

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Escuela de Posgrado

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL Y
DESARROLLO SOSTENIBLE**

**DEGRADACIÓN FOTOCATALÍTICA DE CIANURO EN
SOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE ZINC (ZnO) BIOSINTETIZADAS**

TESIS

**PRESENTADA POR:
GABRIELA DE LOURDES FORA QUISPE**

Para optar el Grado Académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS (*Magister Scientiae*)
CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

**TACNA – PERÚ
2025**


UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**Escuela de Posgrado**

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL Y
DESARROLLO SOSTENIBLE

**“DEGRADACIÓN FOTOCATALÍTICA DE CIANURO EN SOLUCIÓN
ACUOSA MEDIANTE NANOPARTÍCULAS DE OXIDO DE ZINC
(ZnO) BIOSINTETIZADAS”**

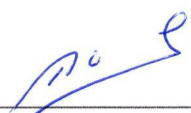
Tesis sustentada y aprobada el 27 de febrero del 2025; estando el jurado calificador
integrado por:

PRESIDENTE :



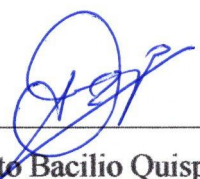
Dr. Nataniel Mario Linares Gutiérrez

SECRETARIO :



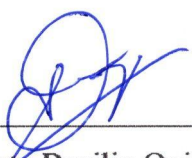
Dr. Tolomeo Raúl Soto Pérez

MIEMBRO :



Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila

ASESOR :



Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila, en mi condición de asesor acreditado con Resolución de Escuela de Posgrado N° 13347-2023-ESPG/UNJBG del 05 de diciembre del 2023, del trabajo de tesis titulado: "DEGRADACIÓN FOTOCATALÍTICA DE CIANURO EN SOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE NANOPARTÍCULAS DE OXIDO DE ZINC (ZnO) BIOSINTETIZADAS", presentado por la Sra. Gabriela de Lourdes Fora Quispe, para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias (*Magister Scientiae*) con mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual TURNITIN, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 4 %.

Por lo que CERTIFICO LA SIMILARIDAD de la tesis y está de acuerdo con el nivel PERMITIDO, para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado a solicitud del interesado con fines de continuar con los trámites respectivos para la obtención del Grado académico de Maestro en Ciencias (*Magister Scientiae*) con mención en Gestión Ambiental y Desarrollo Sostenible.

Tacna, 01 de setiembre 2025

FIRMA ASESOR

Nombres y apellidos


.....

Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila

DNI N° 00419682



FIRMA TESISTA

Nombres y apellidos


.....

Sra. Gabriela de Lourdes Fora Quispe

DNI N° 45007606



DEDICATORIA

A mi amado esposo Elisbán, por alentarme a seguir creciendo profesionalmente mediante su ejemplo, acompañarme durante el proceso y culminación de la presente tesis.

A mi hijo Alejandro, por ser el motor y motivo de esfuerzo para culminar esta investigación

A mi madre, por alentarme y apoyarme para poder realizar las diversas actividades de esta investigación...

Gracias.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme sabiduría y guiar siempre mis pasos.

A mi familia, por ser mi motivo de superación profesionalmente.

A mi asesor el Dr. Alberto Bacilio Quispe Cohaila y co-asesor el Mgr. Elisbán Juani Sacari Sacari, por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo experimental de la presente investigación.

Al proyecto de investigación “Nanotecnología Microbiana: Síntesis Verde de Nanomateriales” aprobada con Resolución Rectoral N° 10086-2022-UNJBG y Grupo de Investigación GIMAEC por brindarme las instalaciones para el desarrollo de mi investigación.

A todos los que contribuyeron de alguna manera en el desarrollo de la presente tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1 Descripción del Problema.....	3
1.2 Formulación del problema.....	4
1.2.1 Problema principal.....	4
1.2.2 Problemas secundarios	5
1.3 Justificación e importancia	6
1.3.1 Justificación ambiental.....	6
1.3.2 Justificación económica	8
1.3.3 Justificación social.....	10
1.4 Alcances y limitaciones	13
1.4.1 Alcances.....	13
1.4.2 Limitaciones	15
1.5 Objetivos.....	16
1.5.1 Objetivo general.....	16
1.5.2 Objetivos específicos.....	16
1.6 Hipótesis	16
1.6.2 Hipótesis general	16
1.6.3 Hipótesis específica.....	16

1.7	Variables.....	17
1.7.2	Identificación de variables.....	17
1.7.2.1	Variable independiente	17
1.7.2.2	Variable dependiente.....	17
1.7.3	Definición operacionalización de las variables	18
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO		19
2.1	Antecedentes del estudio	19
2.2	Bases teóricas.....	20
2.2.2.	Métodos convencionales de remoción del cianuro	21
2.3.	Técnicas de Caracterización	39
2.3.1.	Análisis Termogravimétrico (TGA)	39
2.3.2.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	40
2.3.3.	Difracción de Rayos X.....	41
2.3.4.	Análisis de área superficial por fisisorción de Nitrógeno (BET)	42
2.3.5.	Espectroscopia UV-visible con reflectancia difusa.....	43
2.3.6.	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	44
2.3.7.	Microscopía Electrónica de Barrido	44
2.3.8.	Espectroscopía FTIR.....	45
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		47
3.1.	Caracterización del diseño de investigación.....	47
3.1.1.	Síntesis de nanopartículas de ZnO mediante método biogénico.	47
3.1.2.	Caracterización de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas.....	49
3.1.3.	Evaluación fotocatalítica del ZnO biosintetizada para la degradación del cianuro.	50

CAPÍTULO IV: RESULTADOS	52
4.1. Etapa I, Síntesis biogénica de nanopartículas de ZnO.....	52
4.1.1. Identificación y caracterización molecular de la cepa bacteriana	52
4.1.2. Procedimiento de biosíntesis de nanopartículas de ZnO	56
4.2. Etapa II. Caracterización de las muestras	59
4.2.1. Difracción de rayos X de las muestras antes de calcinar.....	60
4.2.2. Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido.....	62
4.2.3. Análisis por difracción de rayos X de la muestra después de calcinar	64
4.2.4. Análisis por espectroscopía UV Visible.....	67
4.2.5. Análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	69
4.2.6. Análisis de área superficial por el método BET	70
4.2.7. Microscopia Electrónica de Barrido	72
4.2.8. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	73
4.3. Etapa III, evaluación del ZnO biosintetizado en la degradación del cianuro	76
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS	104

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Comparación de los resultados del análisis BLAST del ARN16S	52
Tabla 2 Parámetros estructurales del ZnO biosintetizado	66
Tabla 3 Comparación entre tratamientos para la degradación del cianuro.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	La condición para la reflexión: la ley de Bragg (Lindon et al., op. 2010).	41
Figura 2	Árbol filogenético del <i>Bacillus subtilis</i> .	55
Figura 3	Visualización macroscópica y microscópica de <i>Bacillus subtilis</i> .	56
Figura 4	Etapas de la biosíntesis del ZnO.	57
Figura 5	Nanopartículas de ZnO biosintetizadas por <i>Bacillus subtilis</i> .	59
Figura 6	Patrón de difracción de la muestra biosintetizada.	61
Figura 7	Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido del ZnO preparado sin calcinar.	64
Figura 8	Difractograma de la muestra sintetizada de ZnO calcinada.	65
Figura 9	a) Espectro UV-visible del ZnO y b) Función de Kubelka-Munk.	68
Figura 10	Espectro FTIR de la muestra de ZnO biosintetizada.	70
Figura 11	Gráfica de área de superficie BET.	71
Figura 12	Gráfica de área de superficie BET.	72
Figura 13	Microfotografías de Microscopía electrónica de barrido a distintas magnificaciones.	73
Figura 14	a) Microfotografías de Microscopía electrónica de transmisión, b) distribución de tamaño de partícula, c) imagen HRTEM y d) Patrón de difracción de electrones (SAED).	75
Figura 15	Degradación fotocatalítica del cianuro utilizando ZnO a concentraciones de 0,5 g/L y 1 g/L, con cianuro a distintas concentraciones: a) 100 ppm, b) 200 ppm, c) 300 ppm, d) 400 ppm y e) 500 ppm.	77
Figura 16	Degradación del cianuro a distintas concentraciones utilizando: a) 0,5 g/L de ZnO y b) 1 g/L de ZnO.	78

RESUMEN

En la presente investigación se desarrolló un método de síntesis verde y escalable para la biosíntesis de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) mediante la intervención de la bacteria *Bacillus subtilis*, procedente de pasivos ambientales mineros para su aplicación en la degradación fotocatalítica de cianuro (CN⁻) en solución acuosa. Se optimizaron las condiciones de síntesis y se caracterizaron exhaustivamente las nanopartículas obtenidas mediante técnicas como DRX, TEM, UV-Vis, FTIR y análisis BET. Los resultados mostraron la formación exitosa de nanopartículas de ZnO en fase zincita con un tamaño promedio de 21,87 nm y alta cristalinidad. Los ensayos fotocatalíticos demostraron una eficiente degradación de cianuro bajo irradiación UV, alcanzando hasta un 75,5 % de remoción para una concentración inicial de 100 ppm y 65,8 % para 500 ppm en 180 minutos. Se evaluó el efecto de la concentración de catalizador y de cianuro en la eficiencia del proceso. Estos hallazgos indican que las nanopartículas de ZnO biosintetizadas tienen un gran potencial como fotocatalizadores ecológicos para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro, en comparación con otros métodos aplicados para el tratamiento de aguas residuales de la industria.

Palabras claves: ZnO, biosíntesis, cianuro, degradación

ABSTRACT

In this research, a scalable, green synthesis method was developed for the biosynthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles through *Bacillus subtilis*, derived from mining environmental liabilities, for application in the photocatalytic degradation of cyanide (CN⁻) in aqueous solution. Synthesis conditions were optimized, and the nanoparticles obtained were thoroughly characterized using techniques such as XRD, TEM, UV-Vis, FTIR, and BET analysis. Results showed successful formation of zincite-phase ZnO nanoparticles, averaging 21,87 nm in size and with high crystallinity. Photocatalytic tests demonstrated efficient cyanide degradation under UV irradiation, achieving up to 75,5 % removal for an initial 100 ppm concentration and 65,8 % for 500 ppm in 180 minutes. The effect of catalyst and cyanide concentration on process efficiency was evaluated. These findings suggest that biosynthesized ZnO nanoparticles hold great potential as eco-friendly photocatalysts for treating cyanide-contaminated effluents, in comparison to other methods applied in industrial wastewater treatment.

Keywords: ZnO, biosíntesis, cianuro, degradación

INTRODUCCIÓN

El cianuro es un contaminante altamente tóxico presente en efluentes de diversas industrias, especialmente en la minería del oro y la plata. Su presencia en cuerpos de agua representa un grave riesgo para la salud humana y los ecosistemas acuáticos, incluso en bajas concentraciones. La toxicidad del cianuro se debe a su capacidad para inhibir la respiración celular al unirse fuertemente a la enzima citocromo c oxidasa, bloqueando el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (Suman, 2023).

Los métodos convencionales para degradar cianuro, como la oxidación alcalina o el proceso INCO, presentan limitaciones significativas en términos de costos, eficiencia y generación de subproductos tóxicos (Vidal-Tovar et al., 2019). En este contexto, los procesos avanzados de oxidación (PAOs), particularmente la fotocatalisis heterogénea con semiconductores nanoestructurados, han emergido como una alternativa prometedora para abordar estas limitaciones.

Entre los diversos materiales semiconductores, el óxido de zinc (ZnO) nanoestructurado presenta características que lo hacen especialmente interesante para aplicaciones fotocatalíticas. Estas incluyen una banda prohibida ancha (3,37 eV) que permite una eficiente absorción de luz UV, un alto potencial redox de los pares electrón-hueco fotogenerados, estabilidad química en un amplio rango de pH, baja toxicidad y buena biocompatibilidad (Sharma et al., 2022).

La biosíntesis de nanopartículas de ZnO mediada por microorganismos ha surgido como una alternativa más verde y sostenible frente a los procesos físicos y químicos convencionales. Diversos estudios han reportado el uso de bacterias para sintetizar nanopartículas de ZnO con propiedades controladas (Iqtedar et al., 2020). Sin embargo, aún se requiere investigación exhaustiva para optimizar estos procesos de biosíntesis y evaluar la eficacia de los materiales resultantes en aplicaciones específicas como la degradación de cianuro.

En este contexto, la presente investigación se enfoca en el desarrollo de un método verde y escalable para la biosíntesis de nanopartículas de ZnO utilizando la bacteria

Bacillus subtilis, con el objetivo de aplicarlas en la degradación fotocatalítica de cianuro en solución acuosa. Se busca optimizar las condiciones de síntesis, caracterizar exhaustivamente las propiedades de las nanopartículas obtenidas y evaluar su eficacia en la remoción de cianuro bajo diferentes condiciones operativas.

Los resultados de esta investigación contribuirán al desarrollo de tecnologías más eficientes, económicas y amigables con el ambiente para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro, abordando una problemática ambiental relevante y promoviendo el uso de nanomateriales de síntesis verde en aplicaciones de remediación ambiental.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. Planteamiento del problema del estudio

1.1 Descripción del Problema

El cianuro es un contaminante altamente tóxico presente en efluentes de diversas industrias, especialmente en la minería del oro y la plata. Su presencia en cuerpos de agua representa un grave riesgo para la salud humana y los ecosistemas acuáticos, incluso en bajas concentraciones. La toxicidad del cianuro se debe a su capacidad para inhibir la respiración celular al unirse fuertemente a la enzima citocromo c oxidasa, bloqueando el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Esto provoca una disminución letal de ATP en las células, lo que puede llevar a la muerte rápida de organismos expuestos.

Los métodos convencionales para degradar cianuro, como la oxidación alcalina o el proceso INCO, presentan limitaciones significativas que dificultan su implementación efectiva y sostenible. Estos métodos a menudo implican altos costos operativos debido al uso de grandes cantidades de reactivos químicos costosos. Además, su eficiencia es limitada, especialmente para concentraciones bajas de cianuro (<50 mg/L), lo que los hace poco adecuados para el tratamiento de efluentes diluidos. Otro problema importante es la generación de subproductos tóxicos, como el cianato (CON^-), que, aunque menos tóxico que el cianuro, sigue siendo perjudicial para el medio ambiente. Muchos de estos procesos también requieren condiciones de operación extremas, como ajustes de pH significativos, lo que complica su implementación y aumenta los costos. Finalmente, la disposición de los lodos generados en algunos de estos procesos puede ser problemática, ya que pueden contener compuestos tóxicos que requieren un manejo especial.

En este contexto, existe una necesidad urgente de desarrollar tecnologías más eficientes, económicas y amigables con el ambiente para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro. Los procesos avanzados de oxidación (PAOs), particularmente la fotocatalisis heterogénea con semiconductores nanoestructurados, han

emergido como una alternativa prometedora para abordar estas limitaciones. Entre los diversos materiales semiconductores, el óxido de zinc (ZnO) nanoestructurado presenta características que lo hacen especialmente interesante para aplicaciones fotocatalíticas. Estas incluyen una banda prohibida ancha (3,37 eV) que permite una eficiente absorción de luz UV, un alto potencial redox de los pares electrón-hueco fotogenerados, estabilidad química en un amplio rango de pH, baja toxicidad y buena biocompatibilidad. Además, existe la posibilidad de sintetizarlo en diversas nanoestructuras con alta área superficial, lo que potencia su actividad catalítica.

Sin embargo, la síntesis convencional de nanopartículas de ZnO a menudo implica el uso de precursores químicos tóxicos y condiciones de reacción severas, lo que puede contrarrestar parcialmente sus beneficios ambientales. En este sentido, la biosíntesis mediada por microorganismos surge como una alternativa más verde y sostenible. No obstante, aún se requiere investigación exhaustiva para optimizar estos procesos de biosíntesis y evaluar la eficacia de los materiales resultantes en aplicaciones específicas como la degradación de cianuro. Este proyecto de investigación se enfoca precisamente en abordar estos desafíos, buscando desarrollar un proceso eficiente y sostenible para la degradación fotocatalítica de cianuro utilizando nanopartículas de ZnO biosintetizadas.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema principal

La pregunta central que guía esta investigación es: ¿Es factible desarrollar un proceso fotocatalítico eficiente para la degradación de cianuro en solución acuosa utilizando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) biosintetizadas mediante *Bacillus sp.*? Esta interrogante abarca varios aspectos cruciales que deben ser abordados a lo largo del estudio. En primer lugar, se debe evaluar la viabilidad de la biosíntesis de nanopartículas de ZnO con propiedades adecuadas para aplicaciones fotocatalíticas, lo que implica un estudio detallado de las condiciones de síntesis y su impacto en las características finales del material. En segundo lugar, es necesario determinar la eficacia de estas nanopartículas biosintetizadas en la degradación fotocatalítica del cianuro, comparando su rendimiento con los métodos convencionales de tratamiento. Finalmente, se debe considerar la

posibilidad de escalar este proceso para aplicaciones prácticas en el tratamiento de efluentes industriales, evaluando su viabilidad técnica y económica.

1.2.2 Problemas secundarios

Para abordar el problema principal de manera integral, es necesario desglosarlo en varios problemas secundarios más específicos.

- a) El primero de estos es: ¿Cuáles son las condiciones óptimas para biosintetizar nanopartículas de ZnO con alta actividad fotocatalítica mediante el uso de *Bacillus sp.*? Este problema implica la investigación sistemática de diversos parámetros de síntesis, incluyendo la concentración de precursores (como el acetato de zinc y el bicarbonato de sodio), el tiempo y temperatura de incubación, el pH del medio de reacción, y las condiciones de calcinación (temperatura, tiempo y atmósfera). La optimización de estos parámetros es crucial para obtener nanopartículas con las propiedades deseadas para la aplicación fotocatalítica.
- b) El segundo problema secundario se enfoca en la caracterización del material obtenido: ¿Qué propiedades estructurales, morfológicas y ópticas presentan las nanopartículas de ZnO biosintetizadas? Para responder a esta pregunta, se requiere una caracterización exhaustiva de las nanopartículas utilizando diversas técnicas analíticas. Estas incluyen la difracción de rayos X (DRX) para determinar la estructura cristalina y el tamaño de cristalito, microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM) para analizar la morfología y el tamaño de partícula, espectroscopía UV-visible para estimar la banda prohibida, espectroscopía infrarroja (FTIR) para identificar grupos funcionales superficiales, y análisis de área superficial BET para determinar el área específica. Esta caracterización detallada es esencial para comprender las propiedades del material y su potencial fotocatalítico.
- c) El tercer problema secundario busca establecer relaciones entre las características del material y su actividad catalítica: ¿Cómo influyen las características de las nanopartículas de ZnO en su capacidad para degradar fotocatalíticamente el cianuro? Este aspecto de la investigación implica estudiar el efecto del tamaño de

partícula en la eficiencia de degradación, la influencia de la morfología en la separación de cargas y la actividad catalítica, la relación entre el área superficial y la capacidad de adsorción/degradación del cianuro, y el impacto de la cristalinidad y los defectos estructurales en la actividad fotocatalítica. Comprender estas relaciones es crucial para optimizar el diseño del catalizador y maximizar su eficiencia en la degradación del cianuro.

- d) Además, un cuarto problema secundario aborda la comparación con métodos convencionales: ¿Cómo se compara la eficiencia de degradación del cianuro utilizando las nanopartículas de ZnO biosintetizadas con los métodos convencionales de tratamiento? Este análisis comparativo es fundamental para evaluar el potencial real de la tecnología desarrollada en el contexto de las soluciones existentes para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro.

Este análisis es fundamental para comprender completamente el proceso de degradación y evaluar su eficacia y seguridad ambiental.

1.3 Justificación e importancia

1.3.1 Justificación ambiental

La degradación efectiva de cianuro hasta compuestos inocuos mediante fotocatalisis con ZnO presenta múltiples beneficios ambientales de gran importancia. En primer lugar, este proceso contribuye significativamente a la prevención de la contaminación de fuentes hídricas. El cianuro, incluso en concentraciones muy bajas, puede tener efectos devastadores en los ecosistemas acuáticos, por lo que su eliminación eficiente antes de la descarga de efluentes industriales es crucial para preservar la calidad del agua. Esta protección de los recursos hídricos se traduce directamente en la preservación de la biodiversidad acuática y terrestre asociada. El cianuro afecta a una amplia gama de organismos, desde microorganismos hasta peces y mamíferos, y su eliminación ayuda a mantener el equilibrio ecológico en los cuerpos de agua receptores.

Además, la fotocatalisis con ZnO ofrece una solución para mitigar los impactos a largo plazo del cianuro en el ambiente. A diferencia de algunos contaminantes que se

degradan naturalmente con el tiempo, el cianuro puede persistir en el ambiente, especialmente en condiciones anaerobias. Su tratamiento efectivo previene la acumulación y los efectos crónicos sobre los ecosistemas. Aunque el cianuro no se bioacumula significativamente, sus efectos tóxicos pueden propagarse a través de la cadena alimentaria. La eliminación del cianuro en la fuente mediante fotocátalisis previene este fenómeno, protegiendo así la integridad de los ecosistemas a largo plazo.

La aplicación de esta tecnología también contribuye a la mejora de la calidad del suelo. En casos de derrames o filtraciones, el cianuro puede contaminar los suelos circundantes. Un tratamiento eficaz de los efluentes reduce el riesgo de contaminación del suelo y las aguas subterráneas, protegiendo así la salud de los ecosistemas terrestres y la calidad de los recursos hídricos subterráneos. Además, comparado con algunos métodos convencionales que requieren altas temperaturas o presiones, la fotocátalisis con ZnO opera en condiciones ambientales, reduciendo el consumo energético y las emisiones asociadas, lo que se traduce en una disminución de la huella de carbono del proceso de tratamiento.

Otro beneficio ambiental significativo es la minimización de residuos secundarios. A diferencia de métodos como la adsorción con carbón activado, que generan residuos sólidos que requieren disposición especial, la fotocátalisis degrada el cianuro in situ, minimizando la generación de residuos secundarios. Esto no solo reduce la carga ambiental asociada con la disposición de residuos, sino que también simplifica el proceso de tratamiento y reduce los riesgos de contaminación secundaria.

Finalmente, es importante destacar que el proceso fotocatalítico con ZnO no es específico para el cianuro y podría degradar simultáneamente otros contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en los efluentes, proporcionando un tratamiento más integral. Esta versatilidad del proceso lo hace particularmente valioso desde una perspectiva ambiental, ya que permite abordar múltiples problemas de contaminación con una sola tecnología, maximizando así su impacto positivo en la protección del medio ambiente.

1.3.2 Justificación económica

El uso de nanopartículas de ZnO biosintetizadas como fotocatalizadores para la degradación de cianuro ofrece numerosas ventajas económicas sobre los métodos convencionales de tratamiento, lo que justifica su investigación y desarrollo desde una perspectiva financiera y de eficiencia operativa. En primer lugar, este enfoque promete una significativa reducción en los costos de reactivos. Los métodos convencionales como el proceso INCO o la cloración alcalina requieren grandes cantidades de reactivos costosos como dióxido de azufre, peróxido de hidrógeno o hipoclorito de sodio. En contraste, la fotocatalisis con ZnO utiliza principalmente luz UV y oxígeno del aire, reduciendo drásticamente los costos asociados a insumos químicos. Esta reducción en el uso de reactivos no solo disminuye los gastos operativos directos, sino que también minimiza los costos logísticos y de almacenamiento asociados con el manejo de grandes volúmenes de productos químicos.

Además, el proceso fotocatalítico ofrece la ventaja de un menor consumo energético en comparación con métodos que requieren calentamiento o presurización. La fotocatalisis opera a temperatura y presión ambiente, lo que se traduce en una reducción significativa de los costos energéticos asociados al tratamiento. Esta eficiencia energética no solo tiene un impacto positivo en los costos operativos, sino que también contribuye a la sostenibilidad ambiental del proceso, alineándose con las crecientes demandas de tecnologías más limpias y eficientes en el uso de recursos.

La simplificación del proceso es otro aspecto económicamente ventajoso de la fotocatalisis con ZnO. A diferencia de los métodos convencionales que a menudo requieren múltiples etapas, ajustes de pH extremos y procesos de separación complejos, la fotocatalisis es esencialmente un proceso de un solo paso. Esta simplicidad operativa se traduce en una reducción de los costos de mano de obra, mantenimiento y supervisión. Además, la posibilidad de reutilizar las nanopartículas de ZnO en múltiples ciclos de tratamiento permite amortizar el costo inicial de producción del catalizador, mejorando aún más la economía del proceso a largo plazo.

Un aspecto particularmente prometedor desde el punto de vista económico es el potencial uso de luz solar en lugar de fuentes de luz UV artificiales. Aunque el presente

estudio se enfoca en el uso de luz UV artificial por razones de control experimental, la capacidad del ZnO para aprovechar la luz solar abre la posibilidad de desarrollar sistemas de tratamiento altamente económicos y sostenibles en el futuro. Esto podría reducir drásticamente los costos operativos, especialmente en regiones con alta radiación solar.

La biosíntesis de nanopartículas de ZnO mediante el uso de *Bacillus sp.* representa en sí misma una ventaja económica. Este método utiliza reactivos de bajo costo y condiciones de reacción suaves, lo que reduce significativamente los costos de producción del catalizador en comparación con los métodos químicos convencionales. Además, la naturaleza biológica del proceso ofrece la posibilidad de utilizar subproductos o residuos orgánicos como medios de cultivo, lo que podría reducir aún más los costos y contribuir a la economía circular.

Otra ventaja económica significativa es la eficacia del tratamiento a bajas concentraciones de cianuro. Mientras que algunos métodos convencionales pierden eficiencia cuando la concentración de cianuro es inferior a 50 mg/L, la fotocatalisis mantiene su efectividad incluso a concentraciones muy bajas. Esto permite el tratamiento económico de grandes volúmenes de efluentes diluidos, un escenario común en muchas aplicaciones industriales.

La reducción en la generación de lodos y residuos secundarios también tiene implicaciones económicas positivas. Al minimizar la producción de residuos que requieren tratamiento o disposición especial, se reducen los costos asociados con el manejo y eliminación de residuos peligrosos. Esto no solo disminuye los gastos directos, sino que también mitiga los riesgos financieros asociados con el cumplimiento de regulaciones ambientales cada vez más estrictas relacionadas con la disposición de residuos.

La versatilidad del proceso fotocatalítico con ZnO para tratar simultáneamente otros contaminantes, además del cianuro ofrece otra ventaja económica significativa. Esta capacidad podría reducir la necesidad de múltiples etapas de tratamiento para diferentes contaminantes, disminuyendo así los costos globales de operación y la complejidad de las plantas de tratamiento de efluentes. Además, esta versatilidad podría hacer que la

tecnología sea atractiva para una gama más amplia de industrias, potencialmente aumentando su adopción y reduciendo los costos a través de economías de escala.

Finalmente, la investigación en fotocatalisis con ZnO biosintetizadas tiene el potencial de generar propiedad intelectual valiosa. El desarrollo de tecnologías patentables en este campo podría crear oportunidades de licenciamiento y generación de ingresos adicionales, proporcionando un retorno económico sobre la inversión en investigación y desarrollo. Además, el dominio de esta tecnología podría posicionar a las instituciones y empresas involucradas como líderes en el campo del tratamiento de aguas, abriendo nuevas oportunidades de negocio en un mercado global cada vez más preocupado por la sostenibilidad y la protección del medio ambiente.

1.3.3 Justificación social

Uno de los grandes retos de este ciclo es la diversificación de la matriz energética mundial, debido a que los combustibles fósiles no son renovables, por lo tanto, son limitados a largo plazo, es por ello que los investigadores a nivel mundial vienen investigando diversas maneras de aprovechar las fuentes renovables de energía, como lo es la energía solar, desarrollando celdas solares de bajo costo y que sean eficientes en su conversión de energía solar a eléctrica, lo que conllevaría un considerable ahorro para la sociedad.

La implementación de tecnologías eficientes para la degradación de cianuro, como la fotocatalisis con nanopartículas de ZnO biosintetizadas, tiene importantes implicaciones sociales que justifican su desarrollo e implementación. En primer lugar, esta tecnología contribuye significativamente a la protección de la salud pública. La exposición crónica a bajos niveles de cianuro puede causar diversos problemas de salud, incluyendo daños al sistema nervioso central, la tiroides y el sistema cardiovascular. Un tratamiento más efectivo de los efluentes industriales reduce el riesgo de exposición de las poblaciones cercanas a través del agua potable o alimentos contaminados. Esto es particularmente relevante en comunidades ubicadas cerca de industrias que utilizan o producen cianuro, como la minería de oro, donde la contaminación del agua puede tener impactos directos en la salud de la población local.

Además, la adopción de esta tecnología puede mejorar significativamente la seguridad laboral en industrias que manejan cianuro. Los trabajadores en estas industrias están expuestos a riesgos ocupacionales asociados con el manejo y tratamiento de este compuesto tóxico. La implementación de tecnologías más seguras y eficientes para el tratamiento de cianuro reduce estos riesgos, mejorando las condiciones de trabajo y la salud ocupacional. Esto no solo beneficia directamente a los trabajadores, sino que también puede reducir los costos asociados con accidentes laborales y enfermedades ocupacionales para las empresas.

La preservación de recursos hídricos para las comunidades es otro aspecto social crucial de esta tecnología. La contaminación por cianuro puede inutilizar fuentes de agua para consumo humano, agricultura y pesca, afectando gravemente los medios de vida y la seguridad alimentaria de las comunidades locales. Un tratamiento efectivo ayuda a preservar estos recursos vitales, asegurando que las comunidades mantengan acceso a agua limpia para sus necesidades básicas y actividades económicas. Esto es particularmente importante en regiones donde el agua es un recurso escaso o donde las comunidades dependen fuertemente de fuentes de agua locales.

La implementación de tecnologías avanzadas de tratamiento de agua, como la fotocatalisis con ZnO, también puede contribuir a la reducción de conflictos socioambientales. La contaminación por cianuro es a menudo una fuente de tensiones entre comunidades y empresas, especialmente en zonas mineras. La adopción de tecnologías más eficientes y ambientalmente amigables puede ayudar a mitigar estos conflictos, mejorando las relaciones entre las empresas y las comunidades locales. Esto puede resultar en un ambiente social más estable y cooperativo, beneficioso tanto para las empresas como para las comunidades.

El desarrollo y aplicación de esta tecnología también fomenta la innovación y el desarrollo tecnológico a nivel local. La investigación en nuevas tecnologías de tratamiento de aguas promueve el desarrollo de capacidades científicas y técnicas, contribuyendo al avance tecnológico del país. Esto puede tener un efecto multiplicador, estimulando la investigación en áreas relacionadas y potenciando la capacidad de innovación en el sector del tratamiento de aguas y la protección ambiental.

Además, la implementación de tecnologías avanzadas como la fotocatalisis requiere personal técnico especializado, lo que puede generar oportunidades de empleo de mayor calificación. Esto no solo beneficia directamente a los individuos que obtienen estos empleos, sino que también puede contribuir a elevar el nivel de habilidades y conocimientos técnicos en las comunidades donde se implementa la tecnología. A largo plazo, esto puede traducirse en un aumento de la capacidad local para abordar problemas ambientales y de salud pública.

La adopción de tecnologías más limpias y seguras como la fotocatalisis con ZnO puede mejorar significativamente la percepción pública de las industrias tradicionalmente asociadas con la contaminación, como la minería. Esto puede resultar en una mayor aceptación social de estas actividades económicas, siempre que se demuestre un compromiso real con la protección del medio ambiente y la salud de las comunidades. A su vez, una mejor relación entre las empresas y las comunidades puede facilitar el desarrollo de proyectos futuros y fomentar un clima de inversión más favorable.

El uso de tecnologías más eficientes para el tratamiento de cianuro también facilita el cumplimiento de regulaciones ambientales cada vez más estrictas. Esto reduce el riesgo de sanciones y cierres que podrían afectar negativamente el empleo y la economía local. Al mismo tiempo, demuestra un compromiso con la responsabilidad social empresarial, lo cual es cada vez más valorado por consumidores, inversores y la sociedad en general.

La protección de actividades económicas dependientes del agua es otro beneficio social importante de esta tecnología. Sectores como la agricultura, la pesca y el turismo pueden verse gravemente afectados por la contaminación con cianuro. Un tratamiento efectivo ayuda a proteger estas actividades económicas y los medios de vida asociados, contribuyendo a la estabilidad económica y social de las comunidades que dependen de estos recursos hídricos. Esto es particularmente relevante en áreas rurales o costeras, donde estas actividades son la principal fuente de ingresos para la población local.

Además, la inversión en tecnologías avanzadas de tratamiento de efluentes, como la fotocatalisis con ZnO, demuestra un compromiso tangible con la sostenibilidad y la responsabilidad social empresarial. Esto puede mejorar significativamente las relaciones

entre las empresas y las comunidades locales, fomentando un clima de mayor confianza y cooperación. A largo plazo, este enfoque puede facilitar la obtención de la llamada "licencia social para operar", un factor cada vez más crucial para el éxito y la sostenibilidad de proyectos industriales en muchas regiones.

La implementación de esta tecnología también puede tener un impacto positivo en la educación y la conciencia ambiental de las comunidades. El desarrollo y aplicación de soluciones innovadoras para problemas ambientales puede servir como un ejemplo práctico y motivador para estudiantes y jóvenes profesionales, inspirándolos a involucrarse en campos relacionados con la ciencia, la tecnología y la protección ambiental. Esto puede contribuir a largo plazo al desarrollo de una fuerza laboral más calificada y consciente de los desafíos ambientales.

Finalmente, el éxito en el desarrollo y aplicación de esta tecnología puede posicionar al país o región como un líder en soluciones ambientales innovadoras. Esto no solo puede atraer inversiones y colaboraciones internacionales en el campo de la tecnología ambiental, sino que también puede mejorar la imagen del país en el escenario global, potencialmente beneficiando a otros sectores como el turismo y las relaciones internacionales.

1.4 Alcances y limitaciones

1.4.1 Alcances

El alcance de esta investigación abarca varios aspectos fundamentales del desarrollo y aplicación de nanopartículas de ZnO biosintetizadas para la degradación fotocatalítica de cianuro. En primer lugar, se desarrollará un método de biosíntesis de nanopartículas de ZnO utilizando la bacteria *Bacillus sp.*, la cual se identificará molecularmente. El proceso de biosíntesis implicará la optimización de las condiciones de síntesis, evaluando el efecto de parámetros clave como la concentración de precursores, tiempo y temperatura de incubación, y condiciones de calcinación. El objetivo es establecer un protocolo reproducible y potencialmente escalable para la producción de nanopartículas de ZnO con propiedades adecuadas para aplicaciones fotocatalíticas.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se procederá a una caracterización exhaustiva de sus propiedades estructurales, morfológicas y ópticas. Esta caracterización incluirá análisis estructural mediante difracción de rayos X (DRX) para determinar las fases cristalinas presentes y el tamaño de cristalito. Se realizará un estudio morfológico detallado utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y, de ser posible, microscopía electrónica de transmisión (TEM), lo que permitirá observar la forma y tamaño de las nanopartículas, así como su distribución. Las propiedades ópticas se evaluarán mediante espectroscopía UV-visible, lo que permitirá estimar la banda prohibida del material y su capacidad de absorción de luz. Adicionalmente, se empleará espectroscopía infrarroja (FTIR) para identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas, y se determinará el área superficial específica mediante análisis BET.

La evaluación de la actividad fotocatalítica de las nanopartículas de ZnO para la degradación de cianuro en solución acuosa constituye un componente central de esta investigación. Se llevarán a cabo ensayos fotocatalíticos en un reactor de cuarzo, utilizando luz UV artificial para activar el catalizador. Se estudiará la cinética de degradación del cianuro, determinando la eficiencia de remoción en función del tiempo de irradiación y la concentración de catalizador. Se evaluarán diferentes condiciones operativas, como concentración inicial de cianuro y cantidad de catalizador, para optimizar el proceso de degradación.

Se realizará también un análisis comparativo entre la eficiencia de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas y otros métodos convencionales de tratamiento de cianuro. Esto permitirá evaluar las ventajas potenciales de esta nueva tecnología en términos de eficiencia, costos operativos y sostenibilidad ambiental.

Aunque el enfoque principal será la degradación de cianuro, se explorará también la capacidad de las nanopartículas de ZnO para degradar otros contaminantes comúnmente presentes en efluentes industriales. Esto proporcionará información valiosa sobre la versatilidad del catalizador y su potencial aplicación en el tratamiento de aguas residuales complejas.

1.4.2 Limitaciones

A pesar del amplio alcance de la investigación, es importante reconocer ciertas limitaciones inherentes al estudio. En primer lugar, el trabajo se restringirá a condiciones controladas de laboratorio, utilizando soluciones sintéticas de cianuro. Aunque esto permite un control preciso de las variables experimentales, no refleja completamente la complejidad de los efluentes industriales reales, que pueden contener una variedad de otros contaminantes y especies que podrían afectar el proceso fotocatalítico.

Otra limitación significativa es que no se evaluará la aplicación a gran escala del proceso fotocatalítico. El estudio se limitará a pruebas por lotes a nivel de laboratorio, lo que significa que los resultados obtenidos, aunque valiosos, no pueden extrapolarse directamente a aplicaciones industriales sin considerar los desafíos adicionales que implica el escalado del proceso.

En cuanto a la fuente de luz utilizada, la investigación se centrará en el uso de lámparas UV artificiales en lugar de aprovechar la luz solar real. Si bien esto permite un control preciso de la intensidad y el espectro de la luz utilizada, no refleja las condiciones variables y potencialmente más desafiantes de la luz solar natural. La eficacia del proceso bajo luz solar directa, que sería crucial para aplicaciones prácticas y de bajo costo, queda fuera del alcance de este estudio.

Además, aunque se realizará una caracterización exhaustiva de las nanopartículas de ZnO, algunas técnicas avanzadas de análisis podrían no estar disponibles debido a limitaciones de equipamiento o recursos. Esto podría restringir la profundidad del análisis en ciertos aspectos de la estructura y propiedades del material.

Finalmente, el estudio se centrará en un tipo específico de bacteria (*Bacillus sp.*) para la biosíntesis de las nanopartículas de ZnO. Aunque esto permite una investigación detallada de este método particular, no explora el potencial de otros microorganismos que podrían ofrecer ventajas adicionales en términos de eficiencia de síntesis o propiedades del material resultante.

A pesar de estas limitaciones, la investigación propuesta proporcionará información valiosa sobre la síntesis biológica de nanopartículas de ZnO y su aplicación en la degradación fotocatalítica de cianuro, sentando las bases para futuros estudios que puedan abordar estos aspectos adicionales y acercar la tecnología a su aplicación práctica en el tratamiento de efluentes industriales.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Estudiar la degradación de cianuro mediante un proceso fotocatalítico en solución acuosa empleando nanopartículas de ZnO biosintetizadas.

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Biosintetizar nanopartículas de ZnO a través del uso de *Bacillus sp.*
- b) Determinar las propiedades ópticas, estructurales y morfológicas del ZnO biosintetizado.
- c) Evaluar la actividad fotocatalítica para degradar cianuro.

1.6 Hipótesis

1.6.2 Hipótesis general

Las nanopartículas de ZnO biosintetizadas serán eficaces en la degradación del cianuro mediante un proceso fotocatalítico en solución acuosa.

1.6.3 Hipótesis específica

- a) El uso de *Bacillus sp.* permitirá la biosíntesis exitosa de nanopartículas de ZnO con propiedades adecuadas para su uso en fotocatalisis
- b) Las nanopartículas de ZnO biosintetizadas presentarán propiedades ópticas, estructurales y morfológicas similares o superiores a las obtenidas por métodos de síntesis convencionales.

- c) Las nanopartículas de ZnO biosintetizadas mostrarán una actividad fotocatalítica significativa en la degradación del cianuro.

1.7 Variables

1.7.2 Identificación de variables

1.7.2.1 Variable independiente

- Características físicas, químicas y mineralógicas de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas

1.7.2.2 Variable dependiente

- Eficiencia de la degradación del cianuro mediante proceso fotocatalítico

1.7.3 Definición operacionalización de las variables

Operacionalización de variables

Variable	Dimensión	Subdimensión	Indicador	Escala
Características físicas, químicas y mineralógicas de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas (Independiente)	Propiedades físicas	Morfología	Forma geométrica de las nanopartículas	Nominal
		Tamaño de partícula	Diámetro promedio de nanopartícula (nm)	Numérica razón continua
		Área superficial	Área superficial BET (m ² /g)	
		Band Gap	Energía de banda prohibida (eV)	
	Propiedades químicas	Absorción de luz UV-Vis	Longitud de onda máxima (nm)	Numérica razón continua
		Pureza	Espectro FTIR	
	Propiedades mineralógicas	Grupos funcionales	Presencia de vibraciones moleculares Zn-O (cm ⁻¹)	Nominal
		Estructura cristalina	Fase cristalina (hexagonal wurtzita, zincita)	Nominal
		Tamaño de cristalito	Tamaño promedio de cristalito (nm)	Numérica razón continua
		Fase cristalográfica	% de fase	
Parámetros de red	Constantes de red a y c (Å)			
Eficiencia de la degradación del cianuro mediante proceso fotocatalítico (Dependiente)	Eficiencia de degradación (DE)	% de degradación	$DE = (C_i - C_r / C_i) \times 100$ $C_i =$ Concentración inicial de CN ⁻ $C_r =$ Concentración residual de CN ⁻ DE > 90 % = Muy alta eficiencia 70 % ≤ DE < 90 % = Alta eficiencia 50 % ≤ DE < 70 % = Moderada eficiencia DE < 50 % = Baja eficiencia	Numérica razón continua
		Concentración residual	Concentración final de CN ⁻ (mg/L)	
	Condiciones de operación	Tiempo de degradación	Tiempo para 50 % de degradación t _{1/2} (min)	Numérica razón continua
		Concentración de catalizador	Dosificación de ZnO (g/L)	
		Tiempo de reacción	Tiempo de irradiación (min)	

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

La fotocatalisis heterogénea con semiconductores nanoestructurados ha sido ampliamente investigada en las últimas décadas para la degradación de diversos contaminantes en agua y aire. Dentro de los semiconductores más estudiados se encuentra el TiO_2 , que ha demostrado una alta actividad para la mineralización oxidativa de compuestos orgánicos e inorgánicos bajo irradiación UV (Chen et al., 2020). Sin embargo, la baja absorción del TiO_2 en el rango visible del espectro y la rápida recombinación de pares electrón-hueco limitan su eficiencia (Lettieri et al., 2021).

En este contexto, el ZnO ha surgido como un fotocatalizador prometedor para superar estas desventajas del TiO_2 , debido a su ancha banda prohibida (3,37 eV) y la facilidad para sintetizarlo en nanoestructuras con alta área superficial (Abdullah et al., 2022). Varios estudios previos han reportado una elevada actividad fotocatalítica del ZnO nanoestructurado para degradar contaminantes ambientales como colorantes (Batra et al., 2022), fenoles (Kusiak-Nejman et al., 2021), pesticidas (Khan y Pathak, 2020), fármacos (Majumder et al., 2020), entre otros.

En cuanto a la degradación de cianuro específicamente, también se han publicado investigaciones que evidencian la efectividad del ZnO como fotocatalizador. Razanamahandry et al. (2020) estudiaron la degradación de CN^- por nanopartículas de ZnO sintetizadas por un método verde usando hojas de *Eucalyptus globulus*, logrando una degradación del 98 % luego de 20 min usando luz ultravioleta, partiendo de una concentración inicial de 3 g $\text{CN}^- \text{L}^{-1}$. Núñez-Salas et al. (2019) alcanzaron una degradación de 89 % de una concentración inicial de 10 mg $\text{CN}^- \text{L}^{-1}$ en un periodo de 2 horas, empleando un simulador solar de 300 a 800 nm. Mohar et al. (2019) depositaron ZnO nanoestructurado sobre vidrio, logrando degradar 12,44 % de cianuro de una concentración inicial de 200 ppm y empleando lámparas de luz blanca. Estos estudios

previos demuestran el potencial de aplicación de este semiconductor para el tratamiento de soluciones contaminadas con cianuro.

Sin embargo, aún es necesario profundizar en el efecto de las características nanoestructurales del ZnO biosintetizado por un método verde mediante la aplicación de bacterias, como tipo de estructura, tamaño y morfología de partícula, sobre la actividad fotocatalítica para degradar cianuro. En esta línea, el presente proyecto de investigación pretende biosintetizar nanopartículas de ZnO con *Bacillus sp.* en distintas condiciones y evaluar su capacidad para la eliminación de cianuro mediante irradiación UV, determinando la influencia de variables operacionales sobre la eficiencia del proceso fotocatalítico.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Contaminación por cianuro

El cianuro es un ion monovalente consistente en un átomo de carbono unido por enlaces triples a un átomo de nitrógeno (CN^-). Se forma a partir del ácido cianhídrico, que es un gas incoloro de olor característico. En la naturaleza se encuentra en forma de diversos compuestos simples y complejos, siendo las sales de cianuro de sodio (NaCN), potasio (KCN) y calcio (CaCN_2) las más comunes (Soto, 2013).

Industrialmente, los compuestos de cianuro se utilizan en diversos procesos, principalmente en la minería del oro y la plata para extraer estos metales de los minerales que los contienen, mediante un proceso conocido como cianuración. El cianuro forma complejos muy estables con los iones metálicos Au^+ y Ag^+ , separándolos eficientemente de la mena triturada (Verbrugge et al., 2021). Otras aplicaciones importantes son la producción de polímeros como el nailon, adhesivos y plásticos, tratamiento de superficies metálicas, síntesis química, entre otros (Dzombak et al., 2006).

Los efluentes resultantes de estos procesos contienen ciertas concentraciones de cianuro libre, complejo o a veces cianuros metálicos que deben ser removidos antes de su descarga o reúso, ya que aún a bajas concentraciones el CN^- es sumamente tóxico para los seres vivos. Cuando se ingiere, inhala o absorbe a través de la piel, el ion cianuro (CN^-) bloquea la respiración celular al unirse fuertemente a la enzima citocromo c oxidasa,

inhibiendo el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Esto evita la utilización del oxígeno por las células y causa una disminución letal de ATP. Además, puede provocar daños en el sistema nervioso central, tiroides, corazón, pulmones e hígado (Suman, 2023).

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Unión Europea establecen una concentración máxima de 0,2 mg/L de CN^- en los efluentes descargados por la industria minera, mientras que la Organización Mundial de la Salud recomienda no superar 0,07 mg/L en el agua potable (Dzombak et al., 2006). Para cumplir con estas regulaciones, es necesario aplicar procesos eficientes de remoción de cianuro a los efluentes contaminados.

2.2.2. Métodos convencionales de remoción del cianuro

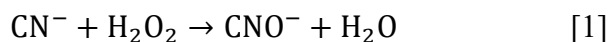
Existen diversos procesos que permiten degradar o remover el cianuro de soluciones acuosas. Los tratamientos más utilizados actualmente en la industria son:

a) Oxidación alcalina con peróxido de hidrógeno u otros oxidantes:

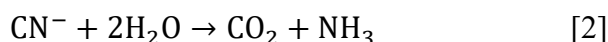
Este método se basa en la reacción del CN^- con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) u otros agentes oxidantes fuertes en condiciones alcalinas. Es uno de los procesos más ampliamente utilizados en la industria, especialmente en el sector minero, debido a su eficacia y relativa simplicidad. El proceso se lleva a cabo en un ambiente fuertemente alcalino, típicamente a un pH superior a 10,5 para asegurar que el cianuro esté presente principalmente en su forma iónica (CN^-) y no como ácido cianhídrico volátil (HCN), que es altamente tóxico y peligroso. La oxidación con peróxido de hidrógeno no solo es efectiva para el cianuro libre, sino también para varios complejos de cianuro metálico, lo que lo hace versátil para tratar diversos tipos de efluentes cianurados. Además del H_2O_2 , otros oxidantes como el hipoclorito de sodio (NaClO) o el permanganato de potasio (KMnO_4) también pueden emplearse en este proceso, cada uno con sus propias ventajas y desventajas en términos de costo, eficacia y generación de subproductos. La elección del oxidante depende de factores como la composición específica del efluente, los costos operativos y las regulaciones ambientales locales (Tu et al., 2019).

El proceso se desarrolla en dos etapas principales:

1ra etapa: Oxidación del cianuro a cianato:



2da etapa: Hidrólisis del cianato a dióxido de carbono y nitrógeno:



Para que el proceso sea efectivo, se requiere un pH superior a 10,5, lo que asegura que el cianuro esté presente principalmente como ion CN^- y no como HCN volátil. La relación molar $\text{H}_2\text{O}_2:\text{CN}^-$ debe ser de al menos 2:1 para garantizar una oxidación completa. En la práctica, suelen utilizarse excesos de H_2O_2 para compensar la descomposición del peróxido y asegurar la reacción completa.

Ventajas:

- Proceso relativamente rápido y eficiente.
- No introduce contaminantes adicionales al medio.
- El exceso de H_2O_2 se descompone en agua y oxígeno.

Desventajas:

- Costo elevado del H_2O_2 .
- Necesidad de un control preciso del pH.
- Posible formación de complejos cianometálicos resistentes a la oxidación.

b) Proceso INCO (SO_2 /aire):

Este método, desarrollado por INCO, utiliza una mezcla de dióxido de azufre (SO_2) y aire para oxidar el cianuro. El proceso opera a un pH entre 8 y 10, lo que lo hace particularmente adecuado para el tratamiento de efluentes mineros que típicamente son alcalinos. El proceso INCO se ha convertido en uno de los métodos más utilizados en la industria minera a gran escala debido a su eficacia en el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes cianurados y su capacidad para manejar simultáneamente la eliminación de cianuro y la precipitación de metales pesados. Una característica distintiva de este proceso es el uso de un catalizador de cobre soluble, que aumenta significativamente la velocidad de reacción. El proceso INCO es especialmente eficaz

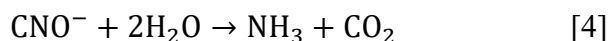
para tratar efluentes con concentraciones moderadas de cianuro (típicamente < 100 mg/L) y es capaz de manejar tanto cianuro libre como complejos débiles de cianuro metálico.

Sin embargo, puede ser menos efectivo para concentraciones muy altas de cianuro o para complejos fuertes de cianuro, como los formados con hierro. Una consideración importante en la implementación de este proceso es el manejo seguro del SO₂, que es un gas tóxico; por esta razón, muchas instalaciones optan por utilizar metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) como fuente de SO₂, ya que es más seguro de manejar y transportar (Breuer y Hewitt, 2020).

La reacción principal es:



El cianato formado posteriormente se descompone en amoníaco y dióxido de carbono:



Se requiere una relación molar SO₂:CN⁻ de 0,5 - 0,6 para una oxidación efectiva. El proceso utiliza típicamente un catalizador de cobre soluble para aumentar la velocidad de reacción.

Ventajas:

- Eficiente para tratar grandes volúmenes de efluentes.
- Capaz de tratar simultáneamente cianuro libre y complejos débiles de cianuro.
- Menor costo operativo comparado con la oxidación con H₂O₂.

Desventajas:

- Generación de lodos que contienen metales y requieren disposición.
- Necesidad de manejar SO₂, un gas tóxico.
- Posible formación de tiocianato como subproducto.

c) Adsorción con carbón activado:

La adsorción con carbón activado es un método físico-químico ampliamente utilizado para la remoción de cianuro de soluciones acuosas. Este proceso aprovecha la alta área superficial y la estructura porosa del carbón activado para retener moléculas de cianuro a través de interacciones físicas y químicas. El carbón activado puede adsorber tanto cianuro libre como ciertos complejos de cianuro metálico, aunque su eficacia varía dependiendo del tipo de complejo y las condiciones de la solución. Una de las principales ventajas de este método es su capacidad para tratar efluentes con bajas concentraciones de cianuro, donde otros métodos químicos pueden ser menos eficientes. Además, el carbón activado puede adsorber simultáneamente otros contaminantes orgánicos presentes en el efluente, lo que lo hace particularmente útil para el tratamiento de aguas residuales complejas. Sin embargo, este método no destruye el cianuro, sino que lo transfiere de la fase líquida a la sólida, lo que requiere un manejo posterior del carbón saturado. Esto implica etapas adicionales de regeneración o disposición del carbón, lo cual puede aumentar los costos operativos y plantear desafíos ambientales adicionales (Aliprandini et al., 2020).

El proceso implica la retención física del cianuro en la estructura porosa del carbón activado.

El mecanismo de adsorción puede involucrar:

- Adsorción física del ion CN^- en la superficie del carbón.
- Formación de complejos entre el cianuro y grupos funcionales en la superficie del carbón.
- Posible oxidación parcial del cianuro a cianato en la superficie del carbón.

La eficiencia del proceso depende de factores como el pH de la solución, la temperatura, el tipo de carbón activado utilizado y la presencia de otros iones que puedan competir por los sitios de adsorción.

Ventajas:

- Efectivo para bajas concentraciones de cianuro.
- Puede remover simultáneamente otros contaminantes orgánicos.

- Tecnología bien establecida y relativamente simple de operar.

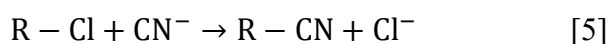
Desventajas:

- Requiere etapas posteriores de regeneración o disposición del carbón saturado.
- La presencia de otros contaminantes puede reducir la eficiencia de remoción del cianuro.
- No destruye el cianuro, solo lo transfiere a otra fase.

d) Intercambio iónico:

El intercambio iónico es un proceso físico-químico que utiliza resinas especialmente diseñadas para remover iones cianuro de soluciones acuosas. Este método se basa en el principio de intercambio de iones, donde los iones cianuro (CN^-) son reemplazados por otros aniones (como cloruro o hidroxilo) presentes en la resina. El intercambio iónico es particularmente eficaz para el tratamiento de efluentes con bajas concentraciones de cianuro y puede lograr niveles muy bajos de cianuro residual en el agua tratada. Una ventaja significativa de este método es su capacidad para recuperar el cianuro, lo cual puede ser económicamente beneficioso en algunas aplicaciones industriales donde el cianuro puede reutilizarse. Sin embargo, el proceso de intercambio iónico no destruye el cianuro, sino que lo concentra en la resina, lo que requiere un manejo posterior de la resina cargada. Esto implica etapas adicionales de regeneración de la resina, durante las cuales se produce una solución concentrada de cianuro que debe ser tratada o gestionada adecuadamente. Además, la presencia de otros iones en el efluente puede competir con el cianuro por los sitios de intercambio en la resina, lo que puede reducir la eficiencia del proceso en aguas residuales complejas (Zhou et al., 2023).

Las resinas, típicamente de base fuerte, intercambian aniones como cloruro o hidroxilo por iones cianuro:



Donde R representa la matriz de la resina.

El proceso implica hacer pasar la solución contaminada a través de una columna llena de resina. Una vez que la resina se satura, se regenera utilizando una solución

concentrada de NaOH o NaCl, que invierte la reacción y libera el cianuro en una solución concentrada.

Ventajas:

- Altamente eficiente para bajas concentraciones de cianuro.
- Puede recuperar el cianuro para su reutilización.
- No destruye el cianuro, lo que puede ser ventajoso si se desea recuperarlo.

Desventajas:

- Requiere regeneración periódica de las resinas.
- La presencia de otros aniones puede interferir con la eficiencia del proceso.
- El efluente de regeneración contiene cianuro concentrado que requiere tratamiento adicional.

e) Biodegradación:

La biodegradación es un método de tratamiento biológico que utiliza microorganismos, principalmente bacterias, para degradar el cianuro en compuestos menos tóxicos o completamente inocuos. Este enfoque se basa en la capacidad natural de ciertos microorganismos para metabolizar el cianuro como fuente de carbono y nitrógeno. La biodegradación puede llevarse a cabo en sistemas aerobios o anaerobios, dependiendo de las especies microbianas utilizadas y las condiciones del proceso. Una de las principales ventajas de la biodegradación es su potencial para ser un método de tratamiento económico y ambientalmente amigable, especialmente para el tratamiento a largo plazo de efluentes con bajas concentraciones de cianuro. Además, los procesos biológicos pueden degradar simultáneamente otros contaminantes orgánicos presentes en el efluente. Sin embargo, la biodegradación generalmente requiere tiempos de tratamiento más largos en comparación con los métodos físico-químicos, y su eficacia puede verse afectada por factores como la temperatura, el pH, y la presencia de otros compuestos tóxicos en el efluente. Además, los sistemas biológicos pueden requerir un período de aclimatación y un control cuidadoso de las condiciones ambientales para mantener una población microbiana saludable y activa (Cáceda Quiroz et al., 2023).

Los procesos de biodegradación pueden ser aerobios o anaerobios y pueden involucrar varias rutas metabólicas:

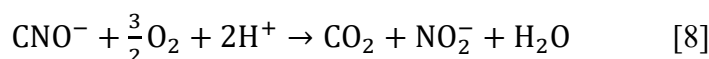
- Hidrólisis enzimática:



- Oxidación inicial del cianuro:



- Oxidación del ion cianato:



- Reducción:



Algunas bacterias comúnmente utilizadas incluyen especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, y *Klebsiella*.

Ventajas:

- Método ambientalmente amigable.
- Bajos costos operativos una vez establecido el sistema.
- Puede tratar simultáneamente otros contaminantes orgánicos.

Desventajas:

- Requiere tiempos de tratamiento más largos comparado con métodos físico-químicos.
- Sensible a cambios en las condiciones ambientales (pH, temperatura, presencia de otros tóxicos).
- Puede requerir la adición de nutrientes y control de las condiciones del medio.

Si bien estos procesos se aplican a nivel industrial, presentan ciertas limitaciones que dificultan su implementación o elevan los costos (Vidal-Tovar et al., 2019):

- Necesidad de etapas posteriores para remover subproductos también tóxicos (CNO^- , NH_3).
- Consumo de elevadas cantidades de reactivos peligrosos como H_2O_2 , O_3 y SO_2 .
- Operación a pH extremos que requiere ajustes previos y posteriores al tratamiento.

- Baja eficiencia a concentraciones de CN^- menores a 50 mg/L.
- Costos asociados a la regeneración de las resinas y el carbón activado saturados.
- Tiempos prolongados para obtener una degradación completa mediante biodegradación.

Por ello, es importante investigar tecnologías alternativas que permitan degradar el cianuro de manera efectiva y segura, sin las desventajas mencionadas. Los procesos avanzados de oxidación basados en la generación y uso de radicales altamente reactivos representan una opción prometedora.

2.2.3. Procesos avanzados de oxidación para degradación de contaminantes

Los procesos avanzados de oxidación (PAOs) involucran la generación de especies de radicales muy oxidantes, principalmente el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), que es capaz de atacar y degradar rápidamente una amplia variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (J. Wang y Wang, 2020). Entre los PAOs más estudiados se encuentran:

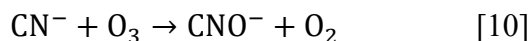
a) Ozonización (O_3)

La oxidación con ozono (O_3) es un método avanzado de oxidación que ha ganado considerable atención para el tratamiento de efluentes cianurados en las últimas décadas. El ozono es un oxidante extremadamente potente con un potencial de oxidación de 2,07 V, lo que lo hace muy efectivo para la degradación de cianuro y sus complejos. Una de las principales ventajas de la ozonización es que no introduce contaminantes adicionales al agua tratada, ya que el exceso de ozono se descompone rápidamente en oxígeno. Este método es particularmente eficaz para el tratamiento de cianuro libre y varios complejos de cianuro metálico, incluyendo algunos que son resistentes a otros métodos de tratamiento. La oxidación con ozono puede llevarse a cabo en un amplio rango de pH, aunque su eficacia y mecanismo de acción pueden variar dependiendo de las condiciones del proceso. En condiciones alcalinas, que son típicas en los efluentes de la industria minera, la oxidación indirecta a través de radicales hidroxilos se vuelve más prominente, lo que puede aumentar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, la implementación de la ozonización a escala industrial puede enfrentar desafíos debido al alto costo energético asociado con la generación de ozono y su baja solubilidad en agua, lo que puede limitar

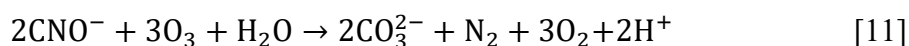
la eficiencia de transferencia de masa en el proceso de tratamiento (Morillo Esparza et al., 2019), (Rekhate y Srivastava, 2020).

El ozono (O_3) es un poderoso oxidante que puede descomponer el cianuro en un proceso de dos etapas:

1ra etapa: Oxidación del cianuro a cianato:



2da etapa: Oxidación posterior del cianato a carbonato y nitrógeno:



La eficacia de la ozonización depende del pH, ya que en condiciones alcalinas se favorece la formación de radicales $\bullet OH$, mientras que en condiciones ácidas predomina la oxidación directa por O_3 .

Ventajas:

- No genera residuos secundarios, ya que el exceso de O_3 se descompone en O_2 .
- Efectivo contra una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos.
- Puede mejorar la biodegradabilidad de los contaminantes recalcitrantes.

Desventajas:

- Alto costo energético para la generación de O_3 .
- Baja solubilidad del O_3 en agua, lo que puede limitar la eficiencia del proceso.
- Posible formación de subproductos de oxidación potencialmente tóxicos.

Aplicaciones:

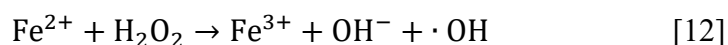
- Tratamiento de aguas residuales industriales.
- Desinfección de agua potable.
- Eliminación de compuestos farmacéuticos y productos de cuidado personal en aguas residuales.

b) Proceso Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$):

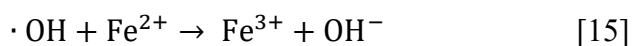
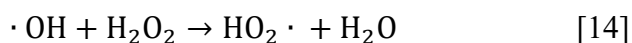
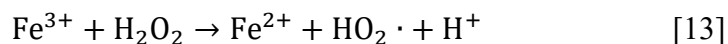
El proceso Fenton es reconocido como un método altamente efectivo para la degradación de cianuro, particularmente en condiciones ácidas. Este proceso se basa en la reacción entre el ion ferroso (Fe^{2+}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$). La alta reactividad de estos radicales los hace extremadamente eficientes para oxidar el cianuro. El proceso Fenton es especialmente potente en medio ácido (típicamente pH 2 - 4) donde la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ es más eficiente. En estas condiciones, el cianuro se encuentra principalmente en forma de ácido cianhídrico (HCN), que es más susceptible al ataque de los radicales $\cdot\text{OH}$ que el ion cianuro (CN^-).

La reacción Fenton no solo es capaz de oxidar el cianuro libre, sino que también puede degradar complejos débiles de cianuro, como los formados con cobre o zinc, que son comunes en efluentes mineros. Además, bajo condiciones optimizadas, el proceso Fenton puede llevar a la mineralización completa del cianuro, convirtiéndolo en dióxido de carbono (CO_2) y nitrato (NO_3^-), eliminando así completamente su toxicidad (Liang et al., 2021):.

Mecanismo de reacción principal:



Reacciones secundarias:



El proceso Fenton es más eficiente a pH ácido (típicamente entre 2,5 y 3,5), lo que puede requerir ajustes de pH antes y después del tratamiento.

Ventajas:

- Alta eficiencia en la degradación de contaminantes orgánicos recalcitrantes.

- Reactivos relativamente económicos y fáciles de manejar.
- Posibilidad de tratar altas cargas de contaminantes.

Desventajas

- Necesidad de ajustar el pH a condiciones ácidas.
- Generación de lodos de hidróxido de hierro que requieren tratamiento posterior.
- Posible consumo ineficiente de H_2O_2 por reacciones secundarias.

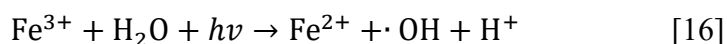
Aplicaciones

- Tratamiento de aguas residuales industriales, especialmente de la industria textil y farmacéutica.
- Remediación de suelos contaminados.
- Pretratamiento para mejorar la biodegradabilidad de efluentes recalcitrantes.

c) Proceso Foto-Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$)

El proceso Foto-Fenton representa una mejora significativa sobre el proceso Fenton convencional para la degradación de cianuro. Este método combina la reacción Fenton clásica con la irradiación ultravioleta (UV) o luz solar. La adición de luz UV potencia la generación de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$) a través de varios mecanismos adicionales. Primero, la fotólisis del peróxido de hidrógeno produce directamente radicales $\bullet\text{OH}$. Segundo, la luz UV promueve la foto-reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} , lo que mantiene el ciclo catalítico del hierro y sostiene la producción de radicales $\bullet\text{OH}$. Tercero, los complejos de hierro-cianuro que pueden formarse durante el tratamiento son susceptibles al fotólisis, liberando cianuro libre que puede ser posteriormente oxidado. Esta sinergia entre la reacción Fenton y la fotólisis resulta en una degradación más rápida y completa del cianuro, incluso a concentraciones más bajas. Además, el proceso Foto-Fenton puede operar eficazmente a pH menos ácido (hasta pH 5) en comparación con el Fenton convencional, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de efluentes mineros que suelen ser alcalinos. La posibilidad de utilizar luz solar como fuente de radiación UV hace que este proceso sea particularmente atractivo para operaciones mineras en áreas remotas o con acceso limitado a la red eléctrica (Rueda-Márquez et al., 2020).

Mecanismo adicional al proceso Fenton convencional:



Esta reacción fotoquímica permite la regeneración continua de Fe^{2+} , lo que mantiene el ciclo catalítico y aumenta la producción de radicales $\cdot\text{OH}$.

Ventajas adicionales sobre el proceso Fenton

- Mayor eficiencia en la producción de radicales $\cdot\text{OH}$.
- Posibilidad de operar a pH menos ácido (hasta pH 5).
- Reducción en la cantidad de hierro necesaria.
- Potencial uso de luz solar, reduciendo costos energéticos.

Desventajas

- Requiere equipos adicionales para la irradiación UV si no se usa luz solar.
- La turbidez del agua puede reducir la eficacia del proceso al limitar la penetración de la luz.
- Mayor complejidad operativa comparado con el proceso Fenton convencional.

Aplicaciones

- Tratamiento de aguas residuales con contaminantes persistentes.
- Descontaminación de aguas subterráneas.
- Eliminación de microcontaminantes emergentes (fármacos, pesticidas, etc.).

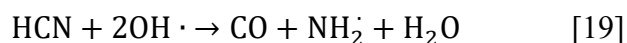
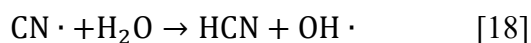
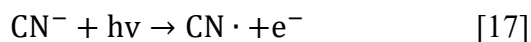
d) Fotólisis UV

La fotólisis UV es un proceso avanzado de oxidación que utiliza radiación ultravioleta para degradar el cianuro en soluciones acuosas. Este método se basa en la capacidad de la luz UV para romper los enlaces químicos del cianuro directamente o para generar especies reactivas, principalmente radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), que luego oxidan el cianuro. La fotólisis UV puede ser particularmente efectiva para el tratamiento de efluentes con bajas concentraciones de cianuro (típicamente $< 20 \text{ mg/L}$), donde otros métodos químicos pueden ser menos eficientes o económicos. Una ventaja significativa

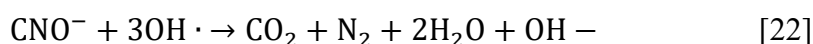
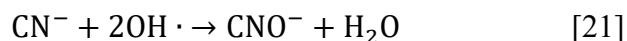
de este método es que no requiere la adición de productos químicos adicionales, lo que puede simplificar el proceso de tratamiento y reducir la generación de subproductos indeseados. Sin embargo, la eficacia de la fotólisis UV puede verse limitada en efluentes con alta turbiedad o color, ya que estos factores pueden interferir con la penetración de la luz UV (Pandey et al., 2023). Además, el proceso puede requerir tiempos de tratamiento relativamente largos para lograr una degradación completa del cianuro, especialmente en concentraciones más altas.

El proceso puede ocurrir por dos vías principales:

1ra vía: Fotólisis directa:



2da vía: Fotólisis indirecta (con H_2O_2):



Este método es especialmente eficiente para bajas concentraciones de cianuro (< 20 mg/L) y se puede mejorar añadiendo H_2O_2 como fuente adicional de radicales $\text{OH} \cdot$.

Ventajas

- No requiere adición de productos químicos (en la fotólisis directa).
- Eficaz para bajas concentraciones de cianuro.
- Puede combinarse con otros procesos de oxidación avanzada.

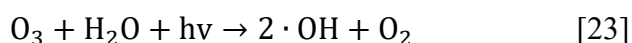
Desventajas

- Alto consumo energético.
- Eficiencia limitada para altas concentraciones de cianuro.
- La presencia de sólidos suspendidos o color puede reducir la eficacia del proceso.

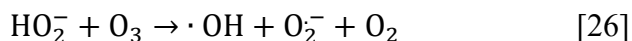
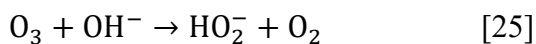
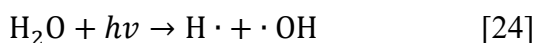
e) Proceso O₃/UV

La combinación de ozonización y radiación ultravioleta (proceso O₃/UV) constituye un enfoque sinérgico y altamente efectivo para la degradación de cianuro. Este proceso aprovecha las fortalezas individuales de la ozonización y la fotólisis UV, resultando en una oxidación más rápida y completa del cianuro en comparación con cualquiera de los métodos por separado. La irradiación UV acelera la descomposición del ozono en agua, generando una cantidad significativamente mayor de radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) que la ozonización sola. Además, la fotólisis directa del cianuro por la luz UV contribuye a su degradación. La combinación de estos mecanismos permite una oxidación más eficiente del cianuro, incluso de formas complejas que pueden ser resistentes a la ozonización simple. El proceso O₃/UV es capaz de mineralizar completamente el cianuro a dióxido de carbono (CO₂) y nitrito/nitrato (NO²⁻/NO³⁻), eliminando efectivamente su toxicidad. Una ventaja adicional de este método es su capacidad para operar eficazmente en un rango de pH más amplio que otros procesos, lo que lo hace adaptable a diversas condiciones de efluentes cianurados (Dadban Shahamat et al., 2022).

Mecanismo principal:



Reacciones adicionales:



Ventajas

- Mayor eficiencia en la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ comparado con la ozonización o fotólisis UV por separado.
- Efectivo contra una amplia gama de contaminantes, incluyendo aquellos resistentes a la ozonización o fotólisis UV individuales.

- Puede operar a pH neutro, evitando la necesidad de ajustes de pH.

Desventajas

- Alto costo energético debido a la generación de O_3 y la irradiación UV.
- Posible formación de subproductos de oxidación que requieren monitoreo.
- La eficiencia puede verse afectada por la turbidez o color del agua.

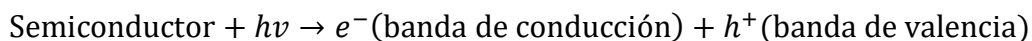
Aplicaciones

- Tratamiento avanzado de aguas residuales industriales.
- Eliminación de contaminantes emergentes en plantas de tratamiento de agua potable.
- Desinfección y oxidación simultánea en sistemas de tratamiento de agua.

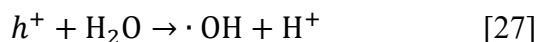
f) Fotocatálisis con semiconductores

La fotocatálisis heterogénea utilizando semiconductores como el dióxido de titanio (TiO_2) o el óxido de zinc (ZnO) emerge como un método promisorio y versátil para la degradación de cianuro. Este proceso se basa en la capacidad de estos materiales semiconductores para generar pares electrón-hueco cuando son irradiados con luz de energía igual o superior a su banda prohibida. Los huecos generados en la banda de valencia pueden oxidar directamente el cianuro o reaccionar con el agua para formar radicales hidroxilos ($\bullet OH$), mientras que los electrones en la banda de conducción pueden reducir el oxígeno molecular para formar radicales superóxidos ($O_2^{\bullet -}$). Estos procesos redox concurrentes conducen a una oxidación eficiente del cianuro. Una ventaja significativa de la fotocatálisis es la posibilidad de utilizar luz solar, lo que la hace especialmente atractiva para aplicaciones en áreas remotas o con acceso limitado a la energía. Además, los catalizadores semiconductores no se consumen en la reacción y pueden reutilizarse, lo que es ventajoso para el tratamiento continuo de efluentes cianurados. La fotocatálisis también ofrece la posibilidad de degradación completa del cianuro sin la generación de subproductos tóxicos persistentes, lo que la convierte en una tecnología prometedora para el tratamiento sostenible de efluentes cianurados en la industria minera y otras aplicaciones (Akerdi y Bahrami, 2019).

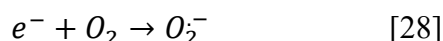
Mecanismo básico, generación de pares electrón-hueco en el semiconductor:



Reacción del hueco con el agua:



Reacción de electrón con el oxígeno:



Ventajas

- Posibilidad de utilizar luz solar, reduciendo costos energéticos.
- El catalizador no se consume en la reacción y puede ser reutilizado.
- Efectivo contra una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos.
- Potencial para la desinfección simultánea del agua.

Desventajas

- La eficiencia puede ser baja bajo luz visible, requiriendo modificación del catalizador para mejorar la absorción de luz.
- Posible recombinación rápida de los pares electrón-hueco, reduciendo la eficiencia.
- Necesidad de separar el catalizador del agua tratada, lo que puede ser complicado para catalizadores nanoparticulados.

Aplicaciones

- Tratamiento de aguas residuales con contaminantes orgánicos persistentes.
- Purificación de aire interior.
- Superficies autolimpiantes y antimicrobianas.
- Producción de hidrógeno por división fotocatalítica del agua.

2.2.4. ZnO como fotocatalizador para la degradación de cianuro

El óxido de zinc (ZnO) es un semiconductor tipo n con una energía de banda prohibida de 3,37 eV que le confiere una elevada actividad fotocatalítica bajo irradiación UV (Sharma et al., 2022). Entre sus principales propiedades se destacan:

- Absorción eficiente de luz UV debido a su ancha banda prohibida.
- Alto potencial redox de los pares electrón-hueco photogenerados (+ 2,53 V vs NHE a pH 7).
- Buena estabilidad química en condiciones ácidas y alcalinas.
- Baja toxicidad y buena biocompatibilidad.
- Mayor velocidad de recombinación electrón-hueco en comparación con TiO₂.
- Posibilidad de sintetizar una amplia variedad de nanoestructuras.

Cuando el ZnO se irradia con luz de energía superior a su banda prohibida, se promueven electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, generando pares electrón-hueco (e^-/h^+). Estos portadores de carga migran a la superficie del semiconductor y participan en reacciones redox con especies adsorbidas. Los huecos oxidan a los compuestos orgánicos o al agua formando radicales $\bullet\text{OH}$, mientras que los electrones reducen al oxígeno molecular adsorbido generando el radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$. Tanto el $\bullet\text{OH}$ como el $\text{O}_2^{\bullet-}$ son extremadamente reactivos y degradan rápidamente los contaminantes hasta mineralizarlos a CO_2 , agua y los correspondientes iones inorgánicos (Abdullah et al., 2022; Khan y Pathak, 2020; Núñez-Salas et al., 2019).

El ZnO presenta una actividad fotocatalítica igual o superior al TiO₂ para la degradación de diversos colorantes, fenoles, plaguicidas, compuestos farmacéuticos y otros contaminantes (Noman et al., 2022). Su capacidad para degradar el cianuro se ha evaluado en diferentes estudios. Por ejemplo, Razanamahandry, et al. (2020) estudiaron la degradación de CN^- por nanopartículas de ZnO sintetizadas por un método verde usando hojas de *Eucalyptus globulus*, logrando una degradación del 98 % luego de 20

min usando luz ultravioleta, partiendo de una concentración inicial de 3 g CN^{-1} , atribuida principalmente a la formación de $\text{OH}\cdot$ y $\text{O}_2\cdot^-$. Otros trabajos también evidencian la efectividad del proceso fotocatalítico con ZnO para oxidar cianuro (Mohar et al., 2019; Razanamahandry et al., 2020).

Además de sus inherentes propiedades semiconductoras, una ventaja clave del ZnO es la facilidad para sintetizarlo en una amplia variedad de nanoestructuras, como nanopartículas, nanovarillas, nanoflores, nanohojas, nanotubos, entre otras (Theerthagiri et al., 2019). Al reducir el tamaño de partícula a la nanoescala, se maximizan propiedades como el área superficial específica disponible para adsorber los contaminantes y promover las reacciones, la actividad fotocatalítica debido a una mayor separación del par e^-/h^+ , y la penetración de la radiación para activar un mayor volumen del material (Raha y Ahmaruzzaman, 2022). Por lo tanto, el empleo de ZnO nanoestructurado resulta altamente promisorio para potenciar los procesos fotocatalíticos de degradación de contaminantes como el cianuro.

Existen diversos métodos para sintetizar nanoestructuras de ZnO, tanto físicos (deposición de vapor, ablación láser) como químicos (sol-gel, hidrotermal, microemulsiones, etc.) (Bandeira et al., 2020; Shahzad et al., 2021; Wojnarowicz et al., 2020). Los métodos químicos ofrecen varias ventajas, incluyendo condiciones de síntesis sencillas y de baja temperatura, buen control del tamaño y morfología mediante el ajuste de parámetros como pH, temperatura, precursores, aditivos, y relativamente bajo costo.

Entre los principales métodos químicos para producir nanopartículas de ZnO se destacan:

- Sol-gel (Arya et al., 2021): Consiste en la hidrólisis y condensación controlada de un precursor de Zn^{2+} como el acetato o nitrato de zinc, seguida de secado y calcinación del gel formado. Permite obtener partículas pequeñas con distribución de tamaño estrecha.
- Precipitación (Arya et al., 2021): Se basa en la precipitación de hydroxo complejos de Zn^{2+} mediante la adición de una base. El tamaño de partícula y la aglomeración dependen fuertemente del pH y la temperatura.

- Hidrotermal (Basnet y Chatterjee, 2020): Implica la cristalización de ZnO en una solución acuosa a temperaturas mayores de 100°C en un sistema cerrado. Se logra un buen control sobre la morfología.
- Microemulsiones (Zhang et al., 2021): Consiste en la precipitación de ZnO dentro de gotas de una microemulsión formada por agua, aceite y surfactante. Permite obtener nanopartículas pequeñas y estrechamente distribuidas.

Dentro de los métodos de síntesis de nanopartículas de ZnO, la ruta de síntesis biológica utilizando microorganismos ha surgido como una alternativa prometedora frente a los procesos físicos y químicos convencionales. Diversos estudios han reportado el uso de bacterias para sintetizar nanopartículas de ZnO con propiedades controladas. Por ejemplo, Rehmann et al. (2019) sintetizaron nanopartículas de ZnO de forma extra e intracelular usando la bacteria *Bacillus haynesii*, logrando partículas de tamaño uniforme de 50 ± 5 nm. con actividad antibacteriana (Rehman et al., 2019). Asimismo, Iqtedar et al. (2020) produjeron nanopartículas de ZnO con un tamaño entre 58,77 – 63,3 nm utilizando *Bacillus cereus*, con mayor actividad inhibitoria sobre patógenos resistentes a múltiples fármacos en concentraciones muy bajas (Iqtedar et al., 2020). Estos estudios demuestran que el uso de rutas de síntesis biológica con bacterias es una alternativa prometedora y ecoeficiente para obtener nanopartículas de ZnO con actividad mejorada frente a diversas aplicaciones, así como de tener la capacidad de escalabilidad frente a otros métodos de síntesis.

Para la presente investigación se empleará el método de síntesis biológica debido a su versatilidad, facilidad y escalabilidad frente a otras técnicas convencionales.

2.3. Técnicas de Caracterización

2.3.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico es una técnica analítica que mide los cambios en la masa de un material en función de la temperatura o el tiempo, bajo una atmósfera controlada. Esta técnica utiliza un analizador termogravimétrico, que consta de una microbalanza de alta precisión rodeada por un horno (Gabbott, 2008). El TGA registra las variaciones de peso de la muestra a medida que se calienta o se mantiene a una

temperatura constante. Los resultados se presentan como gráficos que muestran el peso o porcentaje de peso en el eje Y frente al tiempo o la temperatura en el eje X.

Esta técnica es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y de materiales para evaluar la estabilidad térmica y la pérdida de componentes volátiles. En el caso de la desolvatación, los solventes adsorbidos o unidos se liberan a temperaturas elevadas, causando una disminución en la masa de la muestra. Por otro lado, durante la degradación térmica, la pérdida de masa ocurre debido a la formación de productos de degradación volátiles.

El equipo de TGA típicamente incluye un plato de muestra conectado a una balanza de precisión, que puede estar en una configuración de carga inferior o colgante. La atmósfera de la muestra se controla mediante la purga con un gas inerte, lo que permite un análisis preciso de los cambios de masa en condiciones específicas.

2.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica termoanalítica que mide los cambios en las propiedades físicas y químicas de un material en función de la temperatura. Este método compara el flujo de calor entre una muestra y una referencia mientras ambas se someten al mismo programa de temperatura controlada (Gaisford et al., 2016). La DSC mantiene la muestra y la referencia a temperaturas casi idénticas durante todo el experimento, midiendo las diferencias en el flujo de calor necesario para mantener esta igualdad térmica.

Durante una transición endotérmica, la muestra absorbe calor, requiriendo un mayor flujo de calor en comparación con la referencia. En contraste, durante un evento exotérmico, el flujo de calor hacia la muestra es menor que el de la referencia. Además, cuando la muestra experimenta un cambio en su capacidad calorífica, también se observa una variación en el flujo de calor relativo.

Los resultados de la DSC se presentan generalmente como termogramas, que son gráficos del flujo de calor en función de la temperatura. Estos termogramas proporcionan

información valiosa sobre las transiciones de fase, reacciones químicas y cambios en la estructura cristalina de los materiales analizados.

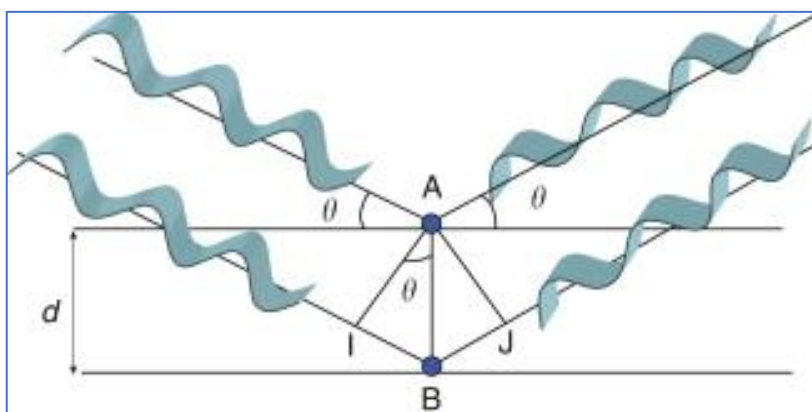
2.3.3. Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica analítica poderosa que se basa en la interacción entre los fotones de rayos X y la materia cristalina. Cuando los rayos X inciden sobre un material, se producen varios tipos de interacciones, incluyendo la dispersión elástica o coherente, también conocida como dispersión de Rayleigh. En este proceso, los fotones interactúan con los electrones que rodean los núcleos atómicos sin cambiar su energía, manteniendo su relación de fase con la onda incidente (McREE, 1999).

La naturaleza periódica de las estructuras cristalinas da lugar a patrones de interferencia constructiva y destructiva de los rayos X dispersados (Figura 1). Estos patrones de difracción característicos pueden analizarse para investigar la estructura cristalina de los materiales a nivel atómico (A. K. Singh, 2016).

Figura 1

La condición para la reflexión: la ley de Bragg (Lindon et al., op. 2010).



La ley de Bragg, formulada por W.L. Bragg, proporciona una interpretación geométrica del fenómeno de difracción de rayos X (BRAGG, 1966). Esta ley se expresa mediante la ecuación:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad [29]$$

Donde λ es la longitud de onda de los rayos X, d_{hkl} es la separación entre los planos de difracción, θ es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de difracción (ángulo de Bragg), y n es un número entero.

La difracción de rayos X proporciona información detallada sobre la estructura de los materiales a nivel molecular y cristalográfico, permitiendo determinar la disposición y organización de los átomos en el espacio. Esta información es fundamental en diversas áreas científicas, incluyendo cristalografía, química, física, biología e ingeniería (Cullity y Stock, 2001).

2.3.4. Análisis de área superficial por fisisorción de Nitrógeno (BET)

El método BET (Brunauer-Emmett-Teller) es una técnica ampliamente utilizada para medir el área superficial específica de materiales sólidos, especialmente aquellos con estructuras porosas. Esta técnica se basa en la adsorción física (fisisorción) de moléculas de gas nitrógeno en la superficie del material analizado. El método fue desarrollado en la década de 1930 por S. Brunauer, P.H. Emmett y E. Teller en el año de 1938, y desde entonces se ha convertido en una herramienta estándar en la caracterización de materiales (Brunauer et al., 1938).

El procedimiento implica medir la cantidad de nitrógeno adsorbido en la superficie del material a diferentes presiones relativas. La variación en la presión del gas adsorbido permite calcular el área superficial del material por unidad de peso. Esta técnica es particularmente útil para materiales con alta porosidad, ya que puede cuantificar el área superficial total, incluyendo la superficie interna de los poros (Lowell et al., 2004).

El análisis BET proporciona información valiosa sobre la textura y estructura porosa de los materiales, lo que es crucial en diversas aplicaciones científicas y tecnológicas, como catálisis, adsorción, y desarrollo de materiales avanzados.

2.3.5. Espectroscopia UV-visible con reflectancia difusa

La espectroscopía UV-visible con reflectancia difusa es una técnica analítica versátil utilizada para medir las propiedades ópticas de materiales sólidos, especialmente útil para muestras en polvo como las nanopartículas de ZnO. Esta técnica se basa en la medición de la luz reflejada difusamente por la muestra en el rango de longitudes de onda del ultravioleta (UV) y visible. Cuando un material absorbe energía, se producen cambios en su estructura electrónica, resultando en alteraciones detectables en sus propiedades ópticas (Clark et al., 1993).

La espectroscopía UV-visible con reflectancia difusa se emplea para determinar la brecha de energía (band gap) mediante el método de Kubelka-Munk y la extrapolación de Tauc.

La función de Kubelka-Munk, $F(R)$, se utiliza para convertir los datos de reflectancia difusa en un formato equivalente a la absorbancia:

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad [30]$$

Donde R es la reflectancia difusa medida.

El método de Tauc se basa en la relación entre la absorción de energía y la energía de la radiación incidente en un material semiconductor. La ecuación de Tauc modificada para reflectancia difusa se expresa como:

$$(F(R)hv)^n = A(hv - E_g) \quad [31]$$

Donde hv es la energía del fotón incidente, $F(R)$ es la función de Kubelka-Munk (que reemplaza al coeficiente de absorción α en la ecuación original), A es una constante relativa al material, E_g es la brecha de energía prohibida, y n es 2 para transiciones directas o 1/2 para transiciones indirectas.

Para determinar la brecha de energía del ZnO, se grafica $(F(R)hv)^n$ vs hv , y se extrapola la parte lineal de la curva hasta el eje x. El punto de intersección corresponde a

la energía de la brecha prohibida (E_g). Este análisis proporciona información valiosa sobre las propiedades electrónicas y ópticas de las nanopartículas de ZnO sintetizadas.

2.3.6. Microscopía Electrónica de Transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM), por sus siglas en inglés, es una técnica de imagen avanzada que permite la observación y análisis de la estructura de materiales a nivel atómico y molecular. Esta técnica se basa en la interacción entre un haz de electrones de alta energía y la materia, lo que permite obtener imágenes de alta resolución de la estructura interna de un material (Fultz y Howe, 2013).

Un microscopio electrónico de transmisión consta de varios componentes clave: una fuente de electrones, un sistema óptico electromagnético para enfocar el haz de electrones, un portamuestras, y un sistema de detección para recoger la información generada por la interacción de los electrones con la muestra. La muestra, que debe ser extremadamente delgada para permitir la transmisión de electrones, se coloca en un portaobjetos y se ilumina con un haz de electrones enfocado (Reimer y Kohl, 2008).

La TEM puede alcanzar resoluciones de hasta 0,1 nanómetros, lo que es significativamente superior a la resolución de los microscopios ópticos convencionales. Esta capacidad de alta resolución hace que la TEM sea una herramienta invaluable en diversos campos científicos y tecnológicos, incluyendo biología, química, ciencia de materiales, física e ingeniería.

La TEM no solo proporciona imágenes de alta resolución, sino que también permite realizar análisis estructurales y composicionales detallados de los materiales. Esto incluye la determinación de la estructura cristalina, la identificación de defectos y la caracterización de interfaces y superficies a escala atómica.

2.3.7. Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM), por sus siglas en inglés, es una técnica para obtener imágenes de alta resolución que permite obtener información de la morfología, tamaño y estructura de los poros de las nanopartículas además, permiten obtener información de su composición elemental (Datye y DeLaRiva, 2023).

El microscopio electrónico de barrido consta principalmente de un cañón de electrones en la parte superior de la columna que generalmente usan dos tipos de filamentos a base de tungsteno (W) o hexaboruro de lantano (LaB_6), una columna, un conjunto de lentes magnéticos y detectores. La generación de imágenes se produce al rasterizar el haz de la luz de electrones emitida por el filamento a través de la superficie de una muestra, donde se producen electrones secundarios con una intensidad de señal lumínica que se expresa, registra y disipa mediante una cámara alojada en la columna (Hornyak et al., 2008).

Este instrumento permite a los investigadores realizar una caracterización superficial de los materiales analizados que proporcionan información preliminar de la morfología del material de estudio y su análisis elemental de composición.

2.3.8. Espectroscopía FTIR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica versátil que identifica y caracteriza compuestos químicos mediante el análisis de sus vibraciones moleculares características. Esta técnica se basa en la absorción de radiación infrarroja por las moléculas, lo que provoca cambios en sus estados vibracionales y rotacionales (Stuart, 2004). En un espectrómetro FTIR, un haz de luz infrarroja atraviesa la muestra o se refleja en su superficie, registrando la energía absorbida a cada longitud de onda. El uso de un interferómetro y la aplicación de la transformada de Fourier permiten obtener el espectro completo rápidamente, ofreciendo ventajas significativas en velocidad y sensibilidad sobre los espectrómetros dispersivos tradicionales (Smith, 2011).

El espectro resultante muestra bandas de absorción características de los diferentes grupos funcionales presentes en la muestra, permitiendo la identificación de la estructura molecular y la composición química de los materiales analizados. La espectroscopía FTIR tiene una amplia gama de aplicaciones en química orgánica e inorgánica, ciencia de los materiales, biología y medicina. Es particularmente útil para identificar compuestos desconocidos, determinar la pureza y composición de muestras, analizar grupos funcionales en moléculas orgánicas, estudiar cambios estructurales en materiales, analizar

procesos de reacción y cinética química, y caracterizar polímeros y materiales compuestos. Además, la técnica FTIR puede acoplarse con otras metodologías analíticas, como la microscopía (micro-FTIR) o la cromatografía de gases (GC-FTIR), para proporcionar información aún más detallada sobre la estructura y composición de los materiales (Griffiths y Haseth, 2007).

La espectroscopía FTIR es una herramienta no destructiva que requiere una preparación mínima de la muestra, lo que la hace especialmente atractiva para el análisis de una amplia variedad de materiales, incluyendo sólidos, líquidos y gases. Su capacidad para proporcionar "huellas dactilares" moleculares únicas la convierte en una técnica indispensable en la investigación científica moderna y en numerosas aplicaciones industriales.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Caracterización del diseño de investigación

Esta investigación es tipo experimental de nivel explicativo/correlacional y de diseño longitudinal. Realizado en tres etapas.

3.1.1. Síntesis de nanopartículas de ZnO mediante método biogénico.

Con el propósito de desarrollar una metodología amigable con el medio ambiente y escalable, en la presente tesis se implementó un procedimiento para producir nanopartículas de ZnO mediado por la bacteria *Bacillus sp.*, obtenida del cepario de investigación del Laboratorio de Biorremediación de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Dicho procedimiento fue modificado del establecido por Tripathy R. et al., (2014), lo cual comprendió las siguientes etapas:

- a) Se reactivó la bacteria *Bacillus sp.* mediante un asa de siembra bacteriológica en un tubo con 7 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24 horas a 35 °C. Posteriormente, se sembró mediante estría en la superficie de una placa Petri con agar nutritivo estéril y se incubó por 24 horas a 35 °C para su caracterización macroscópica de las colonias bacterianas. Luego, se realizó una caracterización microscópica mediante tinción de Gram.
- b) La identificación molecular de la bacteria *Bacillus sp.* se realizó mediante la extracción de ADN utilizando el kit de extracción de ADN bacteriano InnuPREP (Analytik Jena, Alemania) a partir de una colonia de la bacteria sembrada por estría en la superficie de una placa Petri con agar Luria Bertani durante 24 horas a 35 °C. La cuantificación del ADN extraído se realizó mediante fluorometría utilizando un Qubit 4 (Life Technologies, Estados Unidos). Posteriormente, se preparó la librería genómica de secuenciación con 100 ng de ADN genómico usando el kit Illumina DNA Prep (Illumina, Reino Unido) y el kit de índices

Nextera DNA CD Indexes (Illumina, Reino Unido). Las librerías genómicas de secuenciación se secuenciaron en la plataforma Illumina utilizando un secuenciador NGS (Illumina MiSeq, Reino Unido) con lecturas de extremos pares de 2 x 151 pb a 600 ciclos. Finalmente, se obtuvo la secuencia genómica del gen 16S rRNA, la cual fue alineada y ensamblada mediante el software MEGA V 6.0. La identificación bacteriana se realizó mediante una búsqueda de identidad comparativa utilizando el BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica) en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) Anexo 1.

- c) Se obtuvo el pellet bacteriano (biomasa húmeda) mediante la siembra de colonias bacterianas en la superficie de una placa Petri con agar nutritivo, utilizando un asa bacteriológica. La bacteria *Bacillus sp.* fue inoculada en un matraz Erlenmeyer con 300 mL de caldo nutritivo estéril e incubada a 35 °C y 180 rpm durante 48 horas. Posteriormente, se distribuyó el volumen del caldo con la bacteria en tubos cónicos de 50 mL para concentrar el pellet bacteriano mediante centrifugación a 8 000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se pesó el precipitado total obtenido de la biomasa húmeda.
- d) Se inocularon 5 gramos del pellet bacteriano en una botella de vidrio de boca ancha de 1 L, que contenía una solución precursora compuesta por 375 mL de una solución de acetato de zinc dihidratado 0,2 M en agua ultrapura tipo I estéril y 375 mL de solución de bicarbonato de sodio 0,5 M en agua ultrapura tipo I estéril. Luego se incubó a 35 °C y 170 rpm durante 72 horas.
- e) Se concentró la solución precursora con la bacteria posterior a la incubación, mediante centrifugación a 8 000 rpm durante 10 min en tubos cónicos de 50 mL, descartando el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó sucesivamente mediante agitación con agua ultrapura estéril y se volvió a centrifugar, repitiendo este proceso de lavado, agitación y centrifugación 6 veces. Por último, se secó el precipitado a 60 °C durante 18 horas, contenido y extendido en el interior de tubos cónicos de 50 mL, ver Anexo 2.

- f) Para la cristalización del precipitado obtenido, se realizó una molienda fina con ayuda de un mortero de ágata. Luego se calcinó el producto de molienda a 350 °C durante 2 horas sobre un crisol de porcelana de 30 mL. Finalmente, se volvió a realizar una molienda fina y cuidadosa con el mortero de ágata, para desaglomerar posibles nanopartículas de ZnO unidas durante el proceso de calcinación.

3.1.2. Caracterización de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas

La caracterización de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas se llevó a cabo mediante diversas técnicas analíticas avanzadas para comprender sus propiedades físicas, químicas y estructurales (Anexo 3).

Para investigar los procesos térmicos involucrados en la síntesis, se realizaron análisis termogravimétricos (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) en las muestras de ZnO antes de la calcinación. Estos estudios permitieron determinar las temperaturas críticas de transformación de fases. Se utilizó un equipo SDT650 de la marca TA Instruments, operando bajo un flujo de nitrógeno (100 mL/min) y una rampa de calentamiento de 20 °C/min.

La estructura cristalina de las nanopartículas calcinadas se analizó mediante difracción de rayos X (XRD) utilizando un difractómetro PANalytical Aeris Research. El equipo empleó radiación Cu K α , generada a 40 kV y 15 mA. Los patrones de difracción se recolectaron a temperatura ambiente con un paso de 0,02° y una velocidad de escaneo de 0,1 s.

La morfología y tamaño de las nanopartículas se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio Thermo Scientific Talos 200i operando a 200 kV. Las muestras se prepararon dispersando el polvo en isopropanol, sonicando durante 10 minutos, y depositando 3 μ L en rejillas de cobre recubiertas de carbono.

La morfología de las nanopartículas se examinó mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (SEM) utilizando un microscopio Thermo Scientific Co

Scios2 operando a 30 kV y alto vacío. Las muestras se prepararon dispersando el polvo en cintas recubiertas de carbono.

El área superficial específica se determinó mediante el método de adsorción-desorción de nitrógeno Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando un analizador de fisisorción Micrometrics modelo Gemini VII. Las mediciones se realizaron a 77 K, previa desgasificación de la muestra a 150 °C en atmósfera de helio durante 2 horas.

Las propiedades ópticas se estudiaron mediante espectroscopía UV-visible utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific Evolution 220. Los espectros de absorción se registraron en el rango de 200 a 700 nm con un paso de 0,5 nm, proporcionando información sobre la banda prohibida y las características de absorción de las nanopartículas.

Esta batería de técnicas analíticas complementarias permitió una caracterización integral de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas, revelando sus propiedades fundamentales y su potencial para aplicaciones fotocatalíticas.

3.1.3. Evaluación fotocatalítica del ZnO biosintetizada para la degradación del cianuro.

Los ensayos fotocatalíticos se llevaron a cabo en un reactor fotocatalítico de cuarzo con capacidad de 1 L, siguiendo el siguiente procedimiento:

a) Se prepararon 800 mL de soluciones de cianuro de sodio (NaCN) a concentraciones de 500, 400, 300, 200 y 100 ppm en el vaso del reactor fotocatalítico. Previamente, se calculó la masa necesaria de NaCN considerando el factor de conversión de 1,884 (relación entre la masa molar del NaCN y la masa atómica del ion CN^-). Las masas requeridas fueron de: 0,753 g para 500 ppm, 0,603 g para 400 ppm, 0,452 g para 300 ppm, 0,301 g para 200 ppm y 0,151 g para 100 ppm. Los cuales fueron disueltas en volúmenes iniciales de 200 mL de agua ultrapura con agitación hasta su completa solubilización, y posteriormente aforados hasta los 800 mL. El pH de cada solución se ajustó a 10 mediante la adición de solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0,1 N para evitar la volatilización del CN^- .

b) Se agregaron 0,5 mg de nanopartículas de ZnO biosintetizadas por cada 1 mL de solución de cianuro de sodio. Inmediatamente, se ajustó el pH a 10 utilizando soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) al 0,02 N y 0,2 N.

c) Se tapó el vaso reactor y se introdujo el tubo de cuarzo, conteniendo la lámpara de luz UV de 254 nm en la solución. La mezcla se agitó constantemente a 500 rpm y 25 °C durante 3 horas, Anexo 4.

d) Se repitió el experimento utilizando 1 mg de nanopartículas de ZnO biosintetizadas por cada mL de solución de cianuro de sodio, manteniendo las demás condiciones constantes.

e) Durante la reacción, se extrajeron alícuotas cada 10 y 30 minutos por duplicado para cuantificar la concentración remanente de cianuro mediante un método titulométrico basado en el Standard Methods 4500-CN-D. Este método se basa en la reacción entre el nitrato de plata (AgNO_3) y los iones cianuro (CN^-) en solución alcalina para formar el complejo soluble de cianuro de plata ($\text{Ag}(\text{CN})$).

f) A cada alícuota de 10 mL se añadieron 3 gotas de solución de yoduro de potasio (KI) al 5 % como indicador. La titulación se realizó lentamente con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 0,65 %, utilizando una jeringa de 10 mL, hasta que la muestra adquirió un color amarillo tenue, indicando el punto final de la titulación (Anexo 5). El volumen de AgNO_3 consumido se utilizó para calcular la concentración de cianuro libre en la muestra, según la relación:

1 mL de gasto de titulación de $\text{AgNO}_3 = 20$ ppm de CN^-

g) Finalmente, se determinó la eficiencia de degradación de cianuro (Razanamahandry et al., 2020), utilizando la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{C_i - C_r}{C_i} * 100 \quad [32]$$

Donde C_i es la concentración inicial de cianuro y C_r es la concentración residual después del tratamiento fotocatalítico.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en cada una de las etapas indicadas previamente.

4.1. Etapa I, Síntesis biogénica de nanopartículas de ZnO

4.1.1. Identificación y caracterización molecular de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana utilizada en este estudio para la biosíntesis de nanopartículas de ZnO fue sometida a un análisis molecular para su identificación precisa. La secuenciación del gen 16S rRNA de la cepa resultó en un fragmento de 1 538 pares de bases. Este fragmento fue analizado utilizando la herramienta de alineación BLASTn y comparado con la base de datos del NCBI GenBank (Tabla 1).

Tabla 1

Comparación de los resultados del análisis BLAST del ARN16S

Identidad	Max score	Número de pares de bases	Cobertura	Identidad	Código ID de acceso
		(pb)	(%)	(%)	Nº
<i>Bacillus subtilis</i>	2 841	2 841	100	100,00 %	OL636042,1
<i>Bacillus subtilis</i>	2 841	2 841	100	100,00 %	KR967391,1
<i>Bacillus subtilis</i>	2 841	2 841	100	100,00 %	EU047884,1
<i>Bacillus subtilis</i>	2 841	4 175 806	100	100,00 %	CP025941,1

Los resultados del análisis BLASTn revelaron un 100 % de identidad con cuatro secuencias previamente reportadas de *Bacillus subtilis*. Estas secuencias están registradas en el GenBank con los siguientes números de identificación: OL636042,1, KR967391,1, EU047884,1 y CP 025941,1. Esta alta similitud confirma que la cepa utilizada en el presente estudio pertenece a la especie *Bacillus subtilis*.

La secuencia completa del gen 16S rRNA obtenida de la cepa se presenta a continuación:

>OR505001,1 *Bacillus subtilis* strain TT10s 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC
AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGG
TGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCG
TTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG
CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGG
ACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAG
CCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGC
GTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCC
GAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGAT

GATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGAT
CACCT

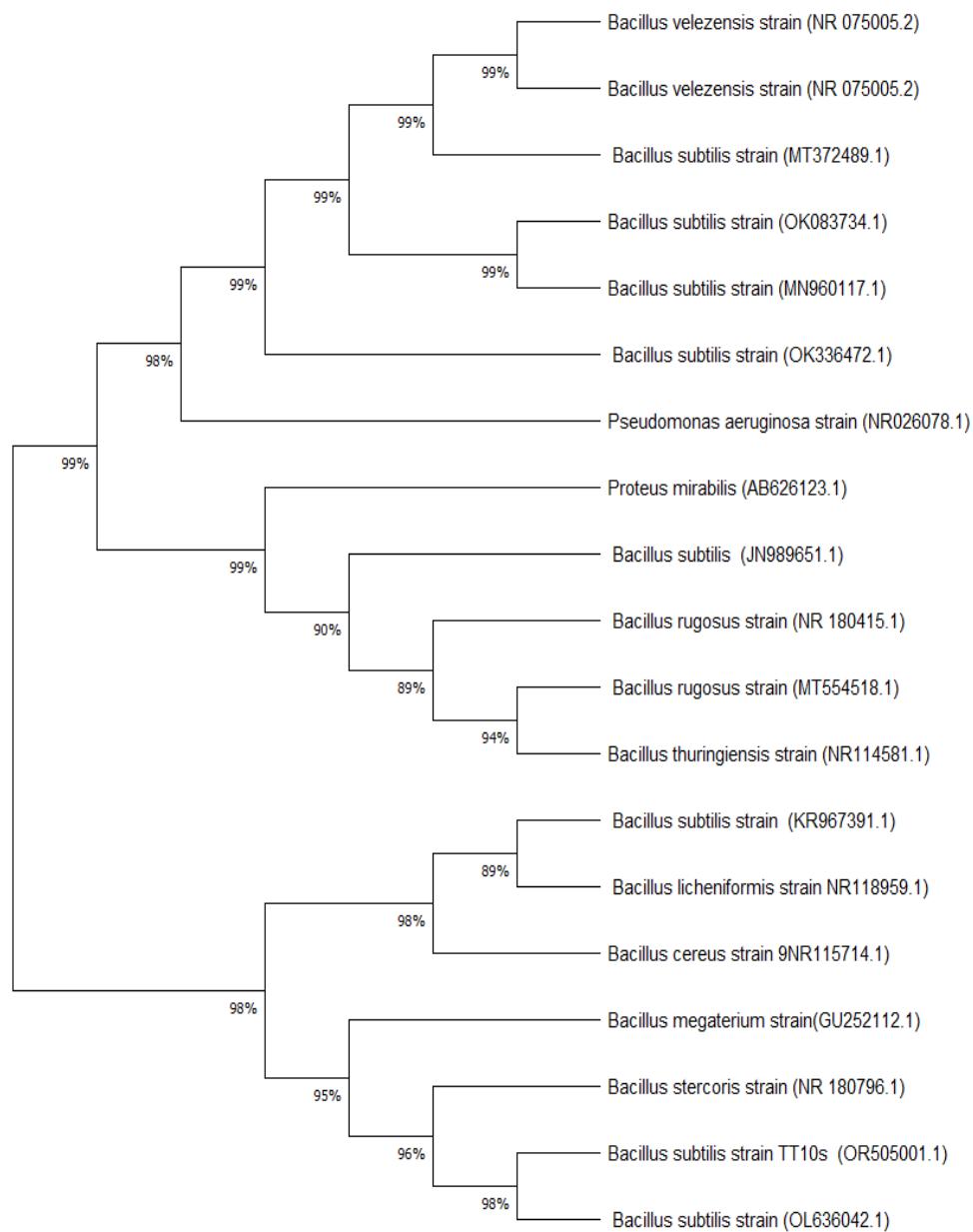
Para corroborar la identificación y establecer las relaciones filogenéticas de la cepa, se realizó un análisis filogenético utilizando el algoritmo de Máxima Verosimilitud (Figura 2). Este análisis confirmó la ubicación de la cepa dentro del clado de *Bacillus subtilis*, específicamente relacionada con la secuencia de ID: OL636042,1.

Como resultado de este estudio, la secuencia del gen 16S rRNA de la cepa ha sido depositada en la base de datos de secuencias genéticas denominada “GenBank” del centro nacional para la información biotecnológica de Estados Unidos y se le ha asignado el número de acceso OR505001,1. Esta secuencia ahora está disponible para futuros estudios comparativos y análisis filogenéticos.

La identificación precisa de la cepa como *Bacillus subtilis* es de gran importancia para el estudio, ya que proporciona un contexto biológico específico para la biosíntesis de nanopartículas de ZnO.

Figura 2

Árbol filogenético del Bacillus subtilis.



El *B. subtilis* es conocido por su versatilidad metabólica y su capacidad para producir una variedad de enzimas y metabolitos secundarios, lo que podría influir en el proceso de biosíntesis y en las características finales de las nanopartículas obtenidas.

Esta caracterización molecular no solo valida la identidad de nuestra cepa bacteriana, sino que también establece una base sólida para la reproducibilidad de nuestros experimentos y facilita la comparación con otros estudios que utilizan *B. subtilis* para la biosíntesis de nanopartículas.

4.1.2. Procedimiento de biosíntesis de nanopartículas de ZnO

El proceso de biosíntesis de nanopartículas de ZnO utilizando *Bacillus subtilis* se llevó a cabo en varias etapas (Sección 3.1), partiendo de la reactivación y masificación del *Bacillus subtilis* y posteriormente de la síntesis a la cristalización, tal como se detalla a continuación:

a) Reactivación:

La cepa bacteriana de *B. subtilis* se reactivó inicialmente en caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una siembra en superficie en agar nutritivo (AN) e incubó a 35 °C por 24 horas adicionales. Esta etapa permitió obtener colonias frescas y viables para su caracterización macroscópica y microscópica, según se visualiza en la Figura 3. Las colonias presentaron un aspecto liso, plano, seco, de borde rugoso y ondulado, características típicas de *B. subtilis*. La tinción de Gram confirmó que se trataba de bacilos Gram positivos con bordes redondeados y esporulados (Figura 4a).

Figura 3

Visualización macroscópica y microscópica de Bacillus subtilis

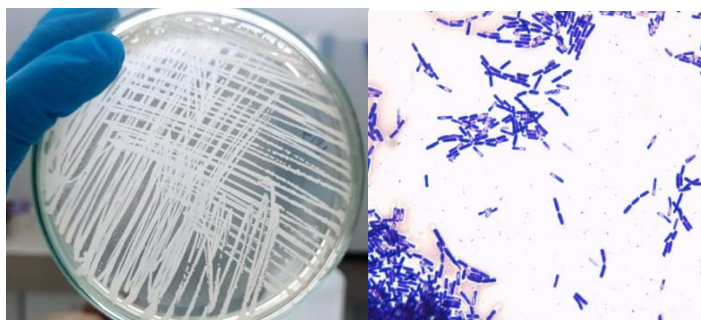
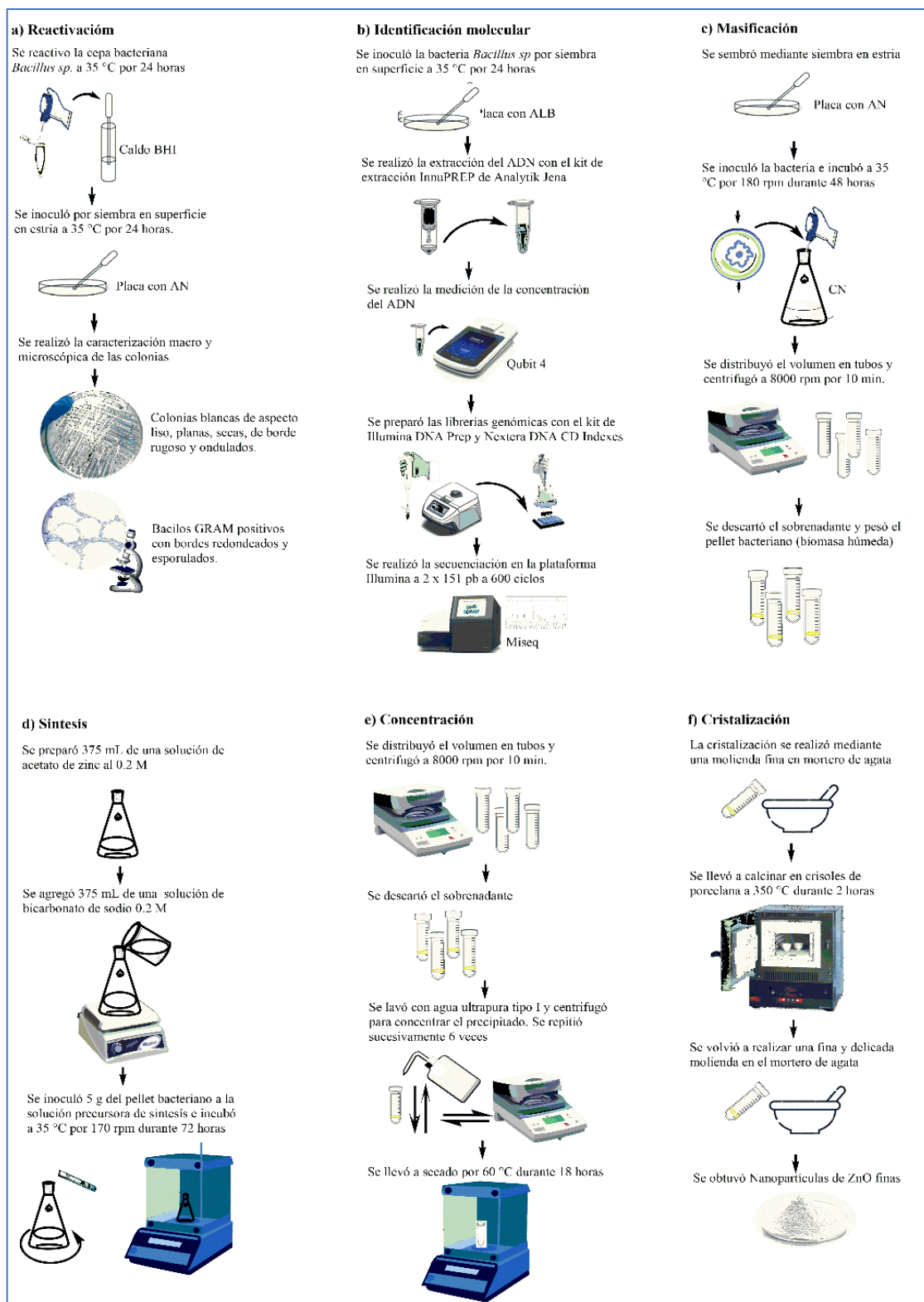


Figura 4

Etapas de la biosíntesis del ZnO



b) Identificación molecular:

Se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el kit InnuPREP de Analytik Jena. La concentración y calidad del ADN extraído se midieron utilizando un fluorómetro Qubit 4. Posteriormente, se prepararon las librerías genómicas y se llevó a cabo la secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq, realizando 600 ciclos para obtener lecturas pareadas de 2 x 151 pb (Figura 4b).

c) Masificación:

La bacteria se cultivó en caldo nutritivo (CN) a 35 °C y 180 rpm durante 48 horas para obtener una biomasa suficiente. El cultivo se centrifugó a 8 000 rpm por 10 minutos para obtener el pellet bacteriano, descartando el sobrenadante.

d) Síntesis:

Se preparó una solución precursora mezclando 375 mL de acetato de zinc 0,2 M con 375 mL de bicarbonato de sodio 0,5 M. A esta solución se le añadieron 5 gramos del pellet bacteriano obtenido en la etapa anterior. La mezcla se incubó a 35 °C y 170 rpm durante 72 horas, permitiendo que las bacterias interactuaran con los precursores para formar las nanopartículas de ZnO (Figura 4c).

e) Concentración:

Tras la incubación, la solución se centrifugó a 8 000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se lavó repetidamente con agua ultrapura estéril, realizando 6 ciclos de lavado y centrifugación para eliminar impurezas y metabolitos residuales (Figura 4d).

f) Cristalización:

El precipitado lavado se secó a 60 °C durante 18 horas. Posteriormente, se realizó una molienda fina en un mortero de ágata y se calcinó a 350 °C durante 2 horas en un crisol de porcelana (Figura 4e-f). Finalmente, se efectuó una segunda molienda fina para desaglomerar las nanopartículas de ZnO formadas (Figura 5).

Figura 5

Nanopartículas de ZnO biosintetizadas por Bacillus subtilis.

**4.2.Etapa II. Caracterización de las muestras**

La caracterización de las nanopartículas ZnO biosintetizadas fueron sometidas a diversas técnicas analíticas avanzadas con el fin de estudiar propiedades ópticas, estructurales y morfológicas. Este enfoque multifacético permite una comprensión profunda de las propiedades físicas, químicas y estructurales del material en diferentes etapas de su síntesis y procesamiento. Inicialmente, las muestras biosintetizadas se someten a análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) para investigar su comportamiento térmico y los procesos de transformación antes de la calcinación. La difracción de rayos X (DRX) se emplea tanto en las muestras pre-calcinadas como en las post-calcinadas, revelando la evolución de la estructura cristalina y la formación de fases. La espectroscopía UV-visible proporciona información sobre las propiedades ópticas y la banda prohibida del material, mientras que la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) identifica los grupos funcionales presentes en la superficie de las nanopartículas. El análisis de área superficial BET cuantifica la superficie específica del material, un parámetro crucial para aplicaciones catalíticas. Finalmente, la microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) ofrecen una visión detallada de la morfología, tamaño y distribución de las nanopartículas.

4.2.1. Difracción de rayos X de las muestras antes de calcinar

El patrón de difracción de rayos X presentado revela una composición compleja de la muestra sintetizada mediante el método biogénico utilizando *Bacillus sp.* El análisis de este difractograma mostrado en la Figura 6, proporciona información valiosa sobre las fases cristalinas presentes en el material antes del tratamiento térmico final, lo que ofrece perspectivas significativas sobre el mecanismo de formación de las nanopartículas de ZnO.

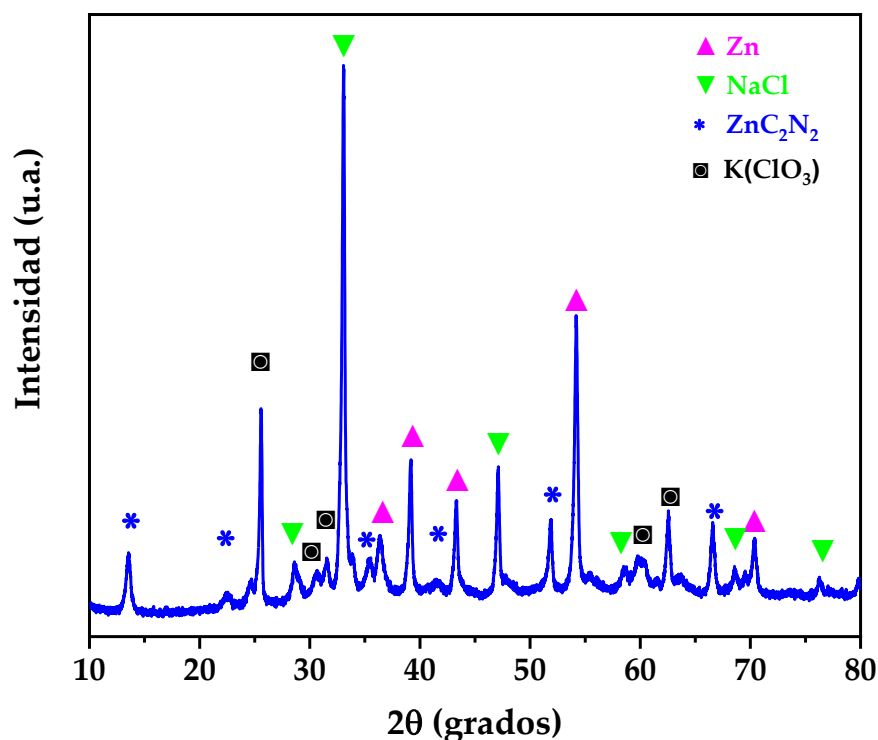
Los resultados muestran la presencia de múltiples fases cristalinas, incluyendo Zn metálico, NaCl, ZnC_2N_2 y $K(ClO_3)$, lo cual indica una serie de reacciones intermedias y subproductos formados durante el proceso de biosíntesis. El pico más intenso observado en el patrón corresponde al NaCl, lo que sugiere una concentración significativa de este compuesto en la muestra. La formación de NaCl puede atribuirse a la interacción entre los iones de sodio provenientes del bicarbonato de sodio utilizado como precursor y los iones cloruro presentes en el medio de cultivo o generados durante el metabolismo bacteriano.

La detección de Zn metálico es particularmente interesante, ya que indica una reducción parcial de los iones Zn^{2+} durante el proceso de biosíntesis. Este fenómeno podría atribuirse a la actividad reductora de ciertas enzimas o metabolitos producidos por *Bacillus sp.*, destacando el papel crucial de la bacteria en la transformación de los precursores. La presencia de Zn metálico también sugiere que el proceso de oxidación para formar ZnO no se ha completado totalmente en esta etapa de la síntesis.

La identificación de ZnC_2N_2 en el patrón de difracción es un hallazgo notable que evidencia la formación de complejos organometálicos intermedios durante la biosíntesis. Este compuesto podría resultar de la interacción entre los iones Zn^{2+} y moléculas orgánicas nitrogenadas producidas por la bacteria o presentes en el medio de cultivo. La presencia de ZnC_2N_2 sugiere un mecanismo de formación de ZnO que involucra intermediarios organometálicos, lo cual es consistente con la naturaleza biogénica del proceso de síntesis.

Figura 6

Patrón de difracción de la muestra biosintetizada



La detección de $K(ClO_3)$ en la muestra es inesperada y podría ser el resultado de reacciones secundarias entre componentes del medio de cultivo o impurezas introducidas durante el proceso de síntesis. La presencia de este compuesto subraya la complejidad de las interacciones químicas que ocurren en el entorno biológico durante la formación de las nanopartículas.

La coexistencia de estas múltiples fases cristalinas en la muestra antes del tratamiento térmico final ofrece una visión única del proceso de biosíntesis de nanopartículas de ZnO. Este análisis sugiere que la formación de ZnO puro requiere un proceso de calcinación posterior para eliminar las fases intermedias y promover la cristalización completa del óxido de zinc. La transformación térmica de estas fases precursoras, especialmente ZnC_2N_2 y Zn metálico, en ZnO cristalino, probablemente ocurre durante el tratamiento térmico subsiguiente.

Este patrón de difracción complejo subraya la importancia de comprender y controlar las condiciones de síntesis biogénica para optimizar la formación de

nanopartículas de ZnO puras. La presencia de fases intermedias y subproductos puede influir en las propiedades finales del material, incluyendo su morfología, tamaño de partícula y actividad fotocatalítica. Futuros estudios podrían enfocarse en modificar las condiciones de síntesis o en implementar procesos de purificación adicionales para minimizar la formación de fases no deseadas y mejorar la pureza del ZnO final.

4.2.2. Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

El perfil de pérdida de peso (TGA) revela un proceso de transformación en varias etapas (Figura 7, línea roja). Inicialmente, en el rango de 25 a 200 °C, se observa una pérdida gradual de peso de aproximadamente 2 %, atribuible a la eliminación de agua adsorbida y residuos orgánicos provenientes del medio de cultivo utilizado para el crecimiento bacteriano. Esta pérdida inicial es común en materiales sintetizados biológicamente y refleja la presencia de biomoléculas asociadas a la superficie de las nanopartículas (Lakshmi et al., 2024). La primera pérdida significativa de peso ocurre entre 200 y 250 °C, con una caída abrupta de alrededor del 10 %, debido a la descomposición de compuestos orgánicos residuales y biomoléculas de la bacteria. Esta etapa es crítica, ya que marca el inicio de la transformación de los precursores en la fase cristalina deseada de ZnO.

La segunda pérdida significativa de peso, observada entre 250 y 350 °C, representa una caída adicional de aproximadamente 15 %. Esta etapa puede asociarse con la descomposición de precursores no reaccionados y la transformación de fases intermedias como ZnC_2N_2 , identificada en análisis previos de la muestra. Finalmente, la curva de TGA se estabiliza en el rango de 350 a 500°C, indicando la formación completa de ZnO cristalino y la eliminación de la mayoría de los componentes orgánicos e impurezas.

El análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC), representado por la línea roja en el gráfico, complementa la información obtenida del TGA (Figura 7, línea azul), revelando los procesos térmicos críticos durante la transformación del material. En la Figura 7, muestra valores negativos del flujo de calor que corresponden a reacciones exotérmicas, mientras que los valores positivos indican reacciones endotérmicas.

Inicialmente, se observa un pico exotérmico amplio entre 50 °C y aproximadamente 200 °C, evidenciado por el flujo de calor negativo. Este evento exotérmico corresponde a la descomposición de compuestos orgánicos volátiles y la liberación de agua adsorbida, coincidiendo con la pérdida de peso gradual detectada en la curva TGA en el mismo rango de temperatura. La naturaleza exotérmica de este proceso sugiere que la eliminación de estas sustancias implica reacciones que liberan energía, posiblemente debido a la descomposición de biomoléculas producidas por *Bacillus subtilis*. durante la síntesis.

A continuación, se distingue un pico endotérmico prominente alrededor de 230 °C, caracterizado por un marcado ascenso en la curva de flujo de calor. Este evento endotérmico es particularmente significativo, ya que indica la absorción de energía asociada a la transformación de fases y el inicio de la cristalización de ZnO. Este punto marca una transición crítica en la formación de la estructura cristalina del óxido de zinc y es fundamental para comprender la cinética de cristalización en el proceso biogénico. La magnitud de este pico sugiere una transformación sustancial que requiere una entrada significativa de energía.

Un segundo pico endotérmico menor se observa alrededor de 320 °C, también evidenciado por un ascenso en la curva de flujo de calor, aunque menos pronunciado que el anterior. Este evento puede atribuirse a la continuación del proceso de cristalización y a la transformación final de fases intermedias en ZnO cristalino. La naturaleza endotérmica de este proceso indica la absorción de energía durante esta transformación final, sugiriendo un proceso de cristalización en dos etapas, donde las fases intermedias, posiblemente incluyendo ZnC_2N_2 , se transforman en la estructura hexagonal zincita del ZnO.

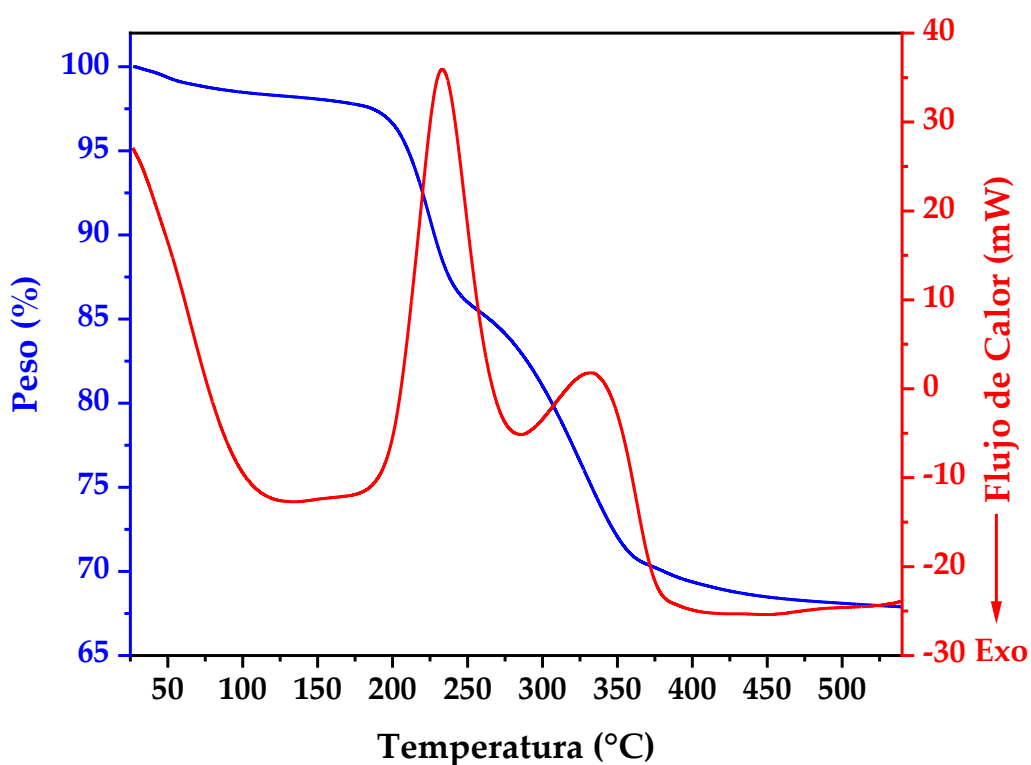
Es notable que estos eventos endotérmicos coinciden con las pérdidas de peso más significativas observadas en la curva TGA, lo que corrobora la relación entre la pérdida de masa y los procesos de transformación estructural que requieren energía.

La presencia previa de fases como Zn, NaCl, ZnC_2N_2 , y $\text{K}(\text{ClO}_3)$, identificadas en análisis anteriores, explica la complejidad de los procesos térmicos observados. El

proceso de calcinación, evidenciado por estos eventos térmicos, elimina estas fases intermedias, resultando en la formación de nanopartículas de ZnO puras.

Figura 7

Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido del ZnO preparado sin calcinar



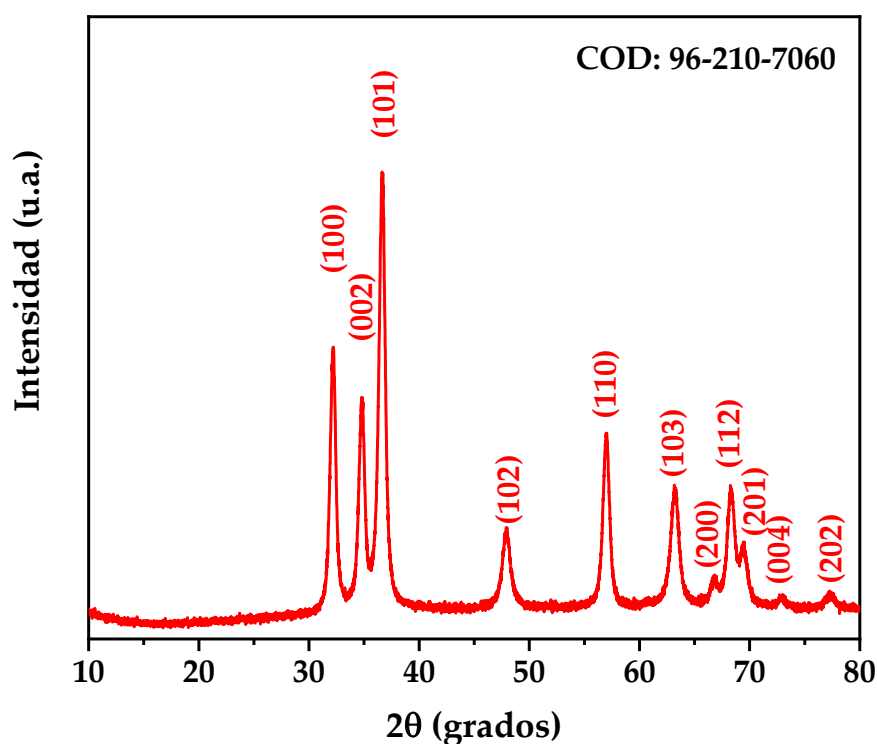
4.2.3. Análisis por difracción de rayos X de la muestra después de calcinar

El patrón de difracción de rayos X presentado en la Figura 8, corresponde a la muestra de nanopartículas de ZnO obtenidas tras el proceso de calcinación a 350 °C de la muestra previamente analizada. Este difractograma revela una transformación significativa en la estructura cristalina del material, evidenciando la formación exitosa de ZnO en su fase zincita.

Los picos de difracción observados en el patrón son característicos de la estructura cristalina del ZnO en fase zincita, lo cual se confirma por la correspondencia con la tarjeta cristalográfica COD: 96-210-7060 indicada en la imagen. Los planos cristalográficos principales están claramente identificados y etiquetados en el difractograma, incluyendo los picos más intensos correspondientes a los planos (100), (002), y (101), que son típicos de la estructura hexagonal del ZnO.

Figura 8

Difractograma de la muestra sintetizada de ZnO calcinada



El refinamiento Rietveld proporciona información detallada sobre la estructura cristalina del ZnO sintetizado. Los resultados mostrados en la Tabla 1, confirman la estructura hexagonal con grupo espacial P63mc (número de grupo espacial 186), característico de la fase zincita. Los parámetros de red refinados, $a = b = 3,251\ 68\ \text{nm}$ y $c = 5,213\ 87\ \text{nm}$, con ángulos $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$, son consistentes con los valores esperados para ZnO de alta pureza. La densidad calculada de $5,65\ \text{g/cm}^3$ está en excelente acuerdo con el valor teórico para ZnO cristalino.

La presencia de picos bien definidos y estrechos sugiere una alta cristalinidad del material obtenido, lo cual se corrobora con el tamaño de cristalito calculado de 14,18 nm. Este tamaño nanométrico es ideal para aplicaciones fotocatalíticas, ya que proporciona una alta relación superficie-volumen. La intensidad relativa de los picos, particularmente la prominencia del pico (101), es consistente con la formación de ZnO cristalino de alta pureza.

El estrés residual extremadamente bajo (0,004 %) indica que las nanopartículas están bien formadas y prácticamente libres de tensiones internas, lo cual es beneficioso para la estabilidad y el rendimiento del material en diversas aplicaciones.

Tabla 2

Parámetros estructurales del ZnO biosintetizado

Parámetros estructurales	Muestra
	ZnO
Estructura cristalina	Hexagonal
Grupo espacial	P 63 m c
Numero de grupo espacial	186
$a=b$ (nm)	3,251 68
c (nm)	5,213 87
$\alpha=\beta$ (°)	90
γ (°)	120
ρ ($\gamma/\chi\mu^3$)	5,65
D (nm)	14,18
Estrés residual (%)	0,004
R_{exp} (%)	5,090 92
R_p (%)	2,821 54
R_{wp} (%)	3,861 43
GOF	0,758 49

La ausencia de picos correspondientes a Zn metálico, NaCl, ZnC_2N_2 , y $K(ClO_3)$ que se observaron en la muestra antes de la calcinación, demuestra que el tratamiento térmico a 350 °C ha sido eficaz para descomponer y eliminar estas fases intermedias y subproductos. Esto confirma la transformación completa de los precursores y compuestos intermedios en ZnO puro.

Los parámetros de ajuste del refinamiento Rietveld ($R_{exp} = 5,090\ 92\ \%$, $R_p = 2,821\ 54\ \%$, $R_{wp} = 3,861\ 43\ \%$) y el factor de bondad ($GOF = 0,758\ 49$) demuestran un excelente ajuste entre el patrón de difracción observado y el modelo teórico. El valor de GOF menor que 1 indica que el modelo propuesto describe muy bien la estructura cristalina real de la muestra, con un nivel de precisión incluso superior al esperado, considerando las incertidumbres experimentales.

4.2.4. Análisis por espectroscopía UV Visible

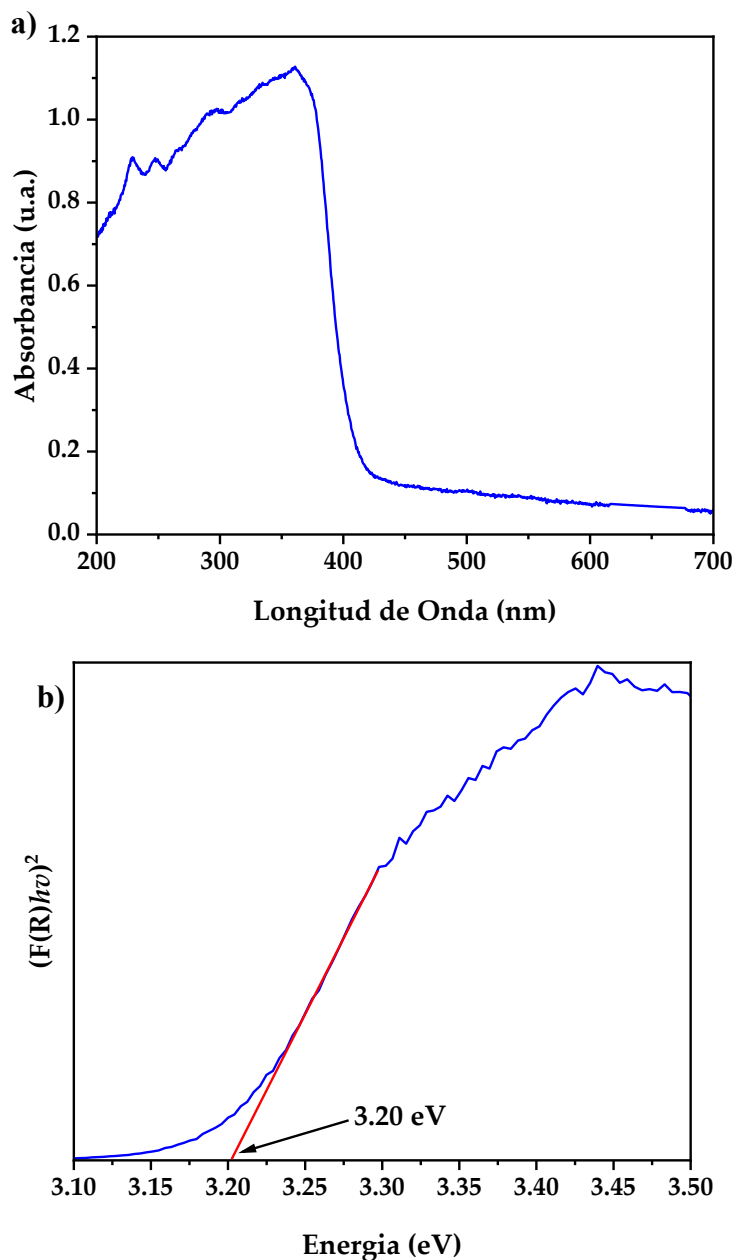
El análisis del espectro de absorción UV-visible y la aplicación de la ecuación de Kubelka-Munk proporcionan información valiosa sobre las propiedades ópticas de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas. La Figura 9 muestra el espectro de absorción UV-visible y el gráfico de Tauc derivado de la función de Kubelka-Munk.

El espectro de absorción UV-visible (gráfico superior) muestra una fuerte absorción en la región ultravioleta, con un borde de absorción pronunciado alrededor de los 380 - 400 nm típica de ZnO.

La aplicación de la función de Kubelka-Munk y la representación de Tauc (gráfico inferior) permiten una determinación más precisa de la energía de banda prohibida (bandgap) del material. La ecuación de Kubelka-Munk se expresa como $F(R) = (1-R)^2/(2R)$, donde R es la reflectancia difusa (Wachs y Bañares, 2023). En el gráfico de Tauc, se representa $(F(R)h\nu)^2$ frente a la energía del fotón ($h\nu$), donde el exponente 2 se utiliza para transiciones directas permitidas, como es el caso del ZnO.

Figura 9

a) Espectro UV-visible del ZnO y b) Función de Kubelka-Munk



La extrapolación de la parte lineal de la curva de Tauc hasta el eje de energía proporciona el valor de la energía de banda prohibida. En este caso, se observa un valor de 3,20 eV, como se observa en la figura 9.

La forma pronunciada del borde de absorción y la claridad de la transición en el gráfico de Tauc indican una distribución estrecha de tamaños de partícula y una alta pureza del material. Esto es consistente con la eficacia del método de biosíntesis y el posterior tratamiento térmico para producir nanopartículas de ZnO bien cristalizadas y homogéneas.

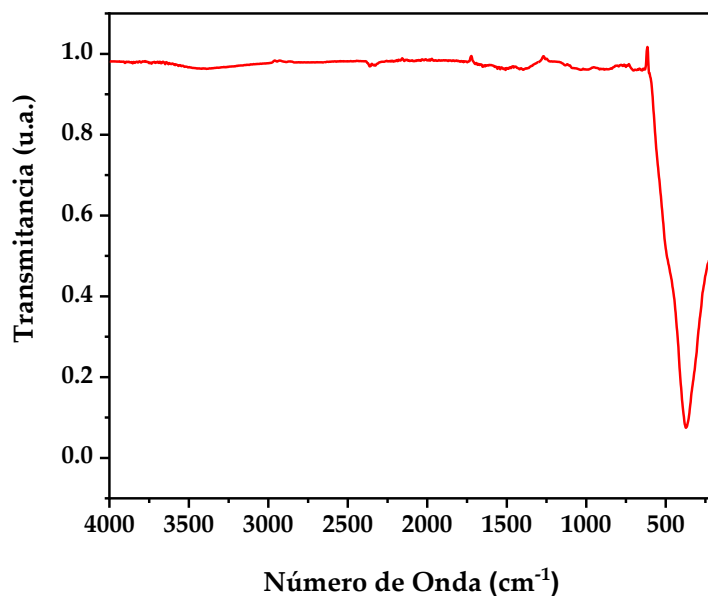
El valor obtenido de la energía de banda prohibida es crucial para predecir y entender las propiedades fotocatalíticas del material. Un bandgap de 3,20 eV corresponde a una longitud de onda de absorción de aproximadamente 388 nm, lo que sitúa la activación del material en la región del ultravioleta cercano, favorable para aplicaciones fotocatalíticas.

4.2.5. Análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 10, corresponde al espectro de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) del ZnO calcinado. Este espectro muestra una serie de bandas características que confirman la formación del óxido de zinc en la estructura zincita. La región comprendida entre 400 y 700 cm^{-1} presenta una fuerte absorción atribuida a las vibraciones de estiramiento Zn-O, lo cual es indicativo de la presencia del ZnO en la fase esperada. En el espectro, se observa una notable banda alrededor de 430 cm^{-1} , la cual se asocia típicamente con las vibraciones de la red cristalina del ZnO, corroborando su estructura zincita. Adicionalmente, la ausencia de bandas significativas en la región superior a 1000 cm^{-1} sugiere que no hay impurezas orgánicas residuales, lo que indica una purificación efectiva durante el proceso de calcinación.

Figura 10

Espectro FTIR de la muestra de ZnO biosintetizada



4.2.6. Análisis de área superficial por el método BET

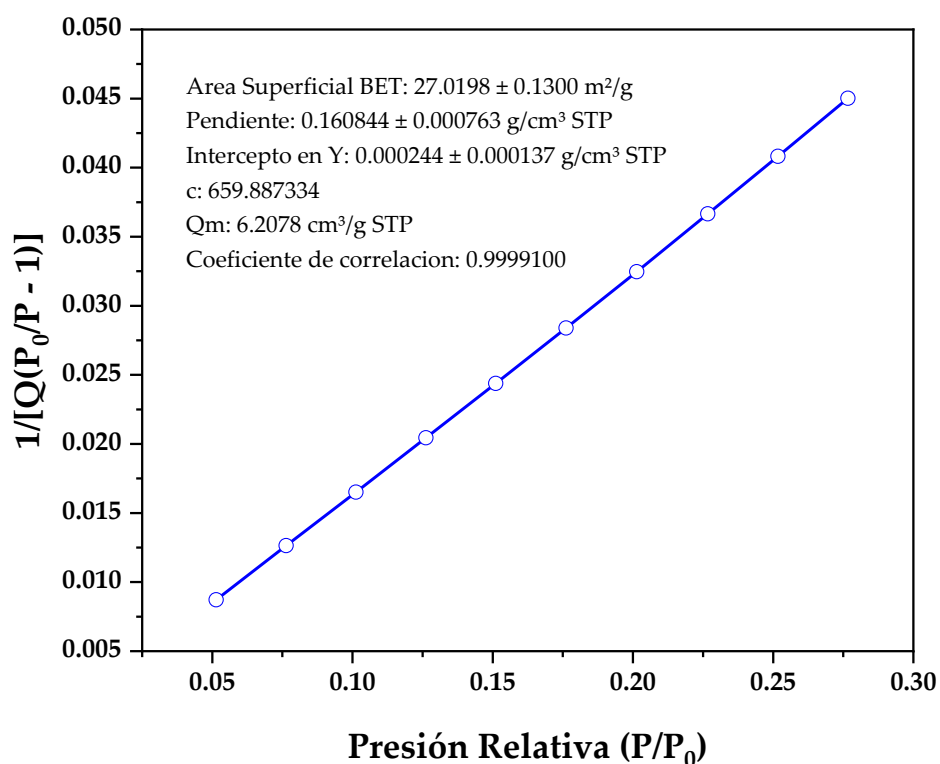
La caracterización de las propiedades texturales de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas se llevó a cabo mediante análisis de fisisorción de nitrógeno utilizando un equipo Gemini VII 2390t. La muestra, con una masa de 0,183 5 g, fue sometida a un proceso de desgasificación previo al análisis para eliminar contaminantes superficiales. Las mediciones se realizaron a una temperatura de 77 °K, utilizando nitrógeno como adsorbato.

El análisis BET (Brunauer-Emmett-Teller) mostrado en la Figura 11, reveló un área superficial específica de $27,019\ 8 \pm 0,130\ 0\ \text{m}^2/\text{g}$ para las nanopartículas de ZnO. Este valor indica una superficie relativamente alta, característica de materiales nanoestructurados, lo cual es favorable para aplicaciones fotocatalíticas donde una mayor área superficial generalmente se traduce en una mayor actividad catalítica.

El factor C de BET, con un valor de 659,887 334, indica una fuerte interacción entre el adsorbato (N₂) y la superficie del ZnO, lo cual es característico de superficies polares como las de los óxidos metálicos.

Figura 11

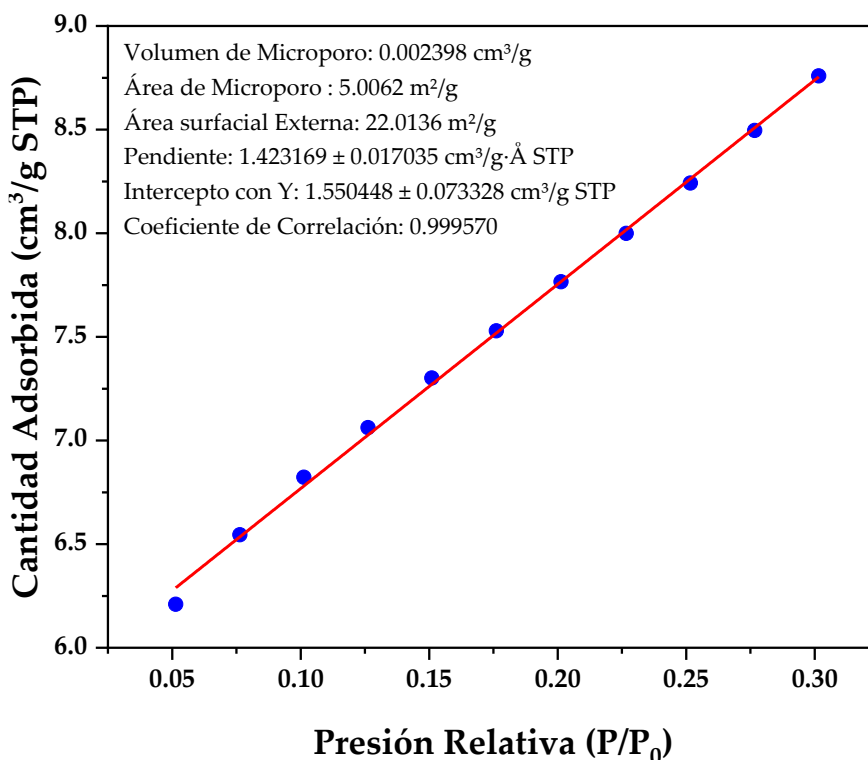
Gráfica de área de superficie BET



El análisis t-Plot (Figura 12) proporciona información adicional sobre la microporosidad del material, revelando un área de microporos de $5,006.2 \text{ m}^2/\text{g}$ y un volumen de microporos de $0,002.398 \text{ cm}^3/\text{g}$. La superficie externa, calculada por diferencia entre el área BET total y el área de microporos, resultó ser $22,013.6 \text{ m}^2/\text{g}$, indicando que la mayor parte de la superficie accesible corresponde a mesoporos y macroporos.

Figura 12

Gráfica de área de superficie BET

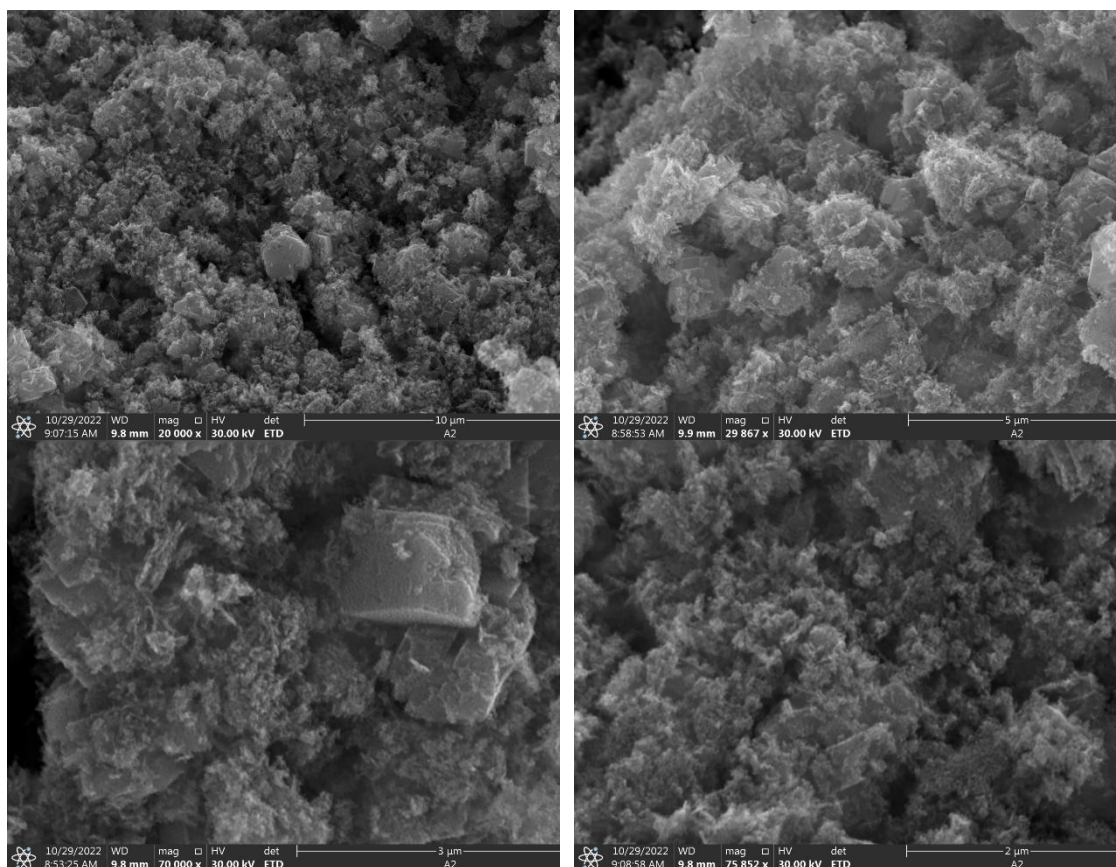


4.2.7. Microscopia Electrónica de Barrido

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido revelan información crucial sobre la morfología y el estado de agregación de las nanopartículas de ZnO sintetizadas. La Figura 13, muestra las microfotografías de la muestra de ZnO biosintetizada a diferentes magnificaciones, se observa que las nanopartículas presentan una morfología irregular, lo cual es común en materiales biosintetizados debido a la influencia de los procesos biológicos en la formación de las partículas. Un aspecto notable es la tendencia de las nanopartículas a formar aglomerados. Estos aglomerados, también de forma irregular, están compuestos por partículas primarias de menor tamaño. La presencia de aglomerados puede influir significativamente en las propiedades del material, afectando, por ejemplo, el área superficial efectiva disponible para reacciones catalíticas.

Figura 13

Microfotografías de Microscopía electrónica de barrido a distintas magnificaciones



4.2.8. Microscopía Electrónica de Transmisión

Los resultados de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostrados en la Figura 14, proporcionan información detallada sobre la estructura a escala nanométrica de las partículas de ZnO en fase zincita biosintetizadas. Las imágenes de baja resolución (Figura 14a), revelan nanopartículas predominantemente cuasi-esféricas con cierta irregularidad en sus contornos y en algunos casos alargadas, estas características son típicas de materiales biosintetizados. El análisis de distribución de tamaño de partícula (Figura 14b), muestra un tamaño promedio de 21,87 nm con una desviación estándar de 5,84 nm, indicando una población homogénea de nanopartículas con una distribución

relativamente estrecha. Esta uniformidad sugiere un buen control del proceso de biosíntesis sobre el crecimiento de las nanopartículas.

La imagen de alta resolución (HRTEM) (Figura 14c), permite observar los planos cristalinos de las nanopartículas de ZnO en fase zincita. Las franjas de red visibles confirman la naturaleza cristalina del material, con una distancia interplanar medida de 2,8 Å, correspondiente al plano (100) de la estructura hexagonal del ZnO. Esta medición concuerda con el valor de $d = 2,785$ Å listado en los datos de difracción para el plano (100), validando la precisión de la medición TEM y confirmando la identidad cristalográfica del material como ZnO en fase zincita.

El patrón de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) (Figura 14d), exhibe anillos concéntricos bien definidos, característicos de un material policristalino. La indexación de estos anillos coincide con los planos cristalográficos esperados para la fase zincita del ZnO. Los anillos más prominentes corresponden a las distancias interplanares de 2,807 65 Å (100); 2,594 00 Å (002); 2,469 25 Å (101); 1,905 30 Å (102); 1,621 00 Å (110), y 1,472 44 Å (103). Estos valores concuerdan perfectamente con los datos de difracción proporcionados y confirman inequívocamente la estructura hexagonal del ZnO.

La estructura cristalina hexagonal del ZnO zincita puede ser descrita matemáticamente utilizando la ecuación para estructuras hexagonales:

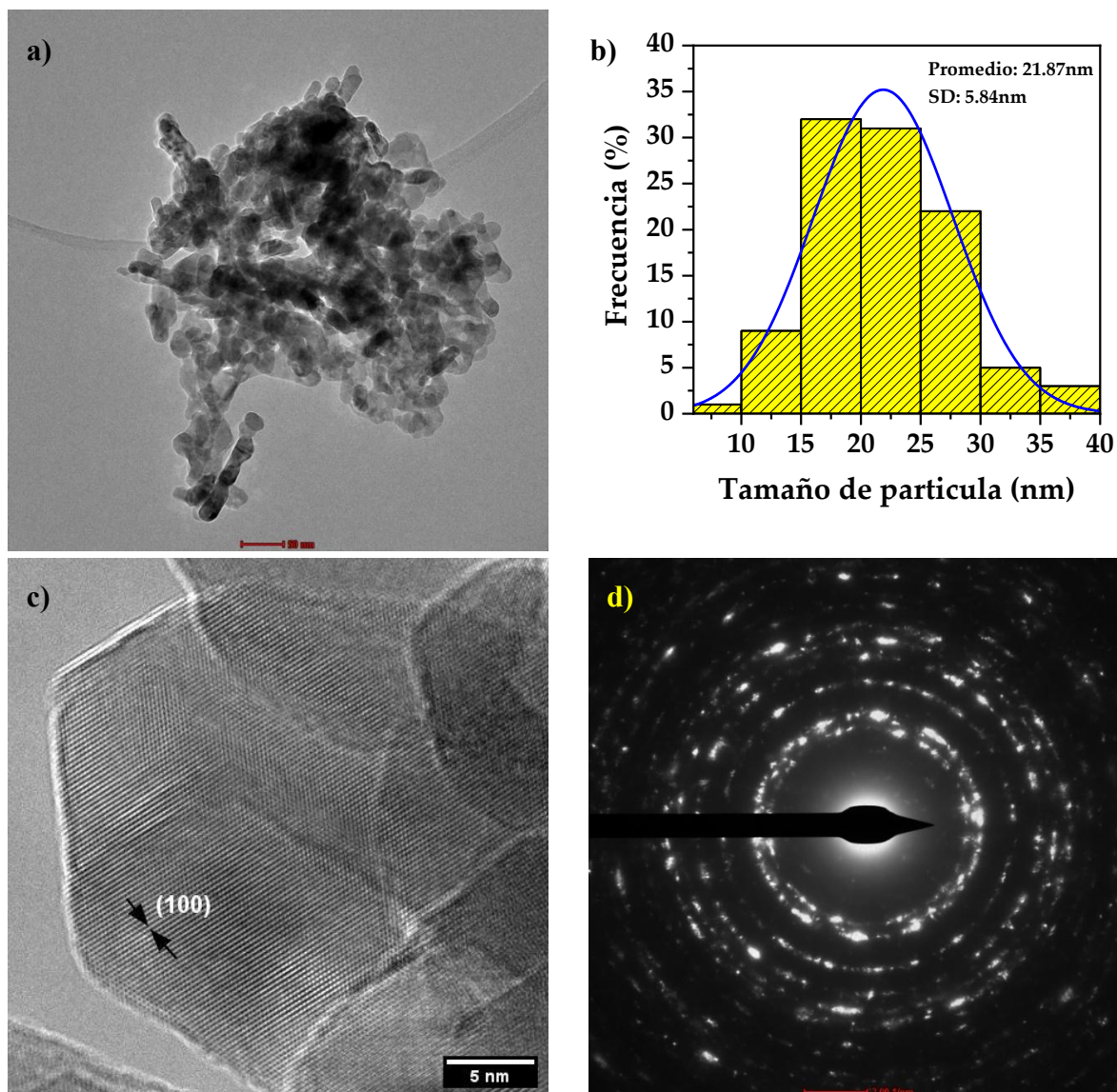
$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) + \frac{l^2}{c^2} \quad [33]$$

Donde h , k , y l son los índices de Miller, y a y c son los parámetros de red. Utilizando los valores estándar para ZnO ($a = 3,251$ 68 Å y $c = 5,213$ 87 Å), se pueden verificar las distancias interplanares observadas, corroborando la precisión de las mediciones y la identidad cristalográfica del material.

La concordancia entre las distancias interplanares medidas en la imagen HRTEM, los anillos observados en el patrón SAED, y los datos de difracción proporcionados, ofrece una confirmación robusta de la estructura cristalina hexagonal ZnO biosintetizado.

Figura 14

a) Microfotografías de Microscopía electrónica de transmisión, b) distribución de tamaño de partícula, c) imagen HRTEM y d) Patrón de difracción de electrones (SAED)



El tamaño nanométrico promedio de 21,87 nm de las partículas de ZnO zincita está en el rango óptimo para aplicaciones fotocatalíticas, ofreciendo una alta relación superficie-volumen. La cristalinidad observada en las imágenes HRTEM y confirmada por SAED sugiere una estructura bien ordenada, crucial para las propiedades electrónicas y ópticas del material en aplicaciones fotocatalíticas.

4.3. Etapa III, evaluación del ZnO biosintetizado en la degradación del cianuro

Los ensayos fotocatalíticos realizados con las nanopartículas de ZnO biosintetizadas demostraron una significativa eficacia en la degradación de cianuro bajo irradiación UV a 254 nm. Se evaluaron dos concentraciones de catalizador (0,5 g/L y 1 g/L) frente a cinco concentraciones iniciales de cianuro (100, 200, 300, 400 y 500 ppm), tal como se aprecia en la Figura 15, revelando patrones en la cinética de degradación y la eficiencia del proceso.

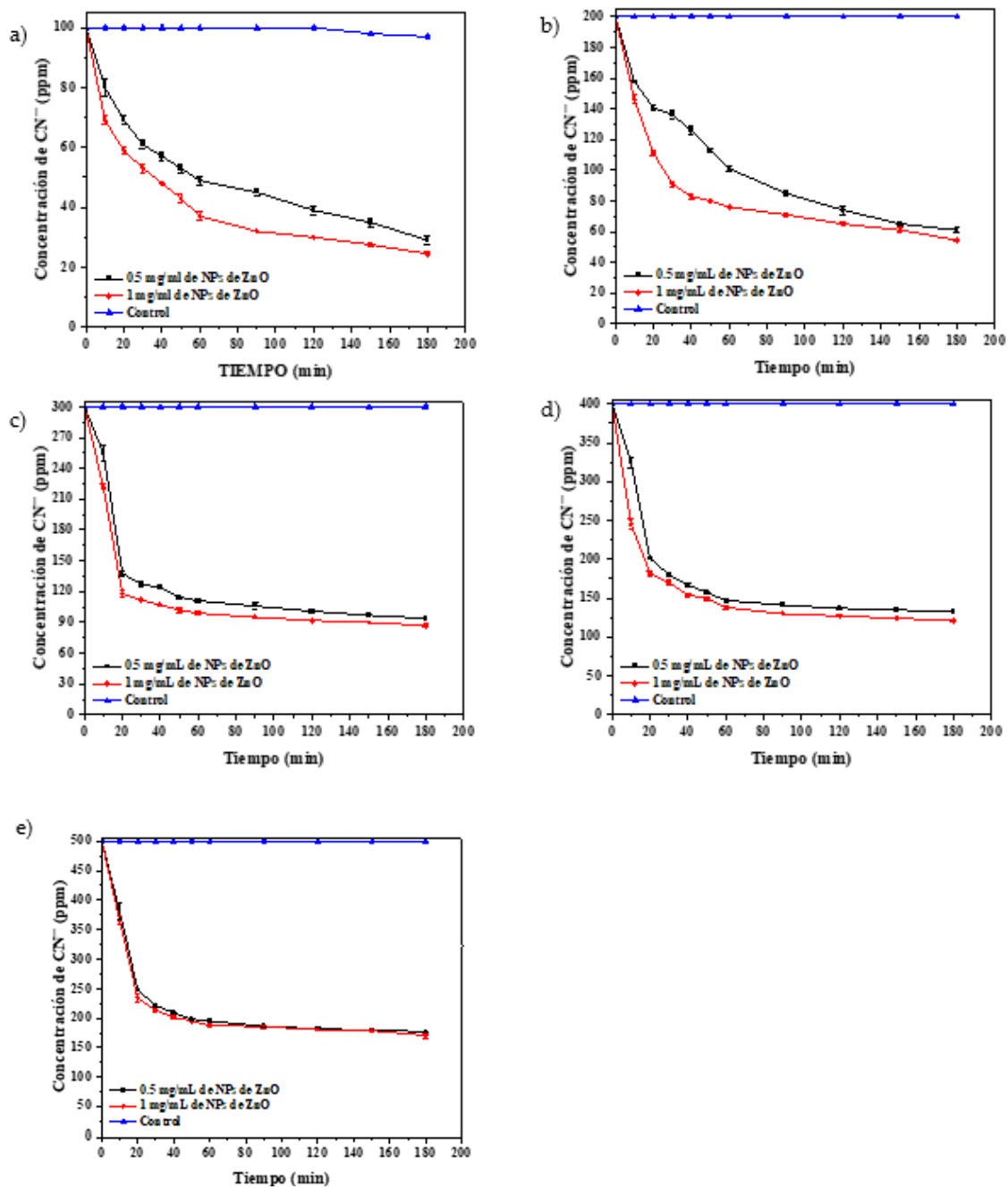
Para la concentración inicial de 100 ppm de cianuro, se observó una rápida disminución en los primeros 60 minutos, seguida de una degradación más gradual. Con 0,5 g/L de ZnO, se logró una degradación del 71 % después de 180 minutos, mientras que con 1 g/L de ZnO, la eficiencia aumentó al 75,5 %. Este incremento en la eficiencia con mayor concentración de catalizador se mantuvo constante en todas las concentraciones de cianuro evaluadas.

Para 200 ppm de cianuro inicial, la tendencia fue similar, aunque con una eficiencia ligeramente menor. Se alcanzó un 69,5 % de degradación con 0,5 g/L de ZnO y un 72,75 % con 1 g/L después de 180 minutos. Es notable que la mayor parte de la degradación ocurrió en los primeros 90 minutos, sugiriendo una cinética de reacción más rápida al inicio del proceso.

En el caso de 300 ppm de cianuro, se observó un fenómeno interesante. Hubo una caída abrupta en la concentración de cianuro en los primeros 20 minutos, alcanzando casi el 54 % de degradación con 0,5 g/L de ZnO y el 60,67 % con 1 g/L. Posteriormente, la tasa de degradación se ralentizó, llegando a 68,67 % y 71 % respectivamente al final de los 180 minutos. Esta rápida degradación inicial podría atribuirse a la alta disponibilidad de sitios activos en la superficie del catalizador al comienzo de la reacción.

Figura 15

Degradación fotocatalítica del cianuro utilizando ZnO a concentraciones de 0,5 g/L y 1 g/L, con cianuro a distintas concentraciones: a) 100 ppm, b) 200 ppm, c) 300 ppm, d) 400 ppm y e) 500 ppm.



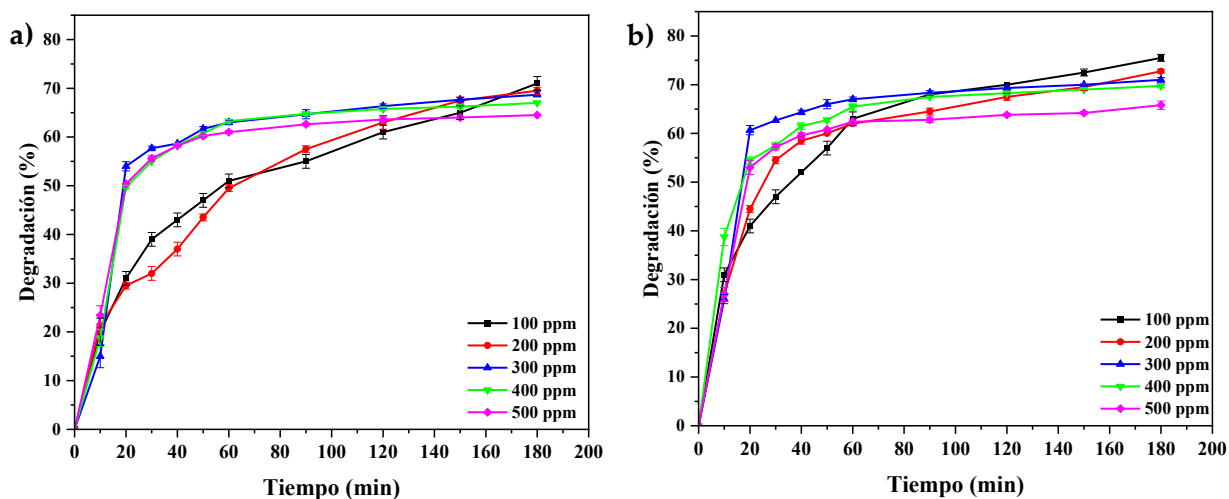
Para concentraciones más altas de cianuro (400 y 500 ppm), la eficiencia de degradación disminuyó ligeramente, pero aun así se mantuvieron resultados significativos. Con 400 ppm iniciales, se logró una degradación del 67 % con 0,5 g/L de ZnO y 69,75 % con 1 g/L. Para 500 ppm, los valores fueron 64,5 % y 65,8 % respectivamente. Esta disminución en la eficiencia a concentraciones más altas puede atribuirse a la saturación de los sitios activos del catalizador y a la competencia entre las moléculas de cianuro por los radicales hidroxilos generados.

Es notable que, en todos los casos, la mayor parte de la degradación ocurrió en los primeros 90 minutos de reacción, con una ralentización posterior. Esto sugiere que, para aplicaciones prácticas, podría ser más eficiente operar el sistema en ciclos más cortos, regenerando o reemplazando el catalizador después de este período para mantener una alta tasa de degradación.

La comparación entre las dos concentraciones de catalizador (0,5 g/L y 1 g/L) en la Figura 16, muestra una mejora consistente en la eficiencia de degradación con la concentración más alta. Sin embargo, el aumento en la eficiencia no es proporcional al aumento en la cantidad de catalizador, lo que indica que existe un punto óptimo de concentración de ZnO más allá del cual los beneficios adicionales son marginales.

Figura 16

Degradación del cianuro a distintas concentraciones utilizando: a) 0,5 g/L de ZnO y b) 1 g/L de ZnO.



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran la viabilidad y eficacia del método de biosíntesis propuesto para la obtención de nanopartículas de ZnO con potencial aplicación en la degradación fotocatalítica de cianuro.

5.1. Síntesis biogénica de nanopartículas de ZnO mediadas por *Bacillus subtilis*

La biosíntesis de nanopartículas mediante el uso de bacterias ha generado un interés científico creciente en el campo de la nanotecnología. Las bacterias se consideran agentes potenciales para la síntesis de nanopartículas debido a su alta capacidad de resistencia frente a condiciones químicas y físicas de estrés, lo cual permite controlar el tamaño, la forma y la estabilidad de las nanopartículas biosintetizadas bajo parámetros específicos como pH, temperatura, concentración del agente precursor, luz y agitación (Agarwal et al., 2017; Irvani et al., 2014; Santos et al., 2017). En este estudio, se controlaron parámetros como la temperatura, la concentración de la solución de precursores, la agitación y la cantidad de biomasa bacteriana húmeda de *Bacillus subtilis*, logrando obtener nanopartículas cristalinas de ZnO con un tamaño promedio de 21,87 nm, comparable a los resultados reportados por Sabir S. et al. (2020). Otros estudios para la obtención de nanopartículas de ZnO han variado el tipo y concentración del precursor en soluciones nutritivas diluidas con compuestos nitrogenados (Sabir et al., 2020) y tiempos de síntesis prolongados (Abd El-Nour et al., 2023). Además, se ha reportado la síntesis de nanopartículas de ZnO con otras bacterias del mismo género, como *Bacillus paramycoides*, utilizando condiciones extremas de radiación gamma y altas concentraciones de sales precursoras (El-Refai et al., 2024); y mediante radiación de baja frecuencia con microondas, con la intervención de *Bacillus foraminis* (El-Ghwas, 2021); aplicando también secado al vacío y liofilización con *Bacillus cereus* en la fase de cristalización (Ahmed et al., 2021). A diferencia de estos estudios, Tripathi et al. (2014) lograron obtener nanoflores de ZnO a partir de *Bacillus licheniformis* en condiciones de síntesis similares a las de este estudio, aunque con variaciones en la concentración de sales precursoras y parámetros de temperatura y agitación, desarrollando un método

escalable y sostenible de producción de ZnO asistido por *Bacillus subtilis* para obtener tamaño y morfología diferenciada.

Las bacterias poseen mecanismos enzimáticos intracelulares y extracelulares, así como no enzimáticos, mediante los cuales producen metabolitos secundarios que les permiten sintetizar nanopartículas asociadas a diversos iones metálicos y no metálicos (Santos et al., 2017). La bacteria *Bacillus subtilis* utilizada en este estudio tiene una alta capacidad de resistencia y adaptación a condiciones adversas, atribuida a su exposición prolongada a concentraciones elevadas de metales en entornos industriales mineros denominados como pasivos ambientales (Cáceda Quiroz et al., 2023; Chandran et al., 2020; Terna et al., 2021). Esto la hace ideal para su uso en procesos de síntesis verde de nanopartículas de ZnO y otros nanomateriales de interés ambiental, mediante un método ecológico y de bajo costo (Terna et al., 2021; Verma et al., 2021).

5.2. Caracterización estructural y morfológica

5.2.1. Análisis cristalográfico

La caracterización mediante difracción de rayos X (DRX) confirmó la formación de ZnO en fase zincita con alta cristalinidad, evidenciada por picos bien definidos y estrechos. Los parámetros de red refinados y el bajo estrés residual (0,004 %) indican una estructura cristalina prácticamente libre de tensiones internas, lo cual es crucial para aplicaciones fotocatalíticas. Esta estructura cristalina hexagonal coincide con estudios previos que identifican esta fase como la más estable y activa (Noman et al., 2022).

5.2.2. Análisis térmico

El análisis de las propiedades térmicas mediante el perfil de pérdida de peso (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) reveló un proceso de transformación con etapas significativas y pérdida gradual de peso, estabilizándose en el rango de 350 a 500 °C, lo cual indica la formación completa de ZnO cristalino y la eliminación de la mayoría de los componentes orgánicos e impurezas de la síntesis biogénica. La pérdida de peso inicial refleja la presencia de biomoléculas asociadas a la superficie de las nanopartículas, lo cual es común en materiales sintetizados biológicamente (Lakshmi et al., 2024). La participación de *Bacillus sp.* ha influido en la formación de fases

intermedias y en los procesos térmicos observados, pues las bacterias actúan como plantillas biológicas, y sus metabolitos, como agentes reductores y estabilizadores (Jayaseelan et al., 2012; Jiang et al., 2018).

5.2.3. Análisis de propiedades ópticas, electrónicas y texturales

El análisis de las propiedades ópticas reveló características particularmente favorables para aplicaciones fotocatalíticas. Las mediciones espectroscópicas UV-visible mostraron una fuerte absorción en la región ultravioleta, con un borde de absorción pronunciado alrededor de 380 - 400 nm. Esta característica es típica del ZnO y se atribuye a la transición electrónica de la banda de valencia a la banda de conducción (Y. Wang et al., 2015). La forma abrupta del borde de absorción sugiere una alta cristalinidad y pureza de las nanopartículas de ZnO, lo cual es consistente con los resultados de difracción de rayos X previamente discutidos.

La determinación del bandgap mediante la función de Kubelka-Munk arrojó un valor de 3,20 eV, ligeramente inferior al valor típico del ZnO en bulto (3,37 eV). Este resultado concuerda con los valores reportados en la literatura para nanopartículas de ZnO de alta calidad (Djurisić y Leung, 2006; Sharma et al., 2022). La energía de banda prohibida, ligeramente menor que el valor típico del ZnO en bulto (3,37 eV), podría atribuirse al tamaño nanométrico de las partículas y a posibles efectos de confinamiento cuántico (Gulia y Rita Kakkar, 2013). Esta característica representa una ventaja significativa al permitir una activación más eficiente bajo irradiación UV cercana al espectro visible, lo que potencialmente mejora la eficiencia energética del proceso fotocatalítico, al facilitar la generación de pares electrón-hueco bajo irradiación UV, crucial para la degradación de contaminantes como el cianuro (Salinas-Guzmán et al., 2010).

Los análisis mediante espectroscopía FTIR proporcionaron evidencia adicional de la formación exitosa de ZnO, mostrando una fuerte banda de absorción característica en la región de 400 a 700 cm^{-1} , con un pico distintivo alrededor de 430 cm^{-1} , típico de la estructura zincita. La ausencia de bandas significativas por encima de 1 000 cm^{-1} confirmó la eliminación efectiva de impurezas orgánicas durante el proceso de calcinación, lo que indica la pureza del material obtenido. Estos resultados son

consistentes con estudios previos donde se ha documentado la identificación de ZnO mediante FTIR, destacando la eficiencia de esta técnica en la caracterización de materiales nanocompuestos (Manikanika et al., 2024). Por lo tanto, el espectro FTIR obtenido valida la formación exitosa de ZnO en fase zincita, un paso crucial para su aplicación potencial en procesos de adsorción y remoción de contaminantes (Dihom et al., 2022).

La caracterización textural mediante análisis BET reveló propiedades superficiales significativas para aplicaciones catalíticas. El área superficial específica de $27,0198 \pm 0,1300 \text{ m}^2/\text{g}$, junto con un volumen de microporos de $0,002398 \text{ cm}^3/\text{g}$ y una superficie externa de $22,0136 \text{ m}^2/\text{g}$, indica una estructura porosa bien desarrollada. El alto valor del factor C de BET ($659,887334$) sugiere una fuerte interacción entre el adsorbato y la superficie del ZnO, una característica deseable para aplicaciones catalíticas. La distribución de porosidad, con un área de microporos de $5,0062 \text{ m}^2/\text{g}$, sugiere una estructura jerárquica que facilita tanto el transporte de reactivos como el acceso a sitios activos para la reacción fotocatalítica.

5.2.4. Análisis morfológico

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) revelaron una morfología amorfa y una tendencia a la aglomeración de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas, fenómeno frecuente en nanopartículas de óxidos metálicos atribuido a interacciones superficiales fuertes, como fuerzas de Van der Waals o dipolo-dipolo. Sin embargo, estos aglomerados no implican sinterización completa, y las nanopartículas individuales pueden mantener gran parte de su superficie accesible para aplicaciones fotocatalíticas. Las imágenes de TEM mostraron nanopartículas cuasi-esféricas con un tamaño de $21,87 \pm 5,84 \text{ nm}$ y planos cristalinos bien definidos (plano 100 con una distancia interplanar de $2,8 \text{ \AA}$), validando la estructura hexagonal del ZnO, lo cual es ventajoso para aplicaciones catalíticas por la uniformidad de las propiedades superficiales. Estudios previos han reportado tamaños similares de nanopartículas, que varían entre 16 y 35 nm, obtenidos mediante la intervención de diversas especies bacterianas del mismo género *Bacillus* (Abd El-Nour et al., 2023; Ahmed et al., 2021; El-Ghwas, 2021; El-Refai et al., 2024; Sabir et al., 2020). Las diferencias en la escala

nanométrica de las estructuras obtenidas se atribuyen principalmente a las condiciones de biosíntesis, el tipo de precursor, el agente biológico intermediario en la síntesis y el método de cristalización empleado. Además, el tamaño nanométrico resulta especialmente favorable para aplicaciones fotocatalíticas, ya que proporciona una amplia superficie para las reacciones catalíticas, lo cual puede mejorar significativamente la eficiencia en el proceso de degradación (Noman et al., 2022).

5.3. Evaluación fotocatalítica en la degradación del cianuro

Los ensayos de degradación fotocatalítica de cianuro lograron una eficacia notable bajo condiciones sostenibles. Con concentraciones de catalizador de 1 g/L y 0,5 g/L, se obtuvo una degradación del 75,5 % y 68 % partiendo de una concentración inicial de 100 ppm de cianuro en un período de 180 minutos. La cinética mostró una fase rápida inicial, seguida de ralentización, típico en sistemas fotocatalíticos heterogéneos, lo cual refleja la complejidad de los mecanismos de degradación (Razanamahandry et al., 2020). La mayor eficiencia observada con una concentración de catalizador de 1 g/L sugiere que la disponibilidad de sitios activos es un factor crítico en el proceso o varios factores interrelacionados: la saturación de los sitios activos disponibles en la superficie del catalizador, la competencia entre las moléculas de cianuro por los radicales hidroxilo generados durante el proceso fotocatalítico y la posible desactivación parcial del catalizador debido a la adsorción de subproductos de la reacción. Esto sugiere la necesidad de optimizar la relación entre la concentración del contaminante y la cantidad de catalizador para maximizar la eficiencia del proceso (Núñez-Salas et al., 2019). La mayor eficiencia observada con una concentración de catalizador de 1 g/L en comparación con 0,5 g/L indica que la disponibilidad de sitios activos representa un factor limitante crítico en el proceso de degradación.

La comparación de nuestros resultados con investigaciones previas demuestra la competitividad de nuestro enfoque, especialmente al considerar condiciones más realistas y sostenibles. Por ejemplo, Razanamahandry et al. (2020) reportaron una degradación del 98 % con una concentración inicial más alta (1 g CN⁻/L) en apenas 20 minutos, utilizando una lámpara UV de 30 W. Núñez-Salas et al. (2019) lograron un 75 % de degradación, aunque partiendo de una concentración significativamente menor (10 ppm CN⁻) y

empleando una mayor cantidad de catalizador (1,4 mg/mL). Salinas-Guzmán et al. (2010) obtuvieron entre un 75 y 90 % de degradación a partir de 20 ppm utilizando 1 mg/mL de catalizador, mientras que Bagabas et al. (2013) alcanzaron hasta un 100 % de remoción con 100 ppm de cianuro, variando las concentraciones de catalizador entre 0,2 y 0,9 mg/mL.

Sin embargo, es importante destacar que las condiciones experimentales y las características específicas de los fotocatalizadores pueden variar significativamente entre estudios, lo que dificulta una comparación directa. Este estudio se distingue particularmente por el uso de NaCN en lugar de KCN, siendo el primero más relevante desde una perspectiva industrial debido a su menor costo, mayor concentración y menor higroscopicidad. Además, se trabajó con concentraciones de cianuro significativamente más altas (hasta 500 ppm) y un pH controlado a 10 para evitar su volatilización, logrando resultados notables utilizando una lámpara UV de solo 9 W. Esto demuestra la eficiencia energética del proceso para alcanzar resultados favorables en la degradación del cianuro.

5.4. Ventajas y perspectivas futuras

La biosíntesis de nanopartículas de ZnO mediante *Bacillus subtilis* ofrece ventajas significativas en términos de sostenibilidad y potencial de escalabilidad, en comparación con los métodos de síntesis química convencionales. El uso de un organismo no patógeno junto con precursores de baja toxicidad representa un avance notable hacia procesos más ecológicos. Este método permite un control preciso sobre las propiedades del material final, a la vez que minimiza el impacto ambiental y los costos operativos asociados con los métodos convencionales, gracias a la optimización de las condiciones de cultivo y síntesis.

Las características del material producido, incluidas su alta cristalinidad, el tamaño controlado de las partículas y las propiedades superficiales optimizadas con una elevada energía de unión de excitación, contribuyen de manera significativa a su capacidad fotocatalítica (Bandeira et al., 2020; Sundrarajan et al., 2015), haciéndolo adecuado no solo para aplicaciones fotocatalíticas, sino también para otros campos. Estudios previos han demostrado el potencial de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas en aplicaciones que van desde catálisis y antioxidantes hasta usos

biomédicos, electrónicos y agrícolas (Dakhil, 2017; Kumar y Mamidyala, 2011; B. N. Singh et al., 2014).

La aplicación de nanopartículas de ZnO biosintetizadas con bacterias procedentes de pasivos ambientales mineros para la degradación de cianuro constituye una alternativa eficiente y ambientalmente amigable en comparación con otras técnicas convencionales empleadas en la industria minera, como el intercambio iónico, la oxidación electroquímica, la ozonización y la cloración alcalina. Estas técnicas tradicionales requieren un mayor gasto energético, el uso de una gran cantidad de compuestos químicos, altos costos de producción y generan residuos con impacto ambiental significativo (Bagabas et al., 2013; Primoradi et al., 2017; Roldán et al., 2021). En este contexto, las nanopartículas de ZnO biosintetizadas representan una alternativa prometedora para el desarrollo de tecnologías de tratamiento de aguas más sostenibles y eficientes. En la Tabla 3, se puede visualizar una comparación entre las distintas tecnologías de tratamiento existentes para la degradación de cianuro en función de costos y condiciones claves para la eficiencia de degradación.

Tabla 3*Comparación entre tratamientos para la degradación del cianuro*

Método de Tratamiento	Costo Estimado (USD) por m³	Características Clave para la eficiencia	Referencias
Tratamiento Biológico	5 - 15	Ecológico, efectivo hasta un 98 % para concentraciones bajas a moderadas en tiempos prolongados y condiciones controladas, costos operativos bajos.	(Sáez et al., 2019)
Oxidación Química (p. ej., peróxido de hidrógeno)	20 - 80	Efectivo para altas concentraciones, pero genera subproductos peligrosos y tiene altos costos operativos. Con alta eficiencia.	(Amaouche et al., 2019; García Girón y Loroña Calderón, 2021; Niati, 2023)
Tratamiento Electroquímico	90 - 120	Alta eficiencia, puede tratar especies de cianuro complejas, pero los costos iniciales pueden ser altos.	(Dobrosz-Gómez et al., 2020; H. Singh y Mishra, 2018)
Adsorción en Carbón Activado	40 - 70	Efectivo para bajas concentraciones, pero requiere regeneración y puede ser costoso a lo largo del tiempo.	(Eskandari et al., 2020)
Ozonización	25 - 60	Efectivo para bajas concentraciones con alta eficiencia hasta un 90 %, pero con costos operativos y complejidad más altos.	(Matino et al., 2018)
Procesos de Fenton		Alta eficiencia, pero requiere condiciones controladas de pH ácido, y temperatura controlada, que incrementan los costos de producción.	(Garzón-Cucaita y Carriazo, 2022; López-Yáñez et al., 2016)
Fotocatálisis (TiO ₂)	15 - 30	Utiliza luz UV para la degradación, efectivo para bajas concentraciones, ecológico.	(López y Sierra, 2012)
Fotocatálisis (ZnO)	15 - 35	Similar a TiO ₂ , con eficiencias que van del 70 % y el 98 % en condiciones optimizadas, con mayores resultados bajo luz UV y concentraciones moderadas a bajas de cianuro.	(Núñez-Salas et al., 2019; Razanamahandry et al., 2020)

Las perspectivas futuras para el desarrollo de esta tecnología son prometedoras en diversos frentes. A nivel fundamental, existe un gran potencial para optimizar el proceso mediante estudios sistemáticos de diferentes cepas bacterianas y condiciones de cultivo. La posibilidad de modificar la superficie del material o crear estructuras híbridas podría ampliar significativamente su gama de aplicaciones sostenibles en el ámbito ambiental. En términos tecnológicos, el desarrollo de sistemas de reactores optimizados y protocolos de escalado podría facilitar la transición hacia aplicaciones industriales.

Un área de especial interés es la integración de este material en tecnologías multifuncionales de tratamiento de agua, en las cuales la capacidad fotocatalítica del ZnO se combine con propiedades adicionales, como la actividad antimicrobiana. La utilización de luz solar y la capacidad de tratar simultáneamente múltiples contaminantes podrían resultar en sistemas de tratamiento más eficientes y económicos.

El desarrollo futuro de esta tecnología debería enfocarse en varios aspectos clave: optimizar la eficiencia energética del proceso, mejorar la recuperación y reutilización del catalizador, avanzar en sistemas híbridos que combinen diversas tecnologías de tratamiento, y llevar a cabo evaluaciones exhaustivas de sostenibilidad del proceso, incluyendo análisis de ciclo de vida y estudios de ecotoxicología.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran el potencial de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas como fotocatalizadores eficientes y ecológicos para la degradación de cianuro en solución acuosa. La combinación de un método de síntesis verde con una alta actividad fotocatalítica hace de este material una opción prometedora para el desarrollo de tecnologías de tratamiento de agua más sostenibles y eficientes.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló exitosamente un método verde y escalable para la biosíntesis de nanopartículas de ZnO utilizando la bacteria *Bacillus subtilis*, obteniendo partículas cristalinas en fase zincita con un tamaño promedio de 21,87 nm.
2. La caracterización exhaustiva de las nanopartículas mediante DRX, TEM, UV-Vis, FTIR y análisis BET confirmó la formación de ZnO de alta pureza con propiedades alternativa ecológica para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro.estructurales y ópticas favorables para aplicaciones fotocatalíticas.
3. Los ensayos fotocatalíticos demostraron una eficiente degradación de cianuro bajo irradiación UV, alcanzando hasta un 75,5 % de remoción para una concentración inicial de 100 ppm y 65,8 % para 500 ppm en 180 minutos.
4. La eficiencia de degradación fotocatalítica del cianuro se vio influenciada por la concentración de nanopartículas biosintetizadas de ZnO y la concentración inicial de cianuro, demostrando su potencial como

RECOMENDACIONES

Se recomienda a los investigadores de grupos de investigación en ingeniería, biotecnología, nanomateriales y ambiental, organizaciones estatales y privadas de fondos de transferencia tecnológica y al sector industrial minero:

1. Investigar el efecto de diferentes parámetros operativos como pH, temperatura y tipo de irradiación en la eficiencia de degradación del cianuro para optimizar aún más el proceso fotocatalítico.
2. Evaluar la estabilidad y reusabilidad de las nanopartículas de ZnO biosintetizadas en múltiples ciclos de tratamiento para determinar su viabilidad en aplicaciones a largo plazo.
3. Explorar la posibilidad de modificar o dopar las nanopartículas de ZnO biosintetizadas para mejorar su actividad en el espectro visible y aumentar su eficiencia bajo luz solar.
4. Investigar la escalabilidad del proceso de biosíntesis y evaluar su viabilidad económica para posibles aplicaciones industriales.
5. Desarrollar un prototipo de reactor fotocatalítico a escala piloto para validar el rendimiento del sistema en condiciones más cercanas a las aplicaciones reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-Nour, A., Abou-Dobara, M., El-Sayed, A. y El-Zahed, M. (2023). Extracellular biosynthesis and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 zinc oxide nanoparticles. *Scientific Journal for Damietta Faculty of Science*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/sjdfs.2023.173178.1064>
- Abdullah, F. H., Bakar, N. H. H. A. y Bakar, M. A. (2022). Current advancements on the fabrication, modification, and industrial application of zinc oxide as photocatalyst in the removal of organic and inorganic contaminants in aquatic systems. *Journal of Hazardous Materials*, 424(Pt B), 127416. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127416>
- Agarwal, H., Venkat Kumar, S. y Rajeshkumar, S. (2017). A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002>
- Ahmed, T., Wu, Z., Jiang, H., Luo, J., Noman, M., Shahid, M., Manzoor, I., Allemailem, K. S., Alrumaihi, F. y Li, B. (2021). Bioinspired Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from a Native *Bacillus cereus* Strain RNT6: Characterization and Antibacterial Activity against Rice Panicle Blight Pathogens *Burkholderia glumae* and *B. Gladioli*. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nano11040884>
- Akerdi, A. G. y Bahrami, S. H. (2019). Application of heterogeneous nano-semiconductors for photocatalytic advanced oxidation of organic compounds: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103283. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103283>
- Aliprandini, P., Veiga, M. M., Marshall, B. G., Scarazzato, T. y Espinosa, D. C. (2020). Investigation of mercury cyanide adsorption from synthetic wastewater aqueous solution on granular activated carbon. *Journal of Water Process Engineering*, 34, 101154. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101154>

- Amaouche, H., Chergui, S., Halet, F., Yeddou, A. R., Chergui, A., Nadjemi, B. y Ould-Dris, A. (2019). Removal of Cyanide in Aqueous Solution by Oxidation With Hydrogen Peroxide Catalyzed by Copper Oxide. *Water Science & Technology*, 80(1), 126–133. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.254>
- Arya, S., Mahajan, P., Mahajan, S., Khosla, A., Datt, R., Gupta, V., Young, S.-J. y Oruganti, S. K. (2021). Review—Influence of Processing Parameters to Control Morphology and Optical Properties of Sol-Gel Synthesized ZnO Nanoparticles. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 10(2), 23002. <https://doi.org/10.1149/2162-8777/abe095>
- Bagabas, A., Alshammari, A., Aboud, M. F. y Kosslick, H. (2013). Room-temperature synthesis of zinc oxide nanoparticles in different media and their application in cyanide photodegradation. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 516. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-516>
- Bandeira, M., Giovanela, M., Roesch-Ely, M., Devine, D. M. y Da Silva Crespo, J. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>
- Basnet, P. y Chatterjee, S. (2020). Structure-directing property and growth mechanism induced by capping agents in nanostructured ZnO during hydrothermal synthesis—A systematic review. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 22, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100426>
- Batra, V., Kaur, I., Pathania, D., Sonu y Chaudhary, V. (2022). Efficient dye degradation strategies using green synthesized ZnO-based nanoplatfoms: A review. *Applied Surface Science Advances*, 11, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100314>
- BRAGG, W. L. (1966). The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal**Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, 17, 43–57 (1913). Communicated by Professor Sir J. J. Thomson. Read 11 November 1912. En X-

ray and Neutron Diffraction (pp. 109–125). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-011999-1.50015-8>

Breuer, P. L. y Hewitt, D. M. (2020). INCO Cyanide destruction insights from plant reviews and laboratory evaluations. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy*, 129(1), 104–113. <https://doi.org/10.1080/25726641.2019.1633506>

Brunauer, S., Emmett, P. H. y Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309–319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>

Cáceda Quiroz, C. J., Fora Quispe, G. d. L., Carpio Mamani, M., Maraza Choque, G. J. y Sacari Sacari, E. J. (2023). Cyanide Bioremediation by *Bacillus subtilis* under Alkaline Conditions. *Water*, 15(20), 3645. <https://doi.org/10.3390/w15203645>

Chandran, H., Meena, M. y Sharma, K. (2020). Microbial Biodiversity and Bioremediation Assessment Through Omics Approaches. *Frontiers in Environmental Chemistry*, 1, Artículo 570326. <https://doi.org/10.3389/fenvc.2020.570326>

Chen, D., Cheng, Y., Zhou, N., Chen, P., Wang, Y [Yunpu], Li, K., Huo, S., Cheng, P., Peng, P., Zhang, R., Wang, L., Liu, H [Hui], Liu, Y. y Ruan, R. (2020). Photocatalytic degradation of organic pollutants using TiO₂-based photocatalysts: A review. *Journal of Cleaner Production*, 268, 121725. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121725>

Clark, B. J., Frost, T. y Russell, M. A. (1993). *UV spectroscopy: Techniques, instrumentation, data handling* (1st ed.). *Techniques in visible and ultraviolet spectrometry: Vol. 4*. Chapman & Hall.

Cullity, B. D. y Stock, S. R. (2001). *Elements of x-ray diffraction* (3rd ed.). Prentice Hall.

Dadban Shahamat, Y., Masihpour, M., Borghei, P. y Hoda Rahmati, S. (2022). Removal of azo red-60 dye by advanced oxidation process O₃/UV from textile wastewaters

- using Box-Behnken design. *Inorganic Chemistry Communications*, 143, 109785. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.109785>
- Dakhil, A. S. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticle (AgNPs) using *Lactobacillus* and their effects on oxidative stress biomarkers in rats. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.05.013>
- Datye, A. y De La Riva, A. (2023). Scanning Electron Microscopy (SEM). En I. E. Wachs y M. A. Bañares (Eds.), *Springer Handbooks. Springer Handbook of Advanced Catalyst Characterization* (pp. 359–380). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07125-6_18
- Dihom, H. R., Al-Shaibani, M. M., Radin Mohamed, R. M. S., Al-Gheethi, A. A., Sharma, A. y Khamidun, M. H. B. (2022). Photocatalytic degradation of disperse azo dyes in textile wastewater using green zinc oxide nanoparticles synthesized in plant extract: A critical review. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102705. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102705>
- Djurisić, A. B. y Leung, Y. H. (2006). Optical properties of ZnO nanostructures. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 2(8-9), 944–961. <https://doi.org/10.1002/sml.200600134>
- Dobrosz-Gómez, I., García, M. A., Gaviria, G. H. y GilPavas, E. (2020). Mineralization of Cyanide Originating from Gold Leaching Effluent Using Electro-Oxidation: Multi-Objective Optimization and Kinetic Study. *Journal of Applied Electrochemistry*, 50(2), 217–230. <https://doi.org/10.1007/s10800-019-01392-1>
- Dzombak, D. A., Ghosh, R. S. y Wong-Chong, G. M. (2006). *Cyanide in water and soil: Chemistry, risk, and management*. CRC/Taylor & Francis.
- El-Ghwas, D. (2021). Short Communication: Characterization and biological synthesis of zinc oxide nanoparticles by new strain of *Bacillus foraminis*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(1). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230159>

- El-Refai, H. A., Saleh, A. M., Mohamed, S. I. A., Aboul Naser, A. F., Zaki, R. A., Gomaa, S. K. y Hamed, M. A. (2024). Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Bacillus paramycoides* for in Vitro Biological Activities and in Vivo Assessment Against Hepatorenal Injury Induced by CCl₄ in Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04817-y>
- Eskandari, P., Farhadian, M., Nazar, A. R. S. y Goshadrou, A. (2020). Cyanide Adsorption on Activated Carbon Impregnated With ZnO, Fe₂O₃, TiO₂ nanometal Oxides: A Comparative Study. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 18(2), 297–316. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02791-0>
- Fultz, B. y Howe, J. M. (2013). *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials* (4th ed.). *Graduate texts in physics*. Springer.
- Gabbott, P. (2008). *Principles and applications of thermal analysis*. Blackwell Pub.
- Gaisford, S., Kett, V. y Haines, P. J. (Eds.). (2016). *Principles of thermal analysis and calorimetry* (2nd edition). Royal Society of Chemistry.
- García Girón, A. y Loroña Calderon, F. (2021). Análisis comparativo del tratamiento de efluentes cianurados con peróxido de hidrógeno y metabisulfito de sodio. *Cátedra Villarreal*, 9(2). <https://doi.org/10.24039/cv2021921226>
- Garzón-Cucaita, V. y Carriazo, J. G. (2022). Óxidos De Hierro Como Catalizadores De Procesos Tipo Fenton Con Potencial Aplicación en Tecnologías De Remoción De Contaminantes. *Tecnológicas*, 25(55), e2393. <https://doi.org/10.22430/22565337.2393>
- Griffiths, P. R. y Haseth, J. A. de. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/047010631X>
- Gulia y Rita Kakkar, S. (2013). ZnO Quantum Dots For Biomedical Applications. *Advanced Materials Letters*, 4(12), 876–887. <https://doi.org/10.5185/amlett.2013.3440>

- Hornyak, G. L., Dutta, J., Tibbals, H. F. y Rao, A. (2008). *Introduction to Nanoscience*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b12835>
- Iqtedar, M., Riaz, H., Kaleem, A., Abdullah, R., Aihetasham, A., Naz, S. y Sharif, S. (2020). Biosynthesis, optimization and characterization of ZnO nanoparticles using *Bacillus cereus* MN181367 and their antimicrobial activity against multidrug resistant bacteria. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19(s1), 253–266. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1605>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V. y Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- Jayaseelan, C., Rahuman, A. A., Kirthi, A. V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A., Gaurav, K., Karthik, L. y Rao, K. V. B. (2012). Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.006>
- Jiang, J., Pi, J. y Cai, J. (2018). The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1062562. <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>
- Khan, S. H. y Pathak, B. (2020). Zinc oxide based photocatalytic degradation of persistent pesticides: A comprehensive review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 13, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100290>
- Kumar, C. G. y Mamidyala, S. K. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 84(2), 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.01.042>
- Kusiak-Nejman, E., Wojnarowicz, J [J.], Morawski, A. W., Narkiewicz, U., Sobczak, K., Gierlotka, S. y Lojkowski, W [W.] (2021). Size-dependent effects of ZnO

- nanoparticles on the photocatalytic degradation of phenol in a water solution. *Applied Surface Science*, 541, 148416. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148416>
- Lakshmi, N., Anandakumar, S., Sampathkumar, V. y Manoj, S. (2024). Synthesized ZnO nanoparticles using Sorghum Panicle for the photocatalytic degradation of pharmaceutical waste water. *Desalination and Water Treatment*, 319, 100557. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100557>
- Lettieri, S., Pavone, M., Fioravanti, A., Santamaria Amato, L. y Maddalena, P. (2021). Charge Carrier Processes and Optical Properties in TiO₂ and TiO₂-Based Heterojunction Photocatalysts: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/ma14071645>
- Liang, D., Li, N., An, J., Ma, J., Wu, Y. y Liu, H [Hongbo] (2021). Fenton-based technologies as efficient advanced oxidation processes for microcystin-LR degradation. *The Science of the Total Environment*, 753, 141809. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141809>
- Lindon, J. C., Tranter, G. E. y Holmes, J. L. (op. 2010). *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. Elsevier.
- López, A. L. B. y Sierra, I. M. C. (2012). Estudio Catalítico Comparativo De Los Sistemas TiO₂ Y Nb₂O₅ en La Degradación De Cianuro en Función Del Tipo De Oxidante. *Ingeniería Y Ciencia*, 8(16), 257–280. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.8.16.10>
- López-Yáñez, A., Zamora-Mata, J. M., Alonso, A. R. y Ramírez-Muñoz, J. (2016). Modelo De Programación No Lineal Para El Diseño De Sistemas De Tratamiento Electroquímico De Aguas Residuales Contaminadas Con Trazas De Amoxicilina. *Información Tecnológica*, 27(5), 87–98. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000500011>

- Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A. y Thommes, M. (2004). *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density. Particle Technology Series, 1567-827X: Vol. 16*. Springer Netherlands; Imprint; Springer.
- Majumder, S., Chatterjee, S., Basnet, P. y Mukherjee, J. (2020). ZnO based nanomaterials for photocatalytic degradation of aqueous pharmaceutical waste solutions – A contemporary review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 14*, 100386. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100386>
- Manikanika, Chopra, L. y Kumar, R. (2024). Combustion-synthesized ZnO-CeO₂ heterojunctions for advanced photocatalytic dye degradation. *Inorganic Chemistry Communications, 160*, 111896. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111896>
- Matino, I., Colla, V. y Branca, T. A. (2018). Extension of pilot tests of cyanide elimination by ozone from blast furnace gas washing water through Aspen Plus® based model. *Frontiers of Chemical Science and Engineering, 12*(4), 718–730. <https://doi.org/10.1007/s11705-018-1771-2>
- McREE, D. E. (1999). DATA COLLECTION TECHNIQUES. En *Practical Protein Crystallography* (pp. 23–90). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012486052-0/50004-X>
- Mohar, R. S., Isnaeni y Hadiko, G. (2019). Synthesis of immobilized nanostructured ZnO grown on glass and its photocatalytic activity for cyanide degradation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 541*(1), 12013. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/541/1/012013>
- Morillo Esparza, J., Cevallos Cueva, N., Sandoval Pauker, C., Vargas Jentsch, P. y Muñoz Bisesti, F. (2019). COMBINED TREATMENT USING OZONE FOR CYANIDE REMOVAL FROM WASTEWATER: A COMPARISON. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental, 35*(2), 459–476. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.02.16>

- Niati, S. M. (2023). Study on the Ability of H₂O₂ and the Effective Concentration of CuSO₄ in Degrading Cyanide. *Chempublish Journal*, 7(2), 117–126. <https://doi.org/10.22437/chp.v7i2.30438>
- Noman, M. T., Amor, N. y Petru, M. (2022). Synthesis and applications of ZnO nanostructures (ZONSs): a review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 47(2), 99–141. <https://doi.org/10.1080/10408436.2021.1886041>
- Núñez-Salas, R. E., Hernández-Ramírez, A [Aracely], Hinojosa-Reyes, L [Laura], Guzmán-Mar, J. L [Jorge Luis], Villanueva-Rodríguez, M. y Maya-Treviño, M. d. L. (2019). Cyanide degradation in aqueous solution by heterogeneous photocatalysis using boron-doped zinc oxide. *Catalysis Today*, 328, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.11.061>
- Pandey, N., Dutta, S. y Biswas, P. (2023). Cyanide Mitigation at Steel Metallurgical Process's Effluent. *Water, Air & Soil Pollution*, 234(11). <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06679-w>
- Primoradi, M., Hachemian, S. y Shayesteh, M. (2017). Kinetics and thermodynamics of cyanide removal by ZnO@NiO nanocrystals. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 27(6), 1394–1403. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(17\)60160-2](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(17)60160-2)
- Raha, S. y Ahmaruzzaman, M. (2022). ZnO nanostructured materials and their potential applications: Progress, challenges and perspectives. *Nanoscale Advances*, 4(8), 1868–1925. <https://doi.org/10.1039/D1NA00880C>
- Razanamahandry, L. C., Sackey, J., Furqan, C. M., Ntwampe, S., Fosso-Kankeu, E [E.], Manikandan, E. y Maaza, M. (2020). Removal of Free Cyanide by a Green Photocatalyst ZnO Nanoparticle Synthesized via Eucalyptus globulus Leaves. En E. Fosso-Kankeu, S. Pandey y S. S. Ray (Eds.), *Photocatalysts in Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment* (pp. 271–288). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119631422.ch9>

- Rehman, S., Jermy, B. R., Akhtar, S., Borgio, J. F., Abdul Azeez, S., Ravinayagam, V., Al Jindan, R., Alsalem, Z. H., Buhameid, A. y Gani, A. (2019). Isolation and characterization of a novel thermophile; *Bacillus haynesii*, applied for the green synthesis of ZnO nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2072–2082. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1620254>
- Reimer, L. y Kohl, H. (2008). *Transmission electron microscopy: Physics of image formation* (5th ed.). *Springer series in optical sciences: Vol. 36*. Springer.
- Rekhate, C. V. y Srivastava, J. K. (2020). Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review. *Chemical Engineering Journal Advances*, 3, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2020.100031>
- Roldán, M. D [María Dolores], Olaya-Abril, A., Sáez, L. P., Cabello, P., Luque-Almagro, V. M. y Moreno-Vivian, C. (2021). Bioremediation of cyanide-containing wastes: The potential of systems and synthetic biology for cleaning up the toxic leftovers from mining. *EMBO Reports*, 22(11), e53720. <https://doi.org/10.15252/embr.202153720>
- Rueda-Márquez, J. J., Levchuk, I., Manzano, M. y Sillanpää, M. (2020). Toxicity Reduction of Industrial and Municipal Wastewater by Advanced Oxidation Processes (Photo-Fenton, UVC/H₂O₂, Electro-Fenton and Galvanic Fenton): A Review. *Catalysts*, 10(6), 612. <https://doi.org/10.3390/catal10060612>
- Sabir, S., Zahoor, M. A., Waseem, M., Siddique, M. H., Shafique, M., Imran, M., Hayat, S., Malik, I. R. y Muzammil, S. (2020). Biosynthesis of ZnO Nanoparticles Using *Bacillus Subtilis*: Characterization and Nutritive Significance for Promoting Plant Growth in *Zea mays* L. *Dose-Response : A Publication of International Hormesis Society*, 18(3), 1559325820958911. <https://doi.org/10.1177/1559325820958911>
- Sáez, L. P., Cabello, P., Ibáñez, M. I., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D [María D.] y Moreno-Vivian, C. (2019). Cyanate Assimilation by the Alkaliphilic Cyanide-

- Degrading Bacterium *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* CECT5344: Mutational Analysis of the Cyn Gene Cluster. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3008. <https://doi.org/10.3390/ijms20123008>
- Salinas-Guzmán, R. R., Guzmán-Mar, J. L. [J. L.], Hinojosa-Reyes, L. [L.], Peralta-Hernández, J. M. y Hernández-Ramírez, A. [A.] (2010). Enhancement of cyanide photocatalytic degradation using sol-gel ZnO sensitized with cobalt phthalocyanine. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 54(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10971-009-2145-5>
- Santos, A., Troncoso, C., Lamilla, C., Llanquinao, V., Pavez, M. y Barrientos, L. (2017). Nanopartículas Sintetizadas por Bacterias Antárticas y sus Posibles Mecanismos de Síntesis. *International Journal of Morphology*, 35(1), 26–33. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000100005>
- Shahzad, S., Javed, S. y Usman, M. (2021). A Review on Synthesis and Optoelectronic Applications of Nanostructured ZnO. *Frontiers in Materials*, 8, Artículo 613825. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.613825>
- Sharma, D. K., Shukla, S., Sharma, K. K. y Kumar, V. (2022). A review on ZnO: Fundamental properties and applications. *Materials Today: Proceedings*, 49, 3028–3035. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.10.238>
- Singh, A. K. (2016). Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. En *Engineered Nanoparticles* (pp. 125–170). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00004-2>
- Singh, B. N., Rawat, A. K. S., Khan, W., Naqvi, A. H. y Singh, B. R. (2014). Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. *PloS One*, 9(9), e106937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106937>
- Singh, H. y Mishra, B. K. (2018). Degradation of Cyanide, Aniline and Phenol in Pre-Treated Coke Oven Wastewater by Peroxide Assisted Electro-Oxidation Process.

- Water Science & Technology*, 78(10), 2214–2227.
<https://doi.org/10.2166/wst.2018.503>
- Smith, B. C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10777>
- Soto-Blanco, B. (2013). *Cyanide: Occurrence, characteristics and applications. Chemical engineering methods and technology*. Nova Science Publishers Inc.
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470011149>
- Suman, S. G. (2023). Challenges in Targeting Cyanide Poisoning. En E. Farkas y C. J. Marmion (Eds.), *Targeted Metallo-Drugs* (pp. 215–238). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003272250-8>
- Sundrarajan, M., Ambika, S. y Bharathi, K. (2015). Plant-extract mediated synthesis of ZnO nanoparticles using *Pongamia pinnata* and their activity against pathogenic bacteria. *Advanced Powder Technology*, 26(5), 1294–1299. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2015.07.001>
- Terna, A. D., Elemike, E. E., Mbonu, J. I., Osafire, O. E. y Ezeani, R. O. (2021). The future of semiconductors nanoparticles: Synthesis, properties and applications. *Materials Science and Engineering: B*, 272, 115363. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115363>
- Theerthagiri, J., Salla, S., Senthil, R. A., Nithyadharseni, P., Madankumar, A., Arunachalam, P., Maiyalagan, T. y Kim, H.-S. (2019). A review on ZnO nanostructured materials: Energy, environmental and biological applications. *Nanotechnology*, 30(39), 392001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab268a>
- Tu, Y., Han, P., Wei, L., Zhang, X [Xiaomeng], Yu, B., Qian, P. y Ye, S. (2019). Removal of cyanide adsorbed on pyrite by H₂O₂ oxidation under alkaline conditions. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 78, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.10.013>

- Verbrugge, B., Lanzano, C. y Libassi, M. (2021). The cyanide revolution: Efficiency gains and exclusion in artisanal- and small-scale gold mining. *Geoforum*, 126, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2021.07.030>
- Verma, R., Pathak, S., Srivastava, A. K., Praver, S. y Tomljenovic-Hanic, S. (2021). ZnO nanomaterials: Green synthesis, toxicity evaluation and new insights in biomedical applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 876, 160175. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.160175>
- Vidal-Tovar, C. [Apellidos no disponibles], C., Correa-Turizo, R., Severiche-Sierra, C. y Cabrera-Lafaurie, W. (2019). Degradation of Cyanides in Wastewater from Gold Mining: A Review of Literature. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(4), 1475–1485. <https://doi.org/10.36478/jeasci.2019.1475.1485>
- Wachs, I. E. y Bañares, M. A. (Eds.). (2023). *Springer Handbooks. Springer Handbook of Advanced Catalyst Characterization* (1st ed. 2023). Springer International Publishing; Springer.
- Wang, J. y Wang, S. (2020). Reactive species in advanced oxidation processes: Formation, identification and reaction mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 401, 126158. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126158>
- Wang, Y [Yongqian], Yang, J., Kong, J., Jia, H. y Yu, M. (2015). ZnO microspheres: Controllable preparation and optical properties. *Superlattices and Microstructures*, 86, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2015.07.055>
- Wojnarowicz, J [Jacek], Chudoba, T. y Lojkowski, W [Witold] (2020). A Review of Microwave Synthesis of Zinc Oxide Nanomaterials: Reactants, Process Parameters and Morphologies. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/nano10061086>
- Zhang, X [Xiaoyu], Han, Y., Liu, W [Wenjiao], Pan, N., Li, D. y Chai, J. (2021). A novel synthesis of hexagonal cylinder-like ZnO with an excellent performance by a surfactant-free microemulsion-hydrothermal method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 97, 326–336. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.02.019>

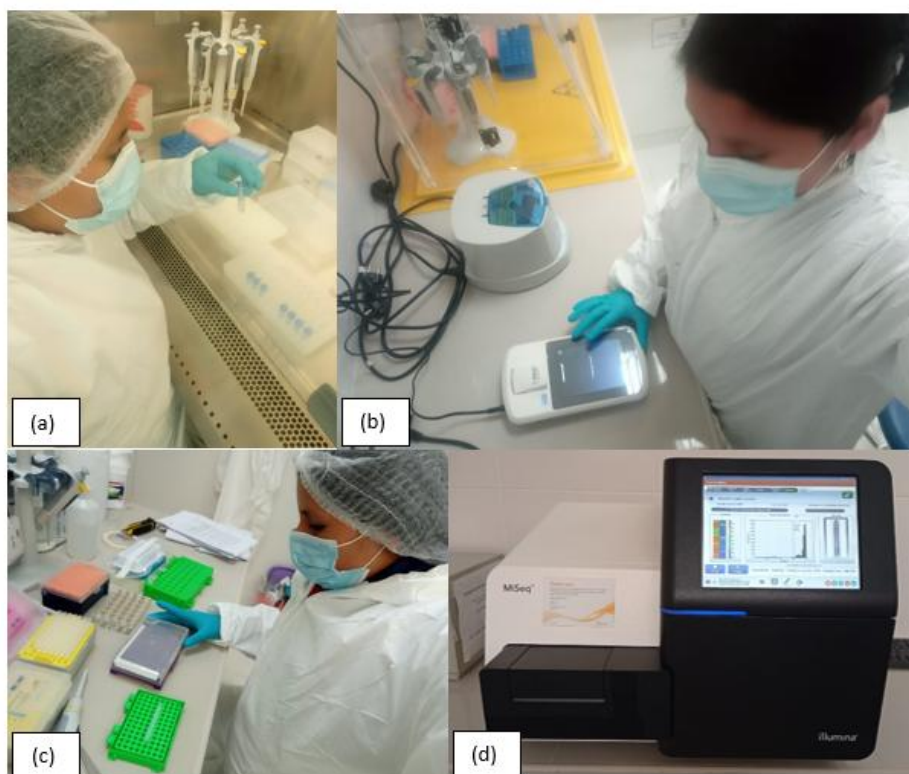
Zhou, S., Li, W., Liu, W [Wengang] y Zhai, J. (2023). Removal of metal ions from cyanide gold extraction wastewater by alkaline ion-exchange fibers. *Hydrometallurgy*, 215, 105992. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2022.105992>

ANEXOS

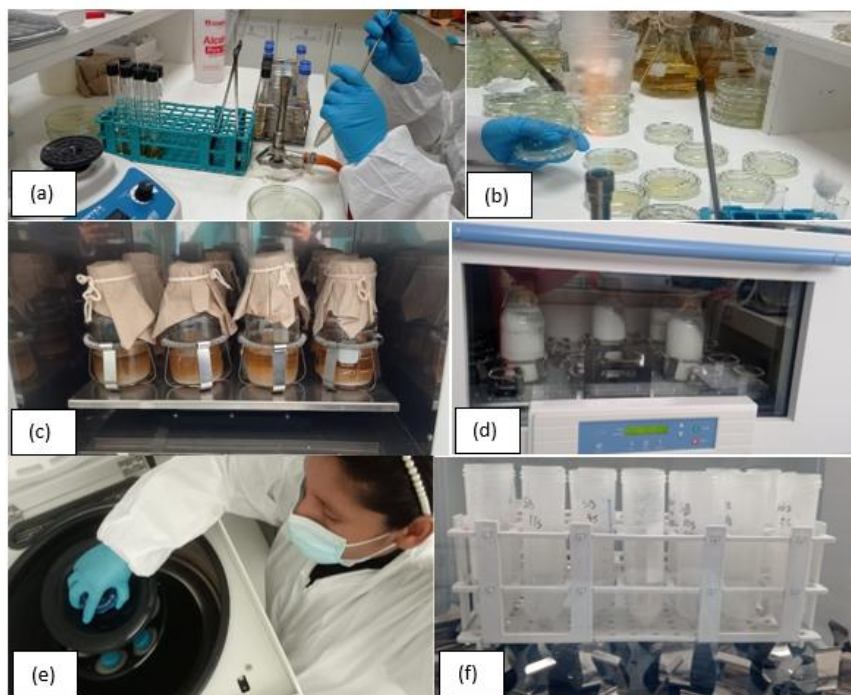
ANEXOS

En esta sección se muestra evidencia fotográfica de los procedimientos realizados para el desarrollo de la presente investigación.

Anexo 01. Procedimientos de identificación molecular



(a) Extracción de ADN bacteriano, (b) Medición de la concentración de ADN extraído, (c) Preparación de librerías genómicas y (d) Secuenciación NGS.

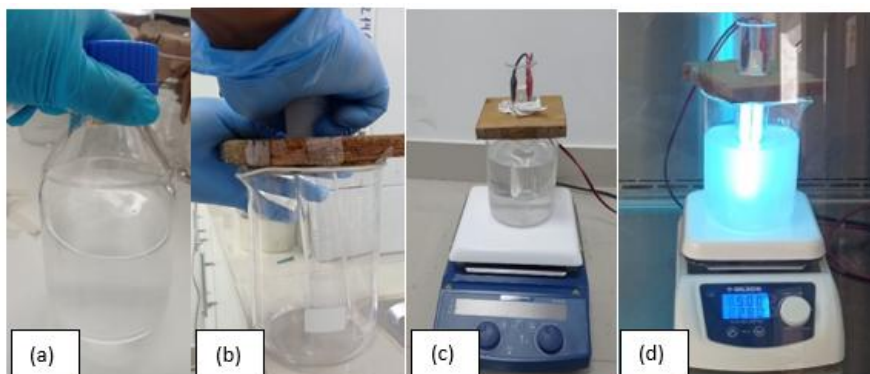
Anexo 02. Procedimientos de biosíntesis de NPs de ZnO

(a) Reactivación de cepa bacteriana *Bacillus sp.*, (b) Preparación de inóculo bacteriano en placa de A.N., (c) Masificación de cepa bacteriana *Bacillus sp.* en caldo de A.N., (d) Síntesis en solución precursora de NPs., (e) Concentración por centrifugación de producción biogénica y (f) Secado de producción biogénica.

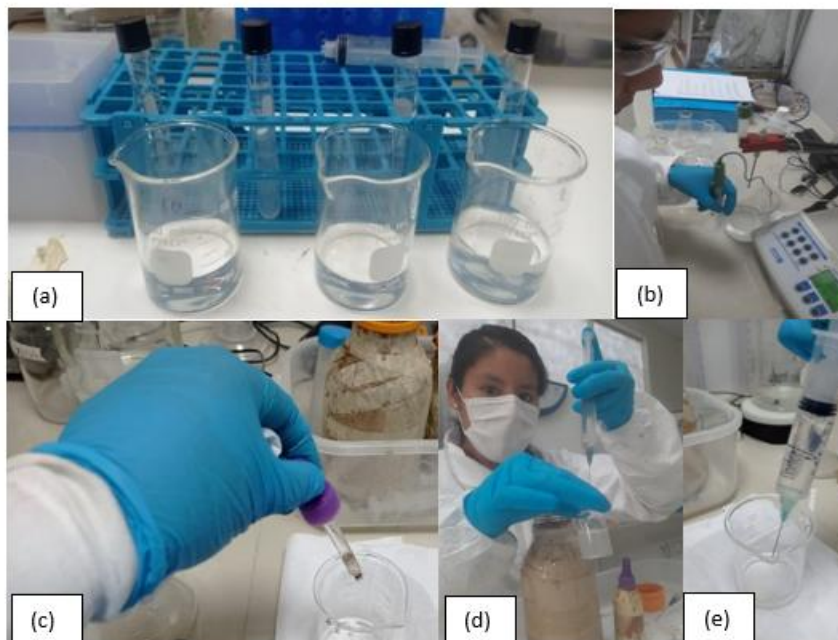
Anexo 03. Procedimientos de caracterización



(a) Caracterización por difracción de rayos X (XRD), (b) Cristalización de NPs de ZnO por calcinación, (c) Caracterización termogravimétrica (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) (d) Caracterización por espectroscopía UV-visible (e) Caracterización por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y (f) Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Anexo 04. Procedimientos de degradación fotocatalítica

(a) Solución de NaCN con NPs de ZnO biosintetizadas, (b) Armado de reactor de fotocatalisis, (c) Instalación de reactor de fotocatalisis con solución de NaCN y NPs de ZnO biosintetizadas y (d) Proceso de degradación fotocatalítica de CN^- .

Anexo 05. Procedimientos de medición del cianuro (CN^-)

(a) Alícuotas de solución cianurada de reactor de fotocátalisis, (b) Control de pH de solución cianurada de reactor de fotocátalisis, (c) Indicador de KI para valoración de CN^- y (d) Titulación con solución de AgNO_3 y (e) Valoración del gasto de solución de AgNO_3 titulado para determinar CN^- .

Anexo 06. Datos del proceso de degradación fotocatalítica de cianuro libre (CN⁻) con una concentración del catalizador de 0,5 mg/L de ZnO

Tiempo min		CC (100)		CC (200)		CC (300)		CC (400)		CC (500)	
		CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE
		ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%	ppm	%
10	R ₁	78	22,0	158	21,0	250	16,7	330	17,5	390	22,0
	R ₂	82	18,0	157	21,5	260	13,3	320	20,0	376	24,8
	\bar{x}	80,0	20,0	157,5	21,3	255,0	15,0	325,0	18,8	383,0	23,4
	σ	2,8	2,8	0,7	0,4	7,1	2,4	7,1	1,8	9,9	2,0
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
20	R ₁	70	30,0	140	30,0	140	53,3	200	50,0	248	50,4
	R ₂	68	32,0	142	29,0	136	54,7	202	49,5	248	50,4
	\bar{x}	69,0	31,0	141,0	29,5	138,0	54,0	201,0	49,8	248,0	50,4
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	2,8	0,9	1,4	0,4	0,0	0,0
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
30	R ₁	62	38,0	138	31,0	126	58,0	180	55,0	220	56,0
	R ₂	60	40,0	134	33,0	128	57,3	180	55,0	224	55,2
	\bar{x}	61,0	39,0	136,0	32,0	127,0	57,7	180,0	55,0	222,0	55,6
	σ	1,4	1,4	2,8	1,4	1,4	0,5	0,0	0,0	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
40	R ₁	56	44,0	128	36,0	124	58,7	168	58,0	210	58,0
	R ₂	58	42,0	124	38,0	124	58,7	166	58,5	208	58,4
	\bar{x}	57,0	43,0	126,0	37,0	124,0	58,7	167,0	58,3	209,0	58,2
	σ	1,4	1,4	2,8	1,4	0,0	0,0	1,4	0,4	1,4	0,3
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
50	R ₁	52	48,0	114	43,0	116	61,3	156	61,0	200	60,0
	R ₂	54	46,0	112	44,0	114	62,0	158	60,5	198	60,4
	\bar{x}	53,0	47,0	113,0	43,5	115,0	61,7	157,0	60,8	199,0	60,2
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	1,4	0,5	1,4	0,4	1,4	0,3
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
60	R ₁	50	50,0	102	49,0	112	62,7	148	63,0	196	60,8
	R ₂	48	52,0	100	50,0	110	63,3	146	63,5	194	61,2
	\bar{x}	49,0	51,0	101,0	49,5	111,0	63,0	147,0	63,3	195,0	61,0
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	1,4	0,5	1,4	0,4	1,4	0,3
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
90	R ₁	44	56,0	84	58,0	108	64,0	140	65,0	188	62,4
	R ₂	46	54,0	86	57,0	104	65,3	142	64,5	186	62,8
	\bar{x}	45,0	55,0	85,0	57,5	106,0	64,7	141,0	64,8	187,0	62,6
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	2,8	0,9	1,4	0,4	1,4	0,3
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
120	R ₁	38	62,0	72	64,0	102	66,0	138	65,5	184	63,2
	R ₂	40	60,0	76	62,0	100	66,7	136	66,0	180	64,0
	\bar{x}	39,0	61,0	74,0	63,0	101,0	66,3	137,0	65,8	182,0	63,6
	σ	1,4	1,4	2,8	1,4	1,4	0,5	1,4	0,4	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
150	R ₁	36	64,0	66	67,0	96	68,0	136	66,0	180	64,0
	R ₂	34	66,0	64	68,0	98	67,3	134	66,5	180	64,0
	\bar{x}	35,0	65,0	65,0	67,5	97,0	67,7	135,0	66,3	180,0	64,0
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	1,4	0,5	1,4	0,4	0,0	0,0
	C	98	2,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
180	R ₁	28	72,0	60	70,0	94	68,7	132	67,0	178	64,4
	R ₂	30	70,0	62	69,0	94	68,7	132	67,0	177	64,6
	\bar{x}	29,0	71,0	61,0	69,5	94,0	68,7	132,0	67,0	177,5	64,5
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1
	C	97	3,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0

Anexo 07. Datos del proceso de degradación fotocatalítica de cianuro libre (CN⁻) con una concentración del catalizador de 1 mg/L de ZnO

Tiempo min		CC (100)		CC (200)		CC (300)		CC (400)		CC (500)	
		CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE	CN ⁻	DE
		ppm	%	ppm	%	ppm	ppm	%	ppm	%	ppm
10	R ₁	68	32,0	148	26,0	220	26,7	240	40,0	360	28,0
	R ₂	70	30,0	144	28,0	224	25,3	250	37,5	370	26,0
	\bar{x}	69,0	31,0	146,0	27,0	222,0	26,0	245,0	38,8	365,0	27,0
	σ	1,4	1,4	2,8	1,4	2,8	0,9	7,1	1,8	7,1	1,4
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
20	R ₁	58	42,0	112	44,0	116	61,3	184	54,0	240	52,0
	R ₂	60	40,0	110	45,0	120	60,0	180	55,0	230	54,0
	\bar{x}	59,0	41,0	111,0	44,5	118,0	60,7	182,0	54,5	235,0	53,0
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	2,8	0,9	2,8	0,7	7,1	1,4
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
30	R ₁	52	48,0	90	55,0	112	62,7	172	57,0	216	56,8
	R ₂	54	46,0	92	54,0	112	62,7	168	58,0	212	57,6
	\bar{x}	53,0	47,0	91,0	54,5	112,0	62,7	170,0	57,5	214,0	57,2
	σ	1,4	1,4	1,4	0,7	0,0	0,0	2,8	0,7	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
40	R ₁	48	52,0	84	58,0	108	64,0	156	61,0	200	60,0
	R ₂	48	52,0	82	59,0	106	64,7	152	62,0	204	59,2
	\bar{x}	48,0	52,0	83,0	58,5	107,0	64,3	154,0	61,5	202,0	59,6
	σ	0,0	0,0	1,4	0,7	1,4	0,5	2,8	0,7	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
50	R ₁	42	58,0	80	60,0	104	65,3	150	62,5	196	60,8
	R ₂	44	56,0	80	60,0	100	66,7	148	63,0	196	60,8
	\bar{x}	43,0	57,0	80,0	60,0	102,0	66,0	149,0	62,8	196,0	60,8
	σ	1,4	1,4	0,0	0,0	2,8	0,9	1,4	0,4	0,0	0,0
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
60	R ₁	38	62,0	76	62,0	100	66,7	140	65,0	190	62,0
	R ₂	36	64,0	76	62,0	98	67,3	136	66,0	186	62,8
	\bar{x}	37,0	63,0	76,0	62,0	99,0	67,0	138,0	65,5	188,0	62,4
	σ	1,4	1,4	0,0	0,0	1,4	0,5	2,8	0,7	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
90	R ₁	32	68,0	70	65,0	96	68,0	130	67,5	188	62,4
	R ₂	32	68,0	72	64,0	94	68,7	130	67,5	184	63,2
	\bar{x}	32,0	68,0	71,0	64,5	95,0	68,3	130,0	67,5	186,0	62,8
	σ	0,0	0,0	1,4	0,7	1,4	0,5	0,0	0,0	2,8	0,6
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
120	R ₁	30	70,0	66	67,0	92	69,3	128	68,0	180	64,0
	R ₂	30	70,0	64	68,0	92	69,3	126	68,5	182	63,6
	\bar{x}	30,0	70,0	65,0	67,5	92,0	69,3	127,0	68,3	181,0	63,8
	σ	0,0	0,0	1,4	0,7	0,0	0,0	1,4	0,4	1,4	0,3
	C	100	0,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
150	R ₁	28	72,0	60	70,0	90	70,0	124	69,0	178	64,4
	R ₂	27	73,0	62	69,0	90	70,0	124	69,0	180	64,0
	\bar{x}	27,5	72,5	61,0	69,5	90,0	70,0	124,0	69,0	179,0	64,2
	σ	0,7	0,7	1,4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,3
	C	98	2,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0
180	R ₁	25	75,0	55	72,5	86	71,3	120	70,0	168	66,4
	R ₂	24	76,0	54	73,0	88	70,7	122	69,5	174	65,2
	\bar{x}	24,5	75,5	54,5	72,8	87,0	71,0	121,0	69,8	171,0	65,8
	σ	0,7	0,7	0,7	0,4	1,4	0,5	1,4	0,4	4,2	0,9
	C	97	3,0	200	0,0	300	0,0	400	0,0	500	0,0