



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias

Programa de Maestría en Microbiología

**Degradación fotocatalítica del hongo fitopatógeno
Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* con películas de TiO₂-
ZnO utilizando radiación en la región visible del espectro**

Angie Lorena Hormiga Hernández

Bogotá D.C., Colombia
Febrero de 2022

**Degradación fotocatalítica del hongo fitopatógeno
Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* con películas de TiO₂-
ZnO utilizando radiación en la región visible del espectro**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

Angie Lorena Hormiga Hernández
Ingeniera química

Director:

Cesar Augusto Quiñones Segura

Químico., Dr.Sc.

Facultad de ingeniería diseño e innovación
Universidad Politécnico Gran Colombiano

Codirectora:

Martha Lucia Posada Buitrago

Bióloga, Ph.D.

Programa Maestría en Microbiología
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Línea de Investigación:

Agroambiental

Grupo de Investigación Ceparium

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias

Programa de Maestría en Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

Febrero de 2021

Dedicatoria

Dedico este trabajo de grado a mis padres, quienes me han apoyado en cada decisión que he tomado, ellos me han permitido explorar diferentes caminos y construir la persona que soy en este momento. A mi hermano, por su apoyo incondicional en cada momento, en cada aventura y cada locura que se pueda presentar, a mi familia que en este tiempo y en los momentos más difíciles me acompañaron de diferentes maneras mostrándome que no estaba sola, muchas gracias significo todo para mí.

Agradecimientos

A mi director, Dr. Sc. César Augusto Quiñones Segura, quien me guió en el transcurso de este trabajo, me ayudo a crecer como persona y a enfrentarme a nuevos retos día a día, me dio una perspectiva diferente de lo que es un grupo de investigación.

A mi directora, Ph. D. Martha Lucía Posada Buitrago, quien me enseñó un nuevo universo tan amplio y versátil como lo es la microbiología en donde cada día se aprende que las posibilidades son infinitas y la investigación permite entender un poco mejor que es lo que ocurre día a día.

A mis tíos, tías, nonos, mis primos y aquellos que por diferentes motivos durante el desarrollo de esta investigación partieron para siempre, se encuentran presentes en cada meta alcanzada.

A mis amigos que me apoyaron y animaron en cada momento tanto en mi carrera como en el desarrollo de este trabajo, conocí personas maravillosas que me enseñaron mucho como Schneider, Fran, Carito, Laura, Daniel, Diego, Motolov, Julián y a mis chicas super poderosas mil gracias.

A las personas encargadas de los laboratorios en la universidad Paola y Viviana, que permitieron y facilitaron el desarrollo de cada una de las actividades en el momento en que se requerían.

A mis jefes Marcela y Sandra que me ayudaron en diferentes momentos durante el transcurso de esta investigación y al equipo de Pharmilab, que cuando se requería me respaldaron.

Finalmente, y no menos importante a mis profesores que afianzaron mis conocimientos y estimularon el descubrimiento de un campo totalmente nuevo en el cual se puede seguir explorando e investigando. Muchas gracias por apoyarme en los momentos oportunos y durante ese camino atravesando situaciones adversas inesperadas como una pandemia, gracias.

Contenido

1.	Marco conceptual y generalidades	13
1.1	El clavel, generalidades y producción colombiana.	13
1.2	<i>Fusarium</i> , la principal amenaza del clavel colombiano.....	16
1.2.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	16
1.2.2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	18
1.3	Fotocatálisis heterogénea	19
1.3.1	Dióxido de titanio (TiO ₂).....	22
1.3.2	Generación de películas delgadas del fotocatalizador.	25
1.3.2.1	Recubrimiento por rotación (<i>Spin coating</i>).....	25
1.3.2.2	Pulverización catiónica (<i>Sputtering</i>).....	26
1.3.2.3	Deposición química de vapor (<i>Chemical vapor deposition CVD</i>)	27
1.4	Aplicación microbiológica de la fotocatalisis heterogénea.....	27
2.	Justificación	29
3.	Hipótesis.....	30
4.	Objetivos	31
4.1	Objetivo General	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5.	Desarrollo Experimental	32
6.	Materiales y métodos	33
6.1	Determinar las condiciones para la deposición de películas de TiO ₂ mediante el método spin coating y de ZnO por sputtering.....	33
6.1.1	Preparación del sustrato para la deposición de las películas.....	33
6.1.2	Deposición de las películas: Método <i>spin coating</i>	34
6.1.3	Deposición de las películas de ZnO mediante el método <i>sputtering</i>	35
6.2	Configuración del reactor.....	35
6.3	Evaluación fotocatalítica con azul de metileno de las películas de TiO ₂ /ZnO.....	36
6.4	MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> 37	
6.5	Evaluación fotocatalítica biológica de las películas de TiO ₂ /ZnO frente a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	37
6.6	Caracterización morfológica y estructural de las películas de TiO ₂ /ZnO	38
7.	Resultados y discusión	39
8.	Conclusiones	55
9.	Referencias.....	57

Lista de figuras

Figura 1 Distribución porcentual de las fincas productoras de flores por especies cultivadas Fuente:(6).....	14
Figura 2 Fincas productoras de flores por tipo de enfermedad según cada especie.....	14
Figura 3 Fincas productoras de flores tipos de control de enfermedades por especie	15
Figura 4 Ciclo de vida general de <i>Fusarium</i> spp	18
Figura 5 Marchitamiento vascular en el clavel	19
Figura 6. Posición relativa de la banda de conducción y de valencia con respecto a algunos semiconductores.....	21
Figura 7 Diagrama esquemático del proceso fotocatalítico del semiconductor TiO_2	22
Figura 8 Estructura cristalina del TiO_2	24
Figura 9. Síntesis de películas delgadas por spin coating	26
Figura 10. Proceso de sputtering. Imagen tomada y modificada de (<i>Fundamentals of sputtering</i> , n.d.)(31).....	26
Figura 11. Método deposición química de vapor.	27
Figura 12 Diseño de actividades desarrolladas durante la ejecución del proyecto	32
Figura 13 Proceso de lavado de vidrios.....	33
Figura 14 Proceso de elaboración de la suspensión de TiO_2	34
Figura 15 Proceso completo de elaboración de películas de TiO_2/ZnO	35
Figura 16 Caracterización estructural de las películas de TiO_2 - ZnO por XRD	39
Figura 17 Caracterización morfológica por SEM Las flechas en la imagen de la derecha señalan las protuberancias de ZnO sobre el TiO_2	40
Figura 18 Caracterización estructural película de dióxido de titanio y óxido de zinc por medio de EDX	41
Figura 19 Espectro de absorción del azul de metileno	41
Figura 20 Concentración ppm vs absorbancia a 665 nm	42
Figura 21 Remoción de azul de metileno usando una película de TiO_2 vs radiación ultravioleta y luz visible	43
Figura 22 Variación de la concentración de Azul de metileno con película de TiO_2 sin fuente de iluminación.....	45
Figura 23 Variación en la concentración de azul de metileno por medio de fotocatalisis heterogénea utilizando películas de TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis	46
Figura 24 Hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> f sp. <i>dianthi</i>	47
Figura 25 Proceso de recolección y conteo de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> ...	47

Figura 26 Configuración del fotorreactor.....	48
Figura 27 Porcentaje de reducción de las esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> por fotocatalisis heterogénea TiO_2 UV y TiO_2 Vis	49
Figura 28 Variación en el porcentaje de la concentración de esporas por fotocatalisis con TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis.....	49
Figura 29 Deterioro de la integridad de la membrana celular de las microconidias al ser expuestas a tratamiento fotocatalítico.....	50
Figura 30 Fotocatalisis heterogénea con películas de TiO_2 UV y TiO_2 Vis sobre microconidias de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	51
Figura 31 Fotocatalisis heterogénea con películas de ZnO UV y ZnO Vis sobre microconidias de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	52
Figura 32 Fotocatalisis heterogénea con películas de TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis sobre microconidias de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	53

Lista de tablas

Tabla 1. Algunas propiedades físicas de las estructuras naturales de TiO_2	23
Tabla 2. Elección de métodos de deposición a partir de algunos sustratos	25
Tabla 3 Concentración ppm vs Absorbancia	42
Tabla 4 Remoción de azul de metileno usando radiación ultravioleta y luz visible	43
Tabla 5 Variación de la concentración de azul de metileno con la película de TiO_2	44
Tabla 6 Variación de la concentración de azul de metileno por medio de fotocátalisis con películas de TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis.....	45
Tabla 7 Variación en el promedio del porcentaje de reducción en la concentración de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> por medio de fotocátalisis utilizando películas de TiO_2 y películas de TiO_2/ZnO usando radiación UV y Vis	48

Glosario y abreviaturas

Banda de conducción: es la banda correspondiente a niveles energéticos superiores, no ocupados. Es la banda vacía.

Banda de valencia: es la banda con más alto nivel de energía ocupada por electrones.

BAND GAP: también conocida como banda prohibida, es la diferencia de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia.

Catalizador: sustancia que le permite a una reacción química producirse más rápido, a partir de la generación de vías alternas de reacción

Espectro visible: región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir. Se encuentra en una longitud de onda de 400 a 700 nanómetros. Se trata del intervalo del espectro electromagnético en el que el Sol presenta su máxima emisión.

Fotorreactor: equipo donde se llevan a cabo las reacciones fotocatalíticas para la degradación de contaminantes.

Radiación UV: energía electromagnética emitida a longitudes de onda menores al correspondiente a la percepción del ojo humano. Se encuentra en una longitud de onda de 150 a 400 nanómetros.

Semiconductor: sólido cuya conductividad eléctrica es intermedia entre la de los metales y los aislantes.

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>TiO₂</i>	Dióxido de titanio
<i>ZnO</i>	Oxido de Zinc
<i>PAO</i>	Proceso avanzado de oxidación
<i>Abs</i>	Absorbancia
<i>UV-Vis</i>	Ultravioleta-Visible

1. Marco conceptual y generalidades

1.1 El clavel, generalidades y producción colombiana.

El género *Dianthus* de la familia Caryophyllaceae conocido comúnmente como clavel, este es originario de la cuenca mediterránea y presenta alrededor de 250 especies en donde se destaca *Dianthus caryophyllus*. El clavel presenta una base leñosa y tallos de 80 cm de longitud aproximadamente (1).

El sector floricultor en Colombia cuenta con más de 40 años de experiencia en la exportación de flores (2,3). Debido a la posición geográfica del país, el clavel tiene las condiciones favorables para su crecimiento como lo son, las temperaturas de la sabana de Bogotá entre los 4 y 8°C en la noche y en el día entre 11 a 22°C (4). Colombia es el líder mundial en la producción de claveles con una participación del 52% de su comercialización, en el país, alrededor de 910 hectáreas son cultivadas con clavel, lo que representa el 12% de la producción de flores en Colombia. En el año 2019 se exportaron 43.500 toneladas de esta flor (5).

La sabana de Bogotá se ha convertido en el principal productor en el sector floricultor del país con el 79% del área cultivada en esta zona, Colombia representa aproximadamente el 14% de la producción mundial de flores en donde aproximadamente el 11.4% de las fincas productoras de flores son de claveles como se presenta en la figura 1, de acuerdo con el último censo realizado por el DANE a fincas productoras de flores (FPF) en 28 municipios de la Sabana de Bogotá y Cundinamarca en el 2009 (6).

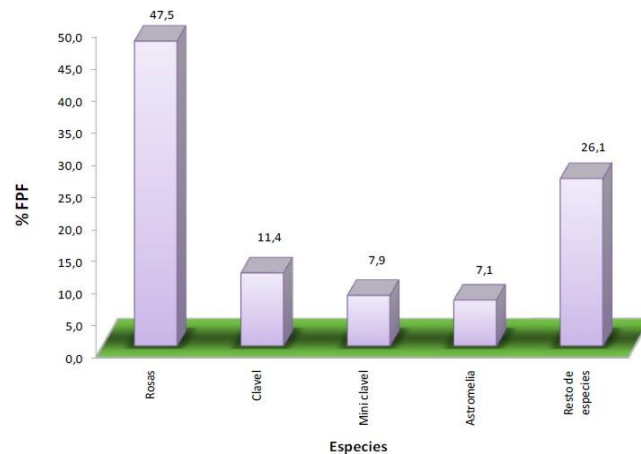


Figura 1 Distribución porcentual de las fincas productoras de flores por especies cultivadas Fuente:(6)

En la figura 2, se presentan las diversas enfermedades que afectan a las flores en las diferentes fincas productoras en la sabana de Bogotá. La principal enfermedad que afecta el clavel es producida por el hongo *Fusarium oxysporum*, el cual genera marchitamiento vascular y pobredumbre de raíz, seguida por la pudrición en las flores causada por el hongo *Botrytis cinérea*, y la enfermedad ocasionada por *Cladosporium*, caracterizada por un anillamiento en las hojas, entre otras; las enfermedades anteriormente mencionadas colonizan la planta por los haces vasculares de la misma evitando así que obtenga los nutrientes necesarios para su crecimiento.

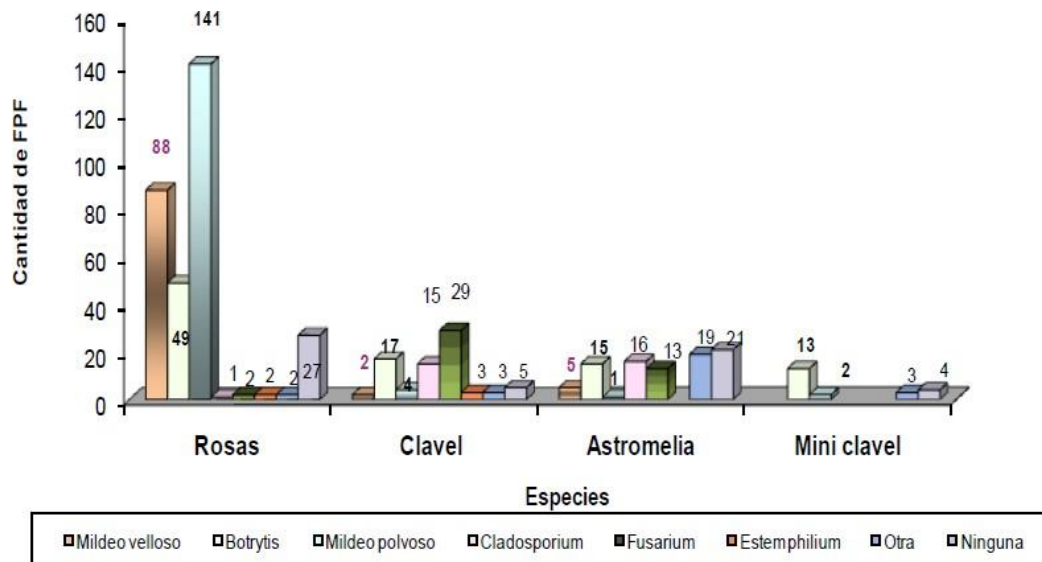


Figura 2 Fincas productoras de flores por tipo de enfermedad según cada especie Fuente:(6)

Con el fin de controlar las enfermedades, en las fincas productoras de flores utilizan diferentes métodos de control como se presenta en la figura 3, principalmente el químico seguido del método

cultural, este último es un método que se basa en las actividades del floricultor con el fin de evitar que la relación hospedero-patógeno se establezca y si ya se encuentra el patógeno en el cultivo tomar las medidas necesarias para eliminarlo a través de los métodos físicos, químicos o biológicos, seguido del método orgánico finalizando con el método biológico, estos dos últimos métodos de control de la enfermedad se basan en el uso de organismos vivos para el control de la enfermedad presente en el cultivo (7).

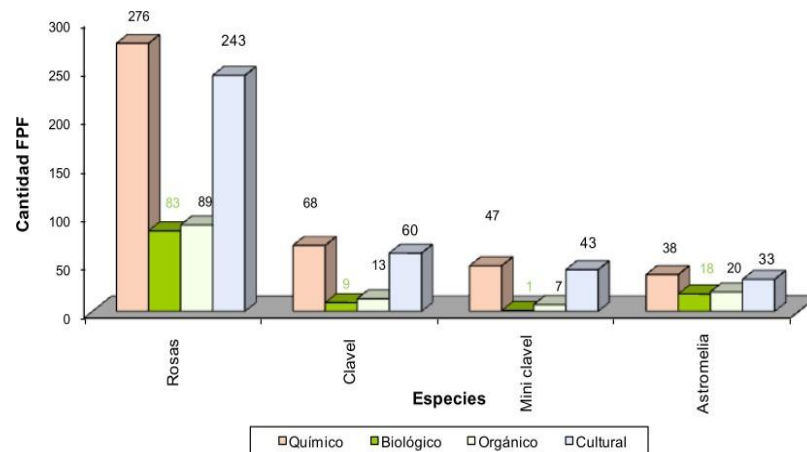


Figura 3 Fincas productoras de flores tipos de control de enfermedades por especie
Fuente:(6)

El control de los fitopatógenos presentes en el suelo como se menciona en la Figura 3 se puede llevar a cabo por métodos biológicos, químicos y físicos. En el control físico se establecen condiciones desfavorables para el crecimiento del hongo fitopatógeno como cambiar su fuente de nitrógeno, mejorar el drenaje en el cultivo, crear surcos más profundos en el arado modificando la porosidad del suelo, entre otros (8).

El control químico es realizado utilizando diferentes tipos de compuestos entre los que se encuentran los desinfectantes como el hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, los cuales pueden llegar a inactivar al patógeno por medio de la ruptura de ácidos nucleicos; alcoholes y sales cuaternarias (como el bisulfato de potasio o sodio), los cuales desnaturalizan proteínas; los fungicidas como bromuconazol y procloraz que al ser aplicados en el suelo disminuyen la aparición de la marchitez vascular, sin embargo, presentan una alta toxicidad que representa un peligro para el medio ambiente y su manipulador directo; los fumigantes como el bromuro de metilo combinado con tricloronitrometano controlan a los patógenos que pueden llegar a afectar el suelo; y procesos

de desinfección anaeróbica del suelo haciendo uso de materia orgánica seguida de irrigación y cubierta con poliestireno para generar condiciones de anaerobiosis, entre otras (9).

Para el control biológico se utilizan organismos vivos (hongos, bacterias) capaces de repeler, causar la muerte o inhibir el crecimiento del patógeno denominados biocontroladores como la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y los hongos *Trichoderma* spp. y *Gliocladium virens*, que generan competencia por nutrientes y de los cuales se desprenden formulaciones comerciales como SoilGard® (*Gliocladium virens*) y RootShield® (*Trichoderma harzianum*) (9).

1.2 *Fusarium*, la principal amenaza del clavel colombiano

El género *Fusarium* es una de las especies de hongos más complejas y adaptativas de especie Eumycota, los hongos del género *Fusarium* se encuentran distribuidos ampliamente alrededor del mundo, se han convertido en un problema serio al generar metabolitos tóxicos que ponen en riesgo la integridad de los humanos, animales y las plantas (10). Al tener un comportamiento fitopatógeno, ocasiona enfermedades caracterizadas por marchitamiento vascular, deterioro en cultivos ornamentales y forestales. Este microorganismo utiliza diferentes métodos de infección dependiendo de cada especie de *Fusarium* (9).

Este hongo puede sobrevivir ya sea, como micelio en el suelo o como espora en ausencia del hospedero; la infección puede iniciar desde la raíz expandiéndose en secciones que se encuentran sobre el nivel del suelo. Este fitopatógeno debe vencer barreras físicas por parte del hospedero como la adhesión a la pared, inactivación y muerte de las células como reacción hipersensible; además, el hongo secreta diferentes enzimas hidrolíticas que permiten romper la pared celular del huésped como las quitinasas, celulasas, pectinasas y proteasas (9).

1.2.1 *Fusarium oxysporum*

Los hongos del género *Fusarium*, especie *oxysporum* son de gran interés económico y agrícola a nivel mundial, ya que se encuentra en suelo, aire y agua, en la mayoría de los casos actúan como fitopatógenos, además algunas especies también son patógenas humanas y animales (11).

Dentro de *Fusarium oxysporum* existen variaciones de acuerdo con su especificidad al momento de colonizar la planta y según los mecanismos de interacción hospedero-patógeno. La forma especial

(f. sp.) es empleada en cepas con características determinadas a nivel morfológico (sujetas a las condiciones ambientales dadas por el huésped). Han sido identificadas aproximadamente 106 formas especiales para 45 familias de plantas hasta agosto de 2018, de las cuales se han asociado a una familia en particular y de este, se ha derivado su nombre de forma especial. Se han reconocido 37 formas especiales que no tienen un amplio fundamento teórico y corresponden a patógenos que, han sido aislados en plantas enfermas sin ser inoculados nuevamente en las plantas de origen con el fin de confirmar su patogenicidad (12).

F. oxysporum se reproduce de manera asexual, pues su estado sexual aún no ha sido observado (13)(Figura 4); En cuanto a la morfología, Valencia et al., (2001)(14) mencionan los tres tipos de esporas asexuales las Microconidias, macroconidias y clamidosporas a continuación se describe brevemente cada una de ellas donde las Microconidias son las esporas que se presentan más frecuentemente

- Microconidias: Son esporas usualmente unicelulares sin septas, se pueden encontrar con forma curva o recta tienen aproximadamente de 5 a 12 μm de largo por 2.5 a 3.5 μm de ancho, se producen en los conidióforos miceliales.
- Macroconidias: producidas en el esporoquio, son esporas de paredes delgadas, largas, ligeramente curvadas en forma de hoz, con varias células (3 a 5 septas transversales) con una célula apical atenuada y con una célula basal elongada, tiene aproximadamente un tamaño de 27 a 46 μm de largo y de 3 a 4.5 μm de ancho, siendo así el carácter morfológico más importante para identificar el hongo.
- Clamidosporas: formadas sobre o en macroconidias y las hifas; son de paredes gruesas tienen un diámetro aproximado de 5 a 15 μm . Debido a este tipo de espора el hongo puede llegar a sobrevivir a ambientes hostiles y en el suelo a pesar de la ausencia de plantas hospedantes.

Los diferentes tipos de esporas se encuentran principalmente presentes en el suelo y en medio de los cultivos puede llegar a infectar a la planta, a continuación, se presenta el ciclo de vida del *Fusarium oxysporum f sp. dianthi*

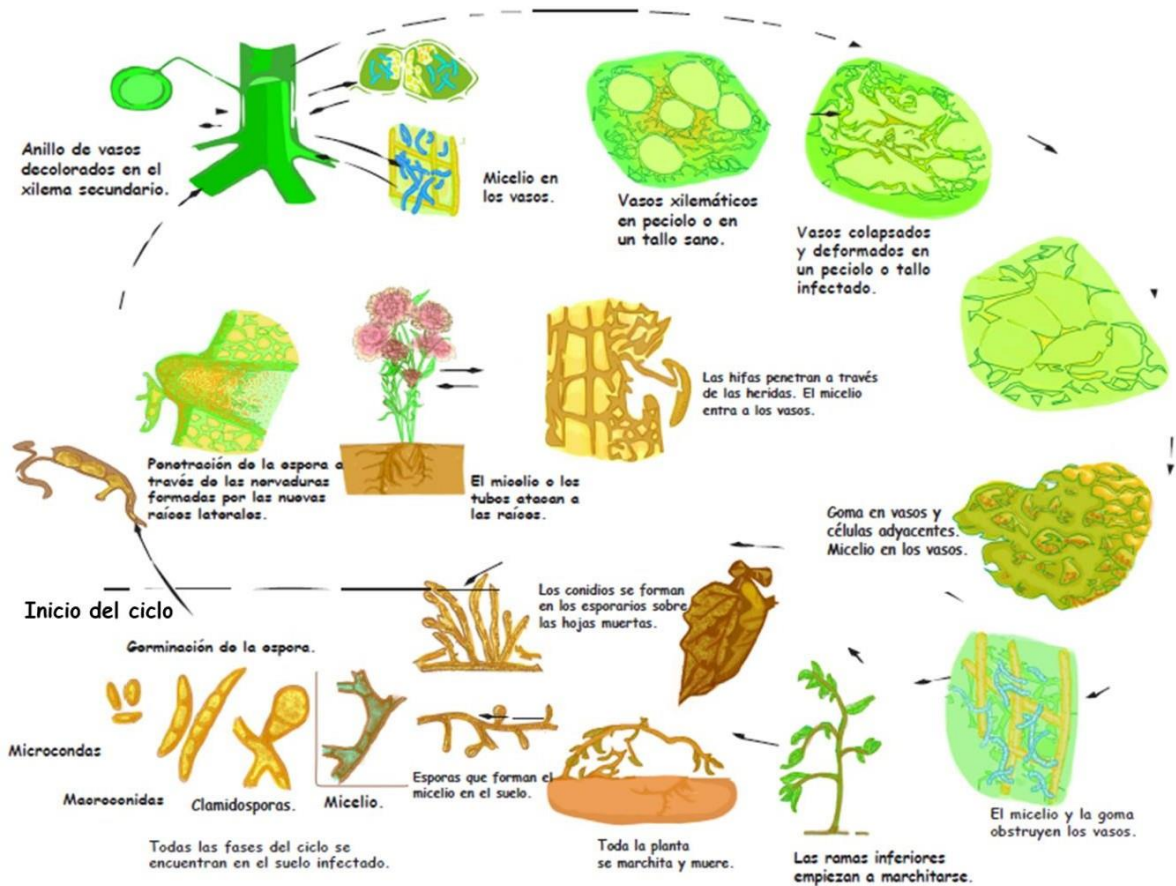


Figura 4 Ciclo de vida general de *Fusarium* spp

Tomado y modificado de (13). Cuando las plantas sanas crecen en suelo infectado por el hongo fitopatógeno los diferentes tipos de esporas ingresan a la planta por la raíz o a través de heridas en la planta, el micelio avanza a través de la corteza de la raíz, al llegar a los vasos del xilema, los micelios comienzan a crecer colapsando los vasos evitando el transporte del agua y nutrientes a través de la planta, generando así el marchitamiento vascular, la podredumbre de raíz y eventualmente la muerte de la planta, sobre las hojas muertas se forman microconidias, iniciando nuevamente el ciclo.

1.2.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Los cultivos de clavel en Colombia son afectados por diferentes patógenos como *Botrytis cinerea*, causante de la pudrición en las flores, *Pseudomonas woodsii*, causando puntos bacterianos en las hojas, entre otros. Sin embargo, la enfermedad que se presenta con más frecuencia es la marchitez vascular, la cual es causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (4). Este hongo se propaga a través de los gajos infectados, presenta una alta resistencia a condiciones desfavorables y baja eficiencia en las medidas de control con un alto costo (14). Este fitopatógeno actúa al obstruir los haces vasculares de la planta de forma progresiva generando así el marchitamiento y deterioro de las hojas y el tallo de la planta, incluso llegando a provocar la muerte de esta (figura 5). Para el control de esta enfermedad se implementan métodos físicos y químicos,

los cuales afectan de manera negativa al medio ambiente, ya que involucran en el proceso reactivos altamente tóxicos, de alto costo y poco eficientes (15).



Figura 5 Marchitamiento vascular en el clavel

Las flechas presentan la presencia del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en los haces vasculares del tallo en el clavel, por otra parte, los óvalos indican la pudrición seca en el tallo. Imagen tomada de (4)

La marchitez vascular generada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* es la principal enfermedad que afecta a los claveles a nivel mundial, lo cual ha generado una disminución considerable en la producción del clavel y grandes pérdidas económicas, el uso de métodos físicos y químicos generan un impacto negativo en el medio ambiente, de alto costo y no son lo suficientemente eficientes; por lo cual, es necesario investigar métodos alternativos que sean eficientes, más económicos y ambientalmente amigable como el uso de fotocátalisis heterogénea (10,15)

1.3 Fotocatálisis heterogénea

La fotocátalisis heterogénea es un proceso avanzado de oxidación (PAO) que ha demostrado efectividad para tratar efluentes contaminados como aire y agua. Este proceso, al no ser selectivo, permite remover diferentes contaminantes orgánicos como fenoles, compuestos orgánicos clorados y plaguicidas entre otros(16). Este proceso se basa en la absorción de energía radiante emitida en la región visible o ultravioleta del espectro (15 nm a 700 nm) por medio de un semiconductor (fotocatalizador) en cual, al entrar en contacto con el medio contaminado reacciona mineralizando el contaminante.

El proceso de la fotocatalisis heterogénea se ha presentado como un método “verde” y ambientalmente amigable, el cual consiste en utilizar un fotocatalizador en suspensión o adherido a un sustrato como el vidrio, polímeros, telas, etc., que al ser expuesto a radiación adquiere la energía suficiente para generar una foto-excitación. Bajo estas condiciones genera que los electrones (e^-) presentes en la banda de valencia (BV) adquieran la energía necesaria para superar la banda prohibida o BAND GAP (17,18) hacia la banda de conducción (BC) dejando así huecos en la banda de valencia, de esta manera permite generar portadores de carga, los cuales se aprovechan posteriormente para generar reacciones de oxido-reducción entre el fotocatalizador y el medio contaminado (18)

De acuerdo con la amplitud de esta banda prohibida o BAND GAP dependen las características del material, ya que, si presenta un valor superior a 4 eV es considerado un material dieléctrico y si este valor es cercano o igual a cero se considera un material metálico, aquellos materiales que se encuentran entre estos dos valores son considerados semiconductores. En la figura 6 se presentan diferentes tipos de semiconductores en donde aquellos que presentan su banda de conducción sobre la línea de H^+/H_2 nos indica su capacidad de reducir el agua termodinámicamente. Por otra parte, aquellos materiales que presentan su banda de valencia por debajo de la línea O_2/H_2O nos indica su capacidad de oxidar el agua, por esta razón, los semiconductores se dividen en tres tipos reductores, oxidantes y aquellos que pueden generar reacciones redox, utilizando como referencia un electrodo neutro de hidrógeno (ENH) y expresando estos valores en electronvolts (eV) la cual es la unidad de energía de los electrones.

Los semiconductores reductores, presentan su banda de conducción sobre la línea de H^+/H_2 sin embargo, su banda de valencia se encuentra sobre la línea de O_2/H_2O , pueden llegar a generar hidrógeno (H_2) por la adición de electrones a una molécula de agua; presentando un potencial de oxidación muy débil como el telururo de cadmio (CdTe), seleniuro de cadmio (CdSe), silicio (Si), entre otros.

Por otra parte los semiconductores oxidativos tienen un comportamiento opuesto a los semiconductores reductores, debido a que su banda de valencia se encuentra debajo la línea de O_2/H_2O y su banda de conducción se por debajo de la línea de H^+/H_2 lo que indica que pueden llegar a producir la disociación del agua generando oxígeno (O_2) sin embargo, su banda de conducción no es suficiente para generar la reducción del agua, caso de los siguientes

semiconductores: Disulfuro de molibdeno (MoS_2), óxido férrico (Fe_2O_3), trióxido de wolframio (WO_3), dióxido de estaño (SnO_2), entre otros.

Finalmente, en los semiconductores Redox su banda de valencia se encuentra debajo la línea de $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ y su banda de conducción sobre la línea de H^+/H_2 , lo cual genera reacciones de oxidoreducción, en los siguientes semiconductores el sulfuro de cadmio (CdS), el titanato de estroncio (SrTiO_3), el dióxido de titanio (TiO_2), el óxido de zinc (ZnO), el pentóxido de niobio (Nb_2O_5), entre otros, estos permiten oxidar y reducir el agua. En la figura 6, se presenta la posición relativa de la banda de conducción y de valencia con respecto a diferentes semiconductores.

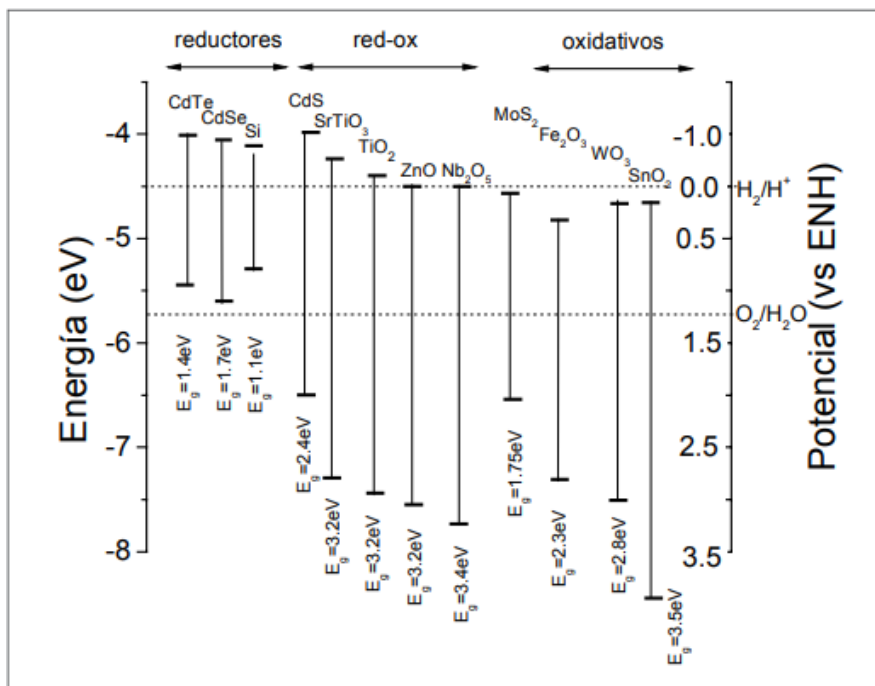


Figura 6. Posición relativa de la banda de conducción y de valencia con respecto a algunos semiconductores. Aquellos materiales que presentan una ubicación superior o igual a la banda de conducción (H_2/H^+) son capaces de reducir el agua mientras que aquellos que presentan una ubicación inferior o igual a la banda de valencia ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) pueden oxidarla. Fuente: Rodríguez et al., 2005 (17).

Con el fin de llevar a cabo la fotocatalisis, se debe tener en cuenta la fuente de radiación, el estado del medio contaminado, cuál va a ser el oxidante y finalmente cuál va a ser el fotocatalizador por utilizar, el cual debe tener un adecuado potencial redox, presentar resistencia a la corrosión, una baja toxicidad y alta área activa (18).

El dióxido de titanio (TiO_2) es uno de los semiconductores más estudiados, debido a su actividad fotocatalítica, alta disponibilidad, su resistencia a la corrosión, además de ser considerado inocuo y biocompatible (18–22). El TiO_2 al ser expuesto a radiación ultravioleta (UV) obtiene la energía

necesaria para genera portadores de carga como se presenta en la Figura 7.1, lo que le permite al electrón hueco (h^+) su separación de la banda de valencia (Figura 7.2) y superar el *BAND GAP* (3) hacia la banda de conducción (Figura 7.4), lo que, a su vez conduce a la interacción con las moléculas contaminantes de manera directa reduciéndolo y/u oxidándolo.

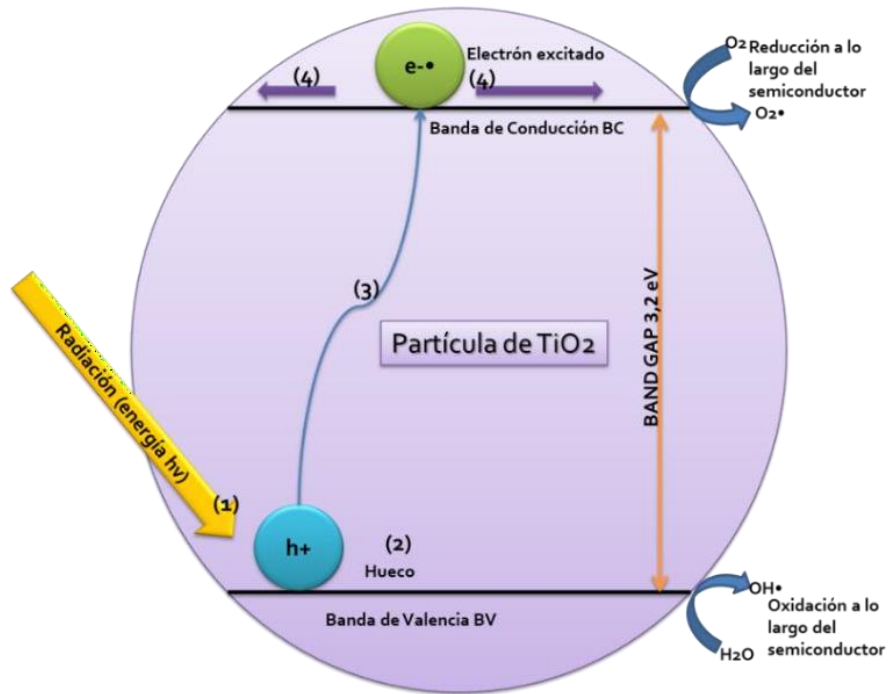


Figura 7 Diagrama esquemático del proceso fotocatalítico del semiconductor TiO_2 .

(1) se excita el electrón debido a una fuente externa de energía (radiación) generando así un hueco (h^+). (2) en la banda de valencia tiene carga positiva. (3) el electrón hueco (h^+) tiene la energía necesaria para realizar el salto de la banda de valencia a la banda de conducción (espacio prohibido o *band gap*). (4) los electrones excitados se transportan desde el seno del semiconductor hacia la superficie de este, allí reaccionan con el medio y el oxígeno para generar radicales hidroxilo especies altamente reactivas las cuales se activan en presencia del contaminante en el medio.

Fuente: figura propia.

1.3.1 Dióxido de titanio (TiO_2)

El TiO_2 posee características que hacen de este óxido un objeto de interés a nivel industrial, ya que, es utilizado regularmente en los procesos de pigmentación de papel, pinturas y plástico; al ser biocompatible, también es usado en diferentes productos como pigmento para el consumo humano en el caso de los bloqueadores y crema dental (23).

El TiO_2 tiene la propiedad de presentar diferentes estructuras cristalinas, en las que se encuentran anatasa, rutilo, brookita, columbita, baddeleyita, cotunnita, y fluorita, siendo las tres primeras

aquellas que se pueden encontrar de manera natural (Figura 8) y las demás formas cristalinas deben ser diseñadas a nivel de laboratorio (24). El estudio de estas estructuras en diferentes aplicaciones como celdas solares, pigmentos, sensores, catálisis, entre otras, permite visualizar su versatilidad (24).

Las diferentes formas cristalinas naturales del TiO_2 presentan características particulares a nivel estructural. Por ejemplo, el rutilo es más estable químicamente que la anatasa y la brookita, estas últimas dos estructuras cristalinas al ser sometidas a temperaturas altas y aumento de presión se convierten irreversiblemente en rutilo. La anatasa, el rutilo y la brookita presentan una alta resistividad eléctrica, dureza considerable (5 - 6.5 Mohs), son transparentes en el espectro visible de la luz (ancho de banda Band gap de 3.2eV) y exhiben los mayores valores de índice de refracción de los óxidos conocidos, como se presentan en la tabla 1 (20,24–26).

Tabla 1. Algunas propiedades físicas de las estructuras naturales de TiO_2

Forma cristalina	Densidad (g/cm ³)	Temperatura de fusión (°C)	Band gap (eV)	Índice de refracción
Brookita	4.14	1825	3.20 a 3.50	2.58
Anatasa	3.89	1825	3.20	2.55
Rutilo	4.25	1825	3.03	2.62

La brookita pura es compleja de obtener, debido a que, se encuentra con cierto porcentaje de anatasa o rutilo en su estado natural, presenta una alta actividad fotocatalítica y es electrónicamente más activa que la anatasa. Por otro lado, la anatasa presenta una mayor actividad fotocatalítica al ser expuesta a radiación ultravioleta y la actividad del rutilo puede ser mejor a la anatasa, ya que, presenta una mayor cantidad de agujeros de electrones y su tasa de recombinación

puede verse afectada, de acuerdo con las condiciones de preparación; en la figura 8 se muestra la representación de las diferentes estructuras cristalinas del TiO_2 (27)

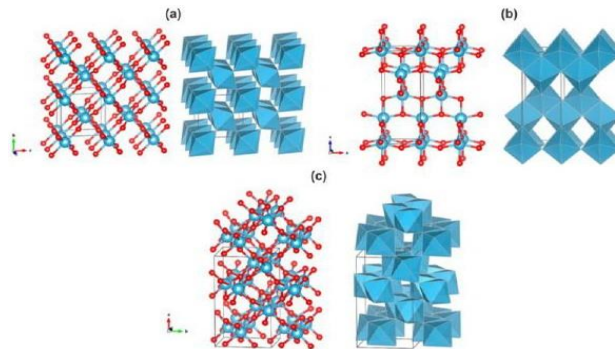


Figura 8 Estructura cristalina del TiO_2 .

Representación de las diferentes estructuras cristalinas del TiO_2 (a) anatasa, (b) rutilo y (c) brookita, en donde se aprecia como el rutilo presenta un mayor espacio en su estructura cristalina a diferencia de la anatasa y la brookita (18).

En cuanto a las propiedades fotocatalíticas, se establece que estas, se pueden ver afectadas por la forma de cristalización y su área superficial. Así, la cristalización ayuda a mejorar la velocidad de recombinación de los portadores de carga, lo cual a su vez, mejora el poder reductor y oxidante del fotocatalizador, al mismo tiempo, un área superficial alta mejora la adsorción de las moléculas objetivo en la superficie del fotocatalizador (28).

Uno de los principales limitantes a la hora de implementar este método de degradación, es el pequeño porcentaje de radiación solar que tiene la energía necesaria para generar portadores de carga en la superficie del semiconductor, por lo cual, se desarrollan fotocatalizadores sensibles a la luz visible y la reducción del *BAND GAP* para minimizar la recombinación del portador de carga y lograr una degradación más alta (28).

Al momento de realizar la descontaminación del medio usando la fotocatalisis heterogénea, es importante determinar el método de disposición del fotocatalizador, ya sea, en suspensión o utilizando películas delgadas del mismo que estén en contacto directo con el medio contaminado. Utilizar el semiconductor en suspensión requiere un paso adicional de filtración, para remover el fotocatalizador restante del medio, por lo cual a continuación se presenta de manera más detallada la generación de películas delgadas del fotocatalizador.

1.3.2 Generación de películas delgadas del fotocatalizador.

Se pueden utilizar uno o más materiales de acuerdo con, los requerimientos y el método de deposición para producir una película del fotocatalizador sobre el sustrato. Dependiendo del sustrato a utilizar existen diferentes métodos de depositar las películas, entre las que, se encuentra la deposición por baño químico (*Chemical Bath Deposition CBD*), deposición química de vapor (*Chemical Vapor Deposition CVD*), spray pirólisis, electrodeposición, recubrimiento por rotación (*spin coating*), y pulverización catiónica (*sputtering*), entre otros (17). La selección del método también depende en gran medida de la composición, la fase cristalina, morfología y espesor deseado del fotocatalizador. Así mismo, la temperatura de deposición depende del sustrato, ya que una elección incorrecta puede afectar su integridad y, a su vez, de la temperatura dependen la tasa de crecimiento del depósito del fotocatalizador, el tiempo de depósito, etc., (29). La tabla 2 muestra algunos métodos de deposición de acuerdo con, el sustrato a utilizar, los cuales garantizan la integridad de éste.

Tabla 2. Elección de métodos de deposición a partir de algunos sustratos

Sustrato	Método de deposición
Acero, aluminio, concreto, resina, papel, fibra textil, vidrio cristalino	Recubrimiento por inmersión (<i>Dip coating</i>) y Aerosol (Spray)
Vidrio	Recubrimiento por inmersión (<i>Dip coating</i>) Recubrimiento por rotación (<i>Spin coating</i>) Pulverización catiónica (<i>Sputtering</i>)
Cerámico	Recubrimiento por inmersión (<i>Dip coating</i>) Aerosol (Spray) Adhesión

Fuente: (17)

A continuación, se explican de forma más detallada los métodos de deposición, recubrimiento por rotación (*spin coating*), pulverización catiónica (*sputtering*) y baño químico de vapor (CVD), los cuales utilizan altas temperaturas al momento de generar las películas y no comprometen la integridad de un sustrato como el vidrio.

1.3.2.1 Recubrimiento por rotación (*Spin coating*)

Para usar este método se agrega en exceso la suspensión del fotocatalizador sobre un sustrato en reposo adherido a una plataforma giratoria, posteriormente se le aplica una velocidad angular al sustrato, el cual, se desplaza desde el centro hacia el exterior eliminando así el exceso, se reduce la velocidad de la plataforma obteniendo una película delgada de la suspensión original, de acuerdo

con las condiciones del equipo y los requerimientos de la deposición de la película. Existe un paso de evaporación de los compuestos volátiles presentes en la suspensión (figura 9.d) (17,28,30).

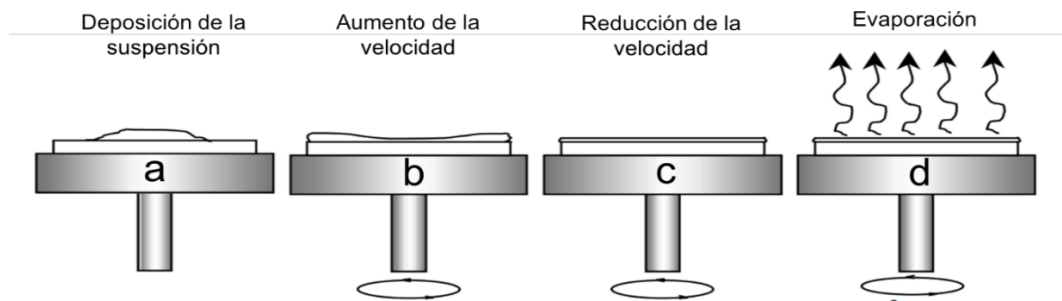


Figura 9. Síntesis de películas delgadas por spin coating.

a) Deposición de la suspensión en el sustrato b) Aumento de la velocidad en el sustrato, c) Homogenización de la película en el sustrato mediante la reducción de la velocidad, d) evaporación de compuestos volátiles. Tomada y modificada de: (Rodríguez et al., 2005).

1.3.2.2 Pulverización catiónica (*Sputtering*)

En el método de *Sputtering* se integra una variedad de procesos en donde una cámara con dos electrodos se somete a presiones menores de 10^{-5} Torr (760 Torr= 0.1MPa). Se emplea un blanco, material que va a ser depositado como cátodo, por ejemplo, el precursor del semiconductor óxido de zinc mantenido a un potencial negativo, y un sustrato, como el vidrio, ubicado de manera paralela al blanco en un ambiente de gases nobles, donde se va a formar la película de interés, en este caso, del semiconductor, interactuando así el gas con el blanco para ser depositado en el sustrato por efectos de potencial. De esta manera se genera una película delgada sobre el mismo, como se presenta en la Figura 10 (29,31–33). Entre los gases más utilizados en este proceso están el Argón

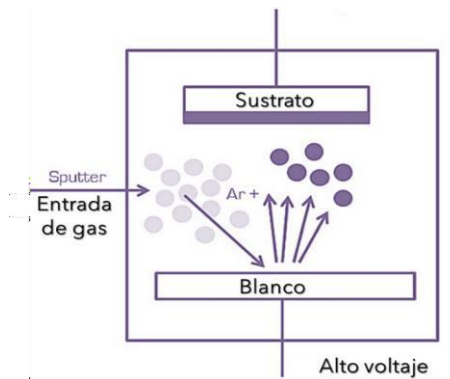


Figura 10. Proceso de sputtering. Imagen tomada y modificada de (*Fundamentals of sputtering*, n.d.)(31)

1.3.2.3 Deposición química de vapor (*Chemical vapor deposition CVD*)

La deposición química de vapor está constituida en una fase gaseosa o vapor que reacciona para formar una película delgada en la superficie del sustrato a altas temperaturas, en donde el proceso se caracteriza por la difusión, adsorción y reacción química de los reactivos en la superficie del sustrato, seguidos por la desorción y difusión de los productos en la superficie. Este método se puede realizar a presión atmosférica o al vacío. Como se representa en la figura 11.a, el depósito se realiza por rociado pirolítico a presión atmosférica. Por una bifurcación presentada en la cámara se recibe aire a presión (~ 30 lb/pulg²) y por la otra la suspensión del semiconductor o precursor de interés para depositar. El flujo de gas con la suspensión genera un efecto *venturi*, el cual forma una nube de gas. Esta asciende y llega al sustrato con alta temperatura, el cual a su vez evapora los compuestos volátiles formando así la película delgada, de acuerdo con la posición del depósito y el tiempo de exposición. El espesor varía, lo cual se puede verificar por medio del software del equipo realizando un seguimiento de este (figura 11.b) (17).

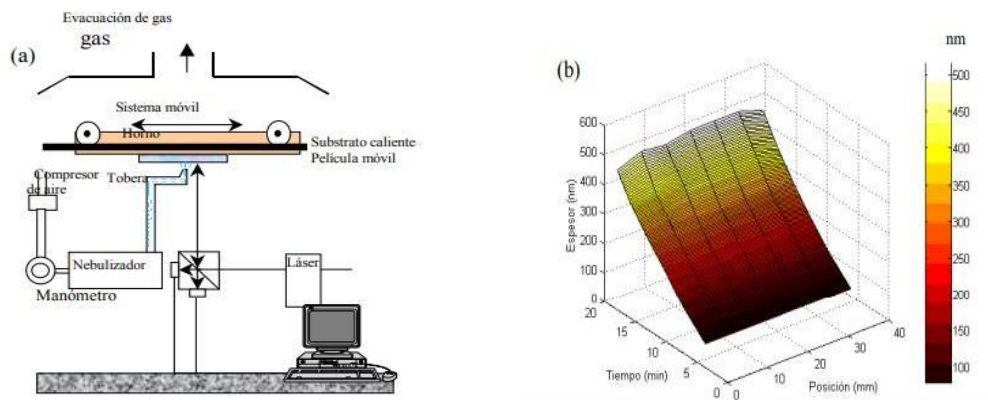


Figura 11. Método deposición química de vapor.

(a) Esquema del método de deposición química de vapor (b) seguimiento del espesor de la película a través del tiempo (17).

1.4 Aplicación microbiológica de la fotocatalisis heterogénea.

La fotocatalisis heterogénea es ampliamente utilizada en diferentes procesos de eliminación de contaminantes orgánicos presentes en medio acuoso y gaseoso. Estudios previos han demostrado su capacidad para eliminar o inactivar microorganismos patógenos (26,34–36). Entre estos estudios se resaltan trabajos como el desarrollado por Rajkumar et al (2019) donde se utilizó ZnO como

fotocatalizador enfrentándolo a patógenos de interés clínico como *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium sp* y *Salmonella sp.*, obtenidos de aislamientos clínicos los cuales al ser expuestos durante la noche a 37°C al fotocatalizador, presentaron daño en su pared celular y migración de sus componentes celulares, generando así muerte celular (35)

Por otra parte, Giannantonio et al (2009) usando TiO₂ en concreto y radiación artificial generó una desinfección de hongos como *Alternaria sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium oxalicum*, *Pestalotiopsis maculans* y *Trichoderma asperellum*, los cuales pueden llegar a colonizar este material al ser expuestos a radiación artificial, evidenció un daño estructural en la pared de los hongos perdiendo así su viabilidad y la capacidad de colonizar el concreto.

2. Justificación

Colombia es el segundo productor de flores en el mundo con una participación del 16% en el mercado mundial, su principal consumidor es Estados Unidos ,con una participación en el mercado de aproximadamente el 78% (37). Para el día de San Valentín se exportaron aproximadamente 600 millones de tallos a nivel mundial en donde el clavel representa aproximadamente 11.6% en la producción nacional (CVN, 2019), presentándose principalmente en la zona centro del país con una producción nacional del 66%. Una de las principales enfermedades que afectan al clavel es el *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* puede producir marchitamiento vascular y pudrición de raíz reduciendo significativamente el rendimiento de la producción. Para minimizar los daños causados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* se utilizan métodos convencionales como productos agroquímicos, químicos y/o biológicos, entre otros. Los cuales deterioran el medio ambiente y la salud del personal encargado de la manipulación de los elementos.

Debido a que los tratamientos actuales son tóxicos para el medio ambiente y ponen en riesgo la salud de su manipulador directo es necesario buscar un método alternativo para la disminución de contaminantes que sea químicamente inerte, mecánicamente estable y de alta durabilidad, por lo cual, la fotocatalisis heterogénea es una alternativa ambientalmente segura y de bajo costo y, que puede ser utilizada en el tratamiento de fitopatógenos generando daños oxidativos en su pared celular.

Por lo anterior, una alternativa antimicótica para garantizar la calidad de los claveles puede llevarse a cabo utilizando fuentes de luz naturales o artificiales en la región visible del espectro y películas de dióxido de titanio con óxido de zinc como agentes de degradación. Para lo cual, esta investigación explora una integración de la ingeniería con la microbiología para enfrentar un tema de interés como lo es la preservación de cultivos, la salud de los manipuladores directos del producto, disminución de costos y el uso de tratamientos ambientalmente amigables para la exportación de los claveles enfocándose así en la línea de microbiología agroambiental.

3. Hipótesis

La fotocatalisis heterogénea logra la degradación del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* utilizando la región visible del espectro.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar la actividad fotocatalítica de las películas de TiO_2/ZnO en la degradación del *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* utilizando luz visible.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar las condiciones para la deposición de películas de TiO_2 mediante el método spin coating y de ZnO por sputtering.
- 2- Caracterizar morfológica y estructuralmente las películas de TiO_2/ZnO mediante la técnica microscopia electrónica de barrido (SEM) y de difracción de rayos X.
- 3- Definir la actividad fotocatalítica de las películas de TiO_2/ZnO en la degradación del *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* utilizando radiación en la región visible del espectro.

5. Desarrollo Experimental

El desarrollo metodológico del presente trabajo de grado se realizó en las etapas descritas a continuación y se presentan resumidas en la figura 12:

- Determinar las condiciones para la deposición de películas de TiO_2 mediante el método spin coating y de ZnO por sputtering, mediante la variación de los parámetros en la deposición de las películas como temperatura, composición y revoluciones por minuto para el método spin coating y el tiempo de exposición del material y temperatura en el método sputtering.
- Establecer la configuración adecuada del fotorreactor teniendo en cuenta los parámetros de iluminación, recirculación del aire y disposición del fotocatalizador en el mismo que permitió una mejor actividad fotocatalítica en él.
- Evaluar la adherencia y la actividad fotocatalítica de las películas depositadas, mediante observación macroscópica y degradación de azul de metileno, respectivamente.
- Evaluación de la actividad antimicótica de las películas de TiO_2/ZnO frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.
- Caracterización morfológica y estructural de las películas de TiO_2/ZnO que presentaron la mejor actividad antimicótica.

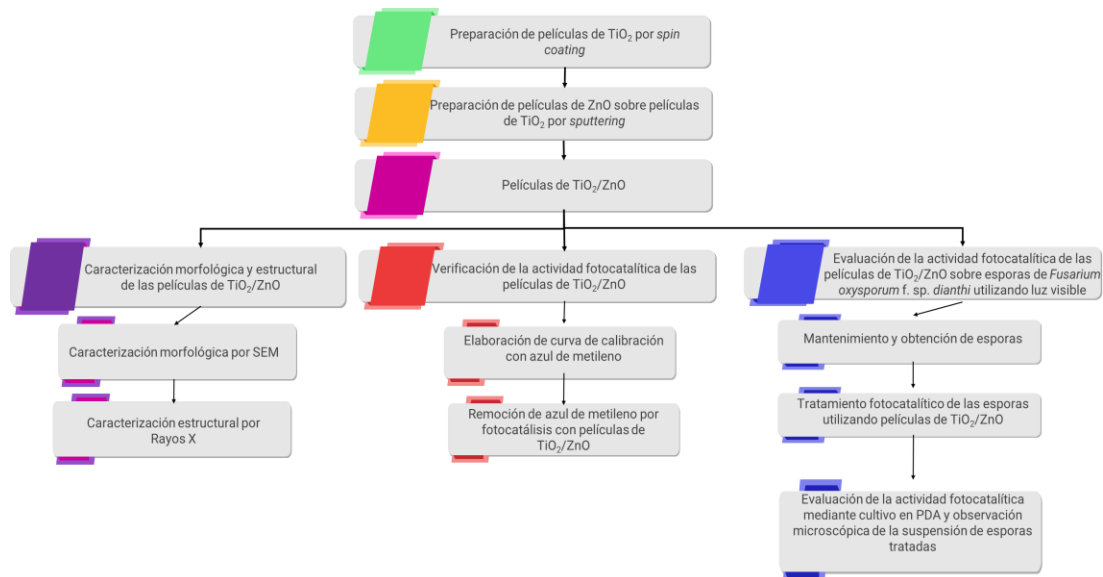


Figura 12 Diseño de actividades desarrolladas durante la ejecución del proyecto
(Fuente: diseño propio)

6. Materiales y métodos

6.1 Determinar las condiciones para la deposición de películas de TiO_2 mediante el método spin coating y de ZnO por sputtering

6.1.1 Preparación del sustrato para la deposición de las películas

Las películas de TiO_2/ZnO fueron preparadas sobre vidrio de borosilicato con dimensiones de 76mm X 26mm. La limpieza de estos sustratos es fundamental para la buena adherencia de las películas, para lo cual fue necesario realizar un lavado de los vidrios con el fin de garantizar la eliminación de posibles contaminantes en la superficie (Figura 13).

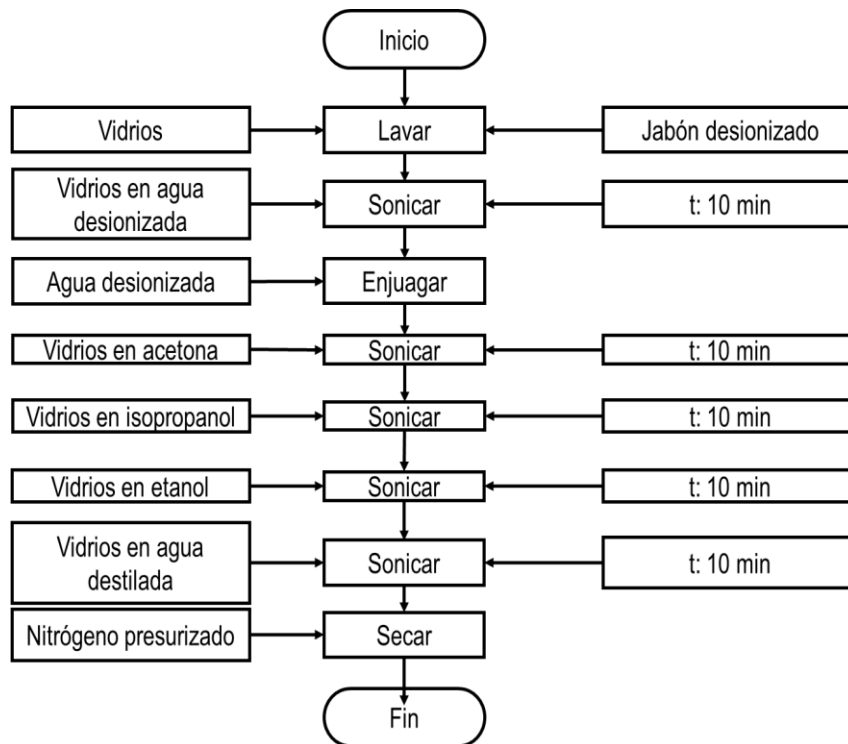


Figura 13 Proceso de lavado de vidrios

6.1.3 Deposición de las películas de ZnO mediante el método *sputtering*

Se procedió a depositar el óxido de zinc por medio de la técnica *sputtering* como se describe en la Figura 15.

1. Se colocó el vidrio con la película de TiO_2 en el soporte a 11 cm del sustrato dentro del *Sputter*.
2. Se colocó el precursor de Zinc metálico en el soporte para el blanco dentro del *Sputter*.
3. Se cerró la cámara del *Sputter* y se alimentó con una mezcla de argón y oxígeno.
4. Se activó el equipo y se generó un diferencial de potencial dirigido al blanco (precursor de ZnO) durante 20 minutos y 30.

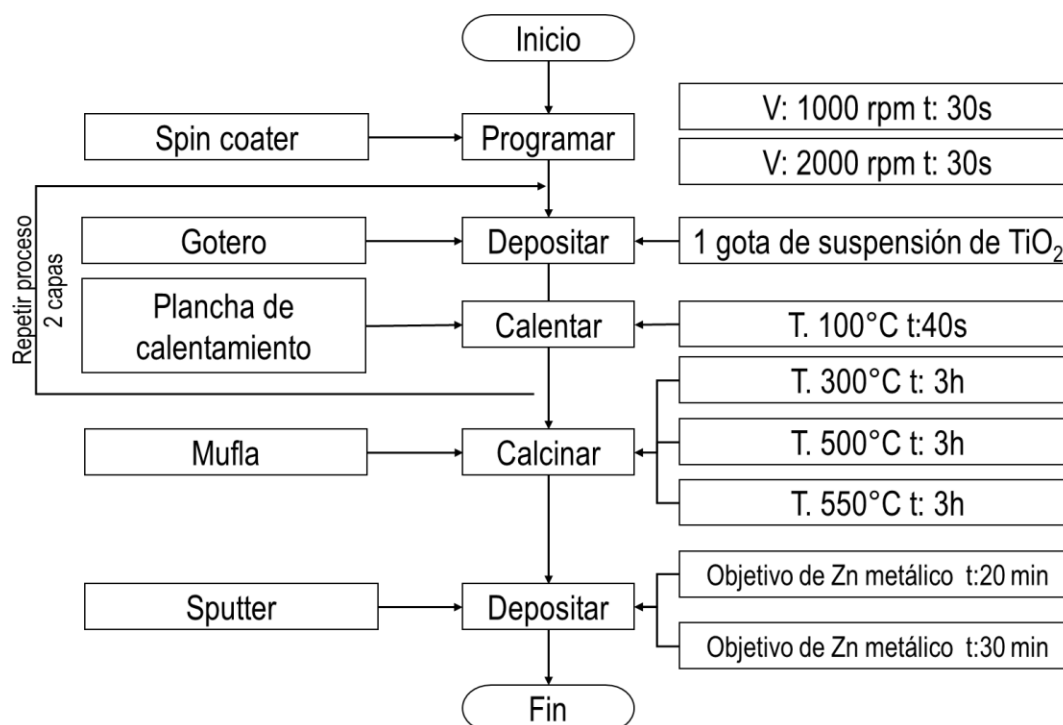


Figura 15 Proceso completo de elaboración de películas de TiO_2/ZnO

6.2 Configuración del reactor

Para establecer la configuración del reactor es necesario validar diferentes parámetros como la Fuente de iluminación, se seleccionan fuentes de iluminación con diferentes longitudes de onda (luz blanca, radiación ultravioleta) en diferentes ubicaciones dentro del reactor. Con el fin de evaluar el mejor comportamiento fotocatalítico al reaccionar con las películas.

Localización del fotocatalizador, al momento de colocar la película dentro del reactor se evalúa la mejor ubicación al realizar diferentes degradaciones con la misma concentración y el mismo tiempo, aquella ubicación que presente un mejor resultado es la cual se usa en cada uno de los ensayos.

Método de agitación dentro del reactor: se selecciona el método adecuado de agitación dentro del reactor garantizando la integridad de las películas y la adecuada interacción entre las películas y la suspensión.

6.3 Evaluación fotocatalítica con azul de metileno de las películas de TiO₂/ZnO

1. Se determinó el máximo de absorbancia espectral del azul de metileno (Merck) usado en este estudio, mediante el uso del espectrofotómetro Merck® prove 600, con lecturas en el espectro de 400 nm a 900 nm con intervalos de 0,5 nm.
2. A partir de la curva de calibración utilizando 10 concentraciones diferentes de azul de metileno (1-10 ppm) con el espectrofotómetro Merck® prove 600 a la longitud de onda determinada en el paso 1, se realizó una regresión lineal basada en la ecuación $y = a + bx$ para realizar el seguimiento de la concentración de azul de metileno durante el proceso de fotocatalisis.
3. La película de TiO₂ se ubicó dentro del fotorreactor en forma paralela a la fuente de iluminación (led de alta potencia), para la circulación de aire se utiliza una manguera de silicona conectada a una bomba de aireación.
4. Se adicionaron 30 mL de una solución de azul de metileno de 8 ppm y se puso en funcionamiento todo el sistema.
5. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro tomando muestras de la solución de azul de metileno, se tomaron 6 muestras en intervalos de 60 segundos empezando en el tiempo 0, posteriormente se realizaron 5 tomas cada 5 minutos y finalmente 3 tomas cada 10 minutos completando así una hora de reacción.
6. Finalizado el proceso se elaboró una curva de degradación mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, esta ecuación toma la forma $x = \frac{y-a}{b}$ donde (x) es la

concentración y (y) es la absorbancia. Se graficaron los datos obtenidos de la concentración (ppm) frente al tiempo (min) que duró la reacción fotocatalítica.

7. Este proceso se repitió utilizando películas de TiO₂/ZnO y de ZnO por triplicado.

6.4 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*

1. En 30 frascos Schott de 250 mL se sembraron en 70 mL de caldo Sabouraud una porción de 0,5 cm X 0,5 cm del hongo previamente incubado, es incubado a 25°C con agitación de 50 rpm durante 15 días.
2. Se utilizó un Erlenmeyer de 500 mL con desprendimiento lateral estéril y una bomba de vacío se filtraron las esporas (microconidias) a través de una malla de nylon SEFAR® PCF estéril con un diámetro de poro de 22 µm (SEFAR, Suiza).
3. El filtrado se recolectó en un frasco Schott de 1000 mL; posteriormente, fue distribuido en tubos tipo Falcon de 15 mL, para la concentración de esporas mediante centrifugación (5 minutos a 4000 rpm).
4. El precipitado fue resuspendido en caldo Sabouraud, y se realizó el conteo de las esporas obtenidas utilizando una cámara de Neubauer para preparar la suspensión de esporas en una concentración determinada de $2,5 \times 10^6$ esporas/mL para los ensayos de fotocátalisis heterogénea.

6.5 Evaluación fotocatalítica biológica de las películas de TiO₂/ZnO frente a *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*

La suspensión de esporas concentradas de $2,5 \times 10^6$ esporas/mL se deposita dentro del reactor en donde interactúa con las películas de dióxido de titanio y óxido de zinc (TiO₂/ZnO) y la fuente de iluminación, en agitación por corriente de aire.

1. La película de TiO₂/ZnO se dispuso en forma vertical dentro del fotorreactor.
2. Se adicionaron 30 mL de la suspensión de esporas.

3. Posteriormente, se dispuso al interior un led UV de alta potencia de 3W ($\lambda=390\text{nm}-395\text{ nm}$), una manguera de silicona por la cual circulaba el aire que provenía de la bomba de aireación, y se puso en funcionamiento todo el sistema.
4. Se tomaron muestras cada 50 minutos por 250 minutos, se observó por medio de un microscopio óptico si presentaba daño estructural en las esporas y usando la cámara de Neubauer se hizo un seguimiento de la concentración a través del tiempo realizando un conteo de estas.
5. Se realizó el mismo procedimiento cambiando la fuente de iluminación por un led de luz blanca de alta potencia (3W) ($\lambda=600\text{nm}$).

6.6 Caracterización morfológica y estructural de las películas de TiO_2/ZnO

Con el fin de evaluar la estructura y la cristalización de las películas se realiza la caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y la caracterización estructural mediante difracción de rayos X de las películas de TiO_2/ZnO que presentaron actividad antimicótica.

7. Resultados y discusión

7.1 Deposición de las películas por *spin coating* y *sputtering*

Homogeneidad: Se espera que las películas sean altamente homogéneas, esto no solamente ayudara a que las medidas sean de buena calidad, y a su vez contribuye a su reproducibilidad que se determina por un examen visual.

Adherencia: Se realizó el test de la cinta el cual consiste en, colocar cinta adhesiva comercial sobre la película, se retira de forma rápida y contundente de la misma.

Actividad fotocatalítica: se evaluó realizando remociones de azul de metileno que es la sustancia utilizada normalmente para hacer estas verificaciones.

7.2 Caracterización de películas de dióxido de titanio y oxido de zinc

Para la elaboración de las películas de dióxido de titanio se utilizó el Hombitan AFDC Sachtleben el cual tiene un tamaño de partícula de 466 nm. Los demás reactivos utilizados para la elaboración de las películas se esperan hayan sido eliminados completamente en la etapa calcinación.

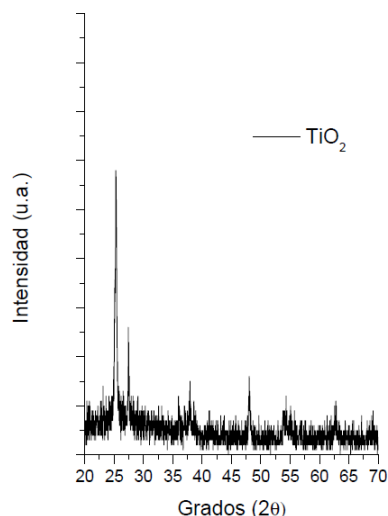


Figura 16 Caracterización estructural de las películas de TiO₂- ZnO por XRD

La Figura 16 muestra la caracterización estructural realizada por difracción de rayos X muestra la composición de la película de dióxido de titanio depositada a partir de una suspensión elaborada con Hombitan AFDC Sachtleben con tamaño de partícula de 466 nm(38), se puede observar en el XRD el crecimiento de las estructuras policristalinas del TiO_2 de anatasa y rutilo, los reflejos presentes en el TiO_2 en 2θ : 27.9 y 2θ : 56.9, se encuentran asociados a los planos (1 1 0) y (2 2 0) de la fase rutilo (JCPDS #021-1276) y los otros dos reflejos en 2θ : 25.5 y 2θ : 48.3 asociados a los planos (1 0 1) y (2 0 0) de la fase anatasa (JCPDS #021-1272)(39). Por otra parte, los difractogramas de Rayos X de las películas modificadas con ZnO no mostraron ningún pico perteneciente al ZnO lo cual es atribuido al espesor de la película depositada en la modificación.

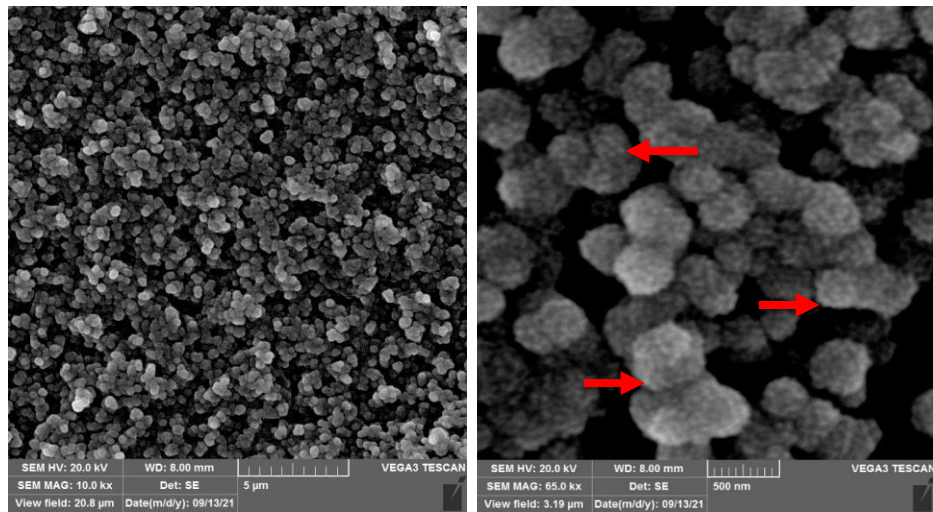


Figura 17 Caracterización morfológica por SEM
Las flechas en la imagen de la derecha señalan las protuberancias de ZnO sobre el TiO_2

La caracterización morfológica de la película de TiO_2/ZnO se realizó por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Los electrones secundarios permiten visualizar la topografía sobre la película presentando así la homogeneidad de los depósitos sobre el sustrato de vidrio (Figura 17), también se pudo observar la naturaleza porosa de la película. Finalmente se confirma el tamaño de partícula que corresponde a la especificación técnica la cual es alrededor de 466 nm. Imágenes más cercanas nos muestran pequeñas partículas de forma esférica de alrededor de 50 nm que atribuimos al crecimiento de ZnO sobre las nanopartículas de TiO_2 más grandes (466 nm), en la figura 17 estas partículas son señaladas con las flechas rojas.

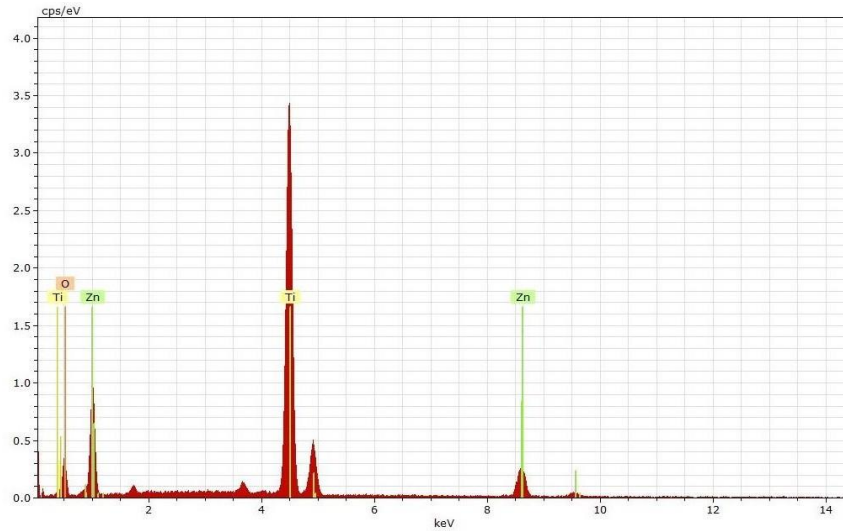


Figura 18 Caracterización estructural película de dióxido de titanio y óxido de zinc por medio de EDX

Finalmente, los picos EDX obtenidos por la técnica SEM nos muestra la presencia de oxígeno, titanio y zinc con los siguientes porcentajes respectivamente 43,77%, 46,45% y 11,27% esto confirma la, relativamente, baja cantidad de zinc (Figura18).

7.3 Remoción de azul de metileno con películas de dióxido de titanio

La longitud de onda de absorción máxima del azul de metileno (Merck) usado en este estudio, es de 665 nm como se observa en la figura 19.

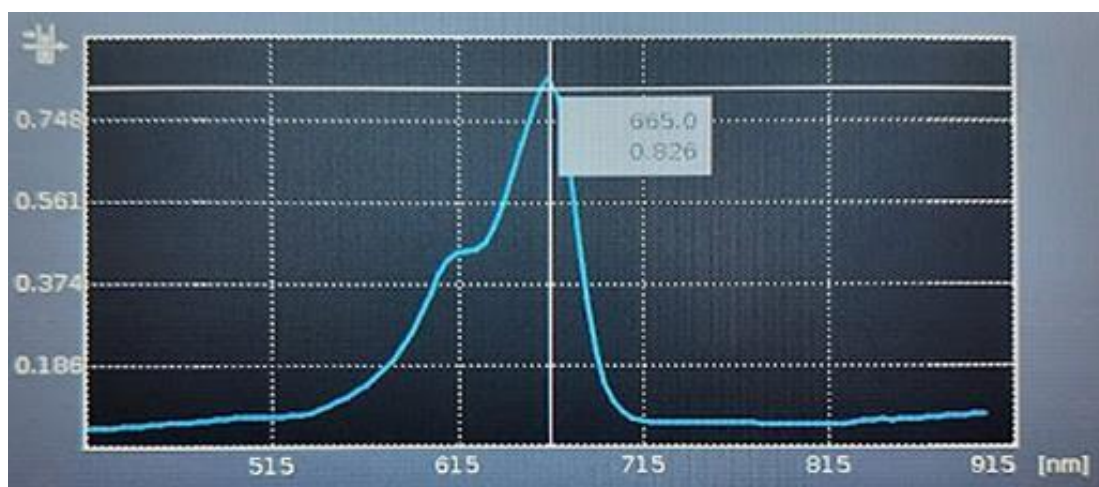


Figura 19 Espectro de absorción del azul de metileno

A partir de la determinación del máximo de absorbancia espectral se configura el espectrofotómetro a 665 nm para realizar la curva de calibración utilizando concentraciones de 1 ppm a 10 ppm leyendo la absorbancia en el equipo (Tabla 3) obteniendo un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9985 (Figura 20)

ppm	Absorbancia
1	0,248
2	0,486
3	0,727
4	0,960
5	1,162
6	1,379
7	1,612
8	1,822
9	2,025
10	2,191

Tabla 3 Concentración ppm vs Absorbancia

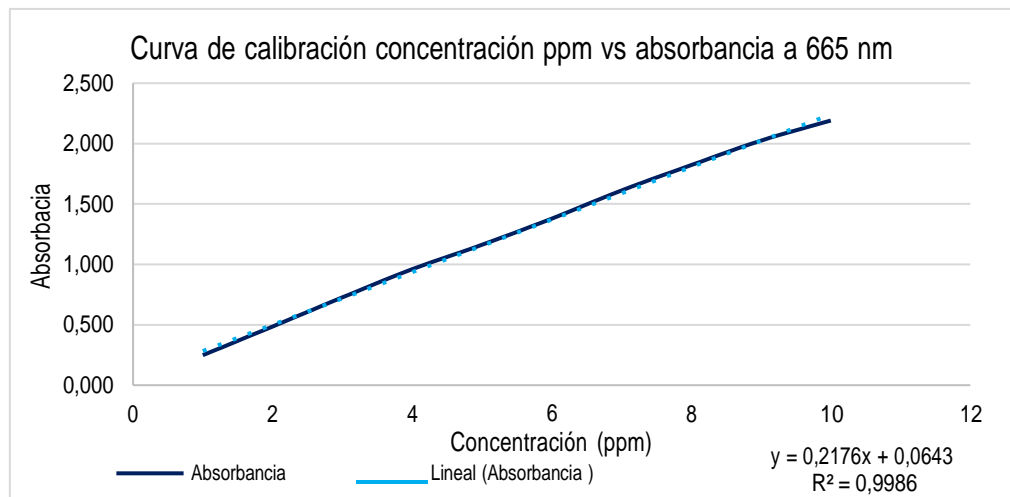


Figura 20 Concentración ppm vs absorbancia a 665 nm

Realizando la regresión lineal de la absorbancia vs la concentración (ppm) se obtiene la ecuación 1, en donde x representa la concentración y la variable y representa la absorbancia, permite calcular así el valor de la concentración a través del tiempo en cada una de las reacciones.

Ecuación 1

$$x = \frac{y - 0.0643}{0.2176}$$

La remoción del azul de metileno mediante fotocatalisis heterogénea con películas de TiO_2 obtenidas por el método de *spin coating* fue evaluada con una solución de azul de metileno de 8 ppm a una longitud de onda de 665 nm, utilizando radiación ultravioleta y luz en el espectro visible. Se calculó la media de la absorbancia de tres repeticiones y con base en ella se calcularon la concentración y el porcentaje de remoción (Tabla 4).

t	TiO ₂ UV			TiO ₂ Vis		
	Abs	ppm	% de remoción	Abs	ppm	% de remoción
0	1,762	7,80	0,00%	1,783	7,898	0,00%
1	1,720	7,61	2,47%	1,698	7,508	4,95%
2	1,713	7,58	2,89%	1,703	7,531	4,65%
3	1,695	7,49	3,95%	1,724	7,627	3,43%
4	1,702	7,53	3,53%	1,714	7,581	4,01%
5	1,671	7,38	5,36%	1,723	7,623	3,49%
10	1,600	7,06	9,54%	1,721	7,614	3,61%
15	1,557	6,86	12,08%	1,713	7,577	4,07%
20	1,520	6,69	14,25%	1,713	7,577	4,07%
25	1,501	6,60	15,37%	1,700	7,517	4,83%
30	1,479	6,50	16,67%	1,719	7,604	3,72%
40	1,436	6,30	19,20%	1,668	7,370	6,69%
50	1,412	6,19	20,62%	1,658	7,324	7,27%
60	1,411	6,19	20,68%	1,656	7,315	7,39%
Remoción (ppm)		1,613		Remoción (ppm)	0,584	
% de Remoción		20,68%		% de Remoción	7,39 %	

Tabla 4 Remoción de azul de metileno usando radiación ultravioleta y luz visible

Al utilizar una película de TiO₂ con radiación ultravioleta después de una hora de reacción se obtuvo una remoción del 20,68%, a diferencia de la exposición de la película de TiO₂ con radiación en el espectro visible de la luz que obtuvo una remoción en su concentración del 7,39% (Figura 21).

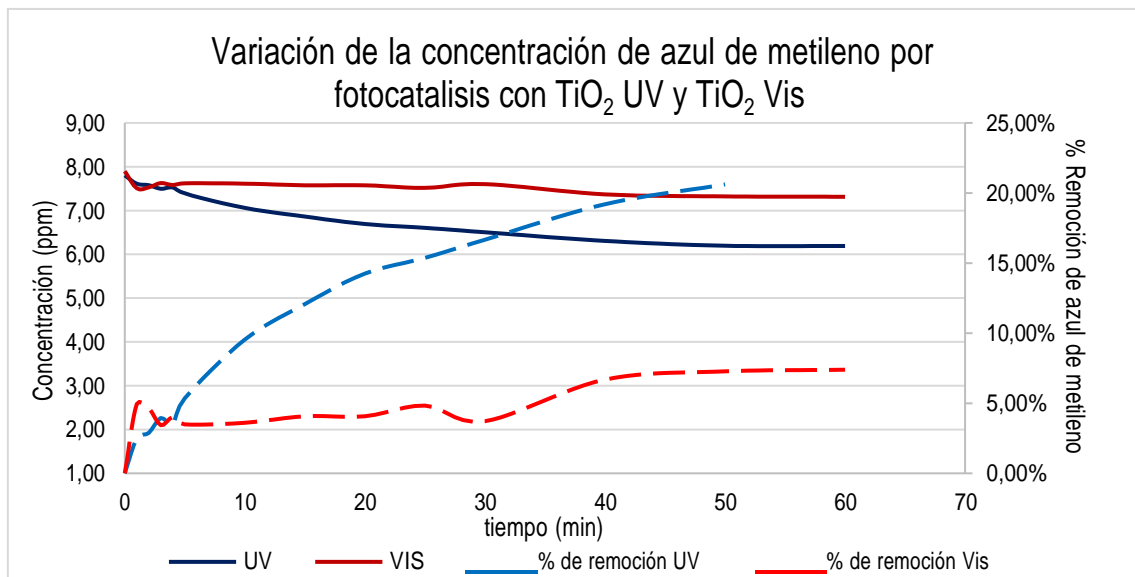


Figura 21 Remoción de azul de metileno usando una película de TiO₂ vs radiación ultravioleta y luz visible

La actividad fotocatalítica de la película de TiO₂ bajo radiación ultravioleta observada fue mayor frente a la actividad presentada por la radiación en el espectro visible, ya que el led utilizado tiene una longitud de onda entre 390 nm y 395 nm, correspondiendo a la radiación UVA, la cual emite

una energía de 3,10 eV a 3,94 eV, por lo tanto, aporta la energía que se requiere para que realice la reacción fotocatalítica dadas las propiedades del TiO₂ con un Band GAP de 3,2 eV, a diferencia de la energía emitida por el led visible que tiene una longitud de onda entre 400 nm a 800 nm que no permite generar la reacción fotocatalítica con la película de TiO₂ (Figura 21), sin embargo, el porcentaje de remoción observado en el espectro visible se puede atribuir al fenómeno de absorción de azul de metileno por el TiO₂ (40).

Adicionalmente, la exposición de azul de metileno únicamente a la película de TiO₂, sin fuente de iluminación, causó una disminución en la concentración del 10,78% después de una hora de reacción (Tabla 5, Figura 22).

Sin luz TiO2			
t (min)	Abs	ppm	% de reducción
0	1,706	7,545	0,00%
1	1,675	7,402	1,89%
2	1,659	7,329	2,86%
3	1,654	7,306	3,17%
4	1,637	7,227	4,20%
5	1,626	7,177	4,87%
10	1,585	6,989	7,37%
15	1,580	6,966	7,67%
20	1,567	6,906	8,47%
25	1,557	6,860	9,08%
30	1,550	6,828	9,50%
40	1,543	6,795	9,93%
50	1,527	6,722	10,90%
60	1,529	6,731	10,78%
Reducción (ppm)		0,813	
% de reducción		10,78%	

Tabla 5 Variación de la concentración de azul de metileno con la película de TiO₂

Este porcentaje de remoción (10,78%) (Tabla 5) se puede atribuir a los procesos de absorción que se dan sobre la película de TiO₂; siendo importante resaltar que las películas de TiO₂ están compuestas por material particulado de tamaño nanométrico, lo cual les confiere un alta área superficial; por otra parte, al no presentar una fuente de energía, no se genera el salto entre la banda de valencia a la banda de conducción (Band gap del TiO₂), la reacción se considera fotoquímica en la fase absorbida y no se atribuye a la actividad fotocatalítica de la película (40), además, la ligera variación presentada entre el minuto 50 y 60 se atribuye a la incertidumbre del instrumento ($A=\pm 0.004$)(41).

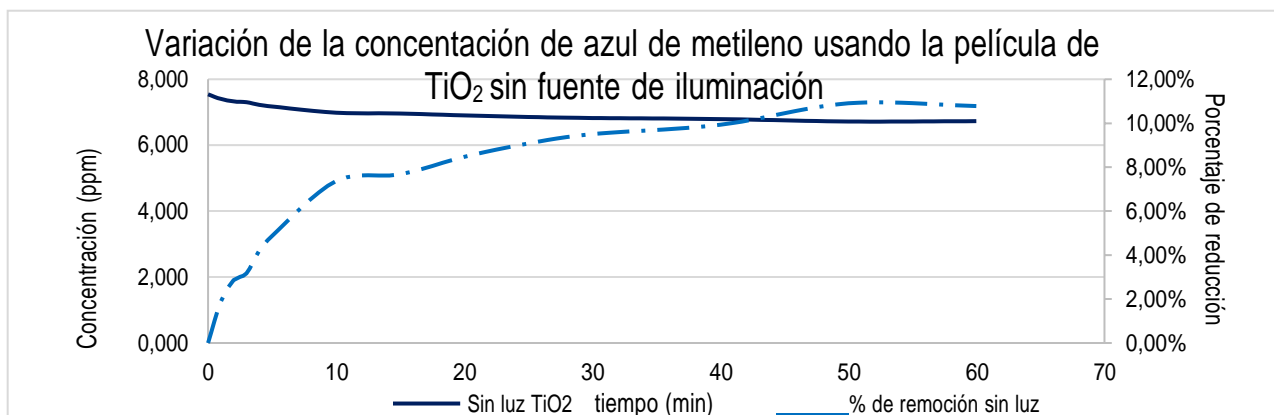


Figura 22 Variación de la concentración de Azul de metileno con película de TiO₂ sin fuente de iluminación

7.4 Remoción de azul de metileno con películas de dióxido de titanio y óxido de zinc (TiO₂/ZnO)

La remoción de azul de metileno con películas de TiO₂/ZnO fue evaluada usando una solución de azul de metileno de 8 ppm a una longitud de onda de 665 nm utilizando radiación ultravioleta y radiación en el espectro visible de la luz durante un periodo de una hora. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo leyendo la absorbancia y a partir de ella y la ecuación 1 determinada anteriormente se realiza el seguimiento de la variación de la concentración y el porcentaje de remoción del azul de metileno (Tabla 6).

t	TiO ₂ /ZnO UV			TiO ₂ /ZnO Vis		
	Abs	ppm	% de remoción UV	Abs	ppm	% de remoción Vis
0	1,755	7,770	0,00%	1,767	7,825	0,00%
1	1,659	7,329	5,68%	1,71	7,563	3,35%
2	1,639	7,237	6,86%	1,681	7,430	5,05%
3	1,642	7,250	6,68%	1,69	7,471	4,52%
4	1,628	7,186	7,51%	1,689	7,466	4,58%
5	1,617	7,136	8,16%	1,694	7,489	4,29%
10	1,597	7,044	9,35%	1,664	7,352	6,05%
15	1,597	7,044	9,35%	1,677	7,411	5,29%
20	1,584	6,984	10,11%	1,65	7,287	6,87%
25	1,596	7,039	9,40%	1,652	7,296	6,75%
30	1,593	7,025	9,58%	1,627	7,182	8,22%
40	1,576	6,947	10,59%	1,622	7,159	8,52%
50	1,56	6,874	11,53%	1,621	7,154	8,57%
60	1,57	6,920	10,94%	1,604	7,076	9,57%
Remoción		0,850		Remoción	0,749	
% de reducción		10,942		% de reducción	9,573	

Tabla 6 Variación de la concentración de azul de metileno por medio de fotocatalisis con películas de TiO₂/ZnO UV y

TiO₂/ZnO Vis

La disminución de la concentración de azul de metileno por medio de fotocatalisis heterogénea utilizando películas de TiO_2/ZnO presentó una reducción del 10,94% utilizando radiación ultravioleta y una reducción del 9,57% utilizando radiación en la región visible del espectro después de una hora de reacción (Tabla 6), a través del tiempo, se presentan ligeras variaciones en la absorbancia leída en el equipo, esta variación se atribuye a su precisión de absorbancia propia del espectrofotómetro de $\pm 0.004(41)$.

La Figura 22 nos muestra cómo el óxido de zinc modifica la actividad fotocatalítica del dióxido de titanio, se evidencia que disminuye el porcentaje de remoción de azul de metileno utilizando como fuente de iluminación radiación ultravioleta con respecto a las películas de TiO_2 , pues pasa de tener un porcentaje de remoción del 20,68% (Figura 21) a uno del 10,94% (Figura 23), sin embargo, al ser expuestas las películas de TiO_2/ZnO a radiación en la región visible del espectro el porcentaje de remoción del azul de metileno aumentó del 7,39% (Figura 21) al 9,57% (Figura 23).

Al integrar ambos semiconductores se realiza una modificación en el band gap y la energía necesaria para realizar el proceso fotocatalítico, y debido a este fenómeno se presenta un mayor porcentaje de remoción al usar la película combinada utilizando radiación en la región visible del espectro con respecto al uso de la película únicamente con TiO_2 usando la misma fuente de radiación

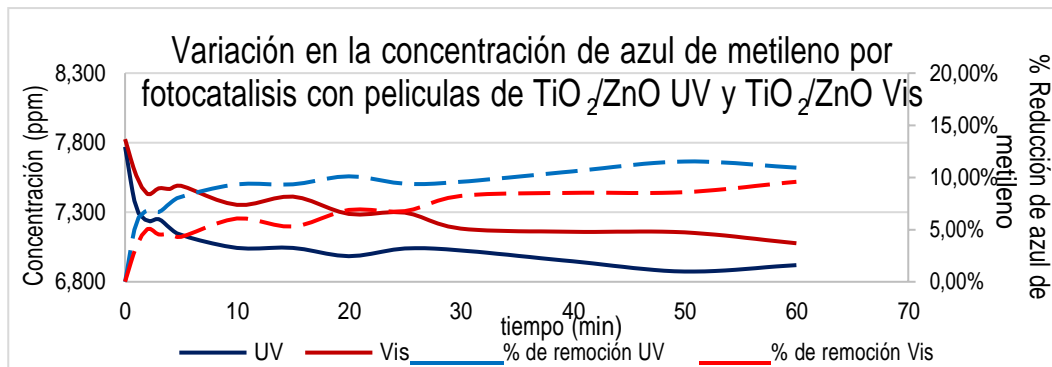


Figura 23 Variación en la concentración de azul de metileno por medio de fotocatalisis heterogénea utilizando películas de TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis

7.5 Mantenimiento del hongo fitopatogéno y obtención de las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Durante el estudio se mantuvo una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en Agar Sabouraud (AS) y Agar Papa dextrosa (PDA) (Figura 24).

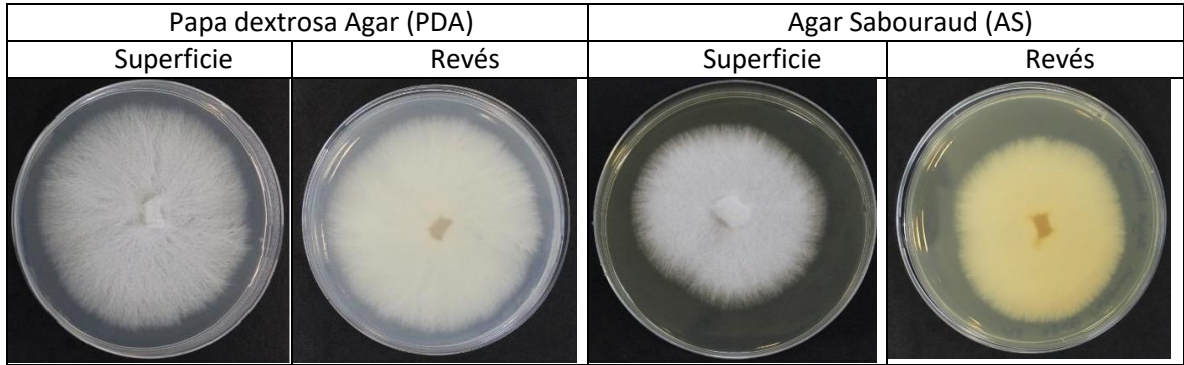


Figura 24 Hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f sp. *dianthi*

A partir de las placas incubadas por siete días se sembró un disco de agar de 0,8 cm de diámetro en frascos Schott de 250 mL con 70 mL de caldo Sabouraud que fueron incubados por 15 días a 25°C a 50 rpm en oscuridad (Figura 25.A) se realizó la filtración utilizando mallas de nylon de 22µm y la suspensión filtrada (Figura 25.B) es separada en tubos tipo Falcon de 15 mL (Figura 25.C), posteriormente es centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos (Figura 25.D), por último se empleó una cámara de Neubauer y el microscopio óptico para obtener recuentos (Figura 25.E) obteniendo en promedio de $3,5 \times 10^6$ esporas/mL; debido al diámetro de apertura de la malla de 22 µm únicamente fueron recolectadas microconidias.

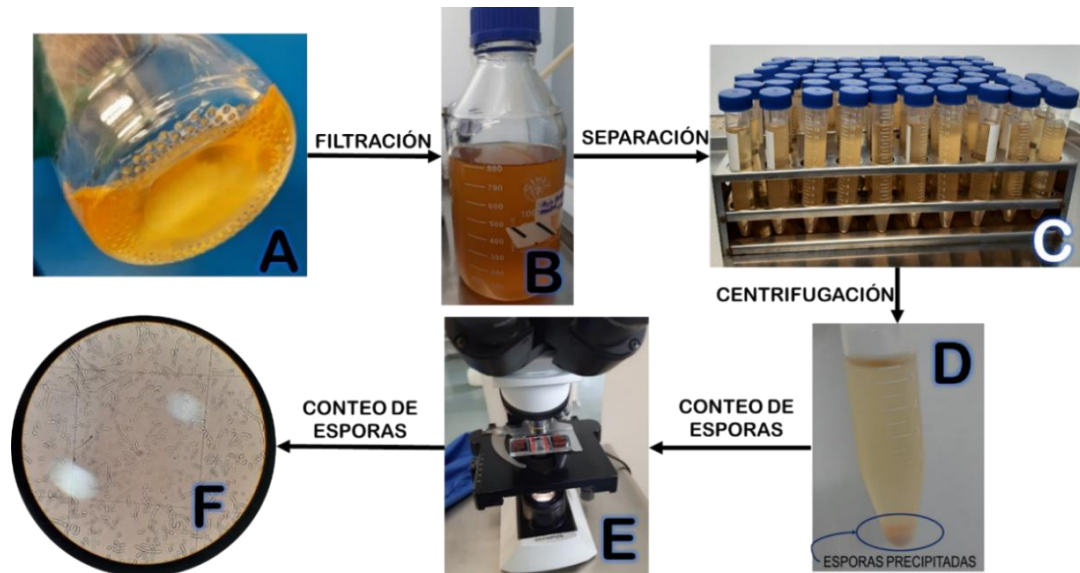


Figura 25 Proceso de recolección y conteo de las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

7.6 Evaluación de la actividad fotocatalítica de las películas de TiO₂, ZnO y TiO₂/ZnO sobre las esporas del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f sp. dianthi*.

Dentro del reactor se puso la suspensión de esporas (20 mL, 2,6 X 10⁶ esporas/mL), se colocó la película de manera paralela a la fuente de iluminación (Figura 26. A y B), como fuente de iluminación se usaron luces led de alta potencia de 3W (radiación UV y Luz blanca) y como sistema de agitación se utilizó una bomba de agua (Figura 26. C, D), se realizó la evaluación del tratamiento mediante observación al microscopio utilizando una cámara de Neubauer durante 250 minutos en intervalos de 50 minutos.

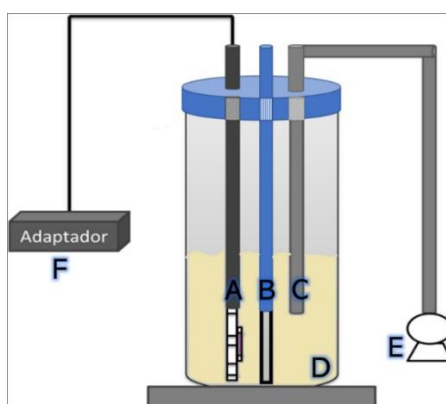


Figura 26 Configuración del fotorreactor

- A. Fuente de iluminación. B. Película fotocatalítica (TiO₂, ZnO o TiO₂/ZnO). C. Ingreso de aireación. D. Suspensión de esporas. E. Bomba de aire. F. fuente de poder para la fuente de iluminación.

A continuación, se presenta el porcentaje de reducción en la concentración de esporas en diferentes pruebas realizadas con películas de TiO₂ y película de TiO₂/ZnO usando 20 mL de una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum f sp. dianthi* con una concentración de 2,6 X 10⁶ esporas/mL por 250 minutos de reacción (Tabla 7).

Tiempo (min)	Película de TiO ₂		Película de TiO ₂ /ZnO	
	Promedio % reducción UV	promedio % reducción Vis	Promedio % Reducción UV	Promedio % Reducción Vis
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
50	26,64%	25,24%	36,92%	39,58%
100	37,97%	42,06%	49,14%	60,49%
150	44,93%	62,17%	70,24%	77,20%
200	58,34%	64,16%	82,67%	84,71%
250	67,49%	76,45%	90,13%	92,33%

Tabla 7 Variación en el promedio del porcentaje de reducción en la concentración de esporas de *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* por medio de fotocatalisis utilizando películas de TiO₂ y películas de TiO₂/ZnO usando radiación UV y Vis

La concentración de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* utilizando las películas de TiO_2 presentó un porcentaje de reducción en promedio del 67,49% y del 76,45%, usando como fuente de iluminación radiación ultravioleta y luz visible, respectivamente (Tabla 7, figura 27); sin embargo, en promedio se presentó una reducción del 90,13% (radiación UV) y del 92,33% (luz blanca) utilizando películas de TiO_2/ZnO en un tiempo de reacción de 250 minutos (Tabla 7, Figura 28). El aumento en su actividad fotocatalítica se presentó principalmente por el acoplamiento en sus Band Gap entre el TiO_2 y el ZnO , los cuales reducen su espacio entre la banda de conducción y la banda de valencia disminuyendo así la recombinación electrón-hueco, es decir, disminuyendo el requerimiento de energía, lo que a su vez genera una mayor difusión sobre la superficie de cargas positivas y negativas aumentando así las reacciones de oxido-reducción en la suspensión (42).

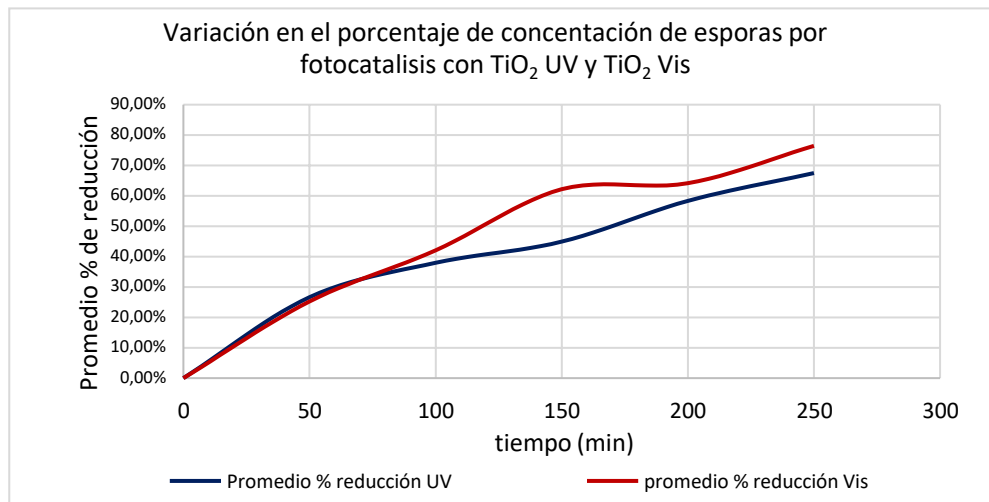


Figura 27 Porcentaje de reducción de las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* por fotocatalisis heterogénea TiO_2 UV y TiO_2 Vis

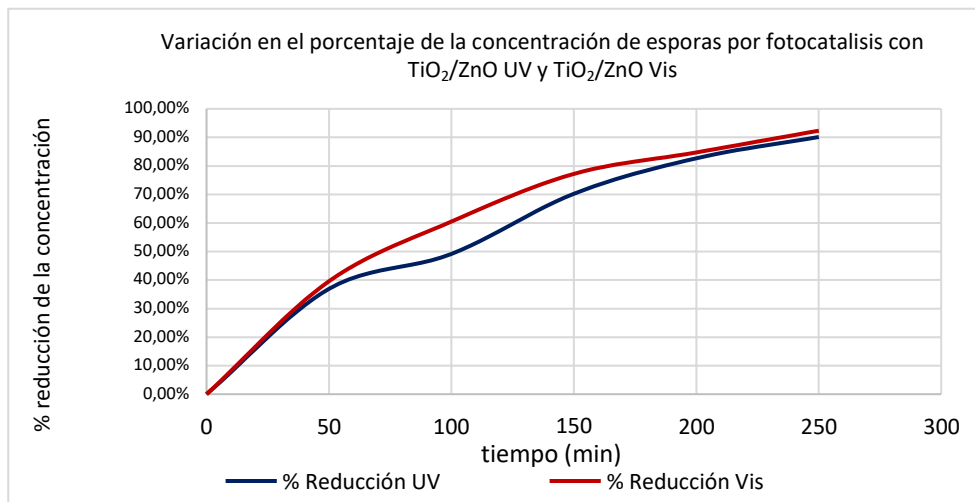


Figura 28 Variación en el porcentaje de la concentración de esporas por fotocatalisis con TiO_2/ZnO UV y TiO_2/ZnO Vis

El seguimiento de la concentración de las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* por medio observación microscópica y uso de la cámara de Neubauer permitió determinar la disminución de la concentración a través del tiempo, así como el inicio de la aparición de residuos de material celular de las esporas debido a las especies reactivas de oxígeno generadas por el proceso fotocatalítico ocasionando inicialmente deterioro en la pared celular y posteriormente en la membrana citoplasmática (Figura 29) (43).

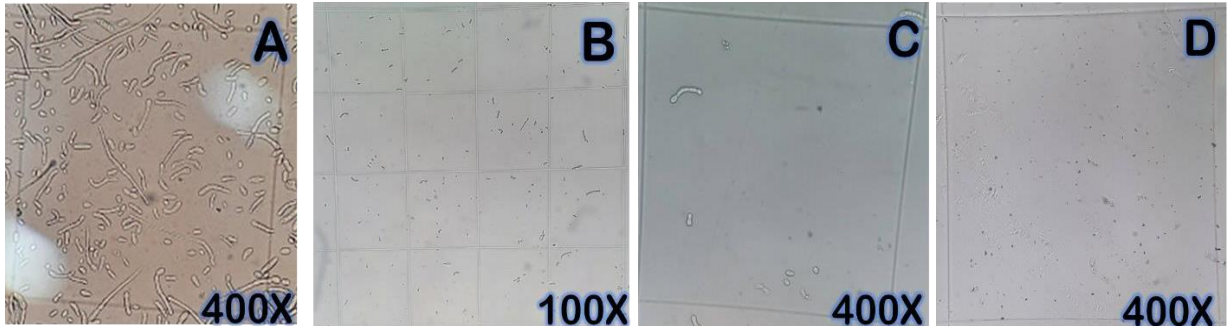


Figura 29 Deterioro de la integridad de la membrana celular de las microcinidias al ser expuestas a tratamiento fotocatalítico

A. Cuento inicial de esporas (0 minutos de tratamiento), B y C. 50 minutos de tratamiento, D. 250 minutos de tratamiento usando películas de TiO_2/ZnO y radiación en la región visible del espectro.

La figura 29 muestra la pérdida de la integridad celular y disminución de la concentración de las esporas causada por el tratamiento fotocatalítico a través del tiempo, evidenciada por el bajo número de esporas por cuadrante en los tiempos y presencia de restos de material celular.

El ensayo de crecimiento en los medios de cultivo PDA y Agar Sabouraud permitió analizar la viabilidad de las esporas después de ser tratadas fotocatalíticamente con las películas de TiO_2 , ZnO y TiO_2/ZnO . Se sembró 1 mL de la suspensión de estas esporas tratadas en PDA y Agar Sabouraud y, después de cinco días de incubación a 25°C , se observó crecimiento del hongo (Figuras 30, 31 y 32).

Luego de la reacción fotocatalítica de la película de TiO_2 sobre las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se observó crecimiento del hongo a una concentración que permitió identificar colonias independientes (Figura 30), por lo tanto, la reacción afectó la viabilidad de las esporas, ya que se había iniciado con una concentración de esporas $2,6 \times 10^6$ esporas/mL que al ser sembradas en placa es imposible identificar colonias individuales puesto que se presenta crecimiento uniforme sobre todo el medio que sugiere la viabilidad de las esporas en la concentración inicial (Figura 30), resultado que complementa y confirma el efecto del tratamiento descrito según el porcentaje de reducción de la concentración de esporas.

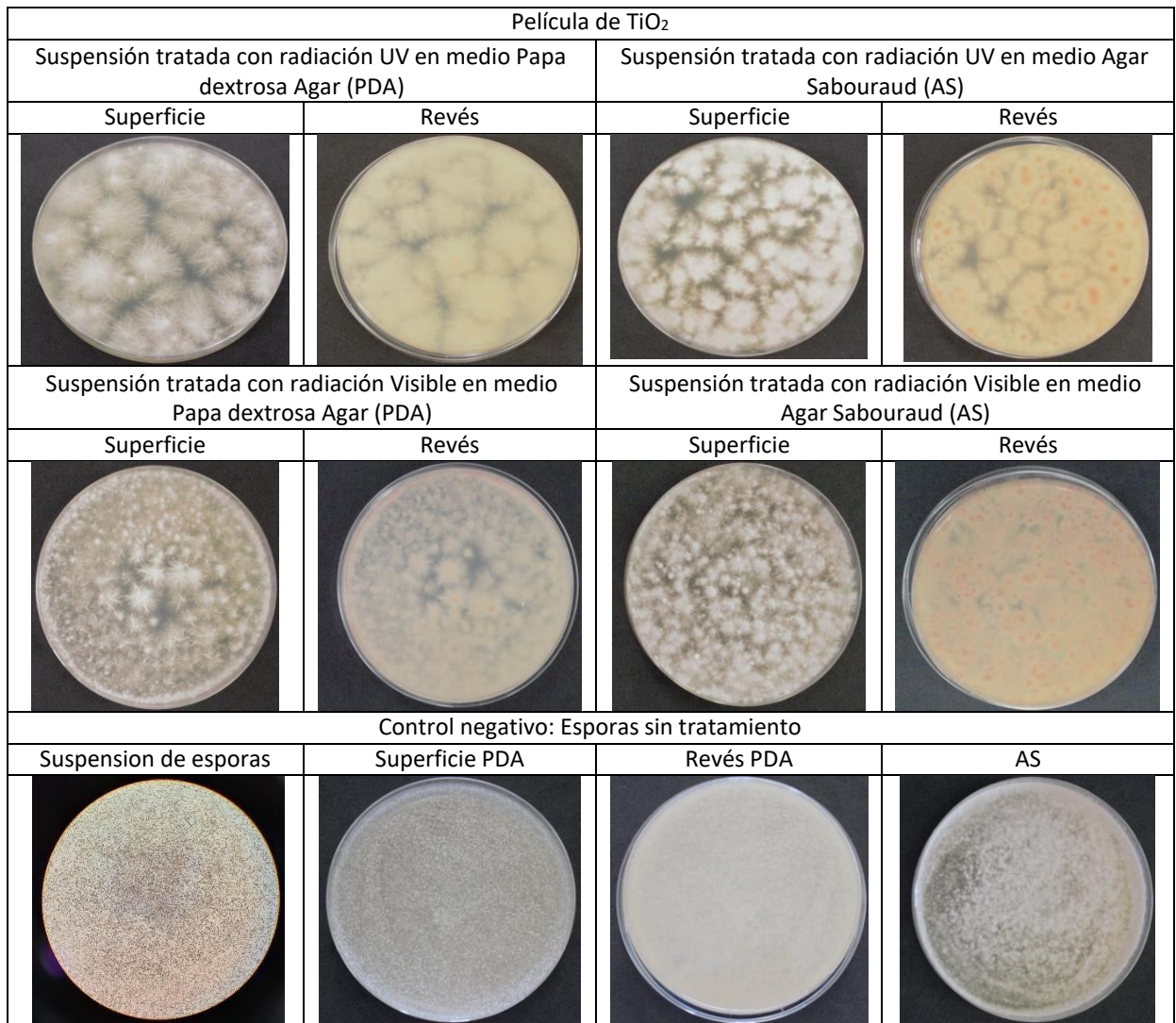


Figura 30 Fotocatálisis heterogénea con películas de TiO₂ UV y TiO₂ Vis sobre microconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Se observó un mayor crecimiento de las esporas tratadas en medio PDA y Agar Sabouraud utilizando radiación visible que en las tratadas con radiación ultravioleta, ya que el TiO₂ en el espectro visible no presenta actividad fotocatalítica, mientras que sí se genera con radiación ultravioleta, puesto que esta aporta la energía que se requiere para que se lleve a cabo la reacción fotocatalítica dadas las propiedades del TiO₂ con un Band GAP de 3,2 eV (40) (Figura 30).

La reacción fotocatalítica de la película de ZnO sobre una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* ($2,6 \times 10^6$ esporas/mL) fue evaluada mediante la observación del crecimiento de las esporas tratadas en PDA y Agar Sabouraud después de cinco días de incubación a 25°C. Se observó crecimiento de colonias aisladas del hongo a partir de las esporas a diferencia de las no tratadas que muestran un crecimiento uniforme (Figura 31).

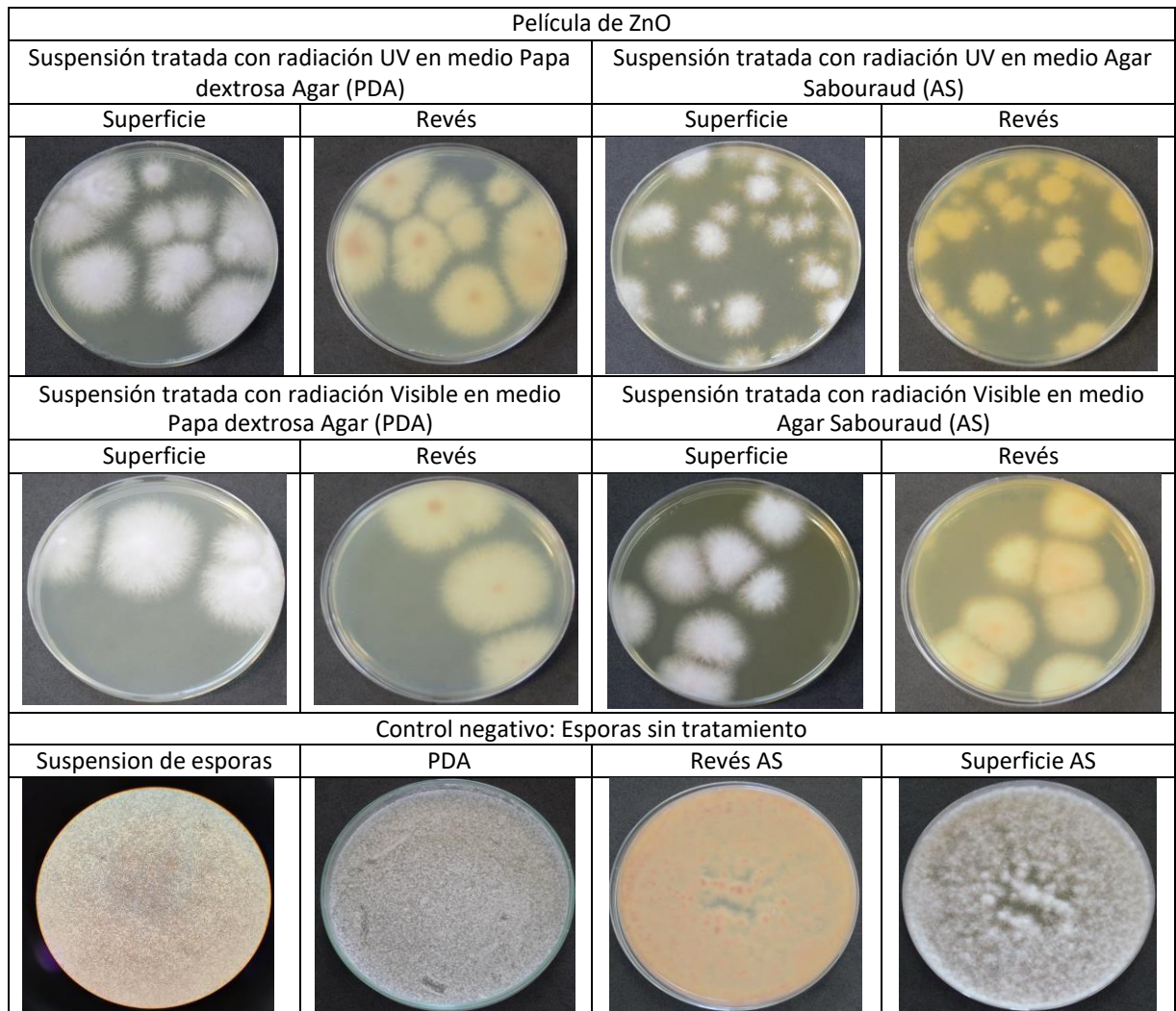


Figura 31 Fotocatálisis heterogénea con películas de ZnO UV y ZnO Vis sobre microconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

La suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* tratada con la película de ZnO presentó un mayor crecimiento utilizando como fuente de iluminación radiación ultravioleta que luz visible (Figura 31), debido a que el ZnO no presenta actividad fotocatalítica bajo radiación ultravioleta, sin embargo, bajo radiación en espectro visible de la luz presenta una interacción con la pared celular de las esporas del hongo donde se presentó deterioro en su pared celular, desnaturalización de las proteínas y rompimiento en las cadenas de electrones generando a su vez muerte celular de las esporas (44).

La reacción fotocatalítica de las películas de TiO₂/ZnO sobre la suspensión de esporas causó una disminución en la concentración de ellas, evidenciada por el bajo número de colonias presentes en los medios de cultivo. Se observó un mayor crecimiento en la suspensión tratada con radiación

ultravioleta en comparación con la tratada con radiación en el espectro visible de la luz en donde no presentaron crecimiento durante este mismo periodo de incubación (5 días) (Figura 32) y tres días más de observación (8 días), resultado que complementa y confirma el efecto del tratamiento descrito según el porcentaje de reducción de la concentración de esporas.

La figura 32 muestra el comportamiento de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* tratada con las películas de TiO₂/ZnO, donde se observó un menor crecimiento con respecto a la película que tenía únicamente TiO₂ y ZnO, tanto con radiación ultravioleta como con radiación en la región visible del espectro.







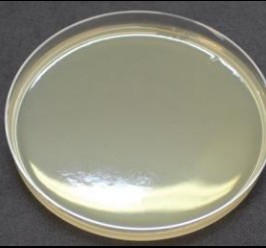
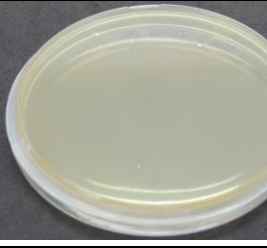
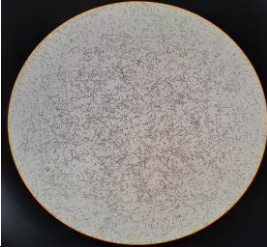



Película de TiO ₂ /ZnO			
Suspensión tratada con radiación UV en medio Papa dextrosa Agar (PDA)		Suspensión tratada con radiación UV en medio Agar Sabouraud (AS)	
Superficie	Revés	Superficie	Revés
			
Suspensión tratada con radiación Visible en medio Papa dextrosa Agar (PDA)		Suspensión tratada con radiación Visible en medio Agar Sabouraud (AS)	
Superficie	Revés	Superficie	Revés
			
Control negativo: Esporas sin tratamiento			
Suspension de esporas	Superficie PDA	Revés PDA	AS
			

Figura 32 Fotocatalisis heterogenea con películas de TiO₂/ZnO UV y TiO₂/ZnO Vis sobre microconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

La reacción fotocatalítica con películas de TiO₂/ZnO generó una disminución en la concentración de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Figura 32); al combinar ambos semiconductores (TiO₂

y ZnO) se modificó el comportamiento fotocatalítico de las películas obteniendo una mayor actividad en el espectro visible de la luz, debido al acoplamiento entre su Band Gap aumentando la difusión de carga y a su vez las reacciones de oxido-reducción entre la suspensión de esporas y la película obteniendo un mejor comportamiento fotocatalítico con respecto a las películas de TiO₂ (Figura 30) o ZnO (Figura 31) en la región visible del espectro (42). Lo anterior sugiere que la reacción fotocatalítica de la combinación de estos semiconductores es más eficiente, por lo cual el tratamiento fotocatalítico recomendado para el control del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* es mediante el uso de películas de TiO₂/ZnO utilizando radiación en el espectro visible de la luz.

8. Conclusiones

1. Se determinaron las mejores condiciones para obtener una película de TiO₂/ZnO de calidad para realizar este estudio: (1) se fijó el TiO₂ al sustrato mediante la técnica de *spin coating* a una velocidad de 1000 rpm durante 30 segundos, utilizando una suspensión de TiO₂ Hombitan AFDC Sachtleben cuya composición fue de 20 g de TiO₂, 10 g de PEG 1000, 50 mL de agua, 10 mL de isopropanol; (2) el sustrato + película de TiO₂ posteriormente fue calcinado a 550°C durante 3 horas; (3) la modificación con ZnO se realizó por el método de *sputtering*, colocando el sustrato a una distancia de 11 cm del blanco de Zinc metálico en un ambiente de Ar y O₂ con un tiempo de deposición de 30 minutos a 275 W y 0.7 Pa.
2. La caracterización estructural por XRD determinó que el TiO₂ presente en la película está compuesto por las fases anatasa y rutilo según el patrón de difracción observado, en tanto que el ZnO no generó ningún patrón de difracción. La caracterización morfológica mediante SEM permitió confirmar la homogeneidad y porosidad de la película, así como el tamaño de partícula de aproximadamente 460 nm para el TiO₂ y alrededor de 50 nm para el ZnO; adicionalmente, los picos EDX obtenidos por la técnica SEM mostraron la presencia del 43,77% de oxígeno, 46,45% titanio y 11,27% zinc.
3. El tratamiento con películas de TiO₂ durante 250 minutos de exposición sobre la suspensión de esporas de *F. oxysporum* f sp. *dianthi* causó una reducción superior al 60% en la concentración de esporas. El tratamiento afectó la viabilidad, aunque se observó crecimiento de colonias independientes en medio de cultivo, siendo mayor el número de colonias a partir de la suspensión tratada con radiación en espectro visible de la luz con respecto a la suspensión de esporas tratadas con radiación ultravioleta.
4. El tratamiento con películas de ZnO durante 250 minutos de exposición sobre la suspensión de esporas de *F. oxysporum* f sp. *dianthi* generó un deterioro en la membrana celular de las esporas, lo cual se vio reflejado en la presencia de material celular finalizando el proceso de reacción fotocatalítica. Se observó crecimiento de colonias independientes en medio de cultivo, siendo mayor el número de colonias a partir de la suspensión tratada con radiación ultravioleta con respecto a la suspensión de esporas tratadas con radiación en espectro visible de la luz.

5. El tratamiento con las películas de ZnO causó una mayor afectación en la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* f sp. *dianthi* con respecto a las al tratamiento con las películas de TiO₂.
6. El tratamiento con películas de TiO₂/ZnO durante 250 minutos de exposición sobre la suspensión de esporas de *F. oxysporum* f sp. *dianthi* causó una reducción superior al 90% en la concentración de esporas. Aunque se observó crecimiento de colonias independientes en medio de cultivo a partir de la suspensión tratada con radiación ultravioleta, el número de colonias independientes fue menor al observado en los tratamientos con las películas de TiO₂ y ZnO.
7. La suspensión de esporas *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* tratadas con películas de TiO₂/ZnO y radiación en el espectro visible de la luz no presentó crecimiento de colonias del hongo, por lo tanto, este es el tratamiento que presentó la mejor actividad fotocatalítica sobre las esporas del hongo fitopatógeno en suspensión.
8. El tratamiento aplicado a las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* utilizando películas de TiO₂/ZnO y radiación en la región visible del espectro presentó la mejor actividad fotocatalítica, por lo tanto, causó la mayor pérdida de la integridad celular y disminución en un 100% del crecimiento de las esporas en medio de cultivo. De tal modo, se esperaría que al aplicarlo a gran escala en las aguas de riego de los invernaderos de cultivo de clavel se controlaría la concentración de este fitopatógeno en ellas sin afectar a los manipuladores directos.

9. Referencias

1. Jácome A. "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*), SECTOR PATUTÁN. COTOPAXI – 2014". 2014;91.
2. Floricultura en Colombia | Marca País Colombia [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.colombia.co/pais-colombia/hechos/en-floricultura-la-respuesta-es-colombia-2/>
3. Sector floricultor colombiano - Funcionamiento | Colombia Trade [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.colombiatrader.com.co/noticias/como-funciona-el-sector-floricultor-en-colombia>
4. Rojas Higuera NS, Medina Garavito LA, Sarmiento Cardenas DA. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO DE PRODUCCIÓN DE LA CEPA. 2018;(November).
5. Clavel: el país le apuesta al desarrollo de sus variedades | Negocios | Portafolio [Internet]. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.portafolio.co/negocios/clavel-el-pais-le-apuesta-al-desarrollo-de-sus-variedades-538609>
6. Bustamante JR. Departamento Administrativo Nacional de Estadística Dirección de Regulación , Planeación , Estandarización y Normalización – DIRPEN – Junio 2010. Dep Adm Nac Estad DANE. 2010;informe de(2009):63.
7. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. 2001;54:1251–73.
8. Vásquez Ramírez LM, Castaño Zapata J. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Rev UDCA Actual Divulg Científica. 2017;20(2):363–74.

9. Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales HA, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra JM, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp . y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts Introducción. *Acta Agronómica*. 2015;64(2):194–205.
10. Ardila HD, Torres AM, Martínez ST, Higuera BL. Biochemical and molecular evidence for the role of class III peroxidases in the resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 2014;85:42–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.01.003>
11. Torres GA. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agron Colomb*. 2000;17(1–3):11–22.
12. Edel-Hermann V, Lecomte C. Current status of *fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology*. 2019;109(4):512–30.
13. Rana A, Sahgal M, Johri BN. *Fusarium oxysporum*: Genomics, diversity and plant-host interaction. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. 2017. 159–199 p.
14. Valencia H. *Fusarium Oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colomb* [Internet]. 2001;6(1):7–25. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/download/63462/pdf>
15. Monroy-Mena S, Chacón-Parra AL, Farfán-Angarita JP, Martínez-Peralta ST, Ardila-Barrantes HD. Selection of reference genes for transcriptional analysis in the pathosystem carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)-*fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Rev Colomb Quim*. 2019;48(2):5–14.
16. Blanco J., Malato S., Estrada C., Bandala E., Gelover S. LT. Purificación de Aguas por Fotocatálisis Heterogénea: Estado del Arte. *Elimin Contam por Fotocatálisis Heterogénea*. 2015;39.
17. Rodríguez J, Candal RJ, Estrada W, Blesa MA. El fotocatalizador : síntesis, propiedades y limitaciones. *Tecnol solares para la desinfección y descontaminación del agua* [Internet]. 2005;129–45. Available from:

<https://www.psa.es/webesp/projects/solarsafewater/curso.php>

18. Nevárez-Martínez MC, Espinoza-Montero PJ, Quiroz Chávez FJ, Ohtani B. Fotocatálisis: inicio, actualidad y perspectivas a través del TiO₂. *Av en Química* [Internet]. 2017;12(3):31–47. Available from: www.saber.ula.ve/avancesenquimica
19. Akpan UG, Hameed BH. Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO₂-based photocatalysts: A review. *J Hazard Mater*. 2009;170(2–3):520–9.
20. Fujishima A, Zhang X, Tryk DA. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surf Sci Rep*. 2008;63(12):515–82.
21. Granda-Ramírez CF, Hincapié-Mejía GM, Lopera-Uribe S. Tratamiento de residuos de laboratorio vía fotocatálisis heterogénea con TiO₂. *TecnoLógicas*. 2018;21(42):187–97.
22. Lan Y, Lu Y, Ren Z. Mini review on photocatalysis of titanium dioxide nanoparticles and their solar applications. *Nano Energy* [Internet]. 2013;2(5):1031–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nanoen.2013.04.002>
23. Contrato CRUC. Titanio. 2018;
24. Mohamad M, Haq BU, Ahmed R, Shaari A, Ali N, Hussain R. A density functional study of structural, electronic and optical properties of titanium dioxide: Characterization of rutile, anatase and brookite polymorphs. *Mater Sci Semicond Process* [Internet]. 2015;31:405–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mssp.2014.12.027>
25. Hashimoto K, Irie H, Fujishima A. Invited Review Paper TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. 2006;44(12):8269–85.
26. Erkan A, Bakir U, Karakas G. Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO₂ and TiO₂ thin films. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2006;184(3):313–21.
27. Lee BI, Wang X, Bhave R, Hu M. Synthesis of brookite TiO₂ nanoparticles by ambient condition sol process. *Mater Lett*. 2006;60(9–10):1179–83.
28. Timoumi A, Albetran HM, Alamri HR, Alamri SN, Low IM. Impact of annealing temperature on structural, morphological and optical properties of GO-TiO₂ thin films prepared by spin coating technique. *Superlattices Microstruct* [Internet]. 2020;139(January):106423.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2020.106423>

29. Sin S. Técnicas de depósito y caracterización de películas delgadas. 2009;(Cvd):6–22.
30. Robert B. Laughlin. Basic Models of Spin Coating [Internet]. 2007 [cited 2020 Feb 27]. Available from: <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>
31. Fundamentals of sputtering [Internet]. [cited 2020 Mar 23]. Available from: <http://www.thfc.de/fundamentals-of-sputtering>
32. Baghriche O, Rtimi S, Pulgarin C, Sanjines R, Kiwi J. Effect of the spectral properties of TiO₂, Cu, TiO₂/Cu sputtered films on the bacterial inactivation under low intensity actinic light. *J Photochem Photobiol A Chem* [Internet]. 2013;251:50–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.10.011>
33. Chuang KT, Abdullah H, Leu SJ, Cheng K Bin, Kuo DH, Chen HC, et al. Metal oxide composite thin films made by magnetron sputtering for bactericidal application. *J Photochem Photobiol A Chem* [Internet]. 2017;337:151–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.01.012>
34. Ratova M, Mills A. Antibacterial titania-based photocatalytic extruded plastic films. *J Photochem Photobiol A Chem* [Internet]. 2015;299:159–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.11.014>
35. Rajkumar KS, Arun S, Dinesh Babu M, Balaji P, Sivasubramanian S, Vignesh V, et al. Facile biofabrication, characterization, evaluation of photocatalytic, antipathogenic activity and in vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2019;22(November):101436. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101436>
36. Giannantonio DJ, Kurth JC, Kurtis KE, Sobecky PA. Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *Int Biodeterior Biodegrad* [Internet]. 2009;63(3):252–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.10.002>
37. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cadena de Flores. 2019;
38. Scientific TF. Safety Data Sheet .Hombitan. Mater Saf Data Sheet [Internet]. 2012;4(2)(1):8–10. Available from: https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/16490607/contents

39. Quiñones C, Ayala J, Vallejo W. Methylene blue photoelectrodegradation under UV irradiation on Au/Pd-modified TiO₂ films. *Appl Surf Sci*. 2010;257(2):367–71.
40. Clavijo Penagos JA. Sobre las reacciones de eliminación de compuestos contaminantes de aguas por fotocátalisis con TiO₂/UV: caso azul de metileno. *Elementos* [Internet]. 2013; Available from: <http://journal.poligran.edu.co/index.php/elementos/article/view/421>
41. Millipore M. Spectroquant[®] Prove 600. 2015;
42. García-Ramírez E, Mondragón-Chaparro M, Zelaya-Angel O. Band gap coupling in photocatalytic activity in ZnO-TiO₂ thin films. *Appl Phys A Mater Sci Process*. 2012;108(2):291–7.
43. Robertson PKJ, Robertson JMC, Bahnemann DW. Removal of microorganisms and their chemical metabolites from water using semiconductor photocatalysis. *J Hazard Mater* [Internet]. 2012;211–212:161–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.058>
44. Akpomie KG, Ghosh S, Gryzenhout M, Conradie J. One - pot synthesis of zinc oxide nanoparticles via chemical precipitation for bromophenol blue adsorption and the antifungal activity against filamentous fungi. *Sci Rep* [Internet]. 2021;(0123456789):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87819-2>