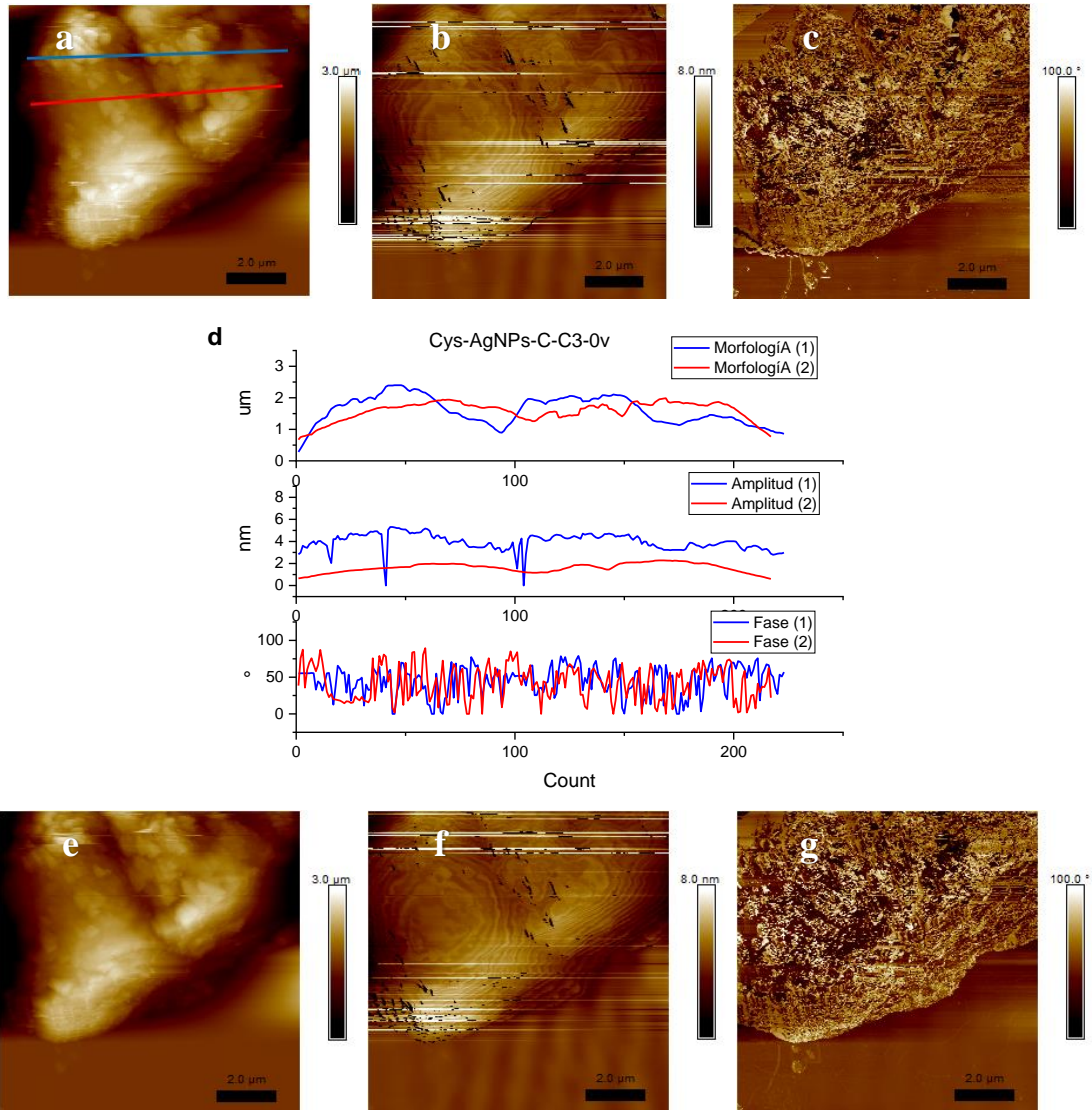


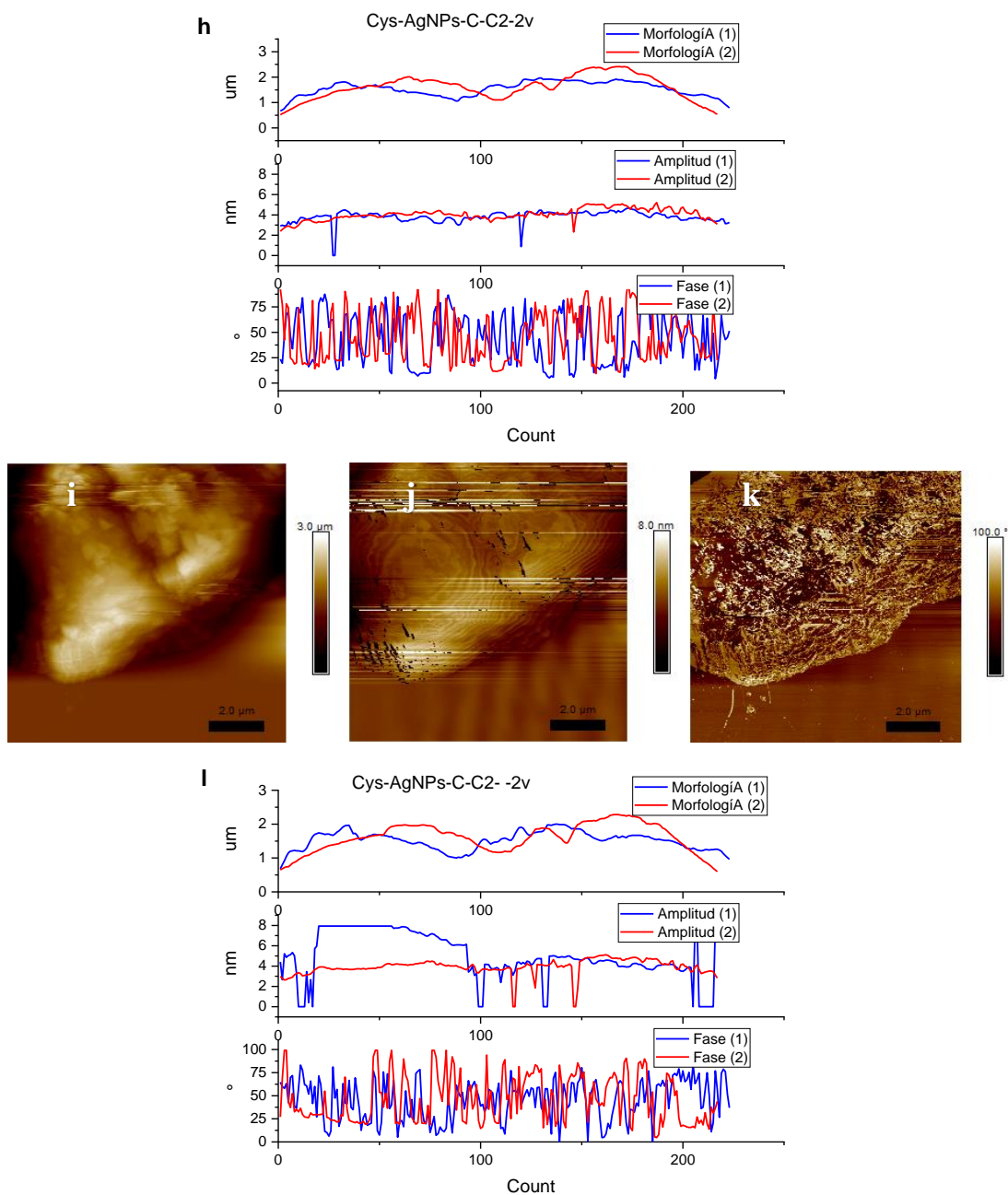


En la imagen “a” se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen “a”, “b” y “c”. e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes “e”, “f” y “g”. i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes “h”, “i” y “j”.

Figura 78.

Análisis de AFM del sistema híbrido Cys-AgNPs-C-C3.





En la imagen "a" se traza dos segmentos, uno superior (azul) y uno inferior (rojo), de los cuales se obtiene un perfil de intensidad para todas las imágenes. a) Adquisición morfológica a 0v. b) Adquisición de amplitud a 0v. c) Adquisición de fase a 0v. d) Perfil de intensidad de los segmentos de la imagen "a", "b" y "c". e) Adquisición morfológica a 2v. f) Adquisición de amplitud a 2v. g) Adquisición de fase a 2v. h) Perfil de intensidad de los segmentos para las imágenes "e", "f" y "g". i) Adquisición morfológica a -2v. j) Adquisición de amplitud a -2v. k) Adquisición de fase a -2v. l) Perfil de intensidad del segmento superior de las imágenes "h", "i" y "j".

Tabla 10.

Resumen de las propiedades eléctricas analizadas con la técnica AFM/EFM.

Nombre del sistema MFC	Altura máxima [nm]	Máxima Amplitud diferencial [nm]	Fase [°]
Alga-0v	1.92	1.79	56.99
Alga-2v	1.89		47.52
Alga- -2v		1.83	32.82
Cys-AgNPs-G-C1-0v	2.05	2.48	49.79
Cys-AgNPs-G-C1-2v	2.03	2.93	34.27
Cys-AgNPs-G-C1- -2v	2.02	2.55	45.23
Cys-AgNPs-G-C2-0v	2.07	2.89	35.55
Cys-AgNPs-G-C2-2v	2.47	2.78	27.23
Cys-AgNPs-G-C2- -2v	2.13	3.72	27.2
Cys-AgNPs-G-C3-0v	2.52	1.32	44.44
Cys-AgNPs-G-C3-2v	2.44	1.25	31
Cys-AgNPs-G-C3- -2v	2.48	1.35	30.95
Cys-AgNPs-C-C1-0v	2.72	1.79	52.89
Cys-AgNPs-C-C1-2v	2.76	1.76	46.68
Cys-AgNPs-C-C1- -2v	2.76	1.91	43.71
Cys-AgNPs-C-C2-0v	2.51	1.36	44.19
Cys-AgNPs-C-C2-2v	2.47	1.31	44.61
Cys-AgNPs-C-C2- -2v	2.48	1.6	43.76
Cys-AgNPs-C-C3-0v	2.45	0.61	43.61
Cys-AgNPs-C-C3-2v	2.45	1	44.61
Cys-AgNPs-C-C3- -2v	1.94	0.76	92.12

La tabla 10 resume los parámetros más importantes analizados de las imágenes obtenidas con la técnica EFM. El primer parámetro importante que se analizó fue el de la altura de la morfología observada, aquí los puntos más altos de cada imagen corresponden a la máxima altura de la muestra que contiene cianobacterias y nanopartículas, el promedio de la observación se encuentra entre los 2 μ m.

El segundo parámetro de análisis corresponde a la amplitud diferencial. Este parámetro es muy importante ya que nos indica cuál de las muestras tiene mayor amplitud en la fuerza electrostática medida, es decir que podemos entender cuál de las muestras presenta una mayor amplitud de fuerza eléctrica, lo cual nos indica mejores propiedades eléctricas de la muestra. Observamos entonces que sí existe una mejoría en las propiedades eléctricas para los organismos híbridos, y entre ellos los que fueron desarrollados con las AgNPs de geranio tienen mejores resultados que los de carrasquilla, y que entre todas las muestras la Cys-AgNPs-G-C2 (organismo híbrido entre la cianobacteria y las AgNPs sintetizadas con geranio e inoculadas en concentración 2.6mL por cada 40mL de biomasa) presentó mejores propiedades eléctricas, teniendo las máximas amplitudes alrededor de los 3.72nm para la medición con potencial de -2v, 2.78nm para el de 2v y 2.89nm para el potencial de 0v. Los demás experimentos presentan amplitudes entre 0.5 y 2nm a excepción del sistema Cys-AgNPs-G-C1, que también presenta valores de amplitud diferencial superiores a 2nm pero no son superiores al sistema mencionado anteriormente.

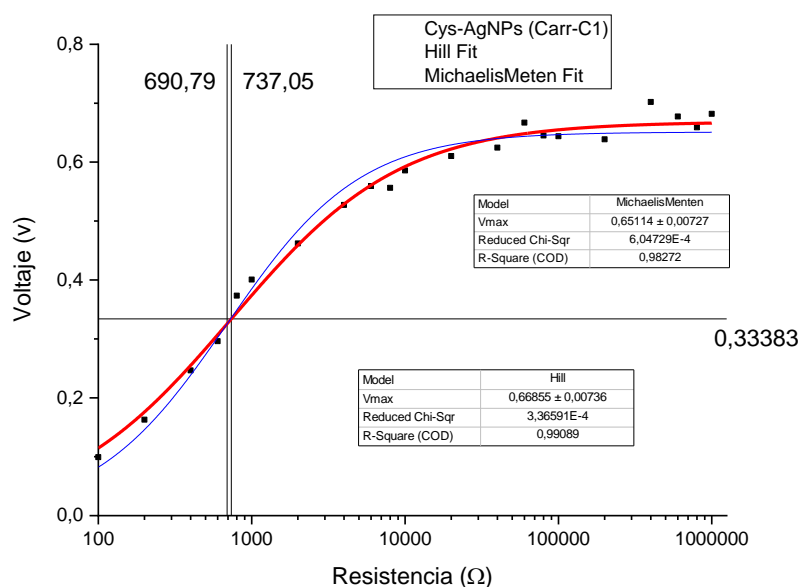
Finalmente analizamos el promedio de los valores obtenidos de las gráficas de fase, en la que valores de 100 corresponden a una baja electronegatividad (fase positiva) y valores de 0 a una alta electronegatividad (fase negativa). Aquí observamos que los valores promedio para todas las muestras se encuentran entre 50 y 30, es decir la tendencia hacia una fase negativa, indicando que han ganado electronegatividad.

Caracterización con la MFC

De acuerdo a lo explicado en el punto 3.6.2 se obtuvo los valores de voltaje y de corriente del circuito utilizado para caracterizar la generación de energía del material híbrido. Los datos fueron utilizados para graficar el comportamiento de la corriente y el voltaje en función de la variación de la resistencia utilizada. Las gráficas obtenidas tuvieron que ser tratadas para obtener su ecuación característica, con una aproximación a una curva sigmoïdal, como se muestra en la Figura 79.

Figura 79.

Curvas de voltaje vs resistencia de carga. Caracterización con la MFC/BPV.



Se observa los datos obtenidos experimentalmente. La curva azul representa la aproximación a una curva sigmoïdal utilizando el método de Michaelis Meten. En rojo la aproximación con el método Hill. Cálculo de la resistencia interna al trazar una línea horizontal en el valor medio del voltaje máximo generado por el sistema.

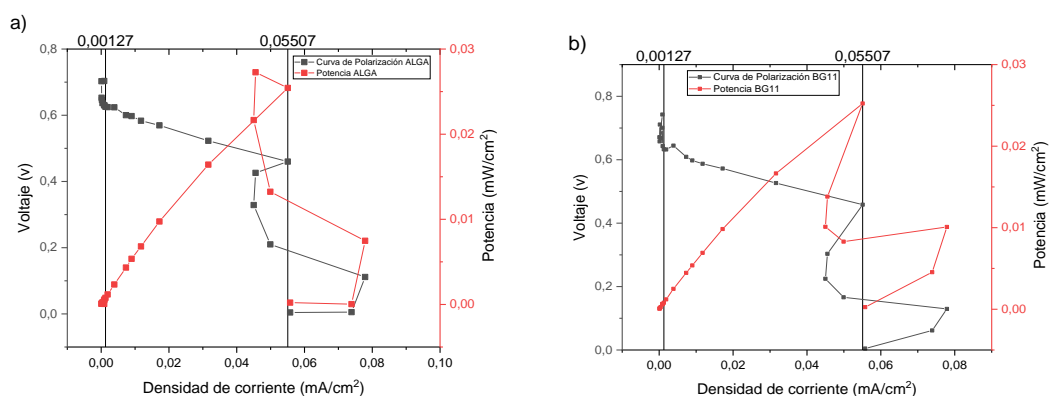
En la Figura 80 se presentan 3 curvas correspondientes a los datos medidos experimentalmente, a la aproximación a una curva sigmoïdal por el método de MichaelisMeten y la aproximación por el método de Hill. Estos análisis fueron desarrollados para encontrar la ecuación característica de la curva de voltaje y así obtener sus valores

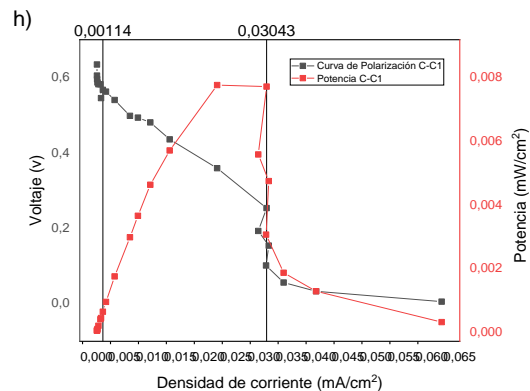
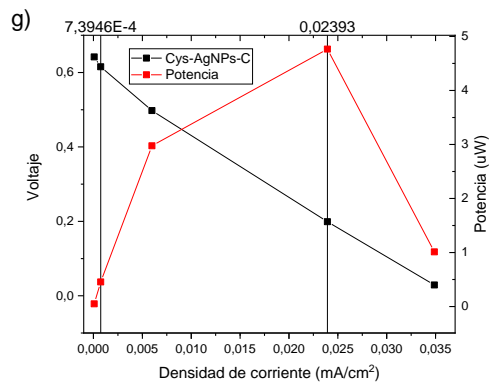
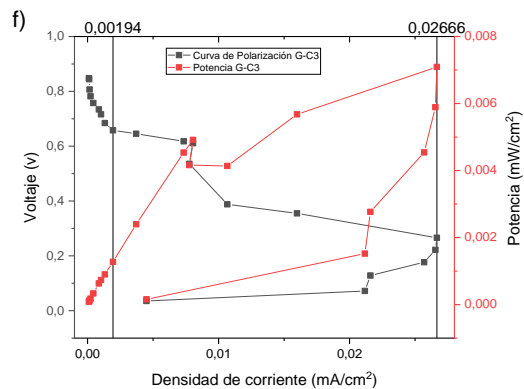
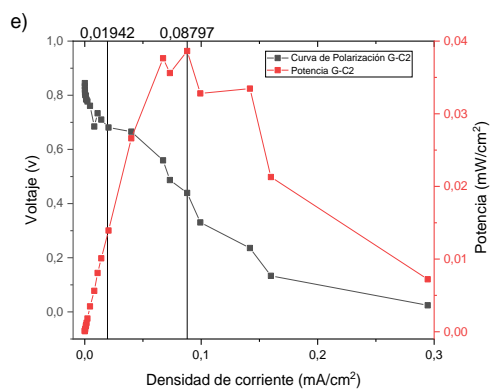
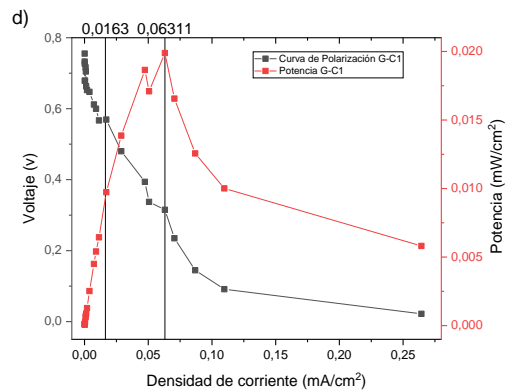
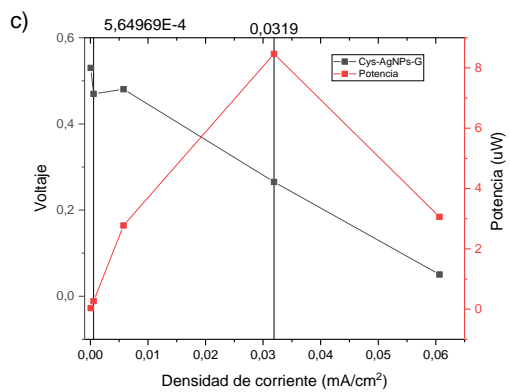
máximos y medios generados. Con el valor medio de voltaje generado encontramos los puntos donde corta a la curva hallada, este punto representa la resistencia interna del sistema. La resistencia interna de un generador eléctrico es un parámetro importante de caracterizar, ya que las pérdidas internas por caída de tensión en la R_{int} dependerán precisamente de este valor. Este análisis presentado corresponde al desarrollado para el sistema que utiliza el organismo híbrido entre las nanopartículas de plata sintetizadas con carrasquilla y la *F. musicola*, proceso que fue repetido para cada uno de los experimentos desarrollados.

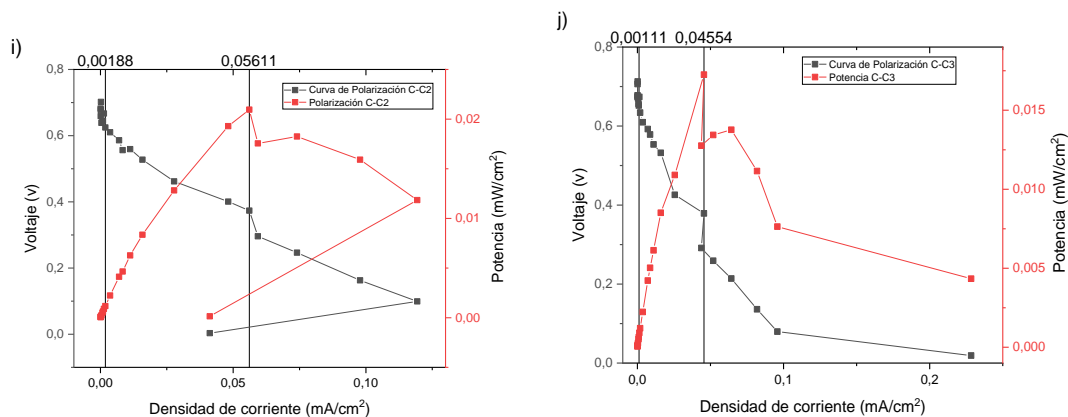
Con los datos de voltaje de cada sistema, se obtuvo los valores de corriente generada al dividir el voltaje para el valor de la resistencia correspondiente. Es decir que se midió el comportamiento de la corriente eléctrica de nuestro sistema, para cada valor de voltaje generado. Graficando el voltaje en función de la corriente se obtiene la curva de polarización de cada uno de los sistemas, lo cual aporta información de los valores máximos y mínimos de corriente generada (Figura 80).

Figura 80.

Curvas de polarización (negro) y Potencia (rojo) de los sistemas caracterizados con la MFC/BPV.







Las líneas verticales en cada figura trazan el límite entre las regiones de pérdida de la curva de polarización, estos valores corresponden al valor mínimo y máximo de densidad de corriente y además la potencia máxima generada.

a) Cys-Alga. b) Cys-BG11. c) Cys-AgNPs-G. d) Cys-AgNPs-G-C1. e) Cys-AgNPs-G-C2. f) Cys-AgNPs-G-C2. g) Cys-AgNPs-C. h) Cys-AgNPs-C-C1. i) Cys-AgNPs-C-C2. j) Cys-AgNPs-C-C3.

La Figura 80 distingue los resultados obtenidos de cada una de las curvas de polarización y potencia de los sistemas experimentales, las líneas verticales dividen la curva de polarización en sus tres regiones: la de pérdidas por activación, óhmica y pérdidas por concentración, regiones cuyos límites marcan los valores mínimos y máximos de corriente generada por unidad de área, al igual que la potencia máxima generada, que coincide con el punto de corriente máxima en el límite entre la región óhmica y la de pérdidas por concentración.

Mediante el experimento de circuito abierto se midió el máximo potencial eléctrico generado por el sistema, ya que al no tener carga no existe circulación de corriente y por lo tanto ninguna caída de tensión en la resistencia interna de la fuente. Este valor máximo se utiliza para calcular las potencias de pérdida y el rendimiento eléctrico externo de la celda microbiana de combustible utilizando las ecuaciones 3.3, 3.4 y 3.5.

Los resultados obtenidos de los experimentos y gráficas se resumen en la tabla 11, en ella podemos analizar los resultados de resistencia interna, voltaje máximo, corriente máxima, densidad de corriente máxima, potencia generada y rendimiento eléctrico externo.

Se comparó los potenciales generados por los sistemas, teniendo como referencia los generados por el BG11 y el Alga, que al compararlos reflejan que la presencia del alga incrementa el potencial generado, llegando a valores entre los 30mV, es decir que la presencia de la *F. musicola* incrementa la generación de potencial eléctrico en el orden de las decenas de mili voltios.

Se referenció también los potenciales generados utilizando únicamente nanopartículas de plata, sean de geranio o carrasquilla. Aquí se observó que el sistema que contiene las AgNPs de geranio presentan una mayor generación de potencial, de alrededor de 100mV, que las de carrasquilla, un valor altamente significativo en el orden de las centenas de mili voltios.

Una vez analizados estos primeros sistemas, que serán la referencia, se compara entonces los valores generados por cada uno de los experimentos, observando una clara diferencia entre los sistemas de referencia y los sistemas de análisis, tanto para los que contienen AgNPs de geranio como las de carrasquilla. Al analizar los sistemas que contienen el organismo híbrido de geranio se observó que estos generan entre 40 y 150mV más que su referencia, y para los sistemas de carrasquilla entre 60 y 160mV más que su referencia. Por lo que se generaliza y concluye que para cualquiera de los sistemas que contienen el organismo híbrido, sea con AgNPs de geranio o carrasquilla, existe un incremento entre 50 y 150mV respecto a los sistemas de referencia que contienen solamente nanopartículas de plata. Finalmente comparamos los potenciales generados entre sistemas de organismos híbridos, mostrando mejor generación de potencial eléctrico para los sistemas de geranio que para los de carrasquilla y comparando entre los sistemas con diferente concentración se observó que existe una mejor generación mientras más concentración de AgNPs tenía el organismo híbrido, sin embargo, la diferencia entre las concentraciones de 2.6mL y 3mL no es

significativa, por lo que se tendrá que analizar los demás parámetros para elegir el mejor sistema.

Adicionalmente al comparar estos resultados de generación eléctrica con los observados en el análisis AFM, se demuestran resultados muy similares, es decir que los sistemas de geranio tienen mejores propiedades eléctricas de acuerdo al estudio de AFM y también en la generación eléctrica y entre ellos el Cys-AgNPs-G-C2 es el que presenta mejores propiedades eléctricas y mayor generación de energía.

Se analiza entonces el parámetro de resistencia interna que, si bien es un parámetro que no se ve influido solamente por el organismo híbrido, sino por otros factores externos como la forma de construcción de la MFC, la eficiencia de intercambio protónico del puente salino, los electrodos, entre otros.

Observamos valores resistivos muy similares para todos los sistemas, estos se hallan entre 700 y 900 ohms para los sistemas con organismos híbridos (excepto el Cys-AgNPs-C-C2) y valores mayores a 1000 ohms para los sistemas de referencia. Esto es bastante concluyente sobre la influencia que tienen los organismos híbridos en el sistema al aumentar la conductividad eléctrica, lo cual mejora el rendimiento eléctrico del sistema.

Si comparamos los valores de corriente máxima generada, tenemos un análisis similar al desarrollado con los voltajes generados, ya que tienen una relación directa influenciada solamente por la resistencia de carga. De ello observamos nuevamente que existe mejor generación eléctrica de los sistemas que contienen organismos híbridos de AgNPs de geranio que de las de carrasquilla, y comparando los resultados de acuerdo a la concentración del organismo híbrido se observa que los mejores se obtienen con la concentración de 2.6mL, sin embargo, este parámetro no es del todo representativo por lo que es necesario analizar la

generación de corriente por unidad de área del electrodo o lo que es lo mismo la densidad de corriente generada.

En el parámetro eléctrico densidad de corriente observamos resultados mucho más concluyentes y con diferencias más marcadas. De ello observamos que la densidad de corriente generada por los sistemas de geranio, es cerca de 10 veces mayor que la generada por los sistemas de carrasquilla. así mismo se ratifica que el uso del organismo híbrido aumenta la generación respecto de los sistemas de referencia. Estos resultados son mucho más concluyentes y nos permiten discernir sobre los sistemas de mayor generación y entre ellos el que ha obtenido mejores resultados, siendo el Cys-AgNPs-G-C2 el sistema con mejor respuesta de generación eléctrica.

La potencia es el parámetro más importante a analizar ya que relaciona todos los analizados anteriormente. En este análisis observamos que los sistemas que contienen solo nanopartículas tienen una muy baja potencia eléctrica respecto a los sistemas de referencia que contienen medio y microalgas. Es decir que la presencia del medio de cultivo incrementa significativamente la generación, y la presencia de microalgas la incrementa, pero no de una manera significativa. Al utilizar sistemas que contienen los organismos híbridos los resultados de generación varían, sea en incremento o decremento, es decir que las nanopartículas si tienen una influencia sobre la generación eléctrica. Con este resultado podemos observar que el sistema que mejores resultados ha presentado es el Cys-AgNPs-G-C2 con un valor de $38.346\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

El parámetro de eficiencia eléctrica externa nos ayuda a comprobar los sistemas de mejor construcción, ya que depende no solamente de la generación eléctrica sino de los parámetros físicos de construcción.

Tabla 11.

Resumen de los resultados obtenidos con la caracterización de los sistemas con la MFC.

Caracterización en MFC sin luz. 20mL de alga inoculada a la concentración de AgNPs + 80mL de medio BG11 en la cámara catiónica y 100mL de ZnSO4 1M en la cámara aniónica										
	Alga	BG11	AgNPs-G	Cys-AgNPs-G-C1	Cys-AgNPs-G-C2	Cys-AgNPs-G-C3	AgNPs-C	Cys-AgNPs-C-C1	Cys-AgNPs-C-C2	Cys-AgNPs-C-C3
Voltaje a plena carga (V)	0.670 ±0.012	0.637±0.008	0,642±0,0014	0.713±0.008	0.804±0.009	0.808±0.018	0,53±0.001	0.589±0.006	0.668±0.007	0.687±0.012
R Interna medida (KΩ)	2.52	1.01	4,37	0,708	0,812	0,725	0,797	0,777	1.17k	0,721
Imáxima (mA)	0,4582	0,5325	0,26541	0,52506	0,73193	0,22189	0.1991	0,2532	0,46681	0,3789
Densidad de I máxima (uA/cm²)	55,072	55,072	31,9	63,11	87,89	26,66	23,93	30,43	56,11	45,54
Densidad de I mínima (uA/ cm²)	1,2675	1,2675	0,5649	16,309	19,42	16,14	0,739	1,136	1,876	1,9105
Potencia útil (uw/ cm²)	27,266	25,235	8,466	19,881	38,364	7,0927	4,764	7,705	20,953	17,255
Rendimiento eléctrico externo	99,81%	99,12%	93,51%	99,28%	99,2%	97,46%	92,96%	96,52%	99,53%	98,27%

En circuito abierto o circuito cerrado. Valores obtenidos de voltaje máximo generado a plena carga en v, corriente máxima generada en mA, densidad de corriente máxima y mínima

en uA/cm², potencia útil en uW/cm² y rendimiento eléctrico externo de los sistemas.

Conclusiones

- En el proceso de síntesis de AgNPs utilizando extractos naturales, la modificación del pH cambia la conjugación de las moléculas antocianinas, en especial en el anillo B con influencia en la región visible de absorción. Se agregan entonces radicales hidroxilos, cambian su posición en la molécula y generan electrones libres, que son los responsables de la reducción de AgNO_3 a Ag^0 . El extracto de *P domesticum* presenta una menor intensidad de absorción en la región visible que la del extracto de *R. myrtifolius*, por lo que para incrementar su intensidad se modificó a un pH más alcalino.
- La síntesis de AgNPs con extracto de *R myrtifolius* presenta NPs más homogéneas y esféricas, mientras que las de *P domesticum*, morfologías menos homogéneas y con poca esfericidad, comprobado mediante las técnicas TEM y STEM. La caracterización de la presencia de Ag^0 mediante la técnica XRD, constata la formación mayoritaria de NPs de plata por sobre moléculas de óxido de plata, estableciendo entonces en la tesis, dos protocolos de síntesis verde de AgNPs de un tamaño entre 20 y 30nm, morfologías esféricas y multiformes y con un tiempo de por lo menos 30 días de estabilidad.
- La técnica de caracterización con Microscopía Confocal demostró la presencia de materiales no orgánicos en el interior y en la membrana de la cianobacteria, y mediante microscopía EFM se comprobó que estos materiales aportaron al incremento de la electronegatividad del material híbrido presentando mejores resultados para los organismos que fueron desarrollados con las AgNPs sintetizadas con extracto de geranio, concentración 2mL por cada 20mL de biomasa y 40mL de medio de cultivo.

- El prototipo de MFC/BVP con puente salino, caracterizó la generación eléctrica de los organismos híbridos presentando los valores más altos para el organismo híbrido de cianobacterias y AgNPs de geranio con concentración 2,6mL, resultados que corroboran lo observado en la caracterización EFM. Estas propiedades eléctricas son influenciadas por la cantidad de NPs en el medio, pero también por su morfología, ya que, al presentar puntas en las formas cuadradas, el campo eléctrico se ve incrementado debido a que este siempre es perpendicular a la superficie y existe una acumulación de campo en estas puntas.
- La investigación culmina con dos protocolos de síntesis verde de AgNPs utilizando extractos del fruto de carrasquilla y de la flor de geranio, con un protocolo de cultivo e hibridación entre la cianobacteria *Fischerella muscicola* y las AgNPs, y midiendo la generación eléctrica de los organismos híbridos mediante un prototipo de MFC/BPV tipo puente salino, demostrando que la presencia de las NPs incrementa la generación de potencial eléctrico hasta en un 26% sobre el potencial generado usando medios que contienen sales minerales como el BG11, y de hasta un 20% sobre el uso de la cianobacteria sin AgNP

Referencias

- Ahmed, M., Stal, L. J., & Hasnain, S. (2014). The morphology and bioactivity of the rice field cyanobacterium *Leptolyngbya*. *Revista de biología tropical*, 62(3), 1251-1260.
- Almanza, S. M. (2012). Interacción de los electrones con la materia: SEM: Microscopía electrónica de barrido.
- Antocianinas, los otros pigmentos del reino vegetal. (2021). In.
- Arroyo Pardo, G. V. (2018). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata a partir del extracto de fruto de carrasquilla (Berberis hallii) y evaluación de su actividad fotocatalítica*. Universidad de las Fuerzas Armada ESPE. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.,
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Avila, H., Moreno, K. J., Moggio, I., Arias, E., Castruita, G., Vazquez, R. A., . . . Dellepiane, G. (2008). Nanopartículas de plata y oro funcionalizadas in situ con el polímero conjugado fluorescente pPET3OC12-sqS: Síntesis, propiedades morfológicas, ópticas y eléctricas. *Superficies y vacío*, 21(1), 20-25.
- Aydın, A., Sipahi, H., & Charehsaz, M. J. R. A. i. N. D. C. S. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures.
- Bahadar, A., & Bilal Khan, M. (2013). Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 128-148.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.029>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Belmares Perales, S., Torres-Lopez, E., L Coparán-Elizondo, J., Arriaga-Garza, J., & Elizondo, N. (2013). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro, plata y fierro por el método de fisicoquímica verde*.
- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*: Courier Corporation.
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. J. A. d. d. r. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *60(11)*, 1289-1306.
- Blosi, M., Albonetti, S., Gatti, F., Baldi, G., Dondi, a. M. J. D., & Pigments. (2012). Au–Ag nanoparticles as red pigment in ceramic inks for digital decoration. *94(2)*, 355-362.
- Bozeman, J. R., & Pilling, M. J. S. M. J. (2013). The convexity ratio and applications. *76(1)*, 47-53.
- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*: Jones & Bartlett Learning.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. J. B. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *2(4)*, MR17-MR71.
- Calderón, H. A. (2020). Microscopía electrónica de transmisión para observar átomos: principios y desarrollo %J Mundo nano. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*. *13*, 133-156.
- Calle, L. C., & Londoño, M. E. J. R. S. d. P. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *6(12)*, 129-140.
- Carmen Alquizar, M. T. d. J., & Chávez Vásquez, N. Y. (2020). Identificación de metabolitos secundarios en Cianobacterias presentes en las aguas termales “Los Perolitos” del distrito de Baños del Inca–Cajamarca.

- Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 9, 25-33.
- Castenholz, R. W. (2015). General characteristics of the cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-23.
- Castillo, D. D. (2019). *Análisis de la absorción de nanopartículas de plata por la cianobacteria Fisherella muscicola en diferentes medios de cultivo para su aplicación en energía*. (Pregrado), Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador.
- Cevik, E., Buyukharman, M., & Yildiz, H. B. (2018). Construction of efficient bioelectrochemical devices: Improved electricity production from cyanobacteria (*Leptolyngbia* sp.) based on π -conjugated conducting polymer/gold nanoparticle composite interfaces. *Biotechnology and Bioengineering*, 0(0). doi:10.1002/bit.26885
- Che, Y., Chen, H., Gui, H., Liu, J., Liu, B., Zhou, C. J. S. S., & Technology. (2014). Review of carbon nanotube nanoelectronics and macroelectronics. 29(7), 073001.
- Cheng, L., Huang, H., Chen, S., Wang, W., Dai, F., & Zhao, H. (2017). Characterization of silkworm larvae growth and properties of silk fibres after direct feeding of copper or silver nanoparticles. *Materials & Design*, 129, 125-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.04.096>
- Chushak, Y. G., & Bartell, L. S. (2001). Melting and Freezing of Gold Nanoclusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(47), 11605-11614. doi:10.1021/jp0109426
- Cianobacterias, características, reproducción, nutrición y ejemplos. (2020). In.
- Clementi, L. A., Gugliotta, L. M., & Vega, J. R. (2008). Regularización de Tikhonov y algoritmos genéticos como herramientas para estimar tamaños de partículas nanométricas por dispersión de luz Dinámica. *Mecánica Computacional*(35), 2753-2764.
- CreTU, G., Morlok, G., & Nechifor, G. DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CROMATOGRAPHIC METHOD FOR ANALYSIS OF DELPHINIDIN 3-GLUCOSIDE IN BERRY EXTRACTS.
- Cruz, D. A., Rodríguez, M. C., López, J. M., Herrera, V. M., Orive, A. G., & Creus, A. H. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Cui, Y., Rashid, N., Hu, N., Rehman, M. S. U., & Han, J.-I. (2014). Electricity generation and microalgae cultivation in microbial fuel cell using microalgae-enriched anode and bio-cathode. *Energy Conversion and Management*, 79, 674-680. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.12.032>
- Cullity, B. D. (1956). *Elements of X-ray Diffraction*: Addison-Wesley Publishing.
- de nanoobjetos Hitachi Ht, E. Centro interdisciplinario" Microscopía analítica.
- del Rocío Coutiño, E. M., Lagunes, L. Á., & Helguera, O. A. (2017). Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39-54.
- Díaz-Urbe, C. E., & Vallejo, W. A. (2015). Analisis de la distribucion del tamaño de partícula de agregados de porfirinas por dispersion dinamica de luz. *Elementos*(5), 113-119.
- Du, Z., Li, H., & Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology advances*, 25(5), 464-482.
- Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2001). Separation and characterization of anthocyanins by HPLC. *Current protocols in food analytical chemistry*(1), F1-3.
- Ebenezer, V., Nancharaiah, Y. V., & Venugopalan, V. P. (2012). Chlorination-induced cellular damage and recovery in marine microalga, *Chlorella salina*. *Chemosphere*, 89(9), 1042-1047.
- Egas Ribadeneira, D. (1998). Microscopía Electrónica: Fundamentos, Teoría y Aplicaciones.

- Egerton, R. F. (2005). *Physical principles of electron microscopy* (Vol. 56): Springer.
- Elton, L. R. B., & Jackson, D. F. (1966). X-ray diffraction and the bragg law. *American Journal of Physics*, 34(11), 1036-1038.
- Emerich, D. F., & Thanos, C. G. J. E. o. o. b. t. (2003). Nanotechnology and medicine. 3(4), 655-663.
- Energía, C. M. d. I. (2013). *Escenarios Mundiales de Energía. La composición de los futuros energéticos hasta 2050*. www.worldenergy.org/publications
- Evans, D. H., O'Connell, K. M., Petersen, R. A., & Kelly, M. J. (1983). Cyclic voltammetry. In: ACS Publications.
- Fábregas, J., Herrero, C., Gamallo, Y., Otero, A., Paz, J. M., & Vecino, E. (1994). Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(6), 533-540.
- Fischerella. (2001). In.
- García Gómez, N. A., Garcia-Gutierrez, D., & Sanchez Cervantes, E. (2015). Producción de bioelectricidad utilizando nanofibras duales de TiO₂/carbón como electrodo de una celda de combustible microbiana. *Ciencia UANL*, 18(71), 102-113.
- García, J. L. (2004). Preparación y caracterización de Membranas de Intercambio Iónico a Partir del Anclaje de Dendrímeros PAMAM en una Base Polimérica de Acetato de Celulosa. *CENTRO*.
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica colombiana*, 13(3), 27-36.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008). Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 15(16), 1586-1605.
- Gómez, A., Ávila, A. G., & Massy, G. I. (2009). Interacción punta-muestra dieléctrica en microscopía de fuerza electrostática. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*(50), 31-40.
- Gonzalez, E., Fougères, A., & Brouillard, R. (2001). Two diacylated malvidin glycosides from *Petunia hybrida* flowers. *Phytochemistry*, 58(8), 1257-1262.
- Goodhew, P. J., & Humphreys, J. (2000). *Electron microscopy and analysis*: CRC Press.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., . . . Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358. doi:10.1073/pnas.0604517103
- Gosser, D. K. (1993). *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms* (Vol. 43): VCH New York.
- Hall, J. (2011). The Most important Organism. *Ecology Global Network*.
- Hao, E., & Schatz, G. C. (2004). Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *J Chem Phys*, 120(1), 357-366. doi:10.1063/1.1629280
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49, 157-173.
- Hernández-Reyes, B., Rodríguez-Palacio, M., Castilla-Hernández, P., Sánchez-Robles, J., Vela-Correa, G., & Schettino-Bermúdez, B. J. R. L. d. B. A. y. A. (2019). Uso potencial de cianobacterias como biofertilizante para el cultivo de maíz azul en la Ciudad de México. *10*(1), 13-27.
- Holm-Hansen, O. (1968). Ecology, physiology, and biochemistry of blue-green algae. *Annual Reviews in Microbiology*, 22(1), 47-70.

- Huang, B., Bates, M., & Zhuang, X. (2009). Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78, 993-1016.
- Huang, L., Regan, J. M., & Quan, X. (2011). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102(1), 316-323.
- Jiang, Z.-J., Liu, C.-Y., & Sun, L.-W. J. T. J. o. P. C. B. (2005). Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. *109*(5), 1730-1735.
- Kaiser, U., Biskupek, J., Meyer, J. C., Leschner, J., Lechner, L., Rose, H., . . . Mueller, H. (2011). Transmission electron microscopy at 20 kV for imaging and spectroscopy. *Ultramicroscopy*, 111(8), 1239-1246.
- Karn, B., Kuiken, T., Otto, M. J. C., & Coletiva, S. (2011). Nanotechnology and in situ remediation: a review of the benefits and potential risks. *16*, 165-178.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. In: ACS Publications.
- Kissinger, P. T., & Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 60(9), 702.
- Klinar, S., Chang, A., Castillo, P., Quispe, C., & Lengua, L. EVALUACIÓN DE CINCO PLANTAS MEDICINALES DE ICA, POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS.
- Lacal-Arántegui, R. (2019). Globalization in the wind energy industry: contribution and economic impact of European companies. *Renewable Energy*, 134, 612-628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.087>
- Lam, K. B., Chiao, M., & Lin, L. (2003). *A micro photosynthetic electrochemical cell*.
- LATRO. (2019). Retrieved from <http://thoughtcollider.nl/project/latro/>
- Ley de Lambert-Beer | Química Orgánica. (2021). In.
- Li, J., Liu, G., Zhang, R., Luo, Y., Zhang, C., & Li, M. (2010). Electricity generation by two types of microbial fuel cells using nitrobenzene as the anodic or cathodic reactants. *Bioresource technology*, 101(11), 4013-4020. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.135>
- Li, W.-W., Sheng, G.-P., Liu, X.-W., & Yu, H.-Q. (2011). Recent advances in the separators for microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102(1), 244-252.
- Li, Y., Chen, S.-M., Ali, M. A., & AlHemaid, F. M. A. (2013). Biosynthesis and Electrochemical Characterization of Silver Nanoparticles from Leaf Extract of *Adenium obesum* and Its Application to Antibacterial Effect. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 2691-2701.
- Lichtman, J. W., & Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature methods*, 2(12), 910-919.
- Liu, H., & Logan, B. E. (2004). Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environmental Science & Technology*, 38(14), 4040-4046.
- Loza, V. (2011). Biodiversidad de cianobacterias en ríos de la Comunidad de Madrid. Análisis polifásico y aplicación en biomonitorización.
- Luna, L. M. G., & Carmenate, Z. R. (2000). *Microalgas como biomonitores de contaminación*. *Revista de Ciencias Químicas*, Vol. XVI, N.º 2, 2004: Universidad de Oriente.
- Mabbott, G. A. (1983). An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of chemical education*, 60(9), 697.
- Maestrin, A. P. J., Neri, C. R., Oliveira, K. T. d., Serra, O. A., & Iamamoto, Y. (2009). Extraction and purification of chlorophyll a isolated from *Spirulina maxima*: an experiment for the chemistry courses. *Química Nova*, 32(6), 1670-1672.
- Martínez-Mejía, G. Microscopia Electrónica de Barrido, análisis de características morfológicas en nanogeles. *Fisicoquímica (FISQ ISSN 2448-914X)*, 22.

- Martinez, F. M., Zuñiga, E., & Sanchez Lafarga, A. K. J. M. N. R. I. e. N. y. N. (2013). Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *6*(10).
- Martinez, J. F. G. (2015). Explorando los límites de la microscopía de fuerzas: ruido térmico y ruido e la interacción punta-muestra.
- Mazel, C. (2008). *The Physics of Fluorescence: Implications for the Application and Evaluation of Alternative Excitation Light Sources*.
- McFarland, A. D., & Van Duyne, R. P. J. N. I. (2003). Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. *3*(8), 1057-1062.
- McLamb, E. (2011). Phytoplankton and Algae: The Air We All Breathe. *Ecology Global Network*.
- Medina, M. (2012). Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad. In: Universidad Austral de Chile, Facultad deficiencias, Escuela de química y
- Meng, X., Savage, P. E., & Deng, D. (2015). Trash to Treasure: From Harmful Algal Blooms to High-Performance Electrodes for Sodium-Ion Batteries. *Environmental Science & Technology*, *49*(20), 12543-12550. doi:10.1021/acs.est.5b03882
- Möbus, G., Phillipp, F., Gemming, T., Schweinfest, R., & Rühle, M. (1997). Quantitative diffractometry at 0.1 nm resolution for testing lenses and recording media of a high-voltage atomic resolution microscope. *Microscopy*, *46*(5), 381-395.
- Mora, B. G. G. (2018). Cianobacterias: Estructuras particulares. Las cianobacterias como fotosintetizadores. Retrieved from <https://dokumen.tips/documents/cianobacterias-estructuras-bernalbiologiabernal-gdo-garro-mora-40-las-cianobacterias.html>
- Naranjo, R. E. (2016). *Identificación y caracterización de microalgas presentes en las fuentes geotermales de baños de agua santa, guapán, papallacta, chachimbiro y aguas hediondas*. Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE, Ecuador.
- Nayak, P. K., Mahesh, S., Snaith, H. J., & Cahen, D. (2019). Photovoltaic solar cell technologies: analysing the state of the art. *Nature Reviews Materials*, *4*(4), 269-285. doi:10.1038/s41578-019-0097-0
- Neciosup Zavaleta, W. R. (2015). Capacidad reductora de las hojas de Pelargonium hortorum LH BAILEY, Eriobotrya japonica (THUMB.) LINDL. y Lupinus mutabilis SWEET para la producción de nanopartículas de plata.
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F. H., Anderson, R. R., Schwarzenberger, K., & Young, R. C. (2012). Introduction to confocal microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, *132*(12), 1-5.
- Ortiz- Moreno, M. L., Cortés - Castillo, C. E., Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J., & Otero-Paternina, A. M. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga chlorella sorokiniana en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, *16*(1), 11-20.
- Patel, A., Matsakas, L., Rova, U., & Christakopoulos, P. J. B. t. (2019). A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria.
- Pattnaik, P. (2005). Surface plasmon resonance. *Applied biochemistry and biotechnology*, *126*(2), 79-92.
- Pérez, R. E. J. E. G. E. G. (2019). Shallow geothermal energy: Geological energy for the ecological transition and its inclusion in European and national energy policies. 28.
- Polsby, D. D., & Popper, R. D. (1991). The third criterion: Compactness as a procedural safeguard against partisan gerrymandering. *Yale Law & Policy Review*, *9*(2), 301-353.
- Raimondo, M., Guadagno, L., Vertuccio, L., Naddeo, C., Barra, G., Spinelli, G., . . . Lafdi, K. (2018). Electrical conductivity of carbon nanofiber reinforced resins: Potentiality of

- Tunneling Atomic Force Microscopy (TUNA) technique. *Composites Part B: Engineering*, 143, 148-160. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.005>
- Rammah, Y. S., Abouhaswa, A. S., Sayyed, M. I., Tekin, H. O., & El-Mallawany, R. (2019). Structural, UV and shielding properties of ZBPC glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 509, 99-105.
- Ramzan, H., & Yousaf, Z. (2018). Chapter 4 - Green fabrication of metallic nanoparticles. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines* (pp. 137-183): William Andrew Publishing.
- Rashid, N., Cui, Y.-F., Saif Ur Rehman, M., & Han, J.-I. (2013). Enhanced electricity generation by using algae biomass and activated sludge in microbial fuel cell. *Science of The Total Environment*, 456-457, 91-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.067>
- Rengifo Zevallos, D. R. (2018). Estudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hojas de *Desmodium vargasianum* Schubert. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 175-182.
- Revelo, D. M., Hurtado, N. H., & Ruiz, J. O. (2013a). Celdas de combustible microbianas (CCMs): Un reto para la remoción de materia orgánica y la generación de energía eléctrica. *Información tecnológica*, 24(6), 17-28.
- Revelo, D. M., Hurtado, N. H., & Ruiz, J. O. (2013b). Celdas de Combustible Microbianas (CCMs): Un Reto para la Remoción de Materia Orgánica y la Generación de Energía Eléctrica. *Información tecnológica*, 24(6), 7-8. doi:10.4067/s0718-07642013000600004
- Reyes, N. M. (2018). Análisis de características diferenciales entre antocianinas y betacianinas en extractos de plantas mediante pruebas de color. *Ambiociencias*(16), 38-48.
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Rivera Morán, J. A. (2019). Una nueva aproximación experimental en dispersión dinámica de luz.
- Safari, J., & Zarnegar, Z. J. J. o. S. C. S. (2014). Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *18*(2), 85-99.
- Sanchez, M. A. S. (2020). ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA. In.
- Sánchez Puertas, M. G. (2011). Comprobación de la Actividad Tintorera en Fibras Orgánicas y Sintéticas de la *Berberis hallii*.
- Schmitz, K. S. (2012). *Introduction to dynamic light scattering by macromolecules*: Elsevier.
- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13-25. doi:10.1016/j.vibspec.2006.06.001
- Shahparnia, M., Packirisamy, M., Juneau, P., & Zazubovich, V. (2015). Micro photosynthetic power cell for power generation from photosynthesis of algae. *TECHNOLOGY*, 03(02n03), 119-126. doi:10.1142/S2339547815400099
- Shukla, A. K., & Iravani, S. J. E. C. L. (2017). Metallic nanoparticles: green synthesis and spectroscopic characterization. *15*(2), 223-231.
- Silva Ponce, C. N. (2011). Cuantificación de los Alcaloides de *Berberis hallii* Carrasquilla. Sector La Josefina, San Isidro del Cantón Guano, Provincia de Chimborazo.
- Smith, A. J. (1983). *Modes of cyanobacterial carbon metabolism*.
- Sotres Prieto, J. (2010). Microscopía y espectroscopía de fuerzas electrostáticas e intermoleculares sobre moléculas biológicas individuales en medio líquido.
- Sournia, A. (1975). Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Advances in marine biology*, 12, 325-389.

- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35(2), 171.
- Suárez, Ó. L., Martínez, M. P. P., & Cortizas, A. M. (2011). Aplicación de la Microscopía Electrónica de Barrido al estudio de los acabados de cerámica antigua de Galicia. *Gallaecia: revista de arqueología e antigüidade*(30), 117-125.
- Surface Plasmon Resonance - an overview | ScienceDirect Topics. (2021). In.
- Tang, Y., Zeng, X., & Liang, J. (2010). Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique. *Journal of chemical education*, 87(7), 742-746.
- Tatiana, M. S. A., & HÍbridas, S. U. A. E. N. C. S. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA.
- Toral, R. (2006). Últimos avances en el movimiento browniano: orden a partir del desorden.
- Valera, R. L. R., Morales, I. P. P., & Morfa, C. A. R. (2017). Caracterización y evaluación sistémica de empaquetamientos de partículas como conjuntos iniciales para simulaciones con elementos discretos. *Revista Cubana de Ingeniería*, 8(2), 34-45.
- Valero, P. L. (2013). *Materiales inorgánicos nanoestructurados basados en plata. Aplicaciones bactericidas*. Universidad de Zaragoza,
- Vallejo, R., Segovia, P., Elizondo, N., Vázquez Cuchillo, O., Coello, V., & Castaño, V. (2010). Green Chemistry Used in The Synthesis and Characterization of Silver and Gold Nanoparticles. In (pp. 3).
- Varón, L. A. B. (2011). Estimación de tamanos de particulas nanométricas a partir de mediciones de dispersión de luz dinámica y utilizando algoritmos de inteligencia de enjambres.
- Velazquez, C. P. R. (2008). Efecto de la dispersión de nanopartículas de plata en una matriz polimérica sobre sus características fisicomecánicas y antimicrobianas.
- Velazquez, H. E. G., & Canton, E. C. (2015). Es el movimiento Browniano un proceso estocástico o determinista? *Boletín de la Sociedad Mexicana de Física*, 29(2), 103-106.
- Walsby, A. E. (1974). The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm. I. Isolation of a macromolecular pigment-peptide complex and other components. *British Phycological Journal*, 9(4), 371-381.
- Warren, B. E. (1941). X-ray diffraction methods. *Journal of applied physics*, 12(5), 375-384.
- Warren, B. E. (1990). *X-ray Diffraction*: Courier Corporation.
- Wessels, J. M., Nothofer, H.-G., Ford, W. E., von Wrochem, F., Scholz, F., Vossmeier, T., . . . Yasuda, A. J. J. o. t. A. C. S. (2004). Optical and electrical properties of three-dimensional interlinked gold nanoparticle assemblies. *126*(10), 3349-3356.
- Whittig, L. D., & Allardice, W. R. (1986). X-ray diffraction techniques. *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 331-362.
- Wu, C., Liu, X.-W., Li, W.-W., Sheng, G.-P., Zang, G.-L., Cheng, Y.-Y., . . . Yu, H.-Q. (2012). A white-rot fungus is used as a biocathode to improve electricity production of a microbial fuel cell. *Applied energy*, 98, 594-596.
- Xue, C.-H., Chen, J., Yin, W., Jia, S.-T., & Ma, J.-Z. J. A. S. S. (2012). Superhydrophobic conductive textiles with antibacterial property by coating fibers with silver nanoparticles. *258*(7), 2468-2472.
- Yang, S., Jia, B., & Liu, H. (2009). Effects of the Pt loading side and cathode-biofilm on the performance of a membrane-less and single-chamber microbial fuel cell. *Bioresource technology*, 100(3), 1197-1202.
- Zavaleta, W. R. N. (2015). *Capacidad reductora de las hojas de Pelargonium hortorum L.H. BAILEY, Eriobotrya japonica (THUMB.) LINDL. y Lupinus mutabilis SWEET para la*

producción de nanopartículas de plata. (Licenciatura), Universidad Nacional de Trujillo, Perú.