

**SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE OXIDO DE TITANIO
Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SU TOXICIDAD AGUDA
EN EL RATON ALBINO**



INGRID ELIANA FERNANDEZ CAMPO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYAN
2016**

**SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE OXIDO DE TITANIO
Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SU TOXICIDAD AGUDA
EN EL RATON ALBINO**

Trabajo de Grado para optar para el título de Químico

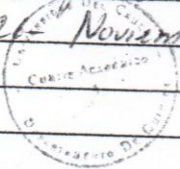
INGRID ELIANA FERNANDEZ CAMPO

Director:
Dr. JORGE ENRIQUE RODRIGUEZ PAEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
POPAYAN
2016**

Nota de aceptación

Aceptado por sustentación
el 29 de Noviembre - 2016



Director _____

[Signature]
Dr. JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ PÁEZ

Jurado _____

[Signature]
Dra. OLGA LUCIA HOYOS SAAVEDRA

Jurado _____

[Signature]
Dr. HAROLD BOLAÑOS BRAVO

Lugar y Fecha de Sustentación: Popayán, 29 de Noviembre 2016

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 GENERAL	3
1.2.2 ESPECIFICOS	3
1.3 BIBLIOGRAFIA	4
2. SINTESIS DEL TIO₂: EFECTO DE LA NATURALEZA DEL SOLVENTE Y DE LA PRESENCIA DEL SURFACTANTE	1
2.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	1
2.1.1 Características Físicoquímicas del TiO ₂	1
2.1.2 Estructura cristalina del TiO ₂	1
2.1.3 Usos del TiO ₂	3
2.1.4 Métodos de síntesis para la obtención del TiO ₂	3
2.1.5 Síntesis del TiO ₂ mediante rutas químicas	4
2.1.6 Surfactante CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio).....	19
2.2 METODOLOGIA.....	19
2.2.1 Reactivos y Solventes	19
2.2.2 Materiales y Equipos.....	20
2.2.3 Determinación de la concentración Micelar crítica.....	20
2.2.4 Síntesis del dióxido de titanio.....	20
2.2.5 Caracterización de los compuestos de dióxido de titanio	22
2.3 ANALISIS DE RESULTADOS	23
2.3.1 Determinación de la concentración micelar crítica	23
2.3.2 Síntesis del dióxido de titanio.....	25
2.3.3 Caracterización de los polvos sintetizados	33
2.4 CONCLUSIONES.....	59
2.5 BIBLIOGRAFIA	60
3. ESTUDIOS PRELIMINARES DEL TIO₂ SINTETIZADO POR SOL-GEL	64
3.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	64

3.1.1	Aspectos generales de la Toxicidad	64
3.1.2	Nanotoxicidad.....	66
3.1.3	Nanotoxicidad del TiO ₂	69
3.3.2	Interacciones de las nanopartículas en el organismo del modelo animal.....	72
3.2	METODOLOGIA.....	76
3.2.1	Reactivos y Solventes	76
3.2.2	Materiales y Equipos.....	76
3.2.3	Estudio de toxicidad aguda oral de TiO ₂	76
3.3	ANALISIS DE RESULTADOS	79
3.3.1	Estudio de toxicidad pre-morten	79
3.3.2	Estudios de Toxicidad Post-morten.....	83
3.4	CONCLUSIONES.....	88
3.5	BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXO 1.....		92
ANEXO 2.....		99

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Principales Características Fisicoquímicas del dióxido de titanio.....	1
Tabla 2.2 Parámetros estructurales de las fases más comunes del TiO ₂	2
Tabla 2.3 Ligandos usados comúnmente en el proceso sol-gel.....	8
Tabla 2.4 Tipo y Formula molecular de los Surfactantes más utilizados	12
Tabla 2.5 Principales Características Fisicoquímicas del CTAB	19
Tabla 2.6 Concentraciones de Surfactante (CTAB) empleadas en este trabajo y denominación asignada a cada una de las muestras sintetizadas usando como solvente etanol	21
Tabla 2.7 Concentraciones de surfactante (CTAB) empleadas y denominación asignada a cada una de las muestras sintetizadas en el presente trabajo, usando tolueno como solvente	21
Tabla 2.8 Principales bandas de absorción en IR para los polvos obtenidos en etanol y tolueno sin tratamiento térmico	35
Tabla 2.9 Tamaño de Cristalito de los sólidos sintetizados en tolueno, con diferentes concentraciones de CTAB y tratadas a 450 °C, para el pico de difracción (101) del TiO ₂	48
Tabla 2.10 Tamaño de Cristalito de los sólidos sintetizados en etanol, con diferentes concentraciones de CTAB y tratados a 450 °C, para el pico de difracción (101)	48
Tabla 3.1 Ítems de comida y su contenido TiO ₂ donde se especifica la cantidad por gramo de alimento (columna central) y el adaptado de acuerdo al tamaño de la porción (columna de la derecha).....	71
Tabla 3.2 Registro de los pesos de cada modelo animal empleado, durante el desarrollo del estudio	79
Tabla 3.3 Registro de los valores encontrados para ΔP , $\overline{\Delta P}$, %V y $\overline{\%V}$	82
Tabla 3.4 Pesos y coeficientes del hígado y riñón para cada animal utilizado en el estudio de toxicidad ...	84
Tabla 3.5 Valores de P para la prueba de levine y T student.....	85

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 Estructuras cristalinas del Dióxido de Titanio(5)</i>	2
<i>Figura 2.2 Etapas de formación de la resina en el proceso Pechini:</i>	4
<i>Figura 2.3 Esquema de las diferentes etapas del proceso Sol-gel (17)</i>	6
<i>Figura 2.4 Mecanismo de reacción mediante ataque nucleófilico (19)</i>	8
<i>Figura 2.5 Mecanismo de reacción mediante ataque electrófilico(19)</i>	9
<i>Figura 2.6 Estructuras obtenidas en: (a) medio ácido y (b) medio básico (19)</i>	9
<i>Figura 2.7 Molécula de Dodecil ester sulfato de sodio</i>	11
<i>Figura 2.8 Molécula típica de un Surfactante (25)</i>	11
<i>Figura 2.9 Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase (26)</i>	13
<i>Figura 2.10 Formación de un agregado de moléculas de surfactante o Micela en el agua. (28)</i>	13
<i>Figura 2.11. Disposición de Micela Normal (25)</i>	14
<i>Figura 2.12 Disposición de Micela Inversa(25)</i>	14
<i>Figura 2.13 Imagen transversal de micela normal y micela inversa (25)</i>	14
<i>Figura 2.14 Diagrama de fases surfactante-agua (25)</i>	15
<i>Figura 2.15 La variación de la tensión superficial Vs la concentración de surfactante permite determinar la Concentración Micelar Critica (28)</i>	15
<i>Figura 2.16 Comportamiento de algunas propiedades físicas de una suspensión frente a la concentración de surfactante (33)</i>	18
<i>Figura 2.17. Estructura del Surfactante Catiónico CTAB</i>	19
<i>Figura 2.18. Programa de tratamiento térmico utilizada para obtener los polvos cerámicos de TiO₂ sintetizados por el método sol-gel.</i>	22
<i>Figura 2.19 Curva de conductividad (μS) Vs concentración de CTAB (mM) en etanol para determinar la CMC del sistema</i>	24
<i>Figura 2.20 Esquema que muestra los estados por los que atraviesa un surfactante al variar su concentración en el medio</i>	24
<i>Figura 2.21 Mecanismo propuesto para la formación de las partículas de TiO₂ en etanol</i>	25
<i>Figura 2.22. Fotografías de las diferentes etapas del proceso de síntesis del TiO₂, en Etanol; en donde (a) representa a la solución de Etanol + CTAB sin temperatura, (b) solución Etanol+CTAB+TBT sin temperatura, (c) solución Etanol + CTAB+TBT a 35°C, (d) adición de agua a la solución anterior, (e) solución final en reposo, (f) aspecto obtenido después de 4 días de envejecimiento, (g) solido sometido a secado, (h) polvo tratado térmicamente y macerado</i>	28
<i>Figura 2.23 Mecanismo propuesto para la formación de las partículas de TiO₂ en Tolueno</i>	29
<i>Figura 2.24 Fotografías de las diferentes etapas del proceso de síntesis del TiO₂ en presencia de tolueno; en donde (a) es la solución de Tolueno +CTAB sin temperatura, (b) solución Tolueno+ CTAB a 35°C, (c) adición de TBT a la solución anterior, (d) inicio de la adición de agua a la solución, (e) terminación del proceso de adición de agua, (f) solución final en reposo, (g) aspecto de la solución transcurridos los 4 días de envejecimiento, (h) obtención de cristales después del proceso de secado, (i) polvo obtenido por la maceración de los cristales, (j) solido tratado térmicamente (calcinación)</i>	31
<i>Figura 2.25 Interacción Surfactante -Partícula</i>	31
<i>Figura 2.26 Mecanismo de adsorción del surfactante sobre la superficie de la partícula de TiO₂ a concentraciones bajas (1mM) (a), intermedias(2mM) (b), micelar critica (3mM)(c) y mayor a la CMC (6mM) (d), en Etanol.</i>	32

Figura 2.27 Mecanismo de adsorción del surfactante sobre la superficie de la partícula de TiO_2 a concentraciones bajas (1mM) (a), micelar crítica (3mM) (b) y mayor a la CMC (6mM) (d), en Tolueno.....	33
Figura 2.28 Espectros IR correspondientes a sólidos sintetizados sin y con la presencia de surfactante a diferentes concentraciones en Etanol (i) y Tolueno (ii), sin tratamiento térmico.....	34
Figura 2.29 Espectros IR correspondientes a sólidos de TiO_2 sintetizados sin y con surfactante a diferentes concentraciones en Etanol (i) y Tolueno (ii), tratados a 450°C.....	35
Figura 2.30 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) sin surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450 °C (b).....	36
Figura 2.31 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango 1000-400 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) sin surfactante, tratadas térmicamente a 450 °C.....	37
Figura 2.32 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 1mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b).....	38
Figura 2.33 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango 1000-400 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) a una concentración 1mM de CTAB, tratadas térmicamente a 450 °C.....	39
Figura 2.34 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango 1000-400 cm^{-1} , del TiO_2 sintetizados en etanol a una concentración 1mM de CTAB, tratadas térmicamente a 450 °C.....	39
Figura 2.35 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etano, a una concentración 2mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450 °C (b).....	40
Figura 2.36 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango 1000-400 cm^{-1} de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) a una concentración 3mM de CTAB, tratadas térmicamente a 450 °C.....	40
Figura 2.37 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 3mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b).....	41
Figura 2.38 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b).....	42
Figura 2.39 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b).....	43
Figura 2.40 Valores de área integrada correspondientes a los enlaces más relevantes obtenidos en los espectros IR deconvolucionados, entre 1000 y 400 cm^{-1} , para las muestras sintetizadas en etanol (a) y en tolueno (b), tratadas a 450 °C.....	44
Figura 2.41 Difractogramas de Rayos X correspondientes a los sólidos sintetizados en etanol, sin surfactante (a) y con una concentración de surfactante 3mM (b), sin tratamiento térmico.....	45
Figura 2.42 Difractogramas de Rayos X correspondientes a muestras sintetizadas en tolueno sin surfactante (a) y con una concentración de surfactante 3mM (b), sin tratamiento térmico.....	46
Figura 2.43 Difractogramas de Rayos X correspondientes a los sólidos obtenidos en etanol sin surfactante (a) y utilizando las siguientes concentraciones de CTAB: (b) 1mM, (c) 2mM, (d) 3mM, y (e) 6mM, tratados térmicamente a 450°C.....	47
Figura 2.44 Difractogramas de Rayos X correspondientes sólidos sintetizados en tolueno sin surfactante (a) y con diferentes concentraciones de CTAB: (b) 1 mM, (c) 3 mM (d) 6 mM, tratados térmicamente a 450°C. 47	47
Figura 2.45 Micrografías MET correspondientes a sólidos obtenidos sin surfactantes en etanol, y sin tratamiento térmico (a) y tratado térmicamente a 450 °C (b).....	49
Figura 2.46 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 1mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a).....	50
Figura 2.47 Micrografías MET correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, con una concentración 1 mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratado térmicamente a 450°C (b).....	50

<i>Figura 2.48 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 2mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y (b) o tratadas térmicamente a 450 °C (c).</i>	51
<i>Figura 2.49 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 3mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) o tratada a 450 °C (b)</i>	52
<i>Figura 2.50 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol con una concentración 6mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a).....</i>	53
<i>Figura 2.51 Fotografías obtenidas con MEB del TiO₂ sintetizado en etanol, sin presencia de surfactante, tratado térmicamente a 450 °C</i>	54
<i>Figura 2.52 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en este trabajo, con una concentración 1mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) o tratada a 450 °C (b).....</i>	55
<i>Figura 2.53. Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados, con una concentración 2mM de CTAB, y tratados térmicamente a 450 °C.....</i>	55
<i>Figura 2.54 Micrografías obtenidas con MEB de solidos sintetizados, con una concentración 3mM de CTAB y tratada térmicamente a 450 °C.....</i>	55
<i>Figura 2.55 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados con una concentración 6mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) (muestra 18.1) y tratada a 450 °C (b) (muestra 18.5)</i>	56
<i>Figura 2.56 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, sin presencia de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450 °C (b).....</i>	57
<i>Figura 2.57 Micrografías obtenidas con MEB de sólidos obtenidos en tolueno, a una concentración 3mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450°C(b).....</i>	58
<i>Figura 2.58 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450°C(b).....</i>	58
<i>Figura 3.1 comparación de una célula macrófaga de rata con el tamaño de una nanopartícula (a escala). Los macrófagos humanos son hasta dos veces más grandes que los macrófagos de rata (8)</i>	67
<i>Figura 3.2 Esquema del proceso de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) donde la exposición interna es la parte de la dosis externa que alcanza la circulación sistémica. Las líneas negras representan rutas confirmadas para las Nanopartículas y las líneas a trazos representan rutas hipotéticas. Las velocidades de transporte y tiempos de retención para los procesos indicados son en gran parte desconocidos.(10).....</i>	68
Figura 3.3 Estadística de los artículos científicos publicados sobre: (a) nanomateriales y (b) su toxicidad (ISI web de ciencia) (8).....	69
Figura 3.4 Histograma que muestra la distribución de tamaño de partícula del TiO₂ en un lote del aditivo alimenticio E171 (15)	70
Figura 3.5 Interacciones hipotéticas de las nanopartículas con la célula. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico. La inflamación y estrés oxidativo pueden ser generados por diversas vías primarias, tal como se indica en el texto (2).....	73
Figura 3.6 Posibles mecanismo por los cuales los nanomateriales interactuarían con tejidos biológicos (22)	74
Figura 3.7 Esquema de los eventos moleculares a través de los cuales las nanopartículas generarían efectos tóxicos a nivel celular (8).....	74
Figura 3.8 Representación esquemática de las dosis empleadas en el estudio y la cantidad de animales usados en cada una de ellas.....	77
Figura 3.9 Variación del peso de los ratones en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO₂-NPs, para el grupo denominado “Blanco”.	80
Figura 3.10 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO₂-NPs con una dosis de 5mg/Kg, de los ratones del grupo 1A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 1B dosificados con TiO₂ sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5)	80

Figura 3.11 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO ₂ -NPs con una dosis de 50 mg/Kg, de los ratones del grupo 2A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 2B dosificados con TiO ₂ sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5).....	81
Figura 3.12 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO ₂ -NPs con una dosis de 300 mg/Kg, de los ratones del grupo 3A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 3B dosificados con TiO ₂ sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5).....	81
Figura 3.13 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado tomada del grupo control.....	86
Figura 3.14 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 5mg/Kg de TiO ₂ sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5).....	86
Figura 3.15 Imágenes MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 50mg/Kg de TiO ₂ sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5)	87
Figura 3.16 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 300mg/Kg de TiO ₂ sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5).....	87

LISTA DE ACRONIMOS

AC	Ácido cítrico
ADME	(Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción)
CTAB	Bromuro de cetiltrimetil Amonio
CMC	Concentración Micelar Critica
EFSA	Difracción de rayos X
EG	Etilenglicol
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
FTIR	Espectroscópica Infrarroja con Transformada de Fourier
FP	Partícula Fina
GIT	Tracto gastrointestinal
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alterna
IARC	Agencia internacional para la investigación sobre cáncer
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IR	Infrarrojo
MA	Aleación Mecánica
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
MM	Molienda Mecánica
NCPI	Inventores de productos de consumo nanotecnológico
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMMA	Polimetilmetacrilato
RM	Reacciones de Molienda
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SM	Síntesis Mecanoquímica
TBT	Tetrabutoxido de titanio
UV	Ultravioleta
α	Porcentaje de error

RESUMEN

El dióxido de titanio (TiO_2), ha sido usado ampliamente, como pigmento desde su producción comercial en la década de 1920. Su bajo costo lo convierten en un ingrediente especial para pinturas, ungüentos, colorantes alimenticios y protectores solares. Dado que absorbe radiación electromagnética principalmente en la región UV, es empleado como un fotocatalizador para degradar moléculas orgánicas en procesos para la purificación del agua. Por estas y otras aplicaciones debido a sus propiedades, es empleado actualmente en cantidades apreciables por la sociedad, despertando un mayor interés sobre el riesgo y la seguridad de este material. Entre las exposiciones de mayor frecuencia al TiO_2 se encuentra la vía oral, la cual presenta periodos de exposición durante la ingesta de alimentos (pigmentos alimenticios) o la deglución de mucosa (expulsión de NPs provenientes de los pulmones por inhalación). Estos antecedentes llevaron a plantear un estudio preliminar de toxicidad aguda oral de nanopartículas de TiO_2 sintetizadas a través de una ruta química para evaluar así su acción sobre el ratón albino.

En este trabajo se sintetizó dióxido de Titanio (TiO_2) a través del método químico Sol-gel. Se utilizó como precursor de titanio el tetrabutoxido de titanio (TBT), que se mezcló con agua, empleando como solvente de síntesis (etanol o tolueno) y como surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), compuesto que favoreció la formación de micelas reduciendo la presencia de aglomerados en el sistema y limitando el crecimiento de las partículas; Sintetizado este sólido, se definió la temperatura óptima de tratamiento térmico para obtener el óxido de interés. Las características del polvo cerámico de TiO_2 se determinaron empleando FT-IR, DRX, MET y MEB. La fase cristalina que predominó en las muestras sintetizadas fue la anatasa, las partículas presentaron diferentes formas (morfologías irregulares para el solvente tolueno, y de tipo esférico y aguja para el solvente etanol), dependiendo de la concentración de surfactante (CTAB) y del solvente de síntesis, con un tamaño nanométrico < 100 nm, en promedio. Posteriormente se llevaron a cabo estudios de toxicidad aguda en un modelo animal (ratón albino suizo), usando como protocolo la metodología de la directriz OECD-420. Para ello se evaluaron 3 concentraciones (5mg/Kg, 50 mg/Kg y 300 mg/Kg) de TiO_2 , tomando un grupo control. El seguimiento de los ejemplares, se realizó por 15 días durante los cuales se registró el peso corporal de los ratones, obteniendo un mayor decrecimiento y porcentaje de variación de los pesos en los grupos dosificados con las nanopartículas sintetizadas en etanol. Finalizada esta actividad, se llevó a cabo la eutanasia de los mismos y se evaluaron sus órganos (riñón, hígado) para determinar la bioacumulación de nanopartículas en ellos, a través de la técnica de absorción atómica para cuantificar el titanio, el cual no fue detectado por el equipo. El análisis ultraestructural del hígado, se llevó a cabo mediante el análisis de biopsias con MET, este mostro daños a nivel celular mas específicamente en la mitocondria y el espacio de disse, este fenómeno fue mas evidente las dosis de 300mg/Kg.

La adición de surfactante en el medio de síntesis modificó la morfología, el tamaño y el estado de agregación de las partículas, dando como resultado formas irregulares, de mayor estado de agregación y tamaño (1-5 μm) para el solvente tolueno, mientras que la síntesis en etanol mostro morfologías de tipo esférico y aguja con una tamaño ($<100\text{nm}$) y aglomeración menor a las nombradas anteriormente; estas diferencias generaron efectos en los valores de pesos de los

especímenes del estudio, en donde las partículas sintetizadas en etanol ocasionaron una mayor pérdida de peso durante el desarrollo del mismo. La no detección del titanio en los órganos seleccionados (riñón e hígado) es un indicador de que el proceso de bioacumulación pudo llevarse a cabo en otros órganos del cuerpo como los intestinos, aun así es evidente el efecto generado por el TiO_2 en la inapetencia y falta de absorción de nutrientes que llevaron a la pérdida de peso de los grupos dosificados; el análisis microestructural mostró un alto estado de toxicidad en donde las funciones del hígado se vieron gravemente afectadas. Para establecer con mayor claridad los efectos generados de las nanopartículas durante el transcurso del estudio es necesario el plantear estudios de mayor especificidad como lo son un cuadro hemático, análisis de orina, materia fecal y el estudio histológico de otros órganos.

1. INTRODUCCION

Durante los últimos diez años la nanociencia y la nanotecnología han logrado grandes avances debido a las propiedades únicas que presentan los sistemas de tamaño nanométrico que en ellas se consideran, como es el caso de las nanopartículas (NPs, Nanoparticles) (NPs ; <100 nm) (1). Estos desarrollos se han dado principalmente en microelectrónica, catálisis, física, óptica, en la fabricación de cosméticos, la liberación controlada de drogas, entre otros (2), propiciando campos novedosos de estudio como por ejemplo en medicina (nanomedicina) y remediación medioambiental (fotodegradación de moléculas orgánicas contaminantes), etc. (2).

El dióxido de titanio (TiO_2) es actualmente uno de los nanocompuestos más utilizados para la fabricación de productos de consumo (pastas de dientes, cosméticos y productos alimenticios), implantes, pinturas, revestimientos de superficies y en la descontaminación ambiental del aire, suelo y agua (3). El TiO_2 existe en la naturaleza en tres diferentes fases cristalinas (anatasa, rutilo y brookita). Sin embargo, sólo las dos primeras estructuras son naturales y de interés industrial, tal que la fase anatasa es considerada como la que presenta más efectos biológicos adversos: citotoxicidad, respuestas inflamatorias, y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) en una variedad de células y tejidos (2).

El TiO_2 es obtenido a través de diferentes métodos, entre los que se destacan: sol-gel (4), hidrólisis directa de una sal de titanio (5), deposición química en fase vapor (6), hidrotermal (7), precipitación controlada (8) y pechini (4), entre otros. Para mejorar las características del TiO_2 , y optimizar su funcionalidad, se han estructurado una serie de procesos entre los que se considera el uso de micelas, normal e inversa, buscando favorecer la formación de nanoreactores o nanomoldes; estas nanocavidades generan pequeños espacios que limitan la nucleación y el crecimiento de las partículas, contribuyendo a un mayor control de la morfología y el tamaño de las mismas (3); estas características, así como la fase cristalina presente, son las que definen las propiedades del material y las que hay que controlar para optimizar su funcionalidad. Con el fin de dar cumplimiento a este objetivo, se determinará el efecto del uso de un surfactante (CTAB, Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) y la naturaleza del solvente (uno polar y otro apolar) sobre las características finales de las partículas y su grado de aglomeración, siendo

este último aspecto un problema común en los trabajos que se reportan en la literatura científica sobre este óxido(4).

En contraste al rápido avance de la nanotecnología, que suministra una gran variedad de nanomateriales para diversas aplicaciones, la nanotoxicidad de las nanopartículas no se ha desarrollado a la misma velocidad (9). La sociedad está demandando un mayor conocimiento del riesgo del uso de estos nanomateriales para propiciar un desarrollo sostenible, lo que requiere mayor información sobre los riesgos de salubridad que surgen cuando los trabajadores y los consumidores se exponen a las nanopartículas (10). Para ello hay que identificar cuáles de sus características (tamaño, área superficial, forma, composición química y reactividad superficial) son las más importantes para explicar su reactividad biológica. Se ha encontrado que las NPs tienen la habilidad de interactuar y atravesar barreras biológicas generando procesos de translación eficientes, que pueden permitir su acceso a la circulación de la sangre propiciando una toxicidad sistémica. En el caso de los mecanismos celulares, las nanopartículas, podrían inducir ciertos efectos debido a su potencial capacidad de generar estrés oxidativo, aunque pueden ocurrir otros mecanismos de toxicidad propiciados por la interacción de las nanopartículas.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El rápido crecimiento en el campo de la nanotecnología ha generado, en el mercado mundial, un aumento del 185% en el número de consumidores de estos productos, ubicando a más de 20 países como fabricantes y comercializadores de más de 600 variedades de diferentes artículos de consumo relacionados con la nanotecnología, siendo los cosméticos los de mayor producción y consumo (NCPI, Nanotechnology Consumers Products Inventor) (NCPI, 2006). El alto posicionamiento de este tipo de productos ha despertado inquietudes entre el público y la comunidad científica, con relación a la seguridad y toxicidad de las NPs (11).

Es de interés para esta investigación, examinar e investigar, el efecto de la adición de un surfactante y la naturaleza del solvente sobre el tamaño, distribución de tamaño, morfología y grado de aglomeración, así como fase cristalina que presentaban las partículas de TiO_2 sintetizadas por una ruta química. Desde el punto de vista nanotoxicológico, se determinó la toxicidad de estas NPs de TiO_2 realizando un estudio preliminar para determinar los efectos adversos que ellas generaban, considerando su naturaleza nanométrica, en un modelo animal (ratón Albino).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL

Determinar la toxicidad aguda de las nanopartículas de TiO_2 sintetizadas por una ruta química, en presencia de micelas, realizando una evaluación preliminar de su acción sobre ratones albinos.

1.2.2 ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones óptimas de síntesis de óxido de titanio (TiO_2), utilizando el método sol-gel, considerando la naturaleza del solvente de síntesis y la adición de un surfactante para favorecer la formación de micelas en el sistema.

- Determinar la influencia del surfactante catiónico adicionado y la naturaleza del solvente empleado sobre las características del óxido de titanio sintetizado, específicamente sobre el tamaño, morfología y grado de aglomeración de las partículas, así como de la fase cristalina presente en ellas.
- Evaluar, de manera preliminar, el efecto de toxicidad aguda y la bioacumulación de las nanopartículas de TiO₂ en un modelo animal, utilizando para ello las metodologías respectivas y espectrometría de absorción atómica

1.3 BIBLIOGRAFIA

1. Klabunde KJ, Richards RM. *Nanoscale Materials in Chemistry*. 2nd ed. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2009. 807 p.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113(7):823 - 839.
3. Lee MS, Park SS, Lee G-D, Ju C-S, Hong S-S. Synthesis of TiO₂ particles by reverse microemulsion method using nonionic surfactants with different hydrophilic and hydrophobic group and their photocatalytic activity. *Catal Today*. 2005;101(3-4):283-290.
4. Ochoa Y, Ortegón Y, Vargas M, Rodríguez-Páez JE. Síntesis de TiO₂, Fase Anatasa, por el método PECHINI. *Rev Latinoam Metal y Mater*. 2009;S1(3):931-937.
5. Lee MS, Lee GD, Ju CS, Hong SS. Preparations of nanosized TiO₂ in reverse microemulsion and their photocatalytic activity. *Sol Energy Mater Sol Cells*. 2005;88(4):389-401.
6. Junwei H, Xiuchun Y, Xiaoyi L, Huang M, Qingyao W, Jun W. Controlled synthesis of TiO₂ mesoporous microspheres via chemical vapor deposition. *J Alloys Compd*. Elsevier B.V.; 2012;511(1):202-208.
7. Yoshida R, Suzuki Y, Yoshikawa S. Syntheses of TiO₂(B) nanowires and TiO₂ anatase nanowires by hydrothermal and post-heat treatments. *J Solid State Chem*. 2005 Jul;178(7):2179-2185.
8. Mouret G, Mozet K, Muhr H, Plasari E, Martin M. Production of Al₂O₃-TiO₂ catalyst supports with controlled properties using a co-precipitation process. *Powder Technol*. Elsevier B.V.; 2009 Mar;190(1-2):84-88.
9. Brayner R, Fiever F, Thibaud C. *Nanomaterials: A Danger or a Promise?: A Chemical and Biological Perspective*. 1st ed. London: Springer London; 2013. 407 p.
10. Grassian VH. *Nanoscience and Nanotechnology: Environmental and Health Impacts*. 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. 470 p.

11. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett.* 2009;185(3):211–218.

2. SINTESIS DEL TiO₂: Efecto de la naturaleza del solvente y de la presencia del surfactante

2.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1.1 Características Físicoquímicas del TiO₂

El titanio, el noveno elemento más abundante en la corteza de la tierra y se encuentra ampliamente distribuido, su concentración promedio es aproximadamente 4400mg/Kg. Debido a su gran afinidad por el oxígeno y otros elementos, este no existe en estado metálico en la naturaleza. El estado de oxidación más común del titanio es el +4 pero los estados +3 y +2 también existen. Entre los compuestos más ampliamente usados en la industria se encuentran: el Ti metálico, el TiO₂ y el TiCl₄. El dióxido de titanio, con numeración química CAS-No.13463-67-7, también es conocido como óxido de titanio (IV), ácido titánico anhídrido, Titania, o titanio blanco, y es el óxido de origen natural del Ti. El TiO₂ es un polvo blanco incombustible e inodoro (1) y sus principales características físicoquímicas se indican en la **Tabla 2.1**:

Tabla 2.1 Principales Características Físicoquímicas del dióxido de titanio (1–3)

Apariencia	Sólido, blanco
Peso molecular	79,9g/mol
Punto de Fusión	1843°C
Punto de Ebullición	2972°C
Densidad	Anatasa 3,79 g/cm ³
	Rutilo 4,13 g/cm ³
	Brookita 3,99 g/cm ³
	TiO ₂ (B) 3,64 g/cm ³
Índice de Refracción	Anatasa 2.561, 2.488
	Rutilo 2.605-2.616, 2.890, 2.903
	Brookita 2.583-2.700
Dureza en la escala de Mohs	Anatasa 5.5-6
	Rutilo 6-6.5
	Brookita 5.5-6
Calor específico	(683-697) J/Kg.K
Conductividad térmica	(4.8-11.8) W/m.K
Constante dieléctrica	(80-100)
resistividad	(10 ¹³ -10 ¹⁸) Ohm.cm
Solubilidad	Soluble en ácido sulfúrico y álcalis; insoluble en agua

2.1.2 Estructura cristalina del TiO₂

El dióxido de titanio cristaliza, principalmente, en 4 diferentes estructuras (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.): Rutilo (tetragonal), Anatasa (tetragonal), Brookita (ortorrómbica), and

TiO₂ (B) (monoclónica). También presenta otras estructuras, por ejemplo la Cotunnita TiO₂ que ha sido sintetizada a alta presión y es uno de los materiales policristalinos más duros conocidos. Considerando la coexistencia de varias fases de TiO₂, una de ellas debería tener el mínimo de energía libre de Gibbs y las otras tendrían una energía submínima. Comúnmente, la fase anatasa es la que presenta el óxido cuando se sintetiza a temperatura ambiente mientras que la fase rutilo es la que se obtiene a altas temperaturas. En la **Tabla 2.2** se listan los principales parámetros estructurales de las diferentes fases que presenta el TiO₂ (4).

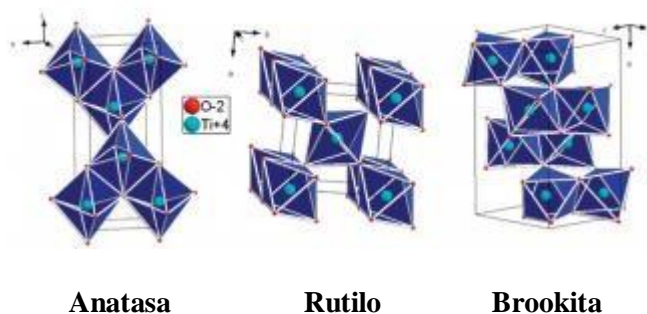


Figura 2.1 Estructuras cristalinas del Dióxido de Titanio(5)

Tabla 2.2 Parámetros estructurales de las fases más comunes del TiO₂ (4)

Forma Cristalina	Sistema Cristalino	Grupo espacial	Densidad (g/cm ³)	Parámetros de la celda unitaria			
				a/nm	b/nm	c/nm	β/deg
Anatasa	Tetragonal	I4 ₁ /amd	3.83	0.379		0.951	
Rutilo	Tetragonal	P4 ₂ /mnm	4.24	0.459		0.296	
Brookita	Ortorrómico	Pbca	0.17	0.918	0.545	0.515	
TiO ₂ (B)	monoclónico	Pbca	3.64	1.216	0.374	0.651	107.3

En las aplicaciones del TiO₂, las fases rutilo y anatasa juegan un papel importante, en ambas estructuras el bloque de construcción básico es el octaedro de Ti ([TiO₆]) el cual consiste de un átomo de titanio rodeado por seis átomos de oxígeno, con una mayor o menor distorsión de la configuración octaédrica tal que los dos enlaces titanio – oxígeno en el octaedro (en el mismo plano o en los ápices) pueden ser ligeramente diferentes; una considerable desviación de 90°, en el ángulo de enlace, es observada en la anatasa. En el rutilo, los octaedros vecinos comparten una esquina, a lo largo del plano (110), y están apilados a lo largo de su eje C, alternados por 90°. En la anatasa, los octaedros comparten esquinas en el plano (001) y están conectados con los bordes del plano del octaedro de abajo. En todas las tres estructuras, el apilamiento de los octaedros resulta en la triple coordinación de los átomos de oxígeno (2).

La anatasa y el rutilo presentan un valor de energía de la banda prohibida (“band gap”) de 3.2 (387nm) y 3.0 eV (413nm), respectivamente. Estas diferencias en los valores de energía del band gap y por lo tanto en su absorción de radiación, tendrían su origen en sus diferencias estructurales propiciadas tanto por la longitud de enlace como por el apilamiento de los octaedros [TiO₆], los

cuales ocasionarían diferentes acoplamientos entre los orbitales $2p$ del oxígeno y los orbitales $3d$ del titanio; la justificación de estas diferencias en el valor del band gap parece más sencilla, a primera vista, cuando se considera el cambio en la longitud del enlace Ti-O en el rutilo y la anatasa (4).

2.1.3 Usos del TiO_2

El dióxido de titanio es un pigmento blanco y debido a su brillo y alto índice de refracción, así como a sus propiedades fisicoquímicas (*Tabla 2.1*), es ampliamente usado; aproximadamente cuatro millones de toneladas son consumidas como pigmento anualmente alrededor del mundo. Este representa el 70% del volumen total de producción de pigmentos en todo el mundo(6), y está entre las 5 Nanopartículas (NPs) más utilizadas en los productos de consumo (7). El TiO_2 es empleado en pinturas, recubrimientos, plásticos, papeles, tintas, medicamentos, productos farmacéuticos, productos alimenticios, cosméticos, protectores solares y pasta dental, incluso como pigmento para blanquear leche descremada. Las propiedades físicas únicas del TiO_2 lo hacen ideal para su uso en diferentes productos para el cuidado de la piel y como agente antibacterial, bajo irradiación de luz UV(1). Además, el TiO_2 ha sido usado como componente para la articulación de implantes óseos, especialmente para cadera y rodilla (1).

Las NPs del TiO_2 son producidas en abundancia y ampliamente utilizadas debido a su alta estabilidad, así como por sus propiedades anticorrosivas y fotocatalíticas (8). Algunos investigadores han atribuido el aumento de su actividad catalítica a su elevada área superficial, razón por la cual es el semiconductor más utilizado en reacciones catalíticas, concretamente fotocatalíticas, para el tratamiento de agua contaminada, con subproductos industriales peligrosos, y en celdas solares nanocristalinas, como material fotoactivo. La utilización industrial del efecto fotocatalítico ha sido dirigida hacia otras aplicaciones, especialmente para fines de auto-limpieza y anti-empañamiento de baldosas, ventanas y textiles autolimpiables. En el campo de la nanomedicina, el TiO_2 está bajo investigación como herramienta útil en la formación de imágenes avanzadas y nanoterapia, siendo considerado como potencial fotosensibilizador para uso en terapia fotodinámica (1).

2.1.4 Métodos de síntesis para la obtención del TiO_2

2.1.4.1 Síntesis industrial del TiO_2

Una de las principales formas de producción industrial del dióxido de titanio es “vía sulfato”, utilizando como materias primas ilmenita (que contiene principalmente Fe_2TiO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) (9).

El proceso de producción de TiO_2 consta esencialmente de 8 etapas fundamentales. Comienza con la **etapa de molienda y digestión** (9) del mineral, en donde el mineral se muele hasta que las partículas alcanzan las 50 micras, tamaño óptimo para que la posterior reacción con ácido sulfúrico sea lo más eficiente posible. Mediante aire caliente, se efectúa el transporte y secado del mineral molido.

A continuación se procede a la **separación de los denominados lodos inatacados**, producto de la anterior reacción. Dicho proceso se lleva cabo en decantadores, mediante la adición de floculante

que favorezca la precipitación de los sólidos en suspensión, propiciando así la **precipitación** de la mayor parte de los inatacados de ilmenita y favoreciendo la formación del TiO_2 (9).

2.1.5 Síntesis del TiO_2 mediante rutas químicas

2.1.5.1 Síntesis Hidrotermal

Se basa en el calentamiento de los precursores de titanio (sales metálicas, óxidos, hidróxidos o polvos metálicos, entre otros), en solución o suspensión en un líquido (frecuentemente agua), a elevada temperatura y presión (implementación de autoclaves), normalmente por encima de 300°C y alrededor de 100 MPa.

Esas temperaturas y presiones extremas obligan a que, en el seno del sistema, se propicien transformaciones de fase, a través de procesos de solubilización, hidrólisis u oxidación, reprecipitación entre otros, lo cual no sería posible a condiciones normales. Cuando la concentración del producto resultante alcanza un valor adecuado, denominado límite de sobresaturación, en la solución comienza a generarse la fase sólida con la formación inicial, de pequeños núcleos en su interior (proceso de nucleación homogénea). Estos son las “semillas” requeridas para que, sobre ellas, crezcan las partículas que conformaran el precipitado que posteriormente, a través de tratamientos térmicos, permitirá la obtención del producto de interés. La nucleación y el crecimiento de las partículas ocurren bajo las condiciones especiales, indicadas anteriormente, que podrían permitir obtener un óxido o partículas metálicas submicrométricas, o nanométricas, con forma y tamaño de partícula controlado (10,11).

2.1.5.2 Método Pechini

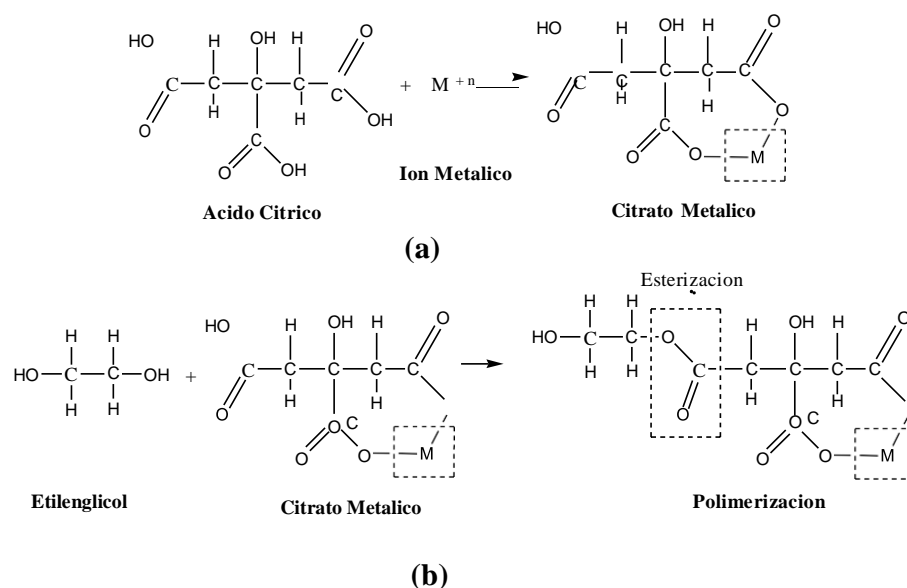


Figura 2.2 Etapas de formación de la resina en el proceso Pechini:
(a) Esterificación y (b) poliesterificación.

Este método consiste en la síntesis de un poliéster a partir de una reacción de poliesterificación entre un polialcohol, generalmente etilenglicol (EG), con un ácido carboxílico, generalmente el ácido cítrico (AC), considerando la adición previa, a esta solución viscosa, de las sales de los cationes de

interés. Esta mezcla debe llevar a la conformación de una disolución líquida transparente sometiendo a tratamientos térmicos y a continua agitación. Como en el sistema se encuentran los cationes de interés es posible que se conformen quelatos polibásicos o de naturaleza ácida, que posteriormente, por calentamiento, experimenten polimerización dando origen a una resina viscosa (12).

La quelación del catión ocurre por acción de la temperatura, acción que se puede esquematizar como se indica en la *Figura 2.2(a)*. Por otro lado, la poliesterificación del citrato metálico con el etilenglicol, que también ocurre por acción de la temperatura, y se puede representar como se ilustra en la *Figura 2.2(b)* (12)..

2.1.5.3 Síntesis vía Combustión

Es un proceso simple que utiliza una reacción química muy rápida y exotérmica para formar el producto deseado. La característica principal del proceso es que el calor requerido para conducir la reacción es suministrado, principalmente, por la propia reacción y no por una fuente externa. En las reacciones vía combustión, los reactivos que se emplean como fuentes de los cationes de interés son, normalmente, nitratos y carbonatos metálicos, y como combustibles, o agentes reductores, urea-CO (NH₂)₂, Glicina-NH₂CH₂COOH, TFTA-C₁₄H₁₆N₆O₂, ODH-C₂H₆N₄O₂, etc. (13,14).

Durante el proceso, usando una fuente externa de calor los nitratos metálicos, precursores de los cationes para la formación del óxido metálico, son forzados a reaccionar con el combustible reductor, definido para tal fin, de manera rápida, exotérmica y auto-sostenida. Por simple calcinación, los nitratos metálicos pueden descomponerse en los óxidos metálicos de interés; el suministro constante de calor externo es necesario para mantener el sistema a alta temperatura y así propiciar que se genere la transición de fase adecuada(13,14).

La descomposición del combustible y de los nitratos da como resultado una rápida evolución de un gran volumen de gas así como de partículas grandes o aglomerados se pueden desintegrar durante el proceso generando, como producto final, un sólido en forma de partículas muy finas o aglomerados blandos. El material poroso, que normalmente se obtiene, puede ser fácilmente molido para obtener un polvo con un tamaño de partícula muy fino(13,14).

2.1.5.4 Síntesis Mecanoquímica

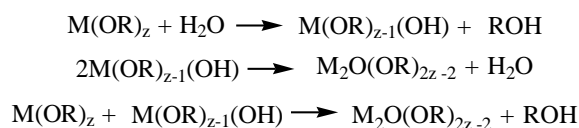
La energía mecánica es empleada para activar reacciones químicas y cambios estructurales. Los tres principales procesos mecánicos son: la molienda mecánica (MM), aleación mecánica (MA) y las reacciones de molienda (RM) (15).

La MM se refiere a la molienda de un metal puro o compuesto que está en un estado de equilibrio termodinámico al inicio de la molienda. Por otro lado, la MA está relacionada, específicamente, con la formación de aleaciones de precursores elementales durante el proceso de molienda en un molino de bolas. Finalmente, en la RM se usan procesos mecánicos para inducir reacciones químicas. Dentro de las principales ventajas del procesamiento mecanoquímico, se destacan: la refinación de los metales, el favorecer reacciones de combustión y propiciar la producción de polvos ultrafinos. (15).

La síntesis mecanoquímica (SM), a través de molienda mecánica (MM) de alta energía, ha ido ganando interés como técnica de procesamiento, de no equilibrio, debido a su versatilidad y viabilidad para producir materiales meta-estables, aleaciones amorfas, materiales cuasi-cristalinos y nanocristalinos, compuestos intermetálicos y termoelectricos, entre otros(15,16).

2.1.5.5 Método Sol-gel

Este proceso implica la transición de un sistema en estado “sol” (suspensión coloidal de partículas sólidas con tamaño suficientemente pequeño para permanecer en suspensión por movimiento Browniano) a una fase solida denominada “gel” (sólido conformado por lo menos de dos fases, con la fase liquida aprisionada e inmovilizada por la fase solida). Las reacciones más importantes que ocurren en el seno del sistema, durante la formación del sol y su transición a gel, son las de hidrólisis y condensación y se representan por las siguiente ecuación(17) :



z = numero entero

donde M representa a un metal y R representa a un protón u otro ligando (si R es un alquil, entonces OR es un grupo alcoxi) (10). Específicamente, el enlace Metal-Oxigeno-Metal (M-O-M) es formado en solución por procesos de autocondensación o de condensación cruzada cuando diferentes alcoxidos son usados.

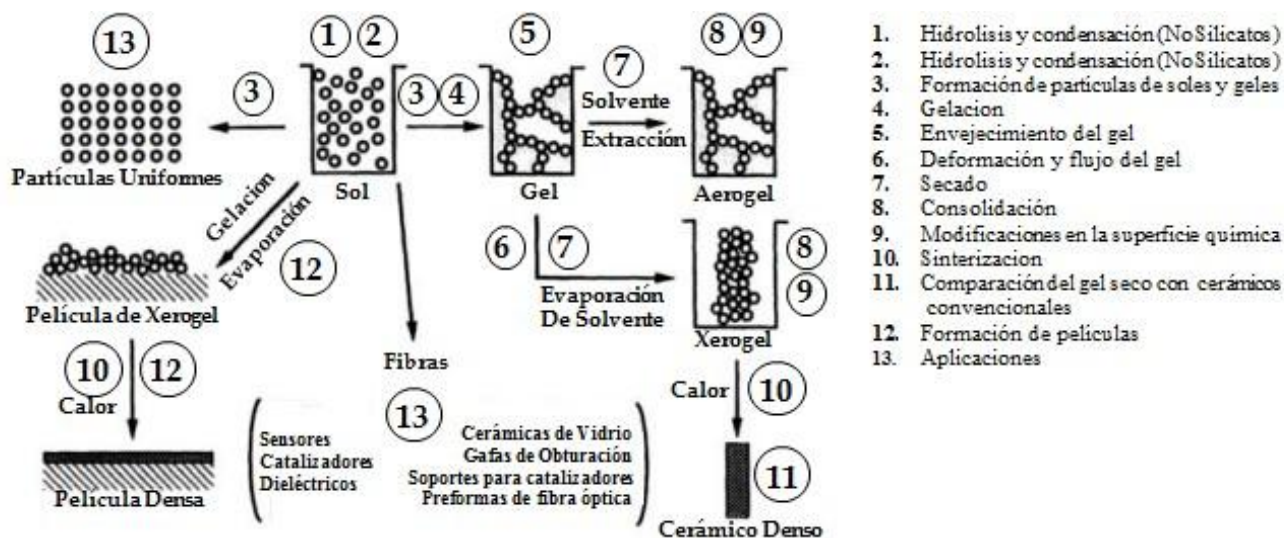


Figura 2.3 Esquema de las diferentes etapas del proceso Sol-gel (17)

Los precursores usados en la preparación del “sol” son sales metálicas inorgánicas y, más frecuentemente, compuestos metal-orgánicos (alcóxidos). En un proceso típico sol-gel, el precursor experimenta una serie de reacciones de hidrólisis y policondensación que llevan a la formación de una suspensión coloidal, o “sol”; a la que, normalmente, se le adiciona un ácido o una base como

catalizador. En el sistema se pueden formar cadenas de pequeñas partículas sólidas, inmersas en el líquido (solvente orgánico o acuoso), o cadenas de especies polinucleares. Las partículas sólidas, o las cadenas de partículas, pueden ser tan pequeñas, de 1 a 1.000 nm, que las fuerzas gravitacionales son despreciables y las interacciones que predominan son las de tipo Van der Waals, coulombicas y estéricas; el “sol” se estabiliza por la acción de la repulsión estérica, el efecto de la doble capa o la combinación de las anteriores. Por otro lado, la transformación de sol a gel es una etapa importante en el proceso y permite obtener materiales cerámicos con diversas formas, así como películas finas sobre un sustrato. Cuando el “sol” se coloca en un recipiente, preferiblemente de vidrio, se forma un “gel húmedo” que con un secado y un tratamiento térmico posterior se puede convertir en un polvo cerámico (18).

Dependiendo de las condiciones de reacción se puede favorecer la formación de un gel sólido monolítico (conocido como un alcogel), el cual después de secarlo y calcinarlo permitiría obtener un óxido en polvo, o la de un precipitado, de manera directa, en el seno de la solución (10).

a) Precursores Sol-gel

Los precursores que más se utilizan en la síntesis de materiales, por la vía sol-gel, son los alcóxidos metálicos, los cuales presentan una alta reactividad en presencia de agua. Los alcóxidos metálicos forman parte de los compuestos metalorgánicos cuya fórmula química es $M(OR)_n$, siendo M un metal, R un grupo alquilo como CH_3 , C_2H_5 , etc. y “n” la valencia del catión metálico (19). Dentro de los metalorgánicos se encuentran los alquilalcóxidos ($M-(OR)_{n-x}(R)_x$) donde el grupo alquílico estaría unido directamente al átomo metálico. Estos grupos no se hidrolizan, por lo que permanecen en la estructura del gel, y se eliminan a través de un tratamiento térmico, aunque pueden permanecer en el sistema hasta temperaturas cercanas a $500^\circ C$. Asimismo, se pueden utilizar como precursores en el proceso sol-gel formiatos, acetatos, sales inorgánicas, etc. (19).

Se obtienen alcóxidos de casi todos los elementos de la tabla periódica y la selección del mismo es importante, esto debido a que su solubilidad y reactividad varían ampliamente dependiendo del metal y del número de coordinación que presente. Una lista de los ligandos alquil y alcóxi, más frecuentemente utilizados en el proceso sol-gel, se indica en la **Tabla 2.3**.

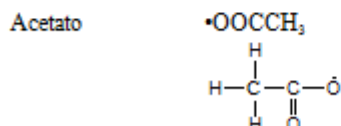
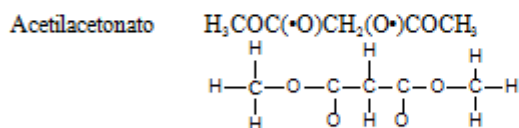
Por otro lado, la reactividad de los metalorgánicos dependerá del número de especies R hidrolizables que ellos presenten y del tamaño de las mismas. Numerosos estudios realizados, sobre el tamaño de los grupos OR, han demostrado su influencia sobre las reacciones de hidrólisis y condensación, siendo la velocidad de hidrólisis inversamente proporcional al tamaño de los grupos OR (19).

En el caso concreto del titanio, este es un elemento con valencia IV (número de coordinación $n=4$) de forma que se puede rodear de 4 grupos OR hidrolizables. Los grupos alcoxi- más utilizados, en la síntesis del TiO_2 , contienen desde 2 (etóxido) hasta 4 (butóxido) átomos de carbono en su cadena alquímica y su reactividad decrece al aumentar la longitud de la cadena (19).

Tabla 2.3 Ligandos usados comúnmente en el proceso sol-gel (17)

<i>Alquil</i>		<i>Alcoxi</i>	
Metil	•CH ₃	Metoxi	•OCH ₃
Etil	•CH ₂ CH ₃	Etoxi	•OCH ₂ CH ₃
n-propil	•CH ₂ CH ₂ CH ₃	n-propoxi	•O(CH ₂) ₂ CH ₃
Isopropil	H ₃ C(•C)HCH ₃	Isopropoxi	H ₃ C(•O)CHCH ₃
n-butil	•CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	n-butoxi	•O(CH ₂) ₃ CH ₃
sec-butil	H ₃ C(•C)HCH ₂ CH ₃	sec-butoxi	H ₃ C(•O)CHCH ₂ CH ₃
iso-butil	•CH ₂ CH(CH ₃) ₂	iso-butoxi	•OCH ₂ CH(CH ₃) ₂
terc-butil	•C(CH ₃) ₃	terc-butoxi	•O(CH ₃) ₃

Otros



El punto (•) indica sitio de enlace. El paréntesis indica un átomo con disponibilidad de enlace
 n=normal (significa una cadena lineal), sec=secundario, terc=terciario

b) Efecto del Catalizador

La síntesis de los soles se puede realizar bajo condiciones ácidas o básicas. Brinker y Scherer (17) mostraron que la naturaleza de los polímeros obtenidos es diferente si estos fueron sintetizados en un medio ácido o básico, ya que el mecanismo que opera es diferente. Estableciendo condiciones básicas en el sistema, la velocidad de hidrólisis es más lenta que la velocidad de condensación y el mecanismo de reacción que actúa en este caso es, principalmente, un ataque nucleófilo donde el átomo metálico, que está enlazado a átomos de oxígeno más electronegativos y rodeado de grupos OR pequeños, presenta sitios favorables para el ataque de los iones negativos OH⁻ (**Figura 2.4**); este ataque por parte del grupo OH⁻, con el correspondiente desprendimiento del grupo OR, dependerá del tamaño y de la carga de ambas especies. Las especies poliméricas de mayor tamaño tienden a reaccionar con las menores originando tanto el aumento del tamaño de los polímeros como su entrecruzamiento, favoreciendo la conformación de estructuras más densas (19).

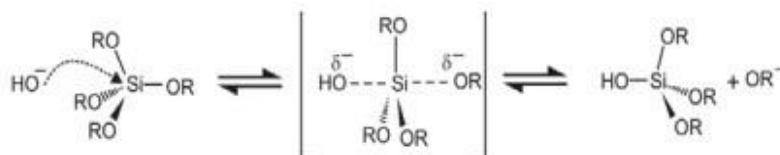


Figura 2.4 Mecanismo de reacción mediante ataque nucleófilo (19)

En el caso de catálisis ácida, la reacción de hidrólisis es mucho más rápida que la de condensación y la reacción ocurre por el ataque electrofílico del grupo alcóxido (**Figura 2.5**). En este caso, los

iones H^+ que provienen del ácido se enlazan con el átomo de oxígeno del grupo alcóxido que presenta dos pares de electrones desapareados(19).



Figura 2.5 Mecanismo de reacción mediante ataque electrófilico(19)

Bajo condiciones ácidas, en el sistema se forman especies ligeramente entrecruzadas de forma que el sol estaría formado por polímeros con estructuras de cadenas cortas y aislados. La **Figura 2.6** muestra un esquema del crecimiento de las cadenas y los polímeros hasta alcanzar la gelificación, para condiciones de: (a) catálisis ácida y (b) catálisis básica (19).

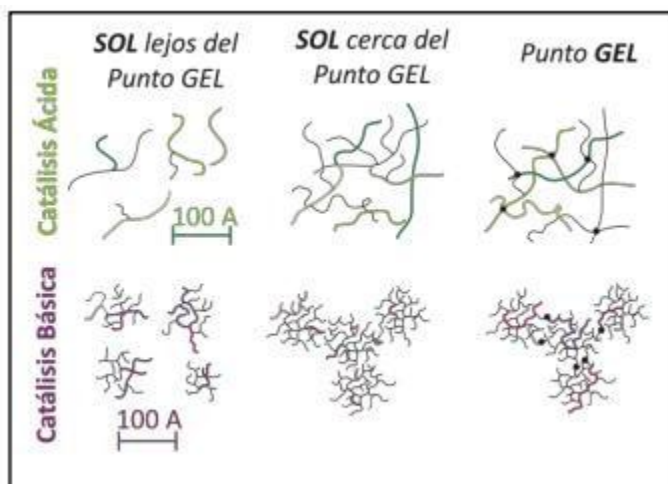


Figura 2.6 Estructuras obtenidas en: (a) medio ácido y (b) medio básico (19)

c) Relación Agua/Alcoxidos

La cantidad de agua empleada en el proceso juega un papel importante ya que ella participa de manera activa en las reacciones de hidrólisis y condensación. Las soluciones preparadas mediante catálisis ácida, con concentración de agua baja, conducen a estructuras poliméricas lineales pero si se aumenta la cantidad de agua, presente en el sistema, se forman polímeros altamente entrecruzados que conducen a redes tridimensionales y/o geles monolíticos (19).

d) Tipo de Disolvente

La necesidad de utilizar disolventes se origina cuando hay inmiscibilidad del agua con los alcóxidos. Los disolventes que más se utilizan son alcoholes, como metanol, etanol o propanol, los cuales aumentan la solubilidad del medio y permiten obtener soles con buena homogeneidad. Es aconsejable que el alcohol empleado sea el mismo que genera la hidrólisis de los radicales orgánicos del alcóxido para evitar fenómenos de re-esterificación, es decir, reacciones parásitas que supongan un cambio de los grupos orgánicos ligados al metal y modifiquen su velocidad. También es importante la cantidad de alcohol utilizada en el proceso, ya que una cantidad elevada de él

puede inhibir la reacción de hidrólisis debido a la generación de alcohol, como producto, durante la correspondiente etapa de hidrólisis (19).

e) Transición Sol-gel

Durante la transición sol-gel, que ocurre en el proceso, se produce un progresivo incremento de la viscosidad del sol, provocado por el entrecruzamiento de las especies poliméricas, hasta alcanzar el punto de gelación o gelificación (tg), en el que la viscosidad aumenta bruscamente (19).

Los factores que afectan el tiempo de gelificación son: la relación agua/alcóxido, el pH del sistema, la concentración del alcóxido y la temperatura. Específicamente, una velocidad de gelificación alta conduce a la obtención de estructuras más abiertas y porosas debido a que los aglomerados, presentes en el sol, se pueden unir más rápidamente sin la posibilidad de que posteriormente se reordenen (19).

f) Aplicaciones

Las aplicaciones de los productos obtenidos vía sol-gel dependen de las diversas formas conformadas en el estado gel (ejemplo: monolitos, películas, fibras y polvos), combinados con un adecuado control microestructural y composicional, a bajas temperaturas de procesamiento. En resumen, las aplicaciones son diversas, considerando las diversas formas: películas delgadas, recubrimientos, monolitos, polvos cerámicos, fibras, compuestos, geles porosos, membranas y, actualmente, mesoporosos, y diferentes funcionalidades (17,20).

2.1.5.6 Método de Micela Normal e Inversa

Este método de síntesis permite la obtención de nanoestructuras de óxidos cerámicos, tanto de nanopartículas (micela inversa) como de materiales mesoporosos (micela normal), en los cuales el tamaño de partícula, la estructura cristalina y la porosidad del producto pueden ser controlados (21).

Para conformar las micelas se emplea un surfactante o compuesto tensioactivo, el cual puede ser de naturaleza iónica o neutra, tal que los agregados de las moléculas del surfactante son las que conforman estas unidades coloidales al exceder un cierto valor de la concentración de este compuesto, cantidad denominada concentración micelar crítica (CMC). Dependiendo de la naturaleza del medio, lo que determina la ubicación de la “cabeza” (normalmente la parte polar o iónica) o la “cola” (parte apolar u orgánica) de la molécula de surfactante, la micela tomaría una cierta orientación dando origen a las denominadas micelas normales (“cabeza” hacia al seno del solvente y “cola” hacia el interior de la unidad coloidal) o inversas (“cola” hacia el seno del solvente y “cabeza” hacia el interior de la micela) (11).

Las micelas son generalmente globulares y de forma esférica, pero es posible que adquieran formas elipsoidales, cilíndricas o como bicapas; la forma que adquiere una micela es una función de la geometría molecular de las moléculas del tensioactivo y de las condiciones de la solución, tales como: concentración de surfactante, pH y fuerza iónica (11).

Los nanomateriales de TiO₂ preparados con este método presentan, generalmente, una estructura amorfa por lo que es necesario calcinar el material para inducir una mejor cristalización del mismo. Por otro lado, el surfactante estabilizado, conformando microcavidades en el caso de la existencia de micelas inversas, proporciona un efecto de “jaula” que limita la nucleación, el crecimiento y la aglomeración de las partículas (11,22).

Algunos conceptos importantes, que permiten entender mejor el desarrollo de este método de síntesis utilizado en este trabajo, se tratarán brevemente a continuación.

2.1.5.6.1 Anfífilo

La palabra anfífilo fue instaurada por P. Winsor hace más de 35 años, se constituyó a partir de dos raíces griegas. De un lado el prefijo "anfi" que significa "doble", de los dos lados, "alrededor"; de otra parte la raíz "filo" que denota amistad o afinidad (23).

Definida desde el punto de vista físico-químico como una doble característica simultánea, polar y apolar por ejemplo. Típicamente, un anfífilo tiene una molécula que se puede dividir en dos partes, de acuerdo a su conformación estructural: por un lado una parte polar, que contiene heteroátomos tales como O, S, N, P en grupos funcionales como alcohol, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc., y del otro un grupo apolar, compuesto por un hidrocarburo parafínico, cicloparafínico o aromático y que eventualmente puede contener halógenos; en ciertos casos particulares, la parte apolar puede ser una cadena de silicona o de polióxido de propileno. La parte polar presenta afinidad por los solventes polares, particularmente el agua, mientras que la parte apolar la tiene hacia los solventes orgánicos, en particular los hidrocarburos, aceites o grasas, o simplemente es repelida por el agua. Es por esto que a la parte polar se denomina también hidrofílica mientras que a la parte apolar hidrofóbica. La **Figura 2.7** muestra la conformación de una molécula típica de un anfífilo (24).

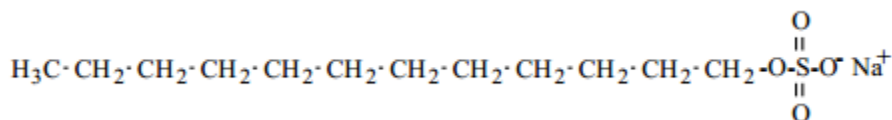


Figura 2.7 Molécula de Dodecil ester sulfato de sodio

2.1.5.6.2 Surfactantes

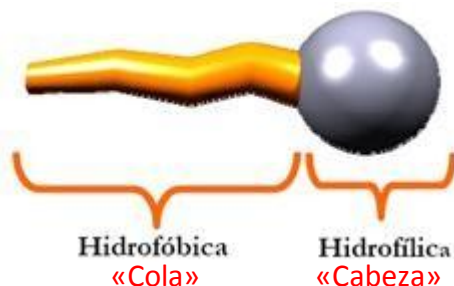
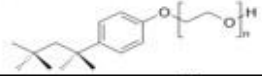


Figura 2.8 Molécula típica de un Surfactante (25)

Debido a su doble afinidad (**Figura 2.8**), una molécula anfífila no se encuentra estable ni en solvente de naturaleza polar ni en un solvente orgánico. Para satisfacer ambos tipos de afinidades, el grupo polar de la molécula debería estar solvatado por un solvente polar mientras que el grupo apolar debería encontrarse en un solvente orgánico o, por lo menos, fuera del solvente polar. Tales condiciones solo se pueden cumplir en la frontera o interfase de dos medios, por ejemplo entre dos fases condensadas, tales como dos líquidos inmiscibles o un líquido y un sólido. Lo anterior hace

que las sustancias anfífilas experimenten una fuerte tendencia a migrar hacia una interfase (favoreciendo un proceso de adsorción). Es la ocurrencia de este proceso lo que ha llevado a la denominación, de estos compuestos anfífilos, como surfactantes, nombre que corresponde a la contracción de las palabras en inglés "**surface-active substances**" (24). Es, por lo tanto, ésta fuerte afinidad por la interfase la que define muchas de las propiedades de los surfactantes. La clasificación de los surfactantes se hace con base en su tipo de molécula, más concretamente considerando el tipo de disociación que presenta su molécula en solución.

Tabla 2.4. Tipo y Formula molecular de los Surfactantes más utilizados (19)

Tipo	Subtipo	Nombre	Acronimo	Estructura
Iónico	Aniónico	Pluronic F127	F127	$H(OCH_2CH_2)_x(OCH_2CH_2)_y(OCH_2CH_2)_zOH$
		Pluronic P105	P105	$H-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$
		Polietilenglicol hexadecil éter	Brij56	$HO-[CH_2-CH_2-O]_n-(CH_2)_{15}-Me$
			Brij58	$HO-[CH_2-CH_2-O]_n-(CH_2)_{18}-Me$
		Tritón X100	Tritón	
		Docecil sulfato sódico	SDS	$CH_3(CH_2)_{10}CH_2O-SO_3^-Na^+$
	Polietilenglicol	PEG	$H-[O-CH_2-CH_2]_n-OH$	
	Catiónico	Cloruro de cetiltrimetilamonio	CTAC	$CH_3(CH_2)_{14}CH_2-N^+(CH_3)_3 Cl^-$
		Bromuro de cetiltrimetilamonio	CTAB	$H_3C(H_2C)_{15}-N^+(CH_3)_3 Br^-$
No-iónico	-----	Alquilamina	-----	R-NH ₂

- **Surfactantes Aniónicos:** Son aquellos que, en solución acuosa, se disocian en un anión anfífilo (grupo hidrófobo queda cargado negativamente) y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario. A este tipo pertenecen los surfactantes de mayor producción industrial: detergentes como alquilbenceno sulfonatos, jabones o sales de ácidos carboxílicos grasos, espumantes como el lauril éster sulfato etc. (24).
- **Surfactantes no iónicos:** Por orden de importancia industrial vienen justo después de los aniónicos, tanto así que hoy en día su producción está aumentando. En solución acuosa no forman iones ya que su parte hidrofílica está formado por grupos polares no ionizados como: alcohol, tiol, éter, éster, amida o bien cadenas de poliéster de óxido de etileno o propileno. Entre los más comunes se encuentran los alquil fenoles etoxilados y los ésteres de sorbitan, éstos últimos conocidos comercialmente como series SPAN y TWEEN(24).
- **Surfactantes Catiónicos:** Son aquellos que se disocian en un catión anfífilo (grupo hidrófobo de la molécula queda cargado negativamente) y un anión, generalmente de tipo

halogenado. Estos surfactantes se usan solamente en aplicaciones especiales donde la carga positiva del anfífilo produce ventajas como en enjuagues o emulsiones asfálticas. En la mayoría de los casos corresponden a un grupo amonio cuaternario(24).

- **Surfactantes Anfotéricos:** Este grupo de surfactantes combinan, en la misma molécula, un grupo con tendencia aniónica y otro con tendencia catiónica y dependiendo del valor de pH del medio dominaría una u otra (aniónico a alto pH, catiónico a bajo pH). La **Tabla 2.4** muestra algunos de los surfactantes más utilizados en el laboratorio e industrialmente, clasificados según el tipo, subtipo, acrónimo y fórmula molecular (19).

2.1.5.6.2.1 Propiedades de los Surfactantes en Solución

Las propiedades y usos de los surfactantes se deben a sus dos principios fundamentales:

- a) **Adsorción:** Cuando una molécula de surfactante se ubica en forma orientada en una interfase se dice que se ha adsorbido. La adsorción es un fenómeno espontáneo motivado por la disminución de energía libre del surfactante, al ubicarse en la interfase, y poder satisfacer su doble afinidad (**Figura 2.9**) (26,27).

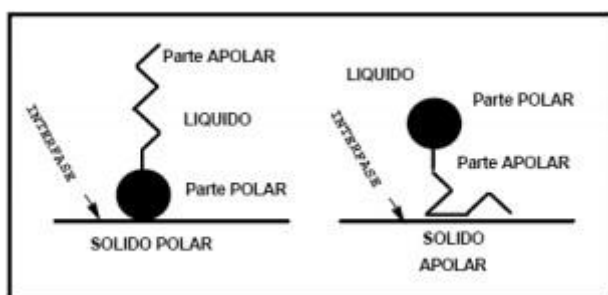


Figura 2.9 Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase (26)

- b) **Asociación:** Una propiedad fundamental de los surfactantes, en solución acuosa, es su capacidad de auto-asociación. La formación de una monocapa más o menos densa de surfactante, en una interfase, es la primera manifestación de la tendencia a asociarse. Cuando la concentración de surfactante aumenta, en la fase acuosa se produce, rápidamente, la saturación del área interfacial y como consecuencia el número de moléculas disueltas tiende a aumentar (**Figura 2.10**) (26)



Figura 2.10 Formación de un agregado de moléculas de surfactante o Micela en el agua. (28)

2.1.5.6.3 Micela

Los agregados de moléculas dispersas de surfactante que se forman en un líquido, al aumentar la concentración del tensioactivo, se denominan micelas (11). En un agregado micelar normal, **Figura 2.11**, los grupos hidrofílicos del surfactante estarían en contacto con el solvente polar, mientras que las colas hidrofóbicas se orientarían hacia el núcleo de la micela, lejos del seno de la solución (29).



Figura 2.11. Disposición de Micela Normal (25)

Por su parte, las micelas inversas serían similares en estructura a las normales pero, debido a que el solvente donde ellas se forman es de naturaleza no polar, la orientación de las partes de la molécula se invierte: los grupos hidrofílicos se dirigirían hacia el interior de la micela y los grupos hidrofóbicos se proyectarían hacia afuera, para interactuar con el solvente (**Figura 2.12**) (29).



Figura 2.12 Disposición de Micela Inversa(25)

En el núcleo de la micela puede existir una fase orgánica o acuosa, dependiendo si la micela es normal o inversa. (**Figura 2.13**), y es esta condición la que se utiliza ya sea para obtener materiales mesoporosos (micela normal) o Nanopartículas (micela inversa).

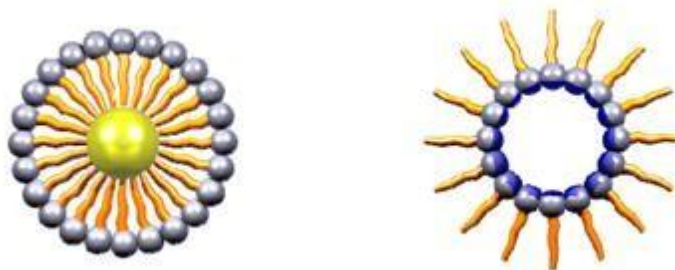


Figura 2.13 Imagen transversal de micela normal y micela inversa (25)

Como ya se indicó, las micelas pueden adoptar diferentes morfologías como: micelas esféricas, helicoidales, cilíndricas, laminares, cúbicas, hexagonal cilíndricas y sus formas inversas. La morfología de las micelas obedece a diagramas de fase estructurados considerando como variables la naturaleza del solvente y del surfactante, la concentración de este último y la temperatura, con

base en ellos se pueden preparar composiciones que definan la morfología de interés, tal como se muestra en la **Figura 2.14** al utilizar agua como solvente (30).

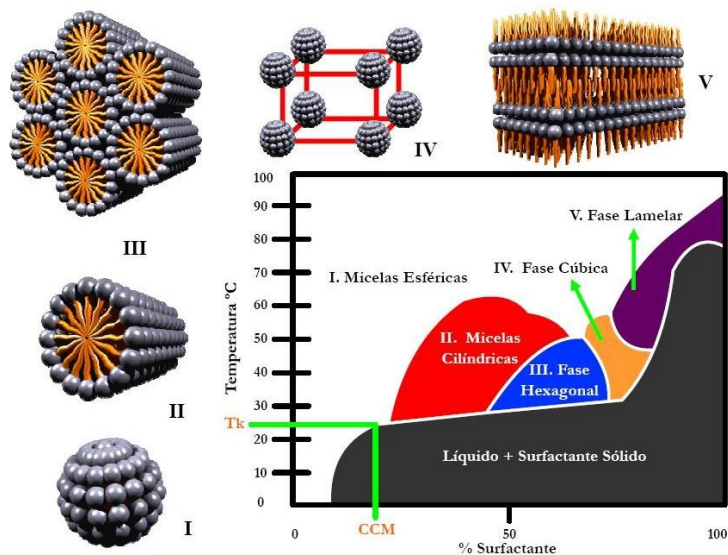


Figura 2.14 Diagrama de fases surfactante-agua (25)

2.1.5.6.4 CMC (Concentración Micelar Crítica)

La Concentración Micelar Crítica (abreviada CMC) corresponde a la transición entre las zonas II y III de la **Figura 2.15**; valor que no presenta un valor exacto sino un cierto rango de concentración, relativamente amplio, ya que el surfactante es realmente una mezcla de especies químicas notablemente diferentes entre sí (28); a partir de esta CMC se garantizaría la conformación de micelas en el sistema.

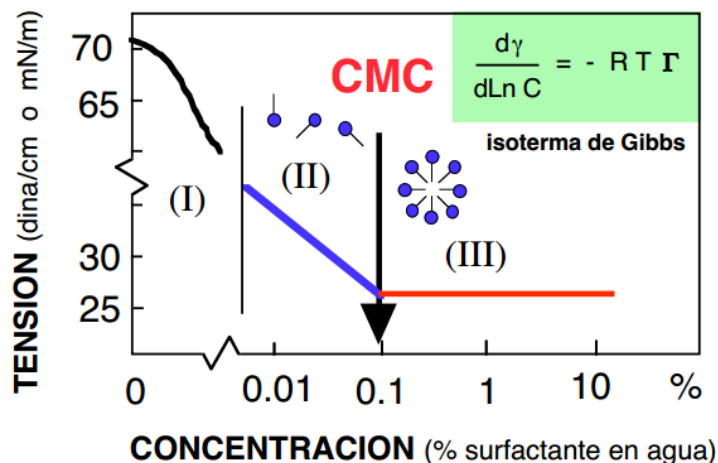


Figura 2.15 La variación de la tensión superficial Vs la concentración de surfactante permite determinar la Concentración Micelar Crítica (28).

Relacionado con la CMC, se destacan cuatro propiedades fundamentales:

- a) Para concentraciones mayores a la CMC, toda molécula adicional de surfactante se incorpora a las micelas y la concentración de surfactante en estado molecular "monomérico", o no asociado, queda prácticamente constante. Sin embargo se debe destacar que el equilibrio monómero-micela es dinámico, es decir, existe un intercambio permanente de moléculas entre las micelas y la fase acuosa (28).
- b) La dimensión de la micela, entre 10-100 Å, y el número de moléculas por micela o número de agregación, depende del tipo de surfactante y del ambiente físico-químico (electrólito, alcohol y temperatura, principalmente) (28).
- c) Las tensiones superficial e interfacial de un sistema que contiene un surfactante puro no varían cuando la concentración de este último sobrepasa su CMC, en otras palabras, un exceso de micelas no cambia en nada la actividad superficial o interfacial del sistema. Sin embargo, la magnitud de los fenómenos de solubilización micelar varía con la cantidad de micelas (28).
- d) Para concentraciones menores a la CMC, las propiedades termodinámicas de las soluciones con surfactante (presión osmótica, descenso crioscópico, etc.) siguen leyes ideales o regulares similares a las que cumplen aquellas soluciones que contienen un soluto de gran dimensión molecular. Por el contrario, para concentraciones mayores a la CMC se observa un comportamiento fuertemente no-ideal y una actividad casi constante; en ciertos casos extremos, se pueden obtener, aún, estructuras de tipo gel o de cristal líquido con apenas algunos porcientos de surfactantes, lo que indica que existen interacciones muy fuertes en el sistema (28).

2.1.5.6.4.1 Factores que influyen la CMC

- a) **Competencia entre interacciones:** La existencia de una CMC en la solución con surfactante, como un fenómeno bien definido, implica la competencia entre varios tipos de interacciones, algunas de las cuales se favorecerían y otras se opondrían a la micelización. Como ya se mencionó, la minimización de las interacciones entre la parte hidrofílica del surfactante y el solvente polar debe contrarrestar el efecto hidrófobo que favorece la asociación de las moléculas en una micela; cuanto más importante la parte hidrófoba del surfactante, más fuerte la tendencia a formar micelas y por lo tanto más baja la CMC (28).

Por otro lado, las interacciones que desfavorecen la formación de micelas pueden ser de dos tipos. Primero, se tiene aquellas que favorecen la solubilización monomolecular del surfactante en el agua, esencialmente por efecto de solvatación del grupo polar, por lo que cuanto más polar sea este grupo menor sería la tendencia a formar micelas y por lo tanto mayor la CMC. El segundo efecto desfavorable, a la formación de micelas, estaría relacionado con las interacciones de tipo electrostático que ocasionarían una repulsión entre las partes hidrofílicas de las moléculas de surfactante que forman la micela. Si las fuerzas de repulsión son demasiado grandes, las moléculas no pueden acercarse lo suficiente para que se produzca la interacción hidrófoba entre grupos lipofílicos. Esto explica el por qué a los surfactantes iónicos, que poseen cargas netas en sus grupos hidrofílicos, se les dificulta más formar micelas que a los surfactantes no iónicos (28).

- b) **Electrolitos:** La adición de electrólitos tiende a disminuir la solubilidad de muchas sustancias en el agua llegando, incluso, a producir la precipitación de alguna especie química en forma de fase sólida. Por lo tanto, su presencia debe disminuir la solvatación de la parte hidrofílica del surfactante que ocasionaría una mayor concentración de iones en la vecindad de la superficie de las micelas, generando un efecto pantalla que reduciría las repulsiones electrostáticas entre las partes hidrofílicas cargadas. Ambos tipos de efectos favorecerían la formación de micelas, esto lleva a concluir que la presencia de electrólitos en el sistema tendería a disminuir la CMC.

La disminución de la CMC se debería, esencialmente, a la reducción del espesor de la doble capa eléctrica que rodea las micelas, acción que ocasionaría una disminución de las fuerzas de repulsión entre grupos hidrofílicos vecinos, permitiendo la agregación de las moléculas del surfactante a una concentración más baja del mismo (28).

- c) **Alcoholes:** Por razones prácticas, los surfactantes se usan a menudo junto con un alcohol, ya sea por el papel físico de éste o bien por su influencia físico-química. Todos los alcoholes tienden a reducir la CMC Sin embargo, su influencia, depende tanto de la naturaleza del alcohol (peso molecular y ramificación) como de su concentración, es decir, depende de sus características como co-surfactante.

Cuando más lipofílico el alcohol, mayor la reducción de la CMC. Este fenómeno se explica por la formación de micelas mixtas, surfactante-alcohol, en las cuales la inserción de las moléculas de alcohol permite reducir las fuerzas repulsivas entre los grupos hidrofílicos cargados de las moléculas vecinas de surfactante, dando como resultado una disminución de la energía de formación de las micelas y, por lo tanto, una reducción de la CMC (28).

- d) **Efecto de la Temperatura:** El incremento de la temperatura afecta el valor de la CMC de los surfactantes, en medio acuoso, produciendo dos efectos opuestos. Por una parte, ocasiona una disminución en la hidratación de los grupos hidrofílicos, favoreciendo el proceso de micelización, y por otro lado, destruye la estructura del agua en los alrededores del grupo hidrofóbico, desfavoreciendo la micelización. La intensidad relativa de estos dos efectos es la que determina si se produce un aumento o un descenso del valor de la CMC, a cierta temperatura. Así, la CMC alcanza su mínimo valor en torno a los 25 °C, en el caso de surfactantes iónicos, y alrededor de los 50 °C en el caso de surfactantes no iónicos (31).

Para los surfactantes iónicos, existe una temperatura determinada por debajo de la cual no se forman micelas, ya que no existe una buena solubilización de los surfactantes; a este valor de temperatura se le denomina temperatura de Kraft. Al superar esta temperatura crítica, se produce un aumento brusco de la solubilidad de los surfactantes y se propicia la formación de micelas, por lo que la temperatura de Kraft correspondería al punto donde la solubilidad del surfactante alcanzaría su CMC. Por debajo de la temperatura de Kraft, el surfactante no es lo suficientemente soluble para obtener la concentración adecuada que permita formar las micelas; en este caso el equilibrio se establece entre una solución monomolecular y el surfactante sólido precipitado (28).

Por el contrario, en las disoluciones micelares formadas por surfactantes no iónicos existe una temperatura por encima de la cual éstas se separan en dos fases líquidas (solvente- surfactante), denominada temperatura de enturbiamiento (31).

- e) **pH:** Un surfactante aniónico, como es el caso del dodecil sulfato de sodio en un medio donde el pH sea muy ácido, las micelas que éste forma se desestabilizan. Esto ocurriría porque el grupo polar del surfactante podría formar un enlace iónico con alguno de los protones presentes en la solución. De esta manera, la molécula de surfactante se estabiliza y pasa a ser neutra en su parte hidrofílica, lo que ocasiona que ésta se torne inestable y se produzca una separación de fases agua – surfactante.

En el caso contrario, cuando el surfactante está en un medio muy básico, la micela se desestabilizaría por la abundancia de cargas negativas en la solución, provocando repulsión entre las partes hidrofílicas del monómero, y generando, finalmente, una apertura de las micelas (32).

2.1.5.6.4.2 Determinación de la concentración micelar crítica

Esta puede establecerse usando diferentes métodos ya que diversas propiedades del sistema presentan, en esta zona, una discontinuidad en su comportamiento (*Figura 2.16*) (28). Las técnicas más empleadas se basan en la variación de la tensión superficial (todos tipos de surfactantes) y la conductividad electrolítica de las soluciones (sólo surfactantes iónicos) (28).

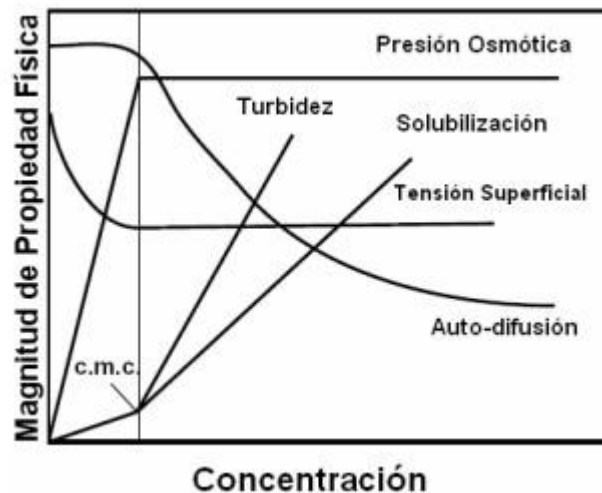


Figura 2.16 Comportamiento de algunas propiedades físicas de una suspensión frente a la concentración de surfactante (33).

El método conductimétrico consiste en medir la conductividad (por ejemplo en micro Simmens - μS) de disoluciones que contienen distinta concentración de tensioactivo. La representación de los datos de conductividad en función de la concentración de surfactante (mM) lleva a una gráfica cuya pendiente, antes y después de la CMC, es diferente; el cambio de pendiente ocurre cuando la concentración del tensioactivo favorece la formación de micelas y por lo tanto la CMC se determina a través de la intersección de la extensión de las pendientes antes y después del cambio.

2.1.6 Surfactante CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio)



Figura 2.17. Estructura del Surfactante Catiónico CTAB

Un caso concreto de surfactante, que fue el que se utilizó en este trabajo, es el Bromuro de hexadecilmetilamonio ((C₁₆H₃₃) N (CH₃)₃Br), identificado con el número CAS 57-09-0. Este es una sal de amonio cuaternaria que presenta un grupo alquilo de gran longitud (**Figura 2.17**) y se le conoce, también, por las siglas CTAB de su nombre en inglés: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (34).

El CTAB es un surfactante catiónico y como cualquier otro surfactante puede formar micelas en una solución acuosa; a 303K (30 °C) forma micelas con un número de agregación de 75-120, según el método de determinación, normalmente con una media de ~95 (34,35). Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se indican en la **Tabla 2.5**:

Tabla 2.5 Principales Características Fisicoquímicas del CTAB (34,36–39)

Formula Molecular	C ₁₉ H ₄₂ BrN
Apariencia	Polvo blanco
Peso Molecular	364.45g/mol
Punto de Fusión	237 a 243 °C (descompone)
Punto de Inflamación	244°C
pH	5.0 - 7 a 36.4 g/l a 25 °C
Densidad aparente	~0.39g/m
Solubilidad en agua	36.4 g/l a 20 °C totalmente soluble
Punto de Descomposición	>200°C
CMC	1mM en agua a 25°C
Temperatura de Kraft (T_k)	20°C a 25°C en agua

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Reactivos y Solventes

- Agua desionizada
- Bromuro de Cetiltrimetil Amonio, CTAB (Mallinckrodt)
- Bromuro de Potasio, 99% (Fisher)
- Etanol, 99%(Merck)
- Hidróxido de Amonio 90%, (Merck)
- Tetrabutoxido de Titanio (Merck)
- Tolueno (Mallinckrodt)

2.2.2 Materiales y Equipos

- Balanza analítica, XT 220 (220 g / 0,0001g)
- ☐ pH-metro, OMEGA PHB-213 (UME)
- ☐ Dosificador, Metrohm Dosimat 665.
- Plancha de calentamiento con agitación magnética, CORNING PC-620D
- baño ultrasonido calentamiento, HELMA E120H
- ☐ Estufa, FISHER SCIENTIFIC
- ☐ Mufla
- Mortero de ágata
- Espectrofotómetro IR, Thermo Electron Nicolet IR200
- Microscopio electrónico de transmisión, JEOL JEM-1200EX
- Microscopio electrónico de barrido, LEOL JSM-6490LV
- Equipo de Difracción de rayos X. BRUKER D8 con CUK α 1
- ☐ Tamiz malla 400
- ☐ Porta muestra de polimetilmetacrilato

2.2.3 Determinación de la concentración Micelar crítica

Experimentalmente, para la determinación de la CMC en el sistema *etanol* – *CTAB* usado en este trabajo, se partió de una solución madre de 200mL, a una concentración 7mM constituida por 200mL Etanol y 0.51g CTAB, a la cual se le realizaron 13 diluciones. Los valores obtenidos de conductividad (μ S) en función de la concentración de surfactante (mM) se reportaron cada una de la soluciones preparadas fue sometida a un baño de calentamiento a 35°C durante la medida de su conductividad con el fin de simular las condiciones de síntesis.

Las medidas conductimétricas solo se realizaron para el solvente etanol, no se registraron para el solvente tolueno debido a la naturaleza del mismo (cancerígeno) y a la usencia de cargas en su estructura debido al enlace covalente entre sus moléculas. Para poder comparar los resultados del proceso de síntesis tanto en etanol como en tolueno, se tomaron las mismas concentraciones de CTAB para los dos solventes.

2.2.4 Síntesis del dióxido de titanio

Los parámetros de síntesis que se consideraron fueron:

- Naturaleza del Solvente
- pH de la Solución
- Temperatura de la solución
- Concentración del Surfactante

El pH de la Solución, así como la cantidad de solvente y agua, se mantuvieron constantes y se tomaron los valores empleados por Ochoa y colaboradores en su trabajo (18). Con relación a la temperatura (temperatura de síntesis), ésta se determinó con base en observaciones experimentales, estableciéndose que a una temperatura de 35°C se obtenía una completa disolución del surfactante en el medio de reacción. La selección de las concentraciones de CTAB se hizo con base en la CMC encontrada experimentalmente, tomándose tanto valores menores como mayores a la CMC establecida.

La síntesis se llevó a cabo mediante un proceso vía sol-gel, adicionando un surfactante CTAB cuya concentración en el sistema se modificó tal como se indica en la **Tabla 2.6** y **Tabla 2.7**. Considerando una concentración dada, se tomó la cantidad necesaria de surfactante (cantidad para un volumen final de solución de 50mL) y se procedió a adicionar 38.17mL de solvente (Etanol o Tolueno). Esta solución se agito, durante aproximadamente 20 minutos, hasta lograr una completa dilución del surfactante en el medio. Posteriormente, se adicionó 10.98mL del precursor de Titanio (TBT) a la solución y se sometió nuevamente a agitación hasta obtener un medio homogéneo. A continuación esta se calentó a una temperatura de 35°C, al alcanzar esta temperatura se agregó de manera controlada 0.85mL de agua destilada (1gota H₂O/min); al finalizar la adición, la solución se mantuvo en agitación y calentamiento continuo durante 10 minutos más. Al término de este tiempo, la suspensión se retiró de la fuente de calor y se dejó en agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente, esta se dejó envejecer durante 4 días, al gel resultante se lo sometió a un proceso de secado, en estufa, a una temperatura de 100°C hasta obtener un polvo blanco fino en la síntesis con etanol y unos cristales amarillos en tolueno, estos fueron calcinado a 450°C en un horno.

Durante los procesos de síntesis el pH de la solución se llevó a valores básicos (pH ~9.0), en el caso del etanol este proceso se desarrolló mediante la adición directa de hidróxido de amonio a la solución después de la adición de solvente y en el caso del tolueno fue durante la incorporación del agua (0,85mL) a la cual se le modifico previamente su pH (~9.0).

Tabla 2.6 Concentraciones de Surfactante (CTAB) empleadas en este trabajo y denominación asignada a cada una de las muestras sintetizadas usando como solvente etanol

Concentración de CTAB (mM)	Denominación de las muestras sin tratamiento Térmico	Denominación de las muestras con tratamiento Térmico
0	19.1	19.5
1	15.1	15.5
2	16.1	16.5
3	17.1	17.5
6	18.1	18.5

Tabla 2.7 Concentraciones de surfactante (CTAB) empleadas y denominación asignada a cada una de las muestras sintetizadas en el presente trabajo, usando tolueno como solvente

Concentración (mM) CTAB	Denominación de la muestra sin tratamiento Térmico	Denominación de la muestra con tratamiento Térmico
0	Exp 6.1	Exp 6.5
1	Exp 3.1	Exp 3.5
3	Exp 4.1	Exp 4.5
6	Exp 5.1	Exp 5.5

➤ Tratamiento Térmico

La eliminación del surfactante del sistema es un paso crucial del proceso, acción que se realizó sometiendo la muestra a un tratamiento térmico programado a 450 °C (ver rampa de tratamiento térmico *Figura 2.18*).

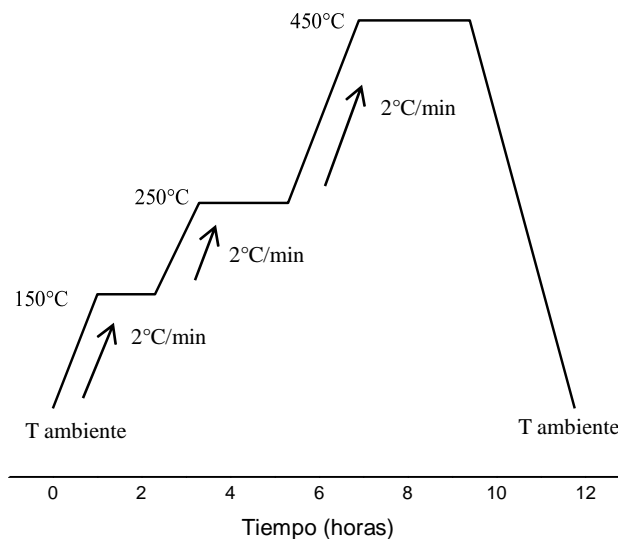


Figura 2.18. Programa de tratamiento térmico utilizada para obtener los polvos cerámicos de TiO₂ sintetizados por el método sol-gel.

2.2.5 Caracterización de los compuestos de dióxido de titanio

2.2.5.1 Espectroscopia FT-IR

Para realizar este análisis se homogenizó el sólido con bromuro de potasio, grado espectroscópico (99 %, Fischer), en un mortero de ágata. La mezcla se sometió a presión mediante un troquel de acero inoxidable-318, hasta formar una pastilla translúcida. La muestra fue analizada con un espectrofotómetro infrarrojo provisto del software EZOMINIC 32. El número de barridos fue de 32 a una resolución de 16 cm⁻¹/s. Dicho análisis fue realizado en el Laboratorio de Catálisis de la Universidad del Cauca.

2.2.5.1.1 Deconvolución de los espectros IR

Haciendo uso del software FITYK 0.8.6 (Marcin Wojdyr) se tomó la región comprendida entre los 1000-400 cm⁻¹ de cada espectro y se realizó su deconvolución usando curvas no simétricas, concretamente la función Gaussian.

2.2.5.1.1 Área integrada

A los espectros deconvolucionados de las muestras tratadas térmicamente se les determinó los valores de banda (A_B) para cada enlace presente, así mismo se estableció el área total del espectro para posteriormente correlacionar este valor con el área de banda, en donde el valor de (A_B/A_T) se graficó versus el número de onda para cada banda. El desarrollo de este parámetro se realizó con la ayuda del software FITYK 0.8.6 (Marcin Wojdyr).

2.2.5.2 Difracción de Rayos X

El uso de esta técnica se hizo con el fin de determinar la fase cristalina presente en las muestras sintetizadas. Estas fueron pulverizadas en un mortero de ágata y luego tamizadas. El espécimen seleccionado de cada muestra fue colocado en un porta muestra, mediante la técnica de llenado frontal. Las medidas se realizaron en un difractómetro, con Geometría DaVinci bajo las siguientes condiciones: voltaje 40(kV), corriente 30(mA), rendija de divergencia 0.6mm, rendijas Soller Primario 2.5°, muestreo 0.01526° 2theta, Rango de Medición 0.6-7° 2theta y 10-70° 2theta, radiación CuK α 1, filtro de níquel, detector lineal LynxEye, Tipo de barrido Continuo y Tiempo de muestreo 2°/minuto; este equipo está adscrito al Laboratorio de Rayos X de la Universidad Industrial de Santander.

2.2.5.2.1 Tamaño de Cristalito

$$\beta(2\theta) = \frac{\lambda}{L \cos\theta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Utilizando la fórmula de Debye-Scherrer (Ec.1) y considerando el pico de difracción más representativo de la fase tetragonal del TiO₂, el (101), se determinó los tamaños medio de cristalito.

2.2.5.3 Microscopia Electrónica de Transmisión

Se impregno individualmente una rejilla de 100mesh, de cobre, con una suspensión en etanol de cada uno de los sólidos sintetizados, esta se colocó en el porta muestras del equipo.

2.2.5.4 Microscopia Electrónica de Barrido

La muestra es colocada en un porta muestras para su posterior recubrimiento de oro al vacío. Una vez finaliza este paso, el porta muestras es llevado al microscopio.

2.3 ANALISIS DE RESULTADOS

A continuación se discuten los resultados del proceso experimental planteado, empezando por la determinación de la concentración micelar crítica, seguido de la síntesis y caracterización de los compuesto de dióxido de titanio sintetizados en etanol y en tolueno, a lo largo de cada ítem se realizara una comparación entre cada una de las muestras sintetizadas a diferentes concentraciones de surfactante en cada solvente.

2.3.1 Determinación de la concentración micelar crítica

La *Figura 2.19* muestra como la conductividad crece al aumentar la concentración de surfactante, comportamiento esperado teniendo en cuenta la naturaleza iónica del CTAB: al aumentar la concentración de CTAB se incrementó la masa por unidad de carga de las especies conductoras. La tendencia del incremento de la conductividad se modificó a una concentración de 3.5mM originándose un cambio de pendiente, comportamiento que puede interpretarse como la aparición de agregados o micelas en la solución. Con base en los datos de la curva de la *Figura 2.19* se pueden definir las concentraciones de CTAB, por debajo o por encima de la CMC, a emplear en la síntesis del TiO₂ para evaluar su efecto sobre el grado de aglomeración y tamaño de la partícula de

TiO₂ que se obtenga. Un esquema gráfico de la transición de moléculas de surfactante dispersas a micelas, a medida que se aumenta la concentración de CTAB, se muestra en la **Figura 2.20**.

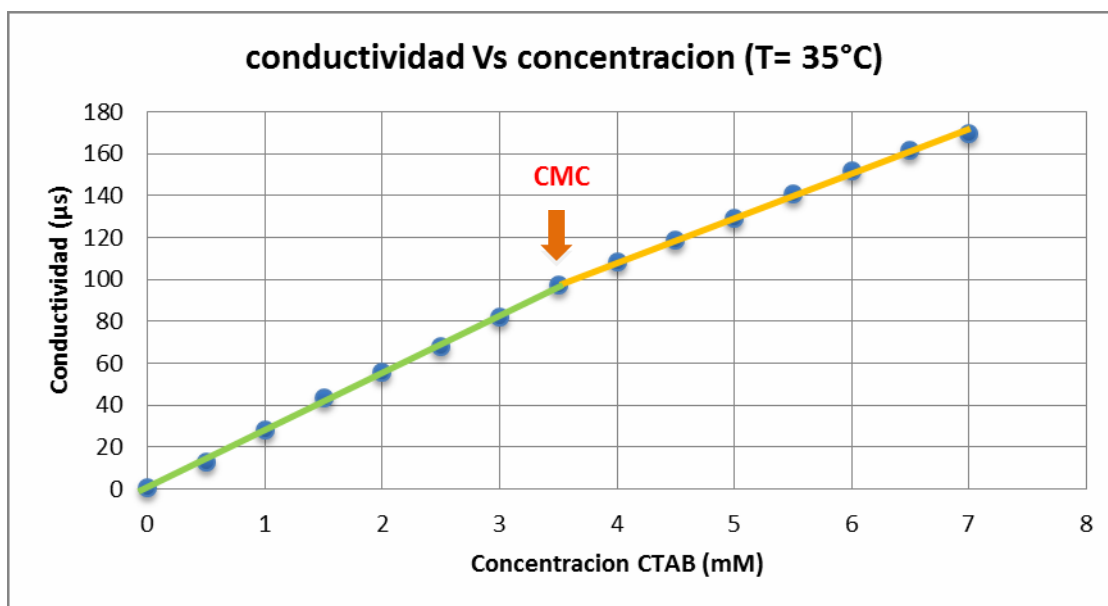


Figura 2.19 Curva de conductividad (μS) Vs concentración de CTAB (mM) en etanol para determinar la CMC del sistema.

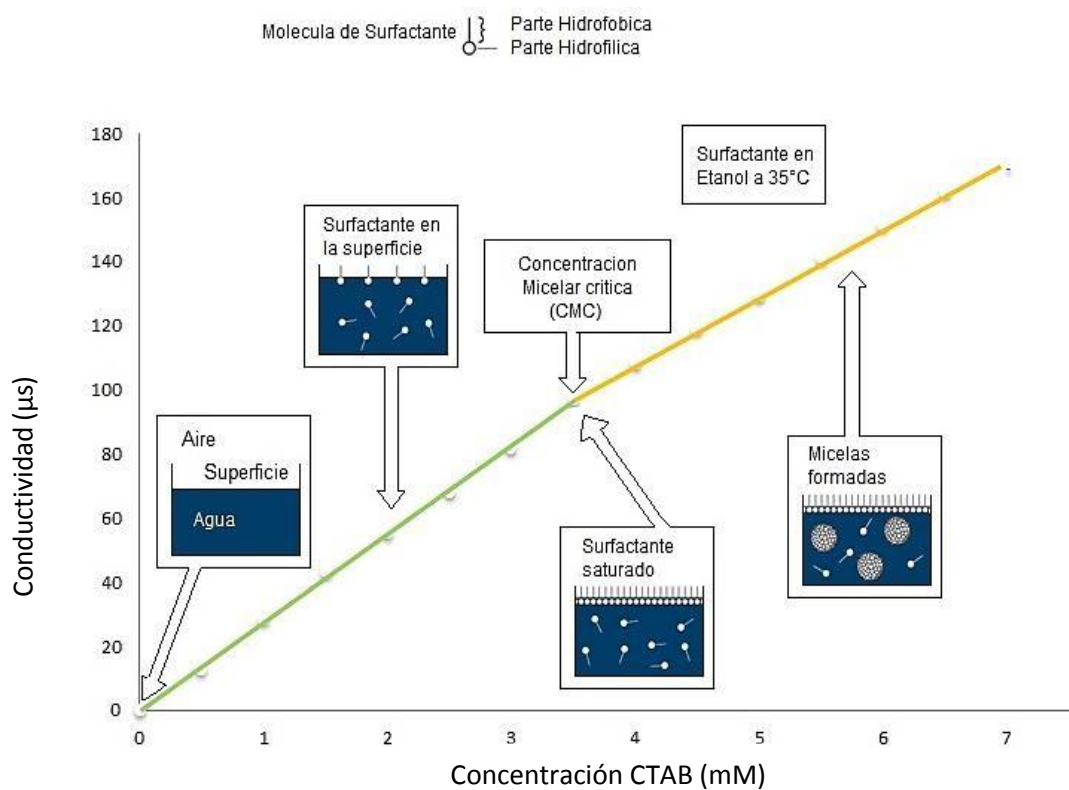


Figura 2.20 Esquema que muestra los estados por los que atraviesa un surfactante al variar su concentración en el medio

2.3.2 Síntesis del dióxido de titanio

□ Solvente Etanol

La adición de surfactante al medio, sin la presencia de temperatura, genera una insolubilidad del mismo debido al carácter apolar representado por la larga cadena carbonada de su estructura, insolubilidad que se presenta en todas las concentraciones seleccionadas en este trabajo para el proceso de síntesis. La aplicación de temperatura a la solución (Etanol+CTAB) contribuye a un aumento de entropía, en donde, a concentraciones menores a la CMC, se generan procesos de asociación (premicelacion)(40), propiciando la orientación de la parte apolar hacia el interior del “core” de la micela y las cabezas (de naturaleza polar) hacia afuera, en contacto con el seno de la solución. En el caso de concentraciones mayores, a la CMC, el aumento del número de moléculas de surfactante es tal que la formación de micelas se genera casi de manera espontánea, tal como se indica en la

Figura 2.21 (a).

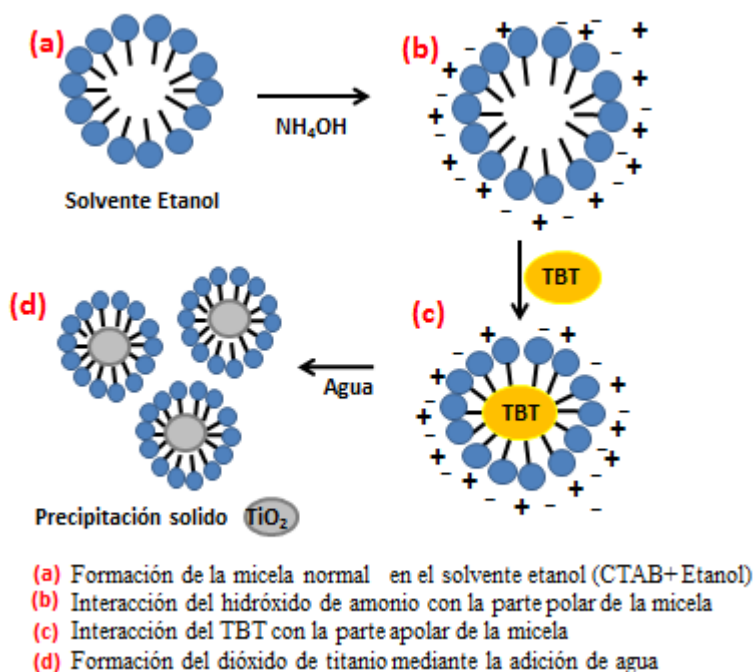


Figura 2.21 Mecanismo propuesto para la formación de las partículas de TiO_2 en etanol

Durante el proceso de disolución del surfactante en el etanol, las cargas presentes en la molécula del mismo (cabeza) son solvatadas por las moléculas de etanol que presentan cargas eléctricas generadas por su momento dipolar ($\mu=1.71\text{D}$, $1\text{D}=3.335\times 10^{-30}\text{C.m}$) (41). La adición de hidróxido de amonio a la solución, incrementa la presencia de iones en solución los cuales generan, a su vez, un efecto de pantalla que reduce las repulsiones electroestáticas entre las cabezas hidrofílicas de las moléculas de surfactante, además de preparar el medio para favorecer las futuras reacciones de hidrólisis y condensación (ver

Figura 2.21 (b) (28) .

Por otro lado, la adición del precursor de titanio, a la solución, propicia interacciones del tipo van der Waals de este con la parte apolar del surfactante, entra la cadena carbonada del CTAB y el grupo alcóxido del complejo de titanio (ver

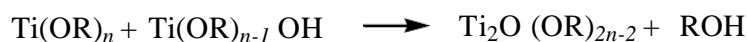
Figura 2.21 (c) (41). La reacción entre el TBT, en presencia del agua adicionada a la solución, puede explicarse mediante el modelo de Menger (31,42), el cual indica un grado de contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas del surfactante, las cuales se distribuyen de manera aleatoria formando huecos entre ellas propiciando lugares donde se favorecería la precipitación del óxido por el ingreso de agua a estos “microreactores”. Las reacciones que se desarrollan durante este proceso se describen a continuación, tomando como base las enunciadas por Tseng en su trabajo (43):

1. Hidrolisis



2. Condensación

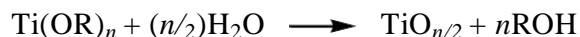
Deshidratación



Desalcoholización

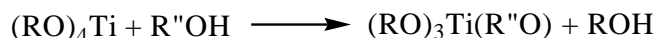


La reacción general es:

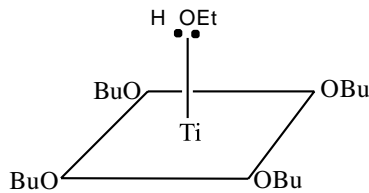


OR= grupo alcóxido

La conformación de la red polinuclear (gel) puede atribuirse a la formación de complejos en donde el átomo metálico en los compuestos de tetrabutoxido puede ampliar su esfera de coordinación a través de los átomos de oxígeno presentes en las moléculas de etanol (44,45), las cuales presentan átomos de hidrógeno de carácter ácido que permiten (44) establecer procesos de intercambio de la siguiente forma:

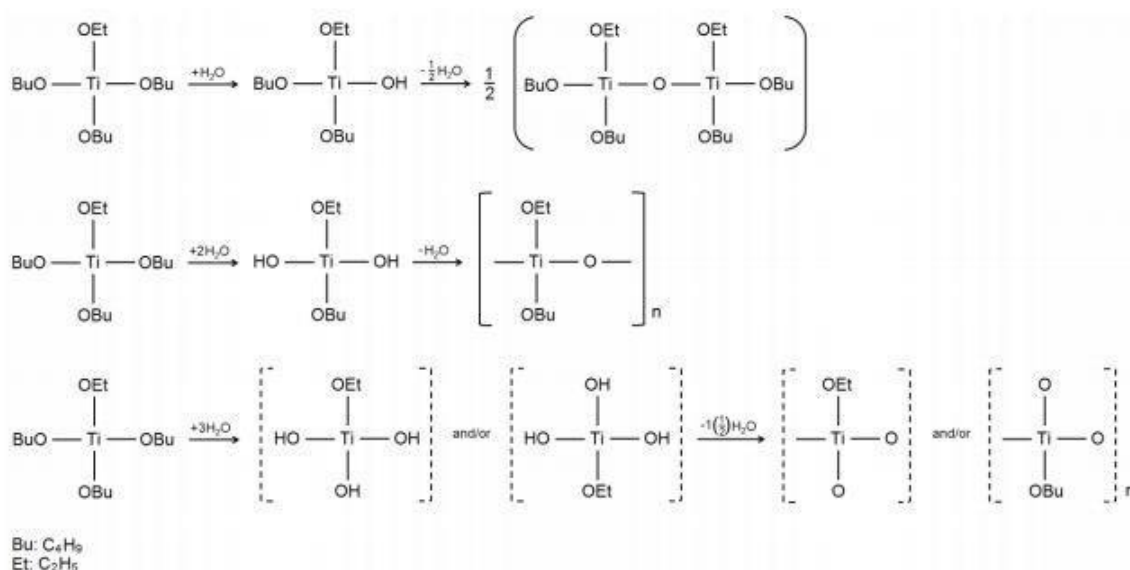


Esta reacción puede ser reversible y su equilibrio se ve influenciado por la cantidad de los reactivos (44); la sustitución de uno de ligandos puede generarse mediante el siguiente intermediario:

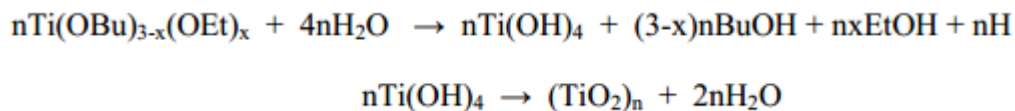


Bu:-(CH₂)₃CH₃
Et: -CH₂CH₃

La adición de agua destilada al sistema Ti(OBu)₄ – EtOH promueve las reacciones de hidrólisis y condensación del compuesto intermediario (45), que puede ser representado esquemáticamente de la siguiente forma:



La hidrólisis del butil-etil titanato y su subsecuente deshidratación (45) pueden resumirse por la siguiente reacción:



Los procesos de hidrólisis en el medio etanólico pueden ocurrir de manera rápida, mientras que las reacciones de condensación son lentas debido al impedimento estérico, conduciendo a la formación de partículas esféricas (46).

Las imágenes que describen el proceso de síntesis, se muestran en la **Figura 2.22**.

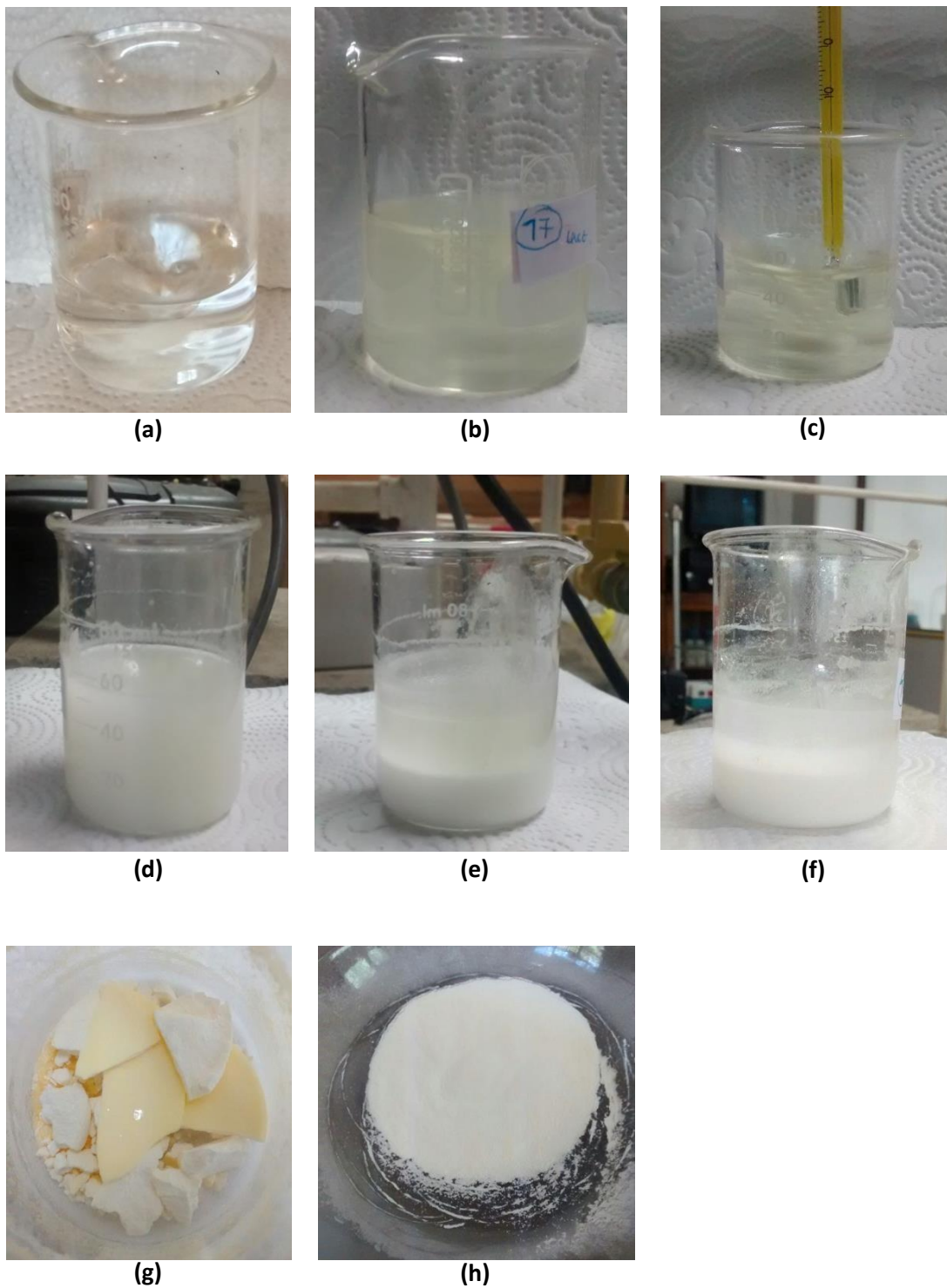


Figura 2.22. Fotografías de las diferentes etapas del proceso de síntesis del TiO_2 , en Etanol; en donde (a) representa a la solución de Etanol + CTAB sin temperatura, (b) solución Etanol+CTAB+TBT sin temperatura, (c) solución Etanol + CTAB+TBT a 35°C , (d) adición de agua a la solución anterior, (e) solución final en reposo, (f) aspecto obtenido después de 4 días de envejecimiento, (g) solido sometido a secado, (h) polvo tratado térmicamente y macerado.

□ Solvente Tolueno

La adición del CTAB al medio de reacción hace que este se disuelva en el solvente tal que la cadena carbonada del surfactante (apolar) interacciona con el Tolueno mediante fuerzas de Van der Waals (41), favoreciendo la formación de micelas inversas (ver **Figura 2.21 a**), orientando su cadena carbonada hacia el seno de la solución y su cabeza (de naturaleza iónica) hacia el interior de la micela, las cuales se generan cuando se alcanza una concentración igual o superior a la CMC. La adición del TBT contribuye a aumentar el carácter apolar de la solución favoreciendo la interacción del precursor con la cadena carbonada del surfactante, mediante fuerzas de Vander Waals (ver **Figura 2.21 b**). Por último, la reacción del agua que contiene el hidróxido de amonio (a pH = 9) y el TBT se explica mediante el modelo de Menger (31,42), descrito anteriormente, donde las reacciones de hidrólisis y condensación propician la precipitación del óxido (ver **Figura 2.21 c**), el cual quedaría inmerso en la estructura micelar que se formó en el sistema (**Figura 2.23(c)**).

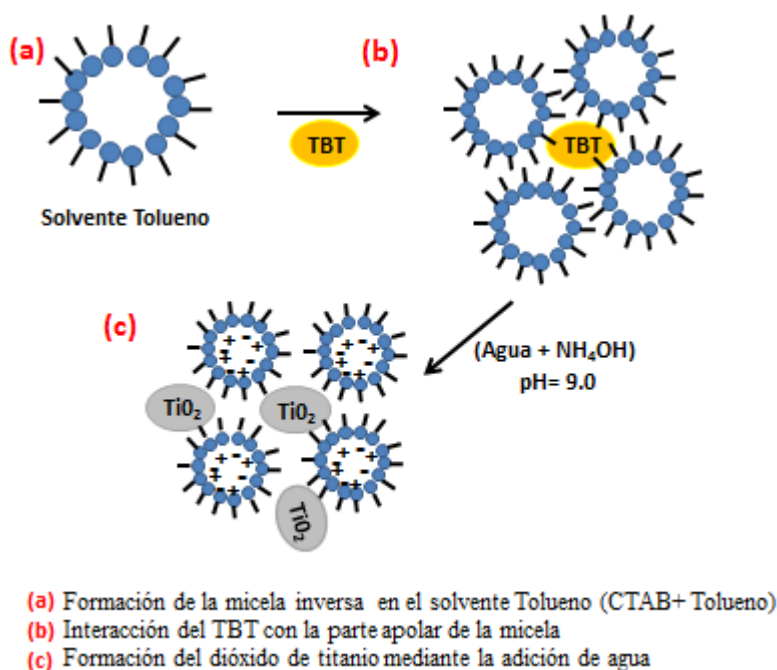


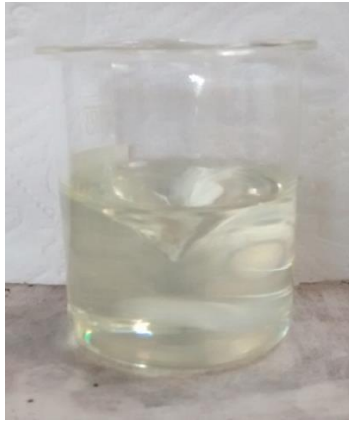
Figura 2.23 Mecanismo propuesto para la formación de las partículas de TiO_2 en Tolueno

Los complejos alcóxido de titanio, en medios apolares, tienden a formar monómeros pues no se cuenta con la presencia de especies químicas ricas en electrones (como sucede en un medio polar) (47); esta conformación favorecería, a su vez, que los procesos de condensación ocurran rápidamente propiciando la formación de partículas con morfología irregular(46)

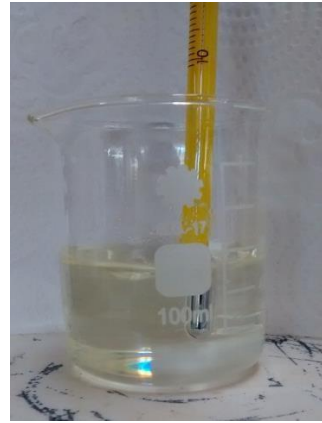
En la **Figura 2.24** se describe el proceso de síntesis



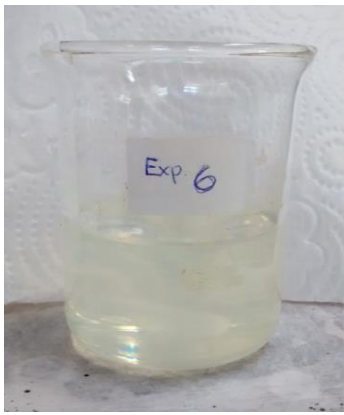
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)



(i)



(j)

Figura 2.24 Fotografías de las diferentes etapas del proceso de síntesis del TiO_2 en presencia de tolueno; en donde (a) es la solución de Tolueno + CTAB sin temperatura, (b) solución Tolueno + CTAB a 35°C , (c) adición de TBT a la solución anterior, (d) inicio de la adición de agua a la solución, (e) terminación del proceso de adición de agua, (f) solución final en reposo, (g) aspecto de la solución transcurridos los 4 días de envejecimiento, (h) obtención de cristales después del proceso de secado, (i) polvo obtenido por la maceración de los cristales, (j) sólido tratado térmicamente (calcinación).

2.3.2.1 Interacción Surfactante –Partícula

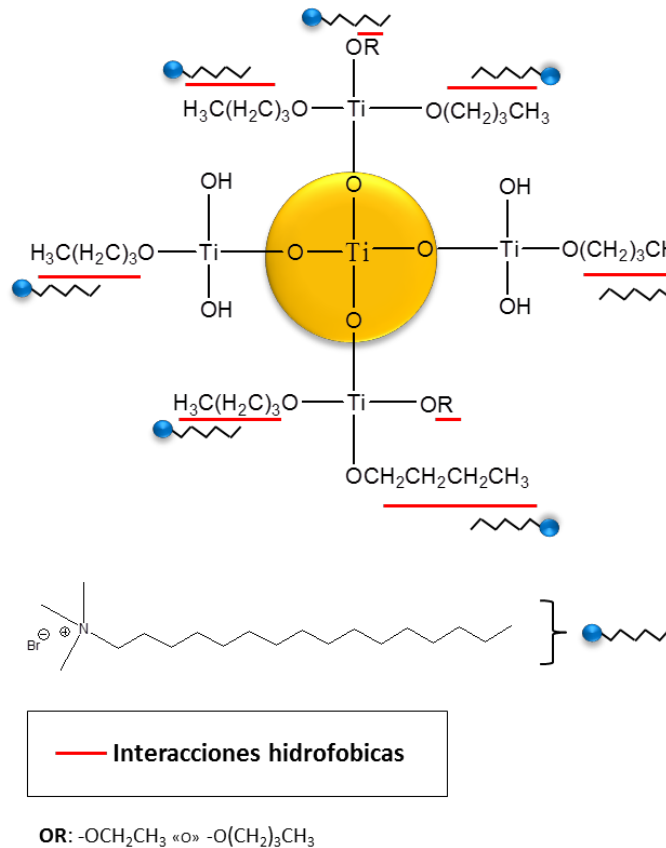


Figura 2.25 Interacción Surfactante -Partícula

La adsorción del surfactante iónico está controlada por fuerzas electrostáticas de repulsión, entre las micelas o premicelas formadas, e interacciones hidrofóbicas (fuerzas de Van der Waals) entre las cadenas carbonadas (grupos etoxi y butoxi) y la “cola” del surfactante (48) (*Figura 2.25*). El proceso de adsorción del CTAB, sobre la superficie de la partícula, genera una inmovilización del mismo, tal que la molécula del surfactante es retinada, impidiendo que regrese a la interface liquido-liquido o aire-liquido (49). Este fenómeno podría explicar las interacciones del óxido de titanio formado con las moléculas de surfactante, en los solventes usados en los procesos de síntesis realizados en este trabajo.

2.3.2.2 Efecto del Solvente sobre la interacción partícula-surfactante:

□ Solvente etanol

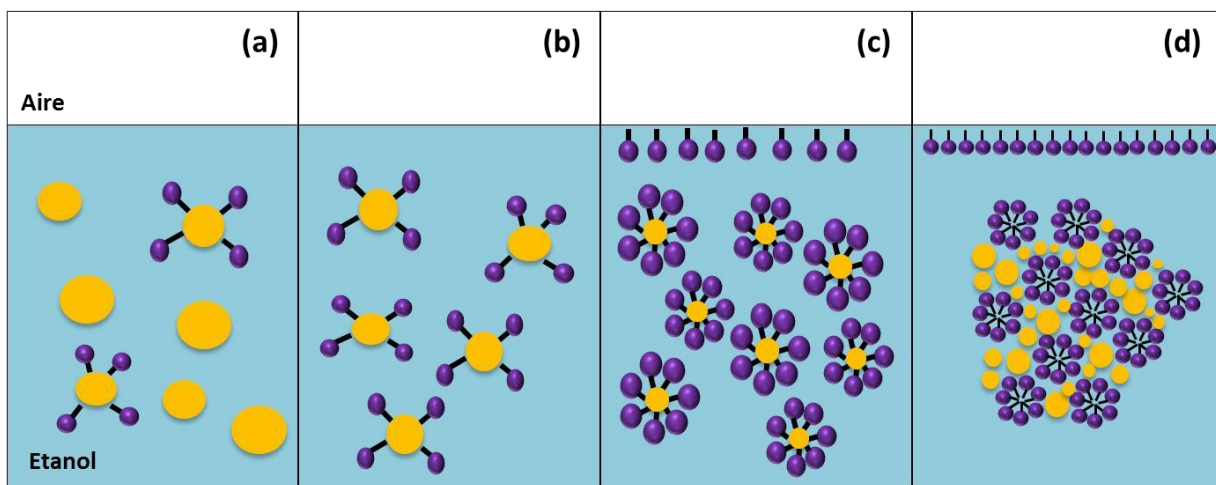


Figura 2.26 Mecanismo de adsorción del surfactante sobre la superficie de la partícula de TiO_2 a concentraciones bajas (1mM) (a), intermedias(2mM) (b), micelar crítica (3mM)(c) y mayor a la CMC (6mM) (d), en Etanol.

En la *Figura 2.26* se ilustra como a medida que se incrementa la concentración de surfactante se favorece el recubrimiento de la superficie de las partículas sólidas, limitando así los procesos de crecimiento de las mismas; para concentraciones bajas, la cantidad de CTAB no es suficiente (ver *Figura 2.26 (a)*), pero para concentraciones altas se genera un exceso de micelas que ocasiona que el TiO_2 se forme fuera de la micela, propiciando la conformación de estructuras mesoporosas (como se ve en el estudio MET) (ver *Figura 2.26 (e)*). En las *Figura 2.26(c)* y *(d)*, el intercambio de monómeros, en la interface aire-solvente, ayuda a disminuir la tensión superficial(40).

□ Solvente tolueno

La formación de micelas inversas en el seno del solvente apolar, para todas las concentraciones de surfactante, generan estructuras de naturaleza mesoporoso, tal que para concentraciones bajas de CTAB la morfología del sólido no se ve afectada por la presencia del mismo.

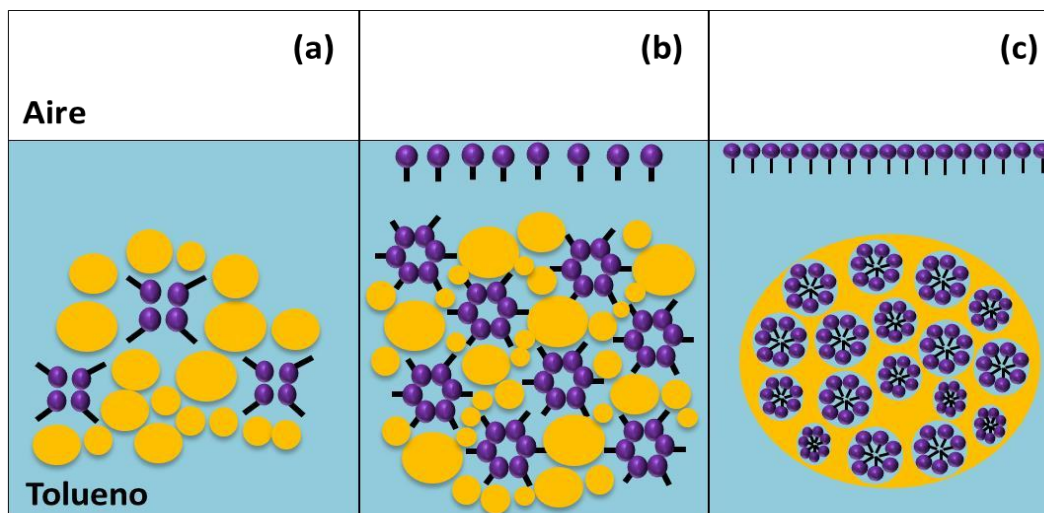


Figura 2.27 Mecanismo de adsorción del surfactante sobre la superficie de la partícula de TiO_2 a concentraciones bajas (1mM) (a), micelar crítica (3mM) (b) y mayor a la CMC (6mM) (d), en Tolueno.

2.3.3 Caracterización de los polvos sintetizados

Los sólidos obtenidos se caracterizaron microestructuralmente, utilizando diferentes técnicas.

2.3.3.1 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Una vez obtenidos los geles con diferentes concentraciones de CTAB (*Tabla 2.6* y *Tabla 2.7*), después de 4 días de envejecimiento y secados a una temperatura de 100°C , se caracterizaron y los espectros obtenidos se indican en la *Figura 2.28*.

En la *Figura 2.28(i)* y *(ii)*, todos los espectros exhiben una banda ancha alrededor de los 3300 cm^{-1} , característica de los enlaces O-H que existen en la muestra, en su mayoría provenientes del solvente de reacción (etanol) y del butanol que se puede formar durante el desarrollo de las reacciones químicas que ocurren al interior del sistema (41,50). Así mismo, en los espectros de la *Figura 2.28(i)*, se observa una pequeña banda situada alrededor de los 1620 cm^{-1} que puede asociarse al modo vibracional de flexión del agua (51); En la *Figura 2.28 (ii)* (espectros (c) y (d)), se observa la aparición de un hombro a 2900 cm^{-1} , característico de los aromáticos monosustituidos, así como una banda asociada al enlace C-H (2960 cm^{-1}) del CTAB, en este mismo espectro se sitúa un pico agudo a 1600 cm^{-1} de baja intensidad que se podría asociar a la tensión del enlace múltiple C-C.

Finalmente, se observa una banda ancha *Figura 2.28 (i)* y *(ii)*, entre $1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, donde se ubican los enlaces de interés: Ti-O-Ti ($\sim 500\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 700\text{ cm}^{-1}$), Ti-O ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$), Ti-OH ($\sim 800\text{ cm}^{-1}$), Ti-O-C ($\sim 900\text{ cm}^{-1}$) y Ti-C ($\sim 450\text{ cm}^{-1}$), los cuales dan información de la estructura interna del TiO_2 . Adicionalmente está presente una banda del enlace C-H, del aromático, ubicada a los $\sim 750\text{ cm}^{-1}$, con intensidad baja (41) *Figura 2.28(ii)*.

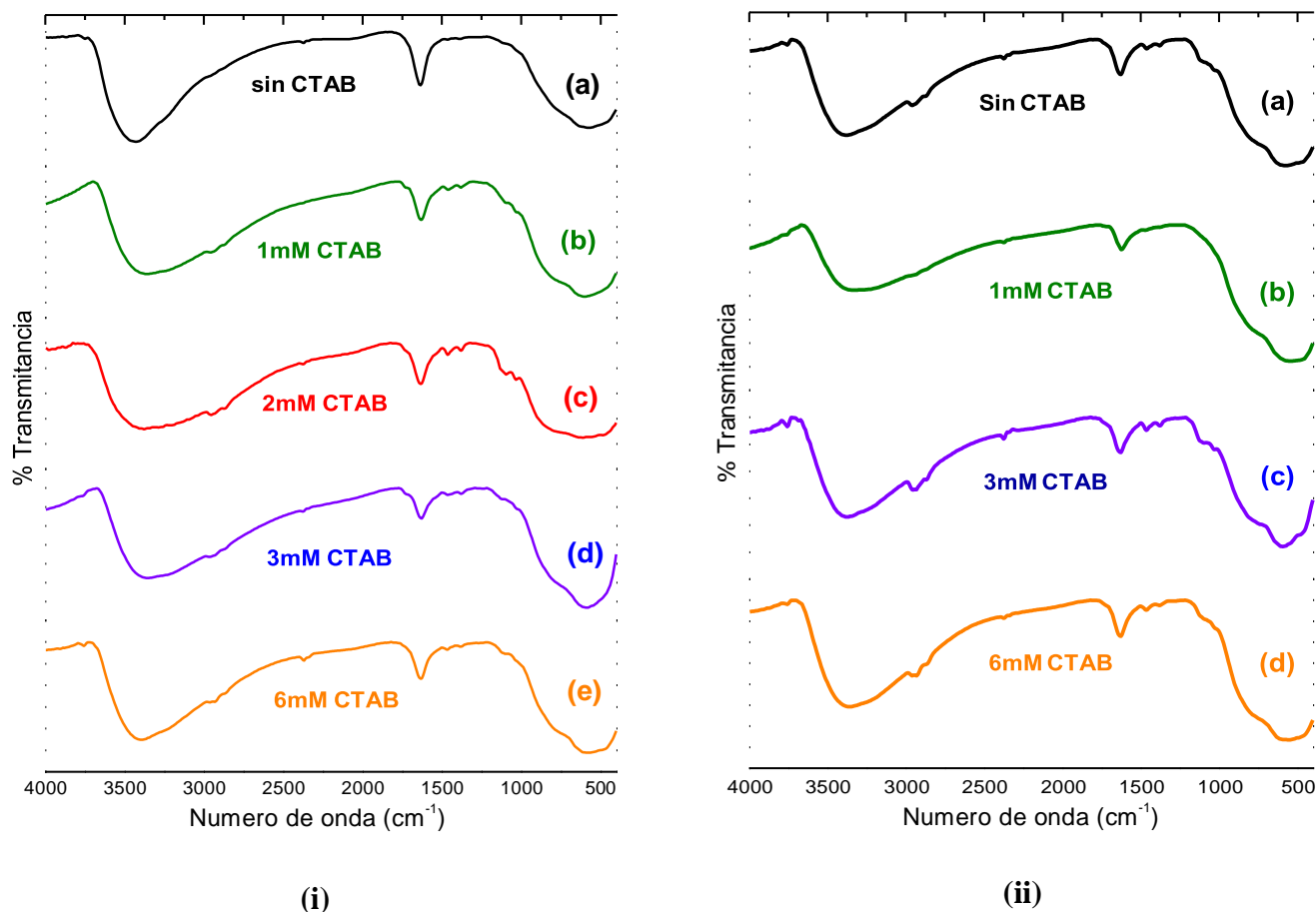


Figura 2.28 Espectros IR correspondientes a sólidos sintetizados sin y con la presencia de surfactante a diferentes concentraciones en Etanol (i) y Tolueno (ii), sin tratamiento térmico.

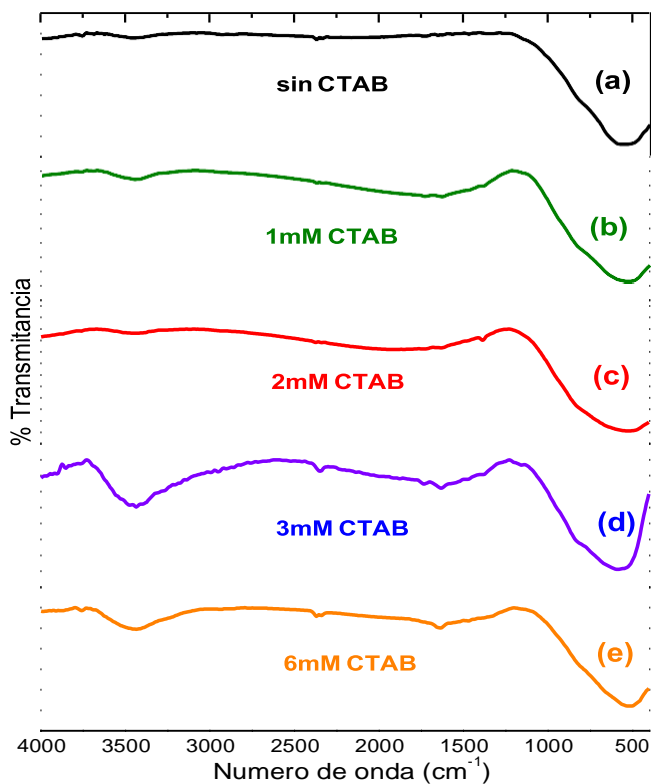
En la **Figura 2.29** se ilustran los espectros IR de las muestras tratadas térmicamente en los que se evidencia la eliminación de bandas ubicadas entre 4000-1000 cm⁻¹ correspondientes, principalmente, a grupos funcionales del surfactante, del etanol y del tolueno para cada muestra respectivamente; en estos se evidencia que en muestras con mayor concentración de surfactante, aún es evidente la existencia de grupos que contienen carbón, por la pequeña banda alrededor de 3300 cm⁻¹, o sea que a mayor concentración de CTAB se dificulta la eliminación de la materia orgánica, requiriéndose de mayores temperaturas de tratamiento térmico.

Las diferencias en la forma de la banda comprendida entre 1000-400cm⁻¹, (forma ancha y aguda para el tolueno, y ancha y de punta redondeada para el etanol) se atribuye a los posibles efectos generados por el solvente en donde es posible que algunos enlaces se hayan visto favorecidos por este factor. Se requiere de un proceso de deconvolución que permita ver más en detalle las bandas características fundamentales del TiO₂ en esta región.

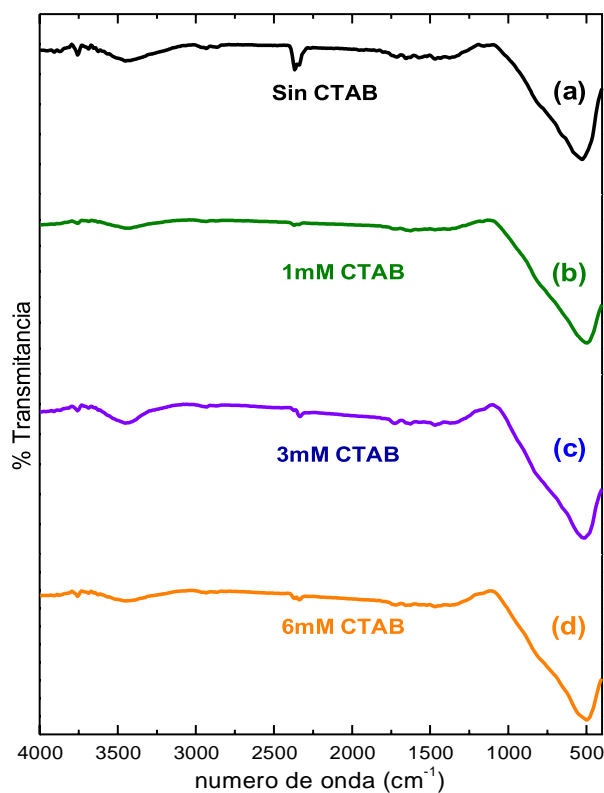
Tabla 2.8 Principales bandas de absorción en IR para los polvos obtenidos en etanol y tolueno sin tratamiento térmico

Solvente	Muestra	Vibración (cm ⁻¹)					
		V _{-OH}	V _{H₂O}	V _{aromático}	V _{C-H}	V _{C-C}	V _{TiO₂}
Etanol	(a)	3300 (h,a)	1620(m)	-----	-----	-----	1000-400 (h,a)
	(b)	3300 (h,a)	1620(m)	-----	2960(md)	-----	1000-400 (h,a)
	(c)	3300 (h,a)	1620(m)	-----	2960(md)	-----	1000-400 (h,a)
	(d)	3300 (h,a)	1620(m)	-----	2960(md)	-----	1000-400 (h,a)
	(e)	3300 (h,a)	1620(m)	-----	2960(md)	-----	1000-400 (h,a)
Tolueno	(a)	3300 (h,a)	-----	-----	2960(d)	1600(m)	1000-400 (h,a)
	(b)	3300 (h,a)	-----	-----	-----	1600(m)	1000-400 (h,a)
	(c)	3300 (h,a)	-----	2900(d)	2960(d)	1600(m)	1000-400 (h,a)
	(d)	3300 (h,a)	-----	2900(d)	2960(d)	1600(m)	1000-400 (h,a)

* Convenciones md=muy débil, d=débil, m=media, F=fuerte, mf=muy fuerte, a=ancho, h=hombro



(i)



(ii)

Figura 2.29 Espectros IR correspondientes a sólidos de TiO₂ sintetizados sin y con surfactante a diferentes concentraciones en Etanol (i) y Tolueno (ii), tratados a 450°C.

2.3.3.1.1 Deconvolución de los Espectros IR

En las siguientes graficas se muestran los espectros deconvolucionados de las muestras con y sin tratamiento térmico mostradas en las **Figura 2.28** y **Figura 2.29**

➤ Muestras sintetizadas sin la presencia de surfactante

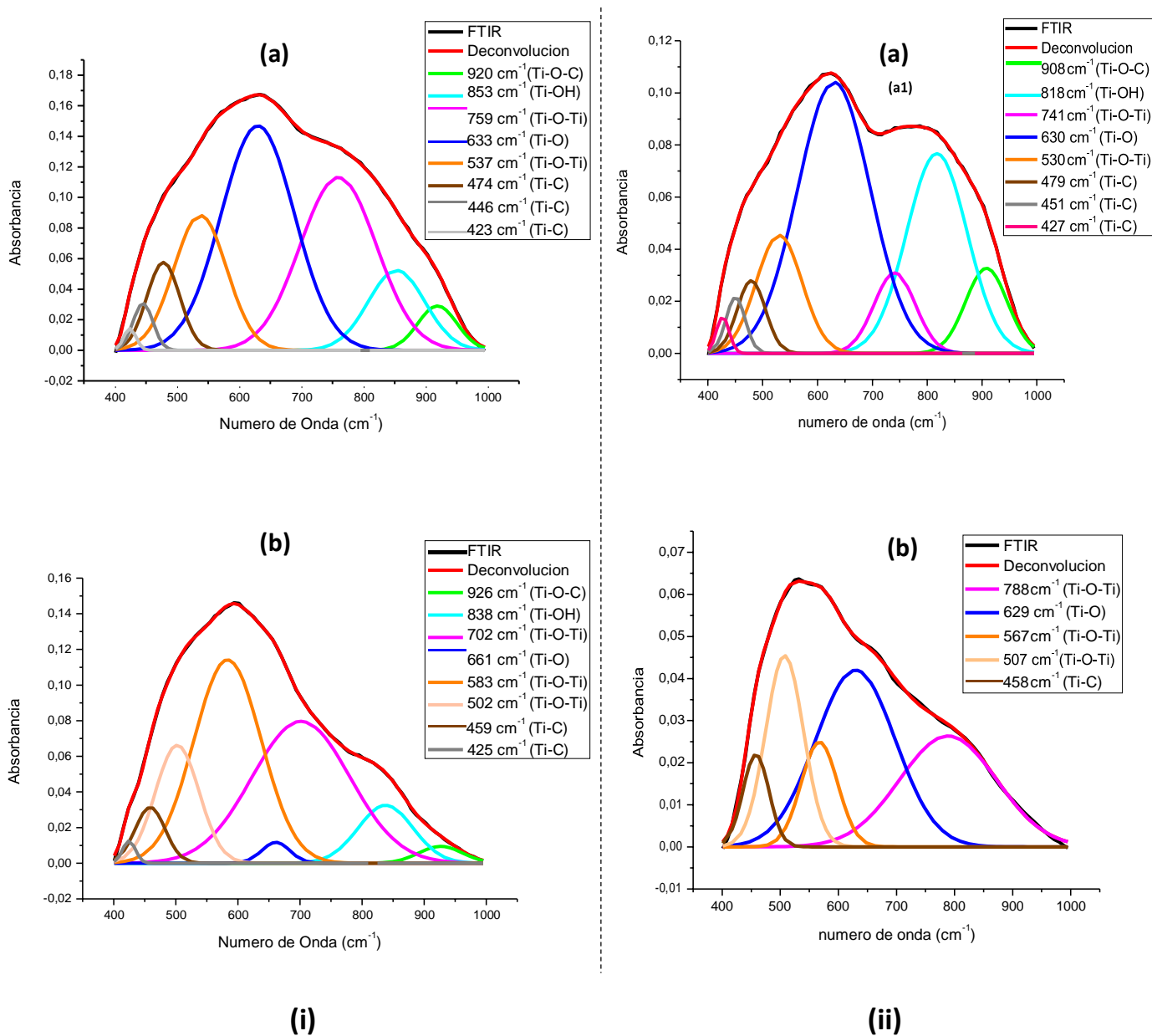


Figura 2.30 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) sin surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450 °C (b).

Los gráficos de la **Figura 2.30 (i)** se presentan una banda a 920 cm^{-1} y 926 cm^{-1} correspondiente al enlace Ti-O-C del grupo butoxi, proveniente del precursor TBT (50,52) o sea que aún existe carbón en el sólido. Por otro lado, las bandas ubicadas entre $\sim 500 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$ se asocian con la presencia de grupos Ti-O-Ti (51), resultado de las reacciones de condensación del Ti-OH, y presentan un alto valor de área integrada para la muestra tratada térmicamente (ver **Figura 2.31(a)**) lo que indica que son los grupos funcionales que más predominan en la misma. Las bandas a 853 cm^{-1} y 838 cm^{-1} se pueden asociar a los grupos Ti-OH presentes en la superficie del sólido producto de las reacciones de quimisorción disociativa del agua y cuya área integrada (ver **Figura 2.31(a)**) presentó un valor bajo respecto a otros grupos funcionales. Por último, las bandas cercanas

a $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ corresponderían a los grupos Ti-O (51) y las bandas próximas a 400 cm^{-1} al enlace Ti-C.

En **Figura 2.30(ii)** se observan las bandas características del Ti-O-Ti (530 cm^{-1} y 741 cm^{-1}), Ti-O (630 cm^{-1}) y Ti-OH (818 cm^{-1}) (51), en donde la banda Ti-O exhibe una mayor área integrada (ver **Figura 2.31(b)**). La banda Ti-OH, bastante intensa en el espectro (**Figura 2.30 (ii) (a)**), es evidencia de las reacciones de hidrólisis y condensación que pudieron ocurrir en el sistema. Así mismo, la presencia de grupos Ti-C y Ti-O-C, de baja intensidad, se pueden relacionar con la presencia del precursor de titanio, TBT, en el sistema de síntesis. Un gran cambio, en la forma del espectro, se observa al tratar térmicamente el sólido (**Figura 2.30 (ii) (b)**), evidenciándose la eliminación de los enlaces Ti-C y Ti-O-C y el aumento de la intensidad de las bandas asociadas al enlace Ti-O, condición que se ratifica con un valor alto de área integrada que ellos presentan (ver **Figura 2.31(b)**). Además, se observa una nueva banda a 507 cm^{-1} relacionada con los grupos Ti-O-Ti, resultado de las reacciones de condensación y deshidroxilación que ocurren en el sistema durante el tratamiento térmico a que se sometió el sólido.

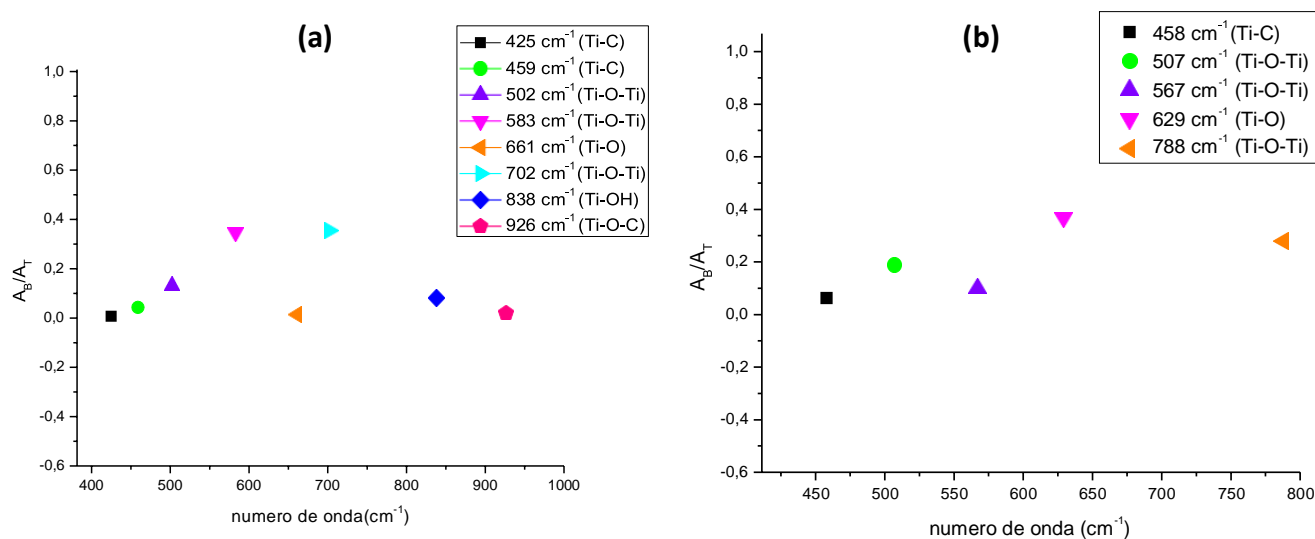


Figura 2.31 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango $1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) sin surfactante, tratadas térmicamente a $450\text{ }^\circ\text{C}$.

En la **Figura 2.30** se observa una tendencia general en donde los enlaces Ti-C disminuyen después de su tratamiento térmico mientras los enlaces Ti-O-Ti se ven fortalecidos.

➤ Muestras sintetizadas a una concentración 1mM de CTAB

En la **Figura 2.32** son evidentes los cambios respecto a los grupos predominantes en la muestra obtenida de un sistema sin CTAB (**Figura 2.30**). Los espectros deconvolucionados nuevamente muestran la presencia de enlaces como: Ti-O-C, Ti-OH, Ti-O, Ti-O-Ti, Ti-C ($50\text{-}52$), donde, nuevamente, los enlaces Ti-O y los enlaces Ti-O-Ti ($\sim 700\text{ cm}^{-1}$) presentaron mayor área en las muestras tratadas térmicamente (Ver **Figura 2.33**). El corrimiento de los enlaces Ti-OH, Ti-O-Ti,

Ti-O a números de onda menores, después de tratar térmicamente la muestra, indicaría el fortalecimiento de los mismos en el sólido (ver *Figura 2.32*).

Adicionalmente, a 949 cm^{-1} (ver *Figura 2.32 (ii) (a)*), aparece una pequeña banda que se podría asociar al grupo funcional Ti-O-C relacionado con el precursor de titanio empleado, banda que no apareció en espectros anteriores (50). El tratamiento térmico a que se sometió la muestra (Exp 3.1) generó un cambio en la forma de la banda envolvente (*Figura 2.32(ii) (b)*), que se evidencio específicamente en los valores de área integrada de los principales enlaces del TiO_2 (*Figura 2.32(ii) (b)*).

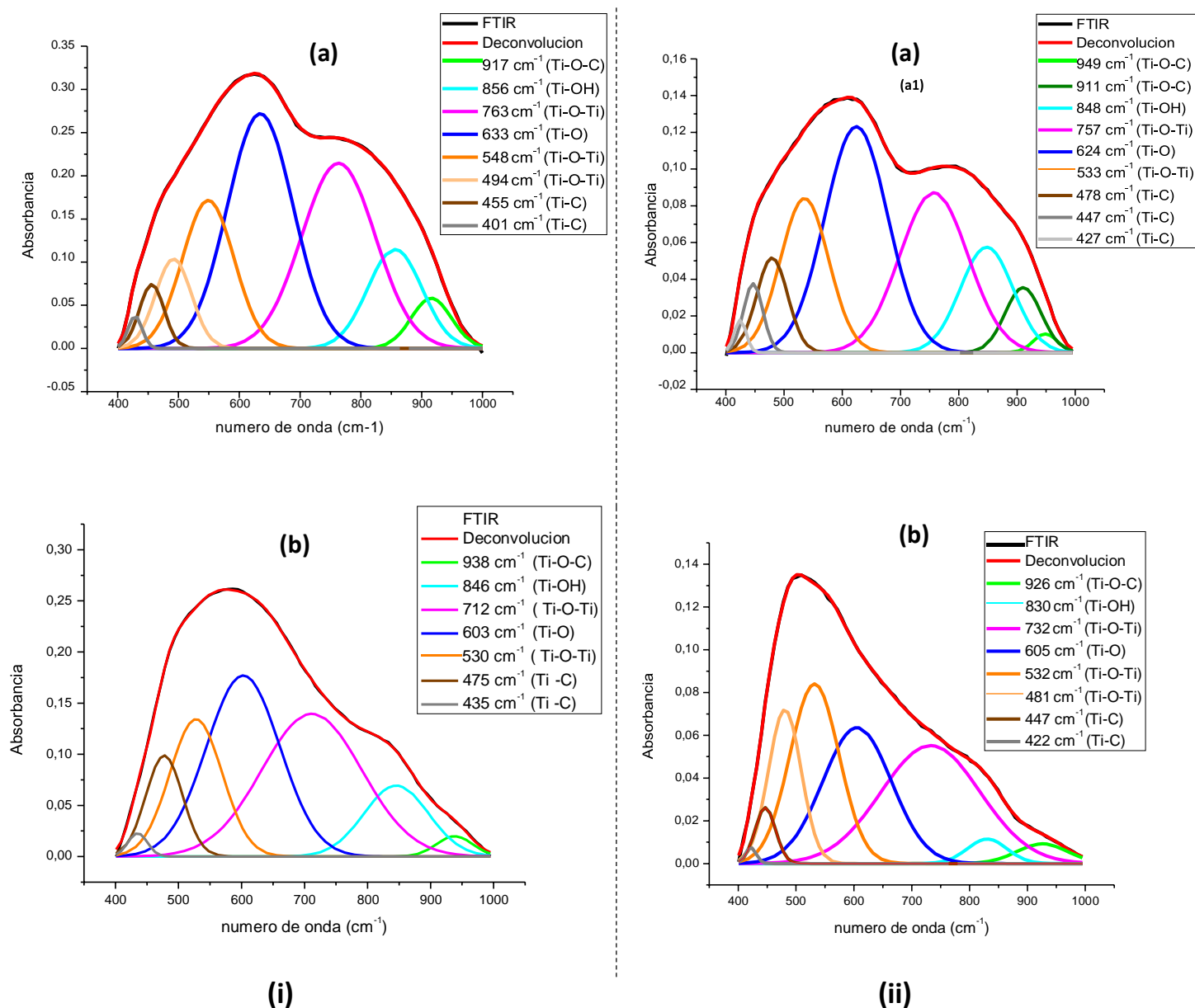


Figura 2.32 Espectros IR, en la región entre $400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 1mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C (b)

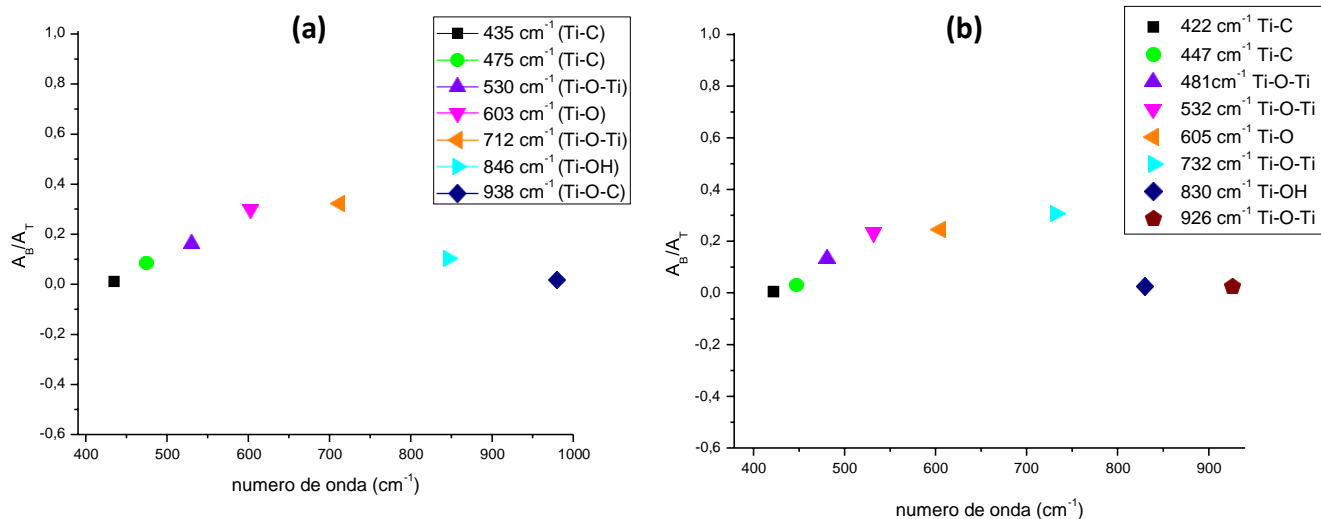


Figura 2.33 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango $1000-400\text{ cm}^{-1}$, de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) a una concentración 1mM de CTAB, tratadas térmicamente a $450\text{ }^\circ\text{C}$.

➤ **Muestras sintetizadas a una concentración 2mM de CTAB**

La deconvolución de la **Figura 2.35**, hace más evidente el efecto del surfactante, observándose la aparición de nuevas bandas asociadas al enlace Ti-O (615 cm^{-1} , 643 cm^{-1} , 662 cm^{-1}) y Ti-O-Ti (744 cm^{-1}), las cuales presentan una pequeña área integrada si se compara con la de otros grupos funcionales, como el enlace Ti-O a 651 cm^{-1} (**Figura 2.34**). Al someter la muestra al tratamiento a $450\text{ }^\circ\text{C}$, aparece una nueva banda a 515 cm^{-1} (Ti-O-Ti) bastante notoria en la deconvolución del espectro IR. Observando los valores de área integrada para la muestra tratada térmicamente (**Figura 2.35(b)**) es evidente que los enlaces Ti-O-Ti, banda a 718 cm^{-1} , y Ti-O-Ti, 568 cm^{-1} , presentaron un mayor valor de área integrada, indicando que ellos son los que predominan en el sólido; mientras que el enlace Ti-O (641 cm^{-1}), uno de los enlaces de mayor importancia en la muestra 15.5 (**Figura 2.33 (i)**), disminuyó su área integrada para la muestra 16.5 (ver **Figura 2.34**).

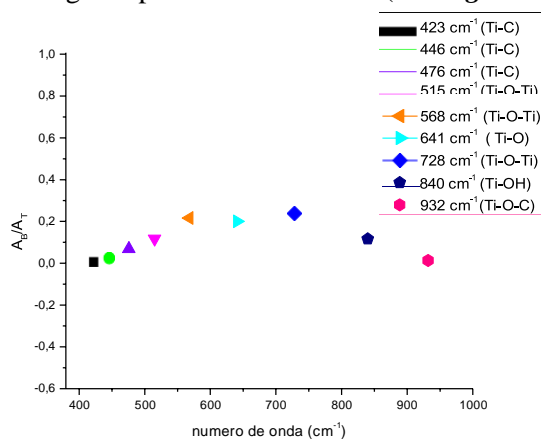


Figura 2.34 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango $1000-400\text{ cm}^{-1}$, del TiO_2 sintetizados en etanol a una concentración 1mM de CTAB, tratadas térmicamente a $450\text{ }^\circ\text{C}$.

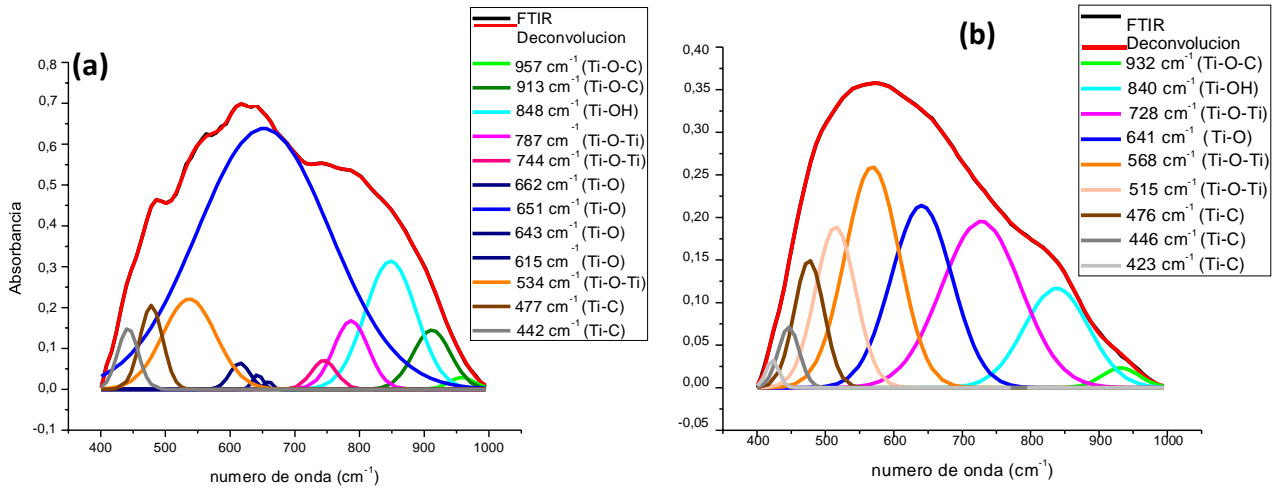


Figura 2.35 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm^{-1} , de los polvos sintetizados en etano, a una concentración 2mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450 °C (b).

➤ **Muestras sintetizadas a una concentración 3mM de CTAB**

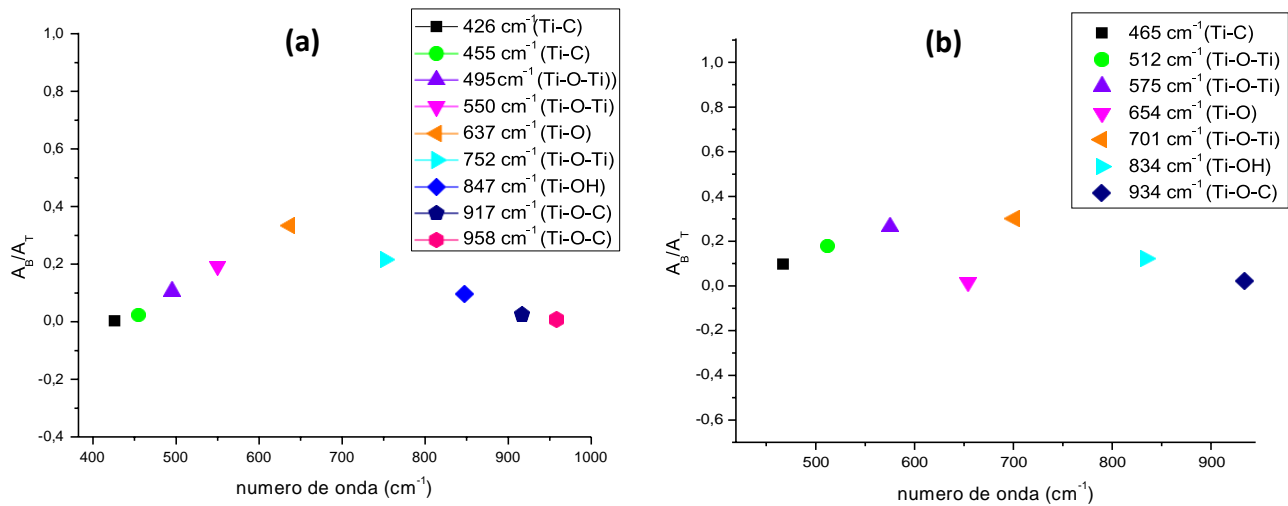


Figura 2.36 Valores de área integrada, A_B/A_T , correspondientes a las bandas del espectro IR, en el rango 1000-400 cm^{-1} de los polvos sintetizados en etanol (a) y tolueno (b) a una concentración 3mM de CTAB, tratadas térmicamente a 450 °C

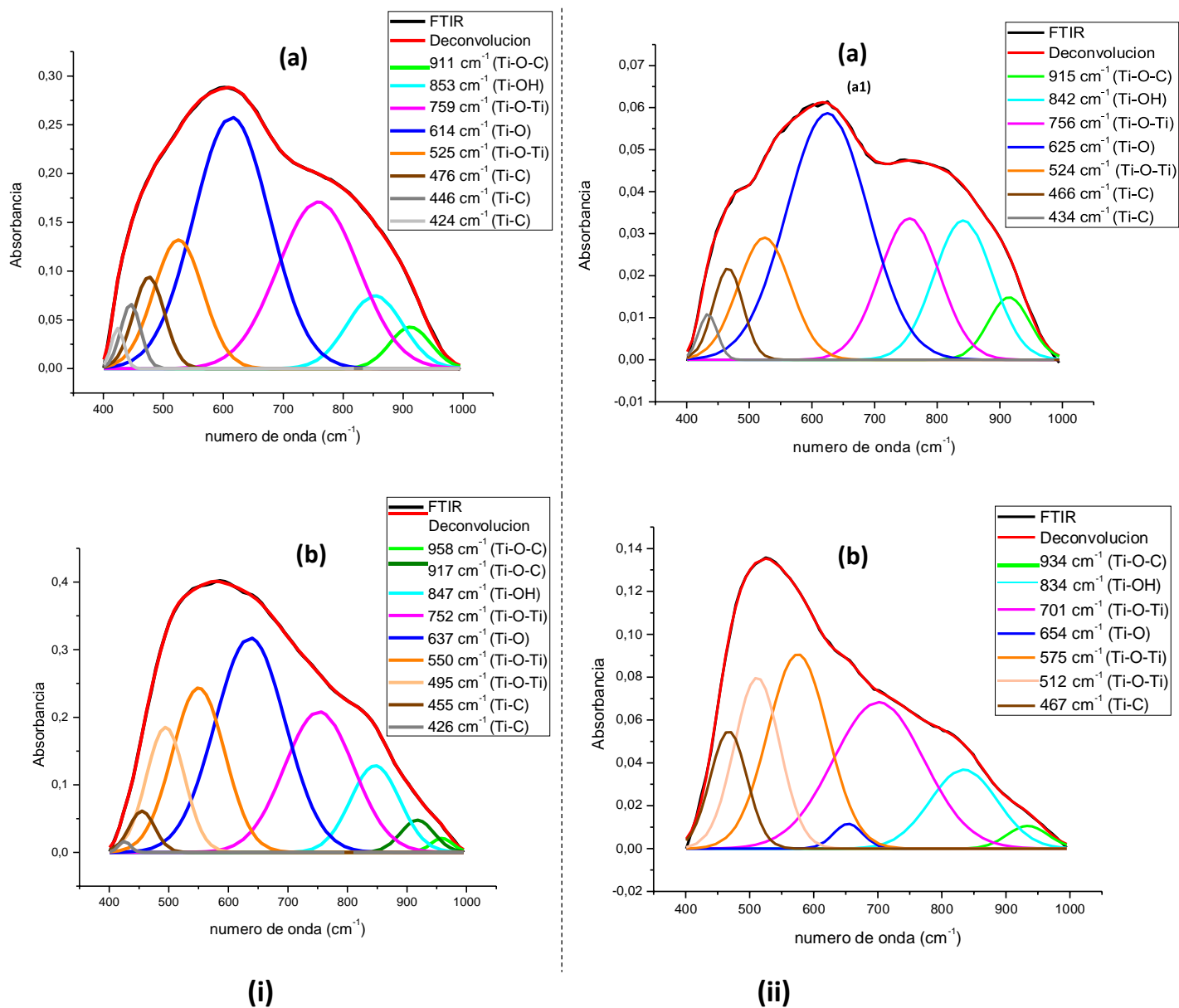


Figura 2.37 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm⁻¹, de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 3mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b)

La **Figura 2.36** indica que a concentraciones cercanas a la CMC se favorece la formación de enlaces Ti-O (ver **Figura 2.36(a)**) y Ti-O-Ti (ver **Figura 2.36 (b)**) pues las bandas asociadas a estos enlaces fueron las que presentaron mayores valores de área integrada. En la **Figura 2.37(i)(b)** se evidencia la aparición de bandas a 495 cm⁻¹ (Ti-O-Ti) y 958 cm⁻¹(Ti-O-C) así como las asociadas a los enlaces Ti-OH y Ti-C, el tratamiento térmico en esta muestra, genera un cambio drástico en la forma e intensidad de la banda envolvente.

➤ **Muestras sintetizadas a una concentración 6mM de CTAB**

En la **Figura 2.38 (i)** no se observan variaciones apreciables entre la muestra sin tratamiento térmico y la tratada a 450°C, el cambio más notorio fue la aparición de una banda a 950 cm⁻¹ (Ti-O-C) en la muestra tratada térmicamente. Respecto a los valores de área integrada, el enlace Ti-O (625 cm⁻¹) fue el que presentó el mayor valor si se compara con el de los demás enlaces (**Figura 2.39(a)**).

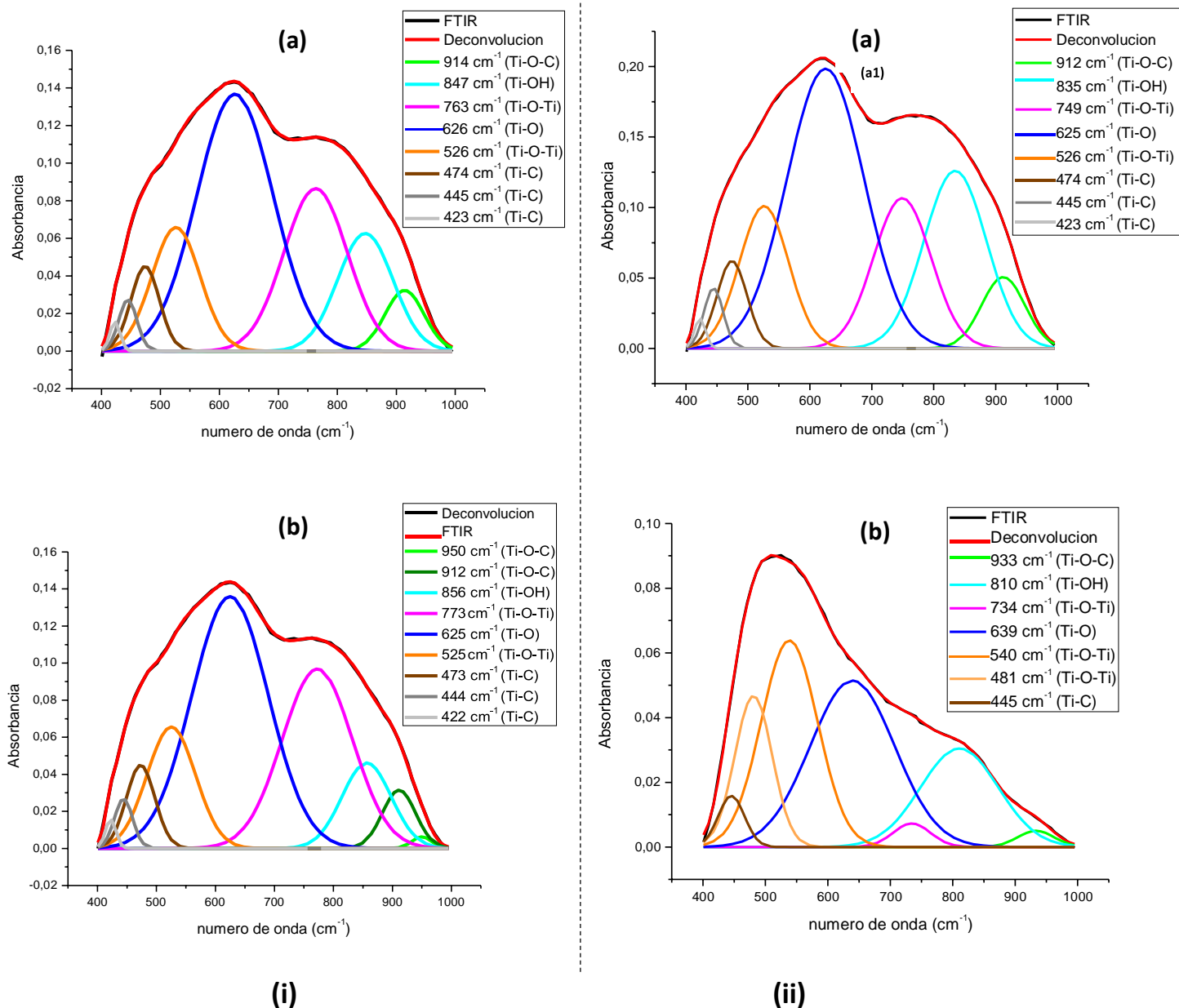


Figura 2.38 Espectros IR, en la región entre 400-1000 cm⁻¹, de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C(b)

En la **Figura 2.38 (ii) (b)** puede observarse como a concentraciones altas de surfactante se favorecen la formación de enlaces Ti-O-Ti (540cm^{-1} y 481cm^{-1}) y la presencia del enlace Ti-OH; en este espectro también están presentes los enlaces Ti-O-C y Ti-C. Para este caso en particular, cabe resaltar, que aunque la intensidad de la banda Ti-O disminuye su valor de área integrada, después de tratar térmicamente la muestra (**Figura 2.39(b)**), ésta presentó una intensidad superior al del espectro anterior (**Figura 2.36(b)**).

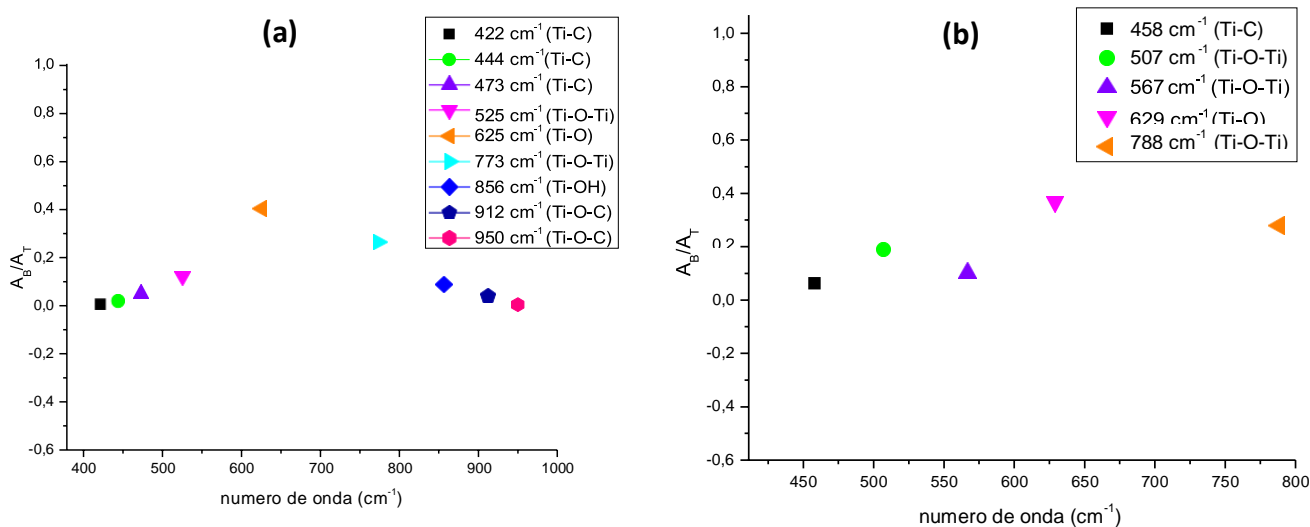


Figura 2.39 Espectros IR, en la región entre $400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, de los polvos sintetizados en etanol (i) y tolueno (ii) a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados a 450°C (b)

➤ **Análisis de los Valores de área integrada de los enlaces más relevantes obtenidos en los espectros IR deconvolucionados**

En la **Figura 2.40 (a)** puede observarse como al aumentar la concentración de surfactante en el medio de síntesis se favoreció la presencia de los enlaces Ti-O (600 cm^{-1}), aumentando el valor de su área integrada con la concentración, por su parte el enlace Ti-OH (800 cm^{-1}) se mantuvo invariable, su área integrada fue prácticamente independiente de la concentración de CTAB, y se presentó una reducción del enlace Ti-O-Ti ($\sim 500\text{ cm}^{-1}$); aunque el enlace Ti-O-Ti ($\sim 700\text{ cm}^{-1}$) no presentó una tendencia clara, en promedio se mantuvo invariable (a medida que se incrementaba la concentración su área disminuyó, inicialmente, pero al acercarse al valor de la CMC volvió a aumentar). Así mismo las bandas Ti-C ($\sim 450\text{ cm}^{-1}$), Ti-O-C ($\sim 910\text{ cm}^{-1}$) y Ti-O-C ($\sim 950\text{ cm}^{-1}$), que contenían la información de la presencia de carbono en el sólido, también presentaron un comportamiento coherente con el incremento de la concentración de CTAB: mientras las bandas a bajos números de onda estuvieron siempre presentes, independiente de la concentración, las dos últimas se presentaron simultáneamente en el espectro solo cuando se tomaron valores cercanos o por encima de la CMC (3.5 mM) o sea que serían las más directamente relacionadas con la acción del surfactante.

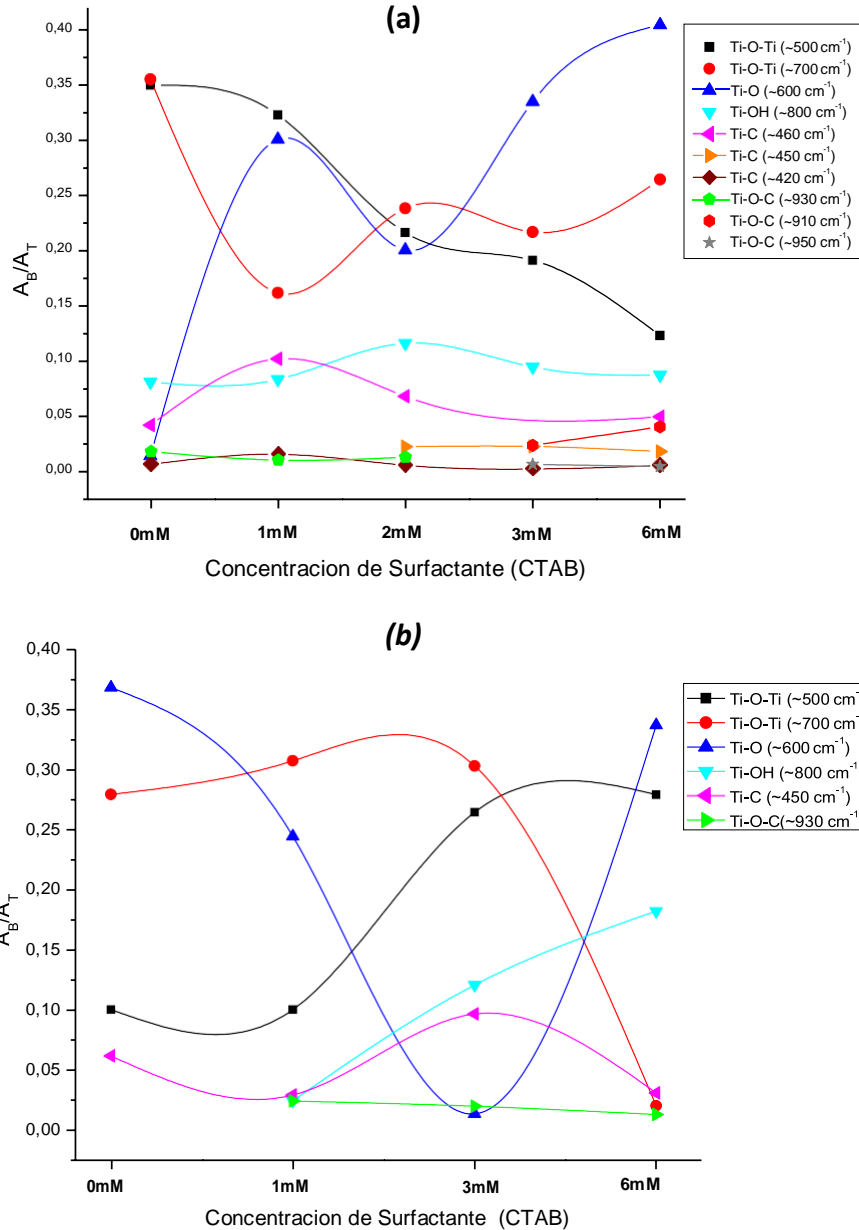


Figura 2.40 Valores de área integrada correspondientes a los enlaces más relevantes obtenidos en los espectros IR deconvolucionados, entre 1000 y 400 cm^{-1} , para las muestras sintetizadas en etanol (a) y en tolueno (b), tratadas a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la **Figura 2.40 (b)** se muestra la evolución de los enlaces más representativos de los espectros IR deconvolucionados, entre 1000 y 400 cm^{-1} correspondientes a muestras sintetizadas en tolueno con diferentes concentraciones de CTAB y tratadas a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. En ella se puede observar como al aumentar la presencia del surfactante en el medio de síntesis se favorecieron los enlaces Ti-O-Ti ($\sim 500\text{ cm}^{-1}$) y Ti-OH ($\sim 800\text{ cm}^{-1}$), y se redujo la presencia del modo vibracional del enlace Ti-O-Ti ubicado a $\sim 700\text{ cm}^{-1}$ para la concentración 6 mM de CTAB. El comportamiento de los enlaces Ti-O ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$) no tiene una tendencia definida, su área integrada decrece hasta la concentración 3 mM y

luego se incrementa en 6mM. Con relación a los grupos funcionales que presentan carbono, los enlaces Ti-O-C ($\sim 930\text{cm}^{-1}$) y Ti-C ($\sim 450\text{cm}^{-1}$), ellos no presentan cambios notorios y permanecen prácticamente constante. La **Figura 2.40(b)** indica la gran dinámica que a nivel de los grupos funcionales superficiales, presentes en las muestras, se presenta, condición que, además, puede estar relacionada con la estructura de defectos que se puede encontrar en la superficie del sólido, condicionada por los parámetros de síntesis de las mismas.

De la **Figura 2.40** puede determinarse que el solvente etanol sin la presencia de surfactante favorece la formación de enlaces Ti-O-Ti, mientras que el solvente tolueno contribuye a la formación de enlaces Ti-O, esta diferencia indica que naturaleza del solvente puede favorecer las reacciones de condensación (solvente etanol) o la aparición de enlaces superficiales (solvente tolueno); la adición de surfactante al medio determina una tendencia creciente en la formación de enlaces Ti-O-Ti para el solvente tolueno, mientras que para el etanol esta misma es decreciente.

El incremento en la concentración de surfactante al medio de reacción favorece la aparición del enlace Ti-O para ambos solventes.

2.3.3.2 Difracción de Rayos X

➤ Patrones de Difracción de Rayos X para las muestras de TiO_2

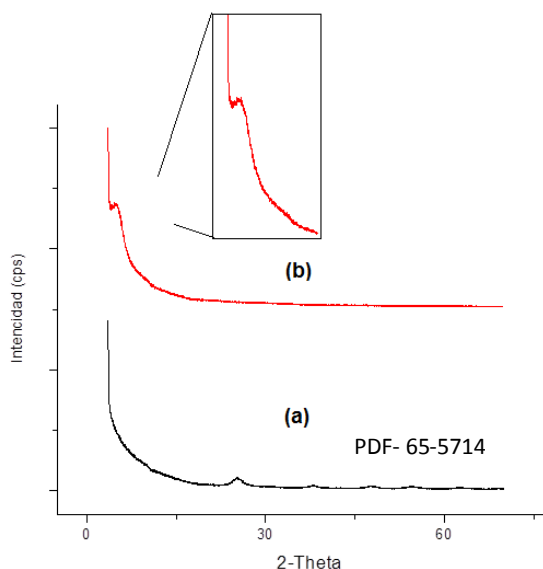


Figura 2.41 Difractogramas de Rayos X correspondientes a los sólidos sintetizados en etanol, sin surfactante (a) y con una concentración de surfactante 3mM (b), sin tratamiento térmico.

En **Figura 2.41** se muestran los difractogramas de dos de las muestras sintetizadas sin tratamiento térmico. Solo el difractograma de la **Figura 2.41(a)**, correspondiente al sólido obtenido sin CTAB (Muestra 19.1), se observó una incipiente fase cristalina de TiO_2 , con PDF 65-5714 inmersa en una estructura amorfa. La otra muestra que contenía titanio, sintetizada en etanol con una concentración 3mM de CTAB (Muestra 17.1) presentó una estructura amorfa pero por debajo de 10° se observa una pequeña zona que presenta una serie de picos que hace presagiar una cierta estructura o

disposición de mesoporosa, condición que es necesario estudiar con más cuidado. Con base en este resultado se puede concluir que la presencia de surfactante, en el medio de síntesis, dificulta la organización de los átomos de titanio y oxígeno estructuralmente, para lo cual se requiere un tratamiento térmico posterior, tal como lo ilustra la **Figura 2.43** donde es evidente la consolidación de la fase anatasa.

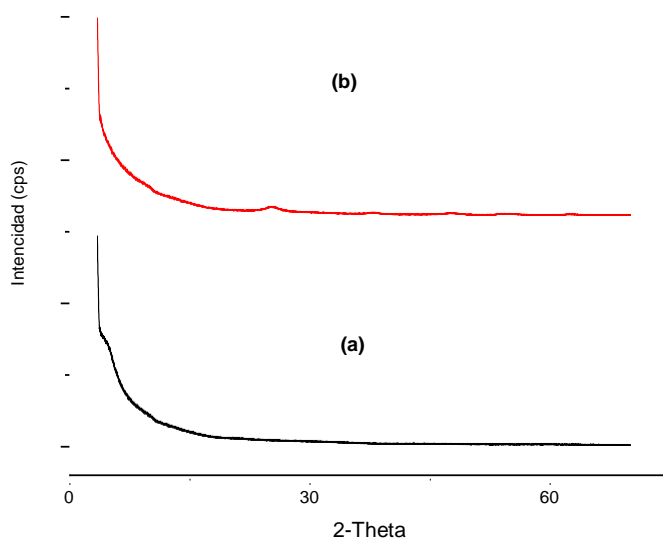


Figura 2.42 Difractogramas de Rayos X correspondientes a muestras sintetizadas en tolueno sin surfactante (a) y con una concentración de surfactante 3mM (b), sin tratamiento térmico.

En la **Figura 2.42** se muestran dos de los difractogramas correspondientes a muestras sintetizadas en tolueno y que no fueron tratadas térmicamente. Solo en el difractograma de la **Figura 2.42 (b)** (muestra Exp4.1), se observa una incipiente cristalización de una fase, pero prevalece en las dos muestras la amorficidad de las mismas. En el difractograma de la muestra obtenida sin surfactante se observa un pequeño lomo, a bajas ángulos, condición que se debería estudiar, a futuro, más cuidadosamente. Con base en este resultado se puede concluir que, a diferencia de lo que se presentó en los sólidos sintetizados en etanol, la presencia de surfactante, en el medio de síntesis, favoreció una incipiente organización estructuralmente de los átomos de titanio y oxígeno, pero se requiere un tratamiento térmico posterior, tal como lo ilustra la **Figura 2.44**, para consolidar la fase anatasa.

Los difractogramas (**Figura 2.43** y **Figura 2.44**) exhibieron como principal fase cristalina la anatasa y los PDF identificados, para cada muestra, se indican en las mismas gráficas. El perfil de los picos presentes en los difractogramas mostrados en la **Figura 2.43** y **Figura 2.44** hace prever que la muestra no está bien cristalizada (falta de definición en los picos).

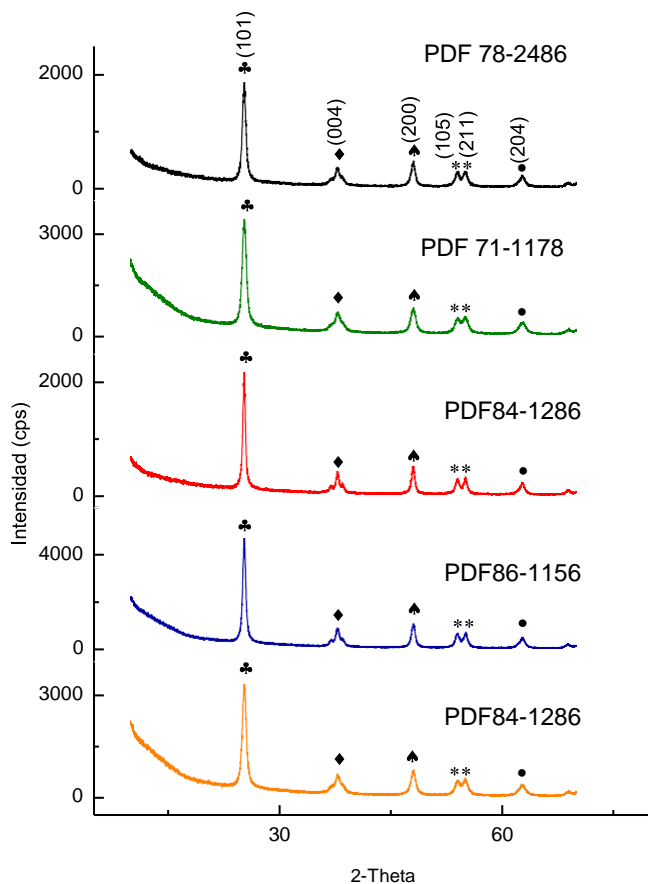


Figura 2.43 Difractogramas de Rayos X correspondientes a los sólidos obtenidos en etanol sin surfactante (a) y utilizando las siguientes concentraciones de CTAB: (b) 1mM, (c) 2mM, (d) 3mM, y (e) 6mM, tratados térmicamente a 450°C.

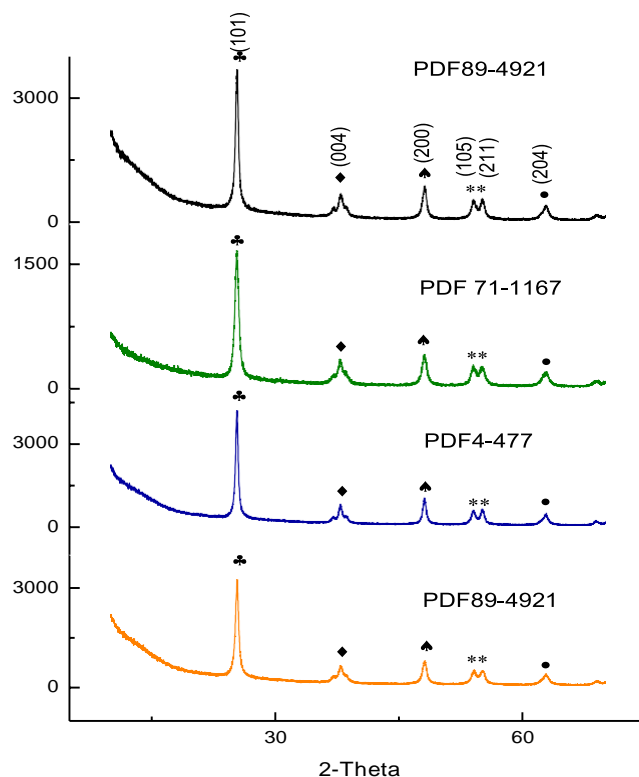


Figura 2.44 Difractogramas de Rayos X correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno sin surfactante (a) y con diferentes concentraciones de CTAB: (b) 1 mM, (c) 3 mM, (d) 6 mM, tratados térmicamente a 450°C.

2.3.3.2.1.1 Tamaño de Cristalito

Utilizando la fórmula de Debye-Scherrer (Ec.1) y considerando el pico de difracción más representativo de la fase tetragonal del TiO₂, el (101), se encontró que los tamaños medios de cristalitos son los que se indican en la **Tabla 2.9 Tamaño de Cristalito de los sólidos sintetizados en tolueno, con diferentes concentraciones de CTAB y tratadas a 450 °C, para el pico de difracción (101) del TiO₂**

Muestra	Concentración CTAB (mM)	Tamaño de Cristalito
Exp6.5	0	4,63
Exp3.5	1mM	3,47
Exp4.5	3mM	4,63
Exp5.5	6mM	3,97

y la **Tabla 2.9**.

Tabla 2.9 *Tamaño de Cristalito de los sólidos sintetizados en tolueno, con diferentes concentraciones de CTAB y tratadas a 450 °C, para el pico de difracción (101) del TiO₂*

Muestra	Concentración CTAB (mM)	Tamaño de Cristalito
Exp6.5	0	4,63
Exp3.5	1mM	3,47
Exp4.5	3mM	4,63
Exp5.5	6mM	3,97

Tabla 2.10 *Tamaño de Cristalito de los sólidos sintetizados en etanol, con diferentes concentraciones de CTAB y tratados a 450 °C, para el pico de difracción (101)*

Muestra	Concentración CTAB (mM)	Tamaño de Cristalito (nm)
19.5	0	3.47
15.5	1mM	2.78
16.5	2mM	4.63
17.5	3mM	3.47
18.5	6mM	2.78

El tamaño de cristalito encontrado fue pequeño y su tendencia es a disminuir, salvo la muestra de 2 mM (*Tabla 2.10*) y la de 3mM (*Tabla 2.9*), con la presencia del CTAB en el medio de síntesis, o sea que restringe la cristalización de las muestras como lo evidencian los difractogramas de la *Figura 2.43* y de la *Figura 2.44*.

Hay un mayor control del tamaño de cristal en las muestras sintetizadas en el solvente etanol que en las obtenidas en tolueno, esto se refleja en los menores valores de tamaño de cristal encontrados para este solvente (ver *Tabla 2.10*)

2.3.3.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

- **Muestras sintetizadas sin la presencia de surfactante**

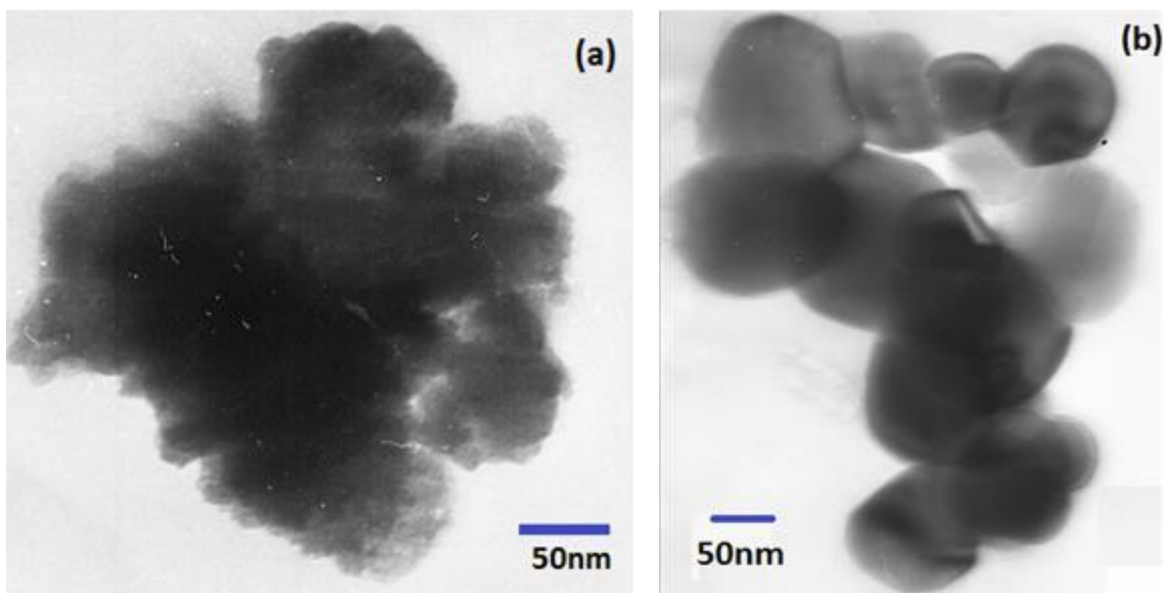


Figura 2.45 Micrografías MET correspondientes a sólidos obtenidos sin surfactantes en etanol, y sin tratamiento térmico (a) y tratado térmicamente a 450 °C (b).

En la **Figura 2.45(a)**, el sólido obtenido presenta una gran cantidad de partículas pequeñas que se encuentran aglomeradas, de un tamaño aproximado de 5-10 nm. En la **Figura 2.43 (b)** las partículas se encuentran más definidas, con una morfología esferoidal y un tamaño comprendido entre 50-100 nm (partículas nanométricas); el efecto del tratamiento térmico es evidente.

- **Muestras sintetizadas a una concentración 1mM de CTAB**

La **Figura 2.46 (a)** se observa la presencia de partículas con diferente morfología: esferoidales, tipo aguja e irregulares, y su tamaño varía entre 5-200 nm. De acuerdo a lo obtenido, la adición de surfactante (1Mm) propicia la formación de muestras con un menor grado de aglomeración pero con partículas que difieren en forma y tamaño.

La **Figura 2.47 (a)** muestra la presencia de grandes aglomerados y, cuando los sólidos se trataron térmicamente a 450 °C (**Figura 2.47 (b)**), se favoreció la presencia de una pequeña porosidad en los mismos, lo que requiere, a futuro, analizar con mayor cuidado dada la posibilidad de que sintetizando en tolueno y con bajas concentraciones de CTAB, se esté favoreciendo la conformación de nanoestructuras de TiO₂, de naturaleza mesoporosa. No se observa una morfología definida en ninguna de las muestras de la **Figura 2.47**.

El efecto de la adición de surfactante y el solvente muestran diferencias notorias, en donde la velocidad con que ocurren los procesos de hidrólisis y condensación mencionados en el ítem 2.3.2, determinan la aparición de morfologías esféricas (solvente etanol) e irregulares (solvente tolueno).A

la concentración 1mM, aún no se presenta un completo control de la morfología y el grado de aglomeración de las partículas.

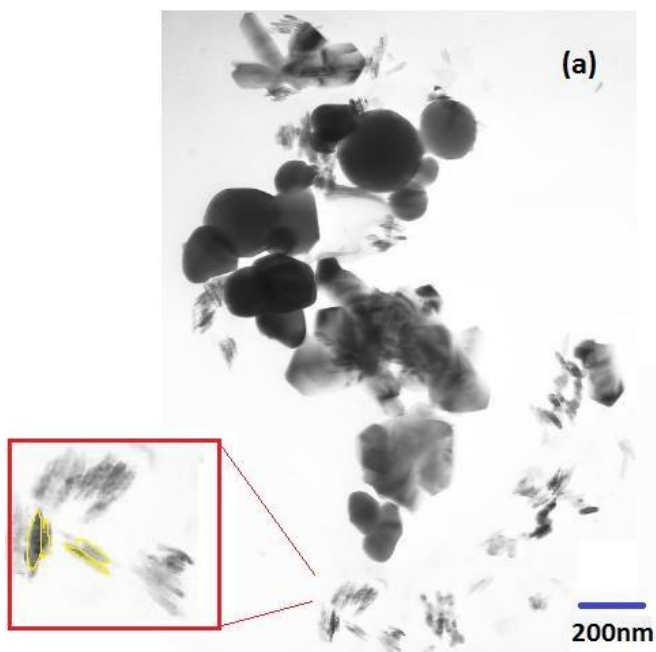


Figura 2.46 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 1mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a)

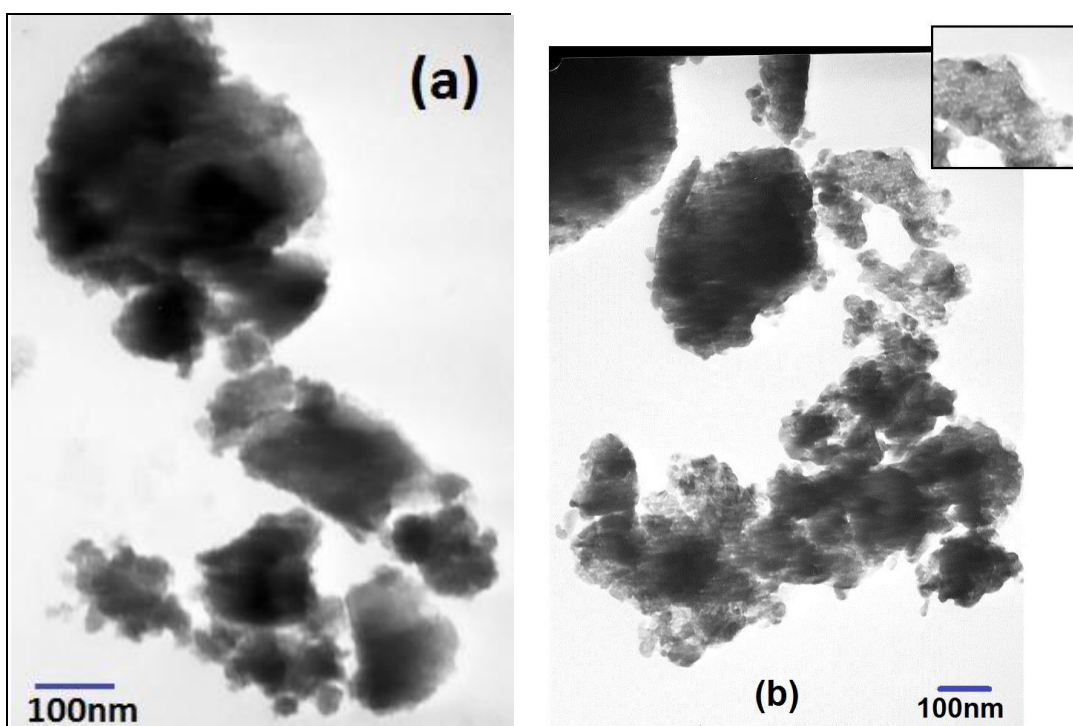


Figura 2.47 Micrografías MET correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, con una concentración 1 mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratado térmicamente a 450°C (b)

- Muestras sintetizadas a una concentración 2mM de CTAB

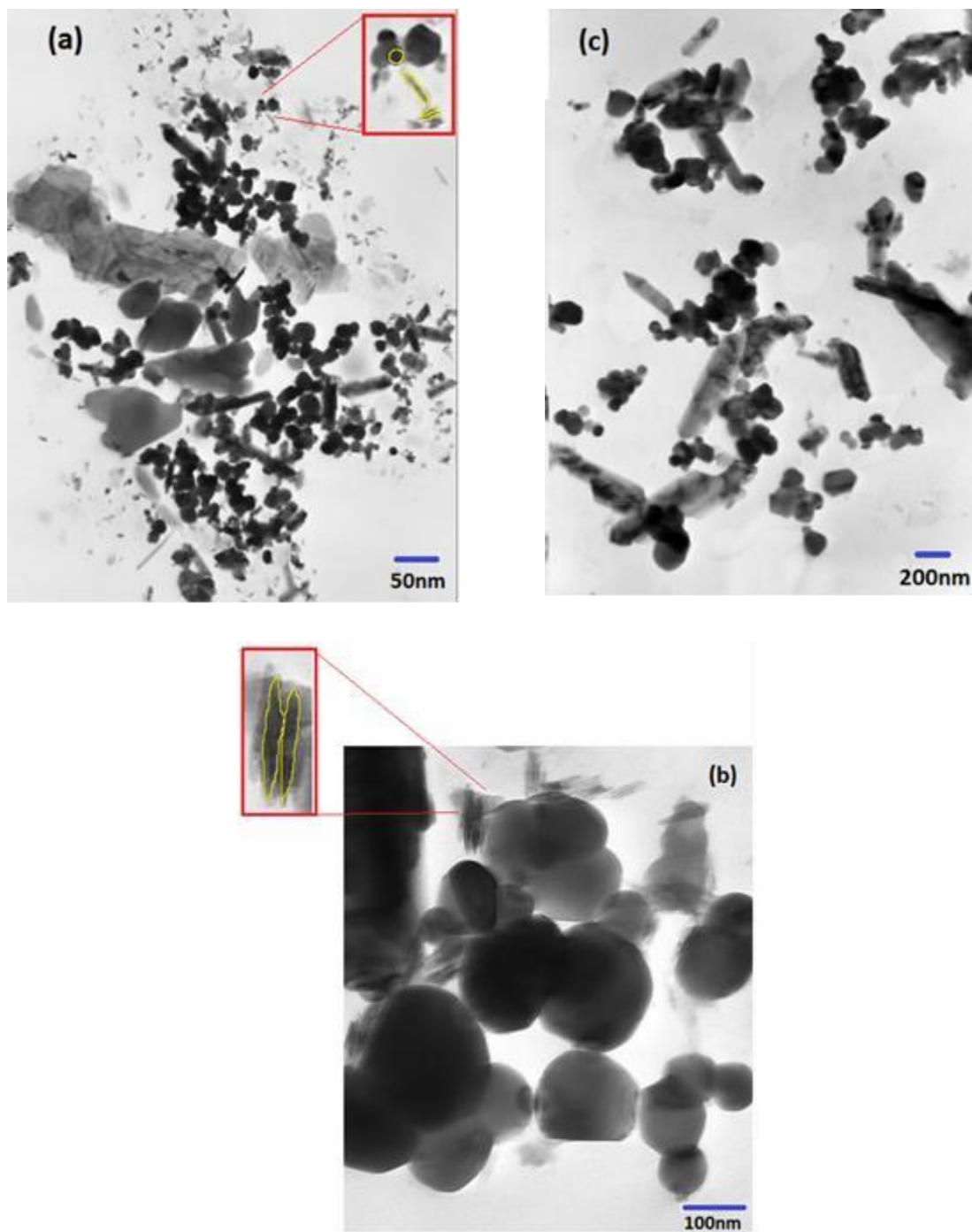


Figura 2.48 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 2mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y (b) o tratadas térmicamente a 450 °C (c)

Las muestras de las *Figura 2.48 (a) y (b)*, sintetizadas con una concentración 2mM y sin tratamiento térmico, presentaron partículas con morfología definida: algunas esferoidales y otras con forma de aguja, con cierto grado de aglomeración. Al tratar térmicamente la muestra (*Figura 2.48(c)*), se encuentra que el tamaño de las partículas se incrementa, manteniéndose las morfologías esferoidal y acicular con baja aglomeración.

- **Muestras sintetizadas a una concentración 3mM de CTAB**

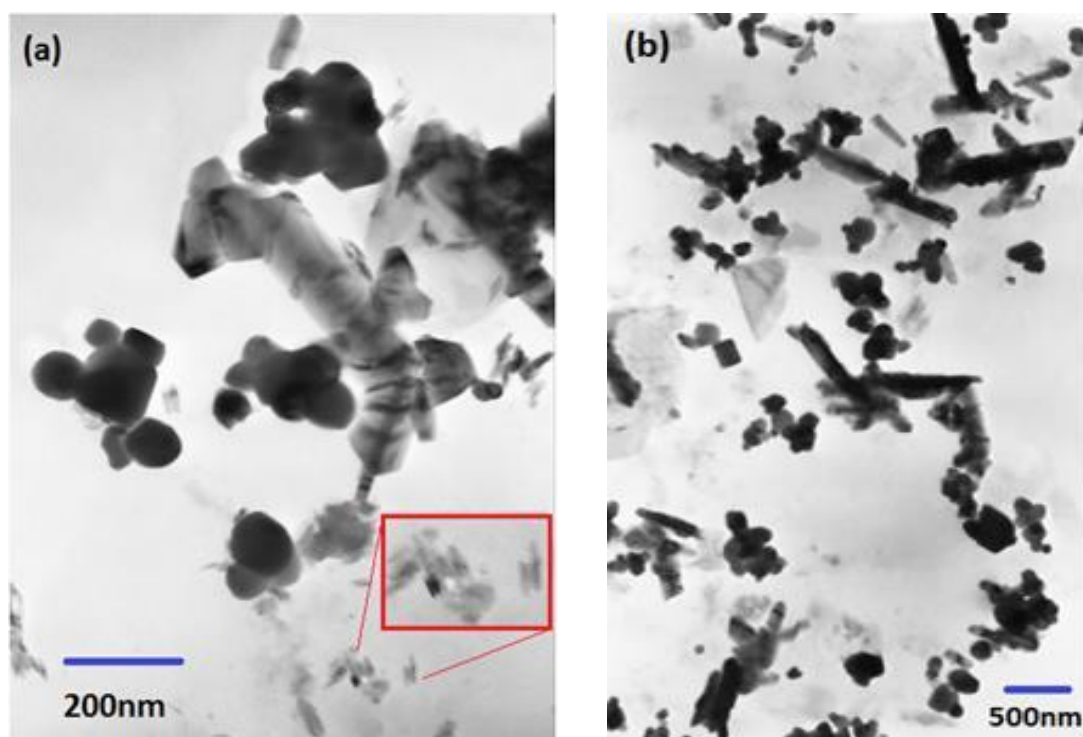


Figura 2.49 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol a una concentración 3mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) o tratada a 450 °C (b)

La *Figura 2.49(a)*, correspondiente a sólidos sintetizados con 3 mM de CTAB y sin tratamiento térmico, muestra la aparición de grandes aglomerados, con forma tubular resultado de la unión de varias partículas esferoidales, y la presencia de pequeñas agujas. Al tratar térmicamente la muestra, *Figura 2.49(b)*, se observan partículas esferoidales y columnares, más que agujas.

- Muestras sintetizadas a una concentración 6mM de CTAB

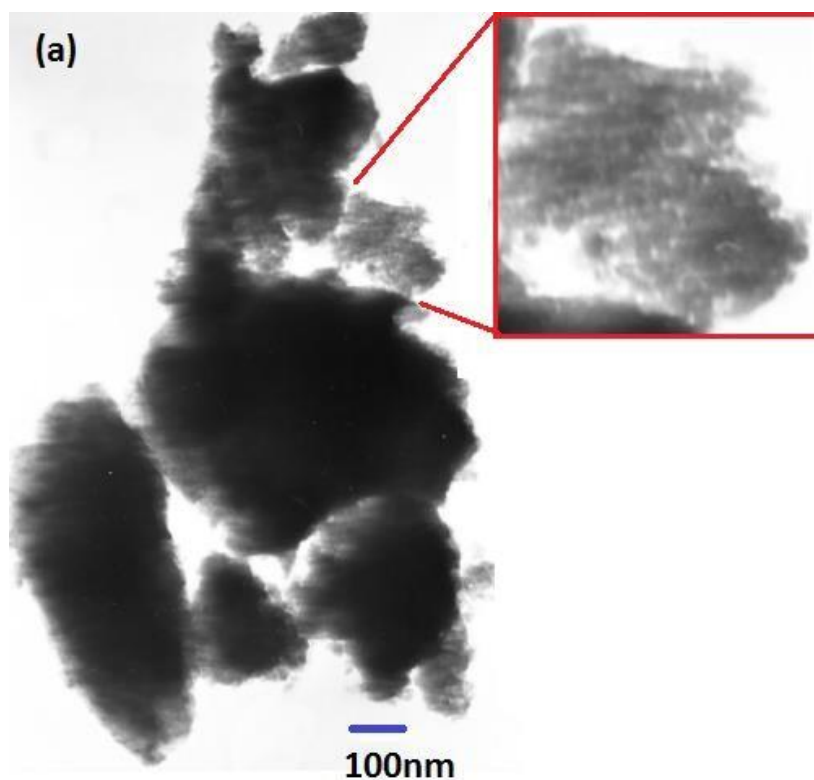


Figura 2.50 Micrografías obtenidas con MET correspondientes a sólidos sintetizados en etanol con una concentración 6mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a).

La *Figura 2.50 (a)* muestra el sólido sintetizado a una concentración 6mM, sin tratamiento térmico, donde se observa que este presenta una porosidad, tal como se ilustra en el “inset” de la figura, poniendo en evidencia una estructura mesoporosa como resultado de un exceso de surfactante en el medio; la presencia de aglomerados es evidente en estas muestras

2.3.3.4 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

- Muestras sintetizadas en etanol

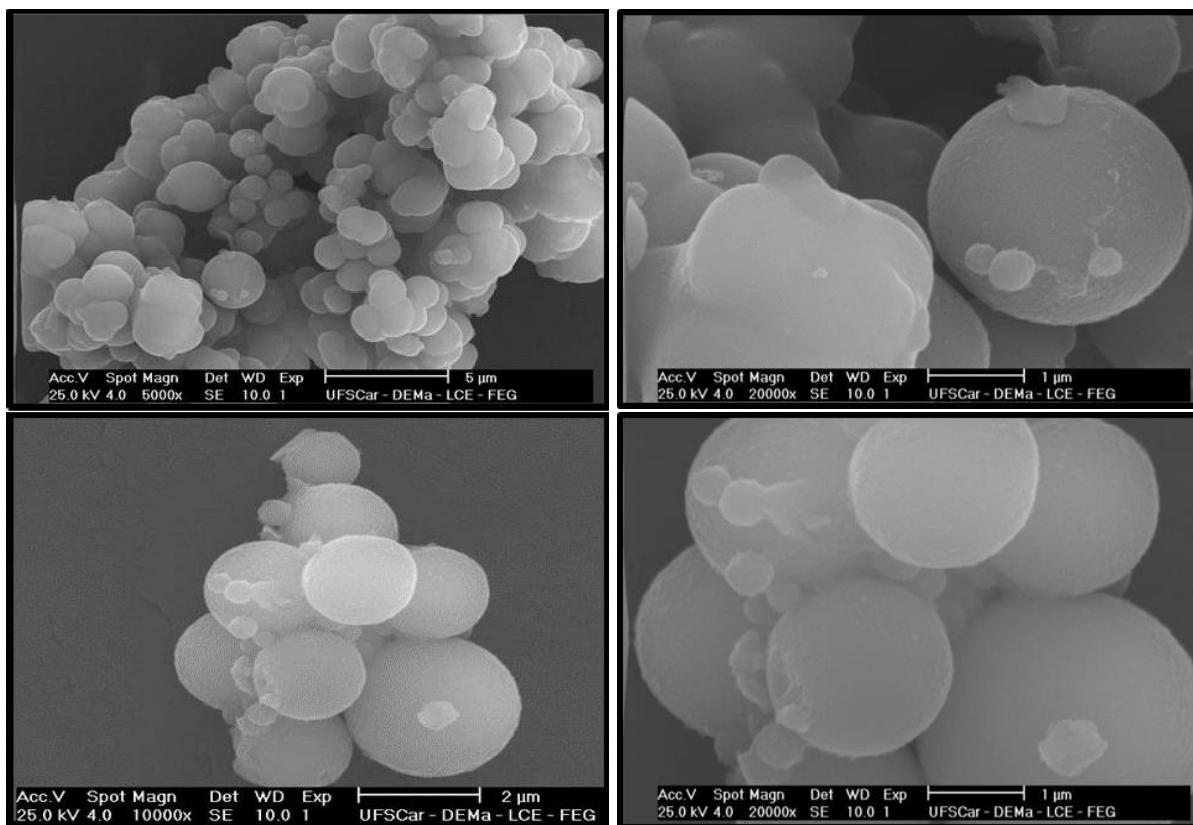
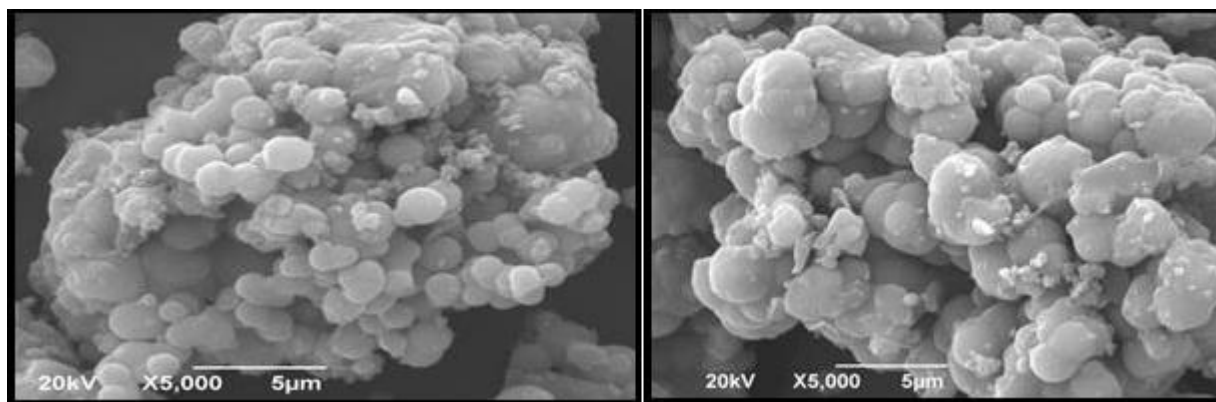


Figura 2.51 Fotografías obtenidas con MEB del TiO_2 sintetizado en etanol, sin presencia de surfactante, tratado térmicamente a 450 °C.



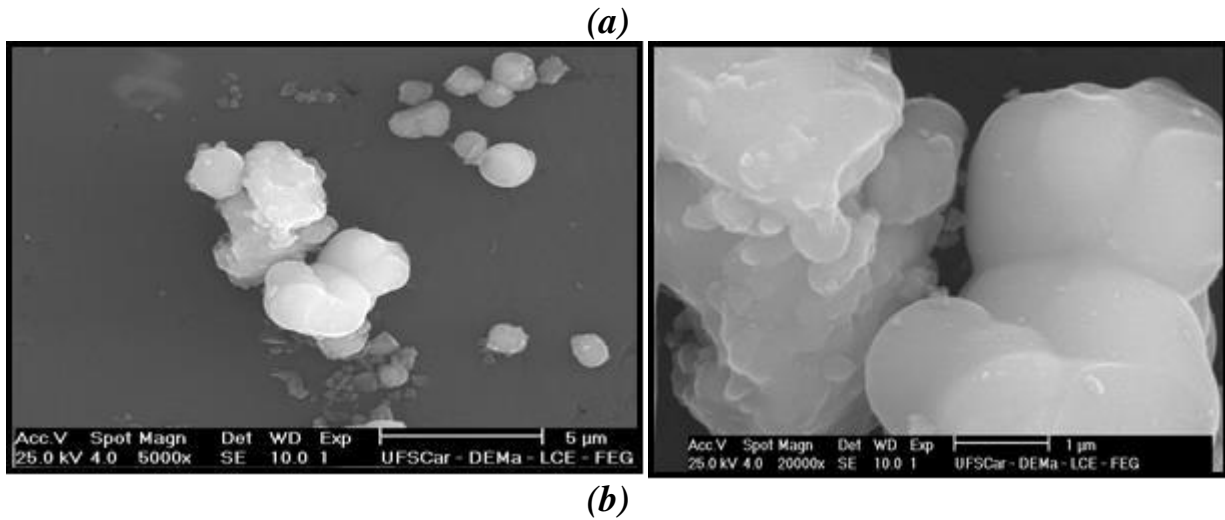


Figura 2.52 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en este trabajo, con una concentración 1mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) o tratada a 450 °C (b)

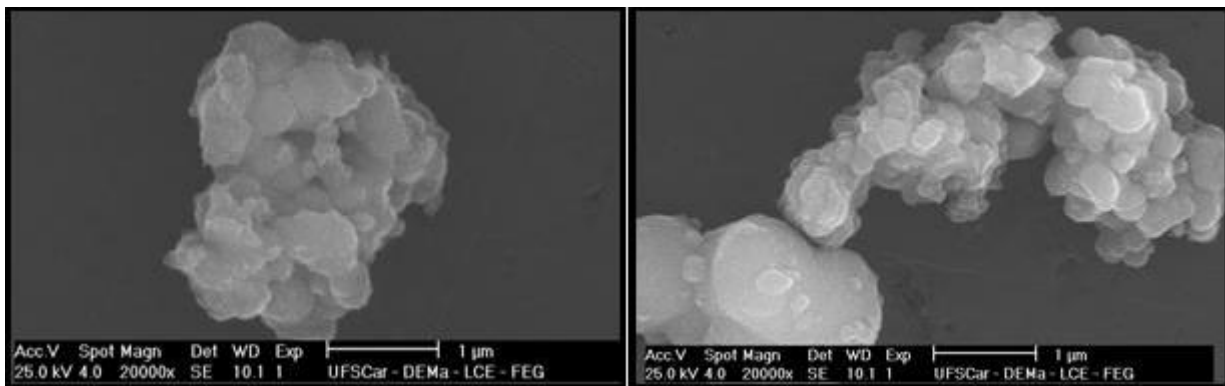


Figura 2.53. Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados, con una concentración 2mM de CTAB, y tratados térmicamente a 450 °C

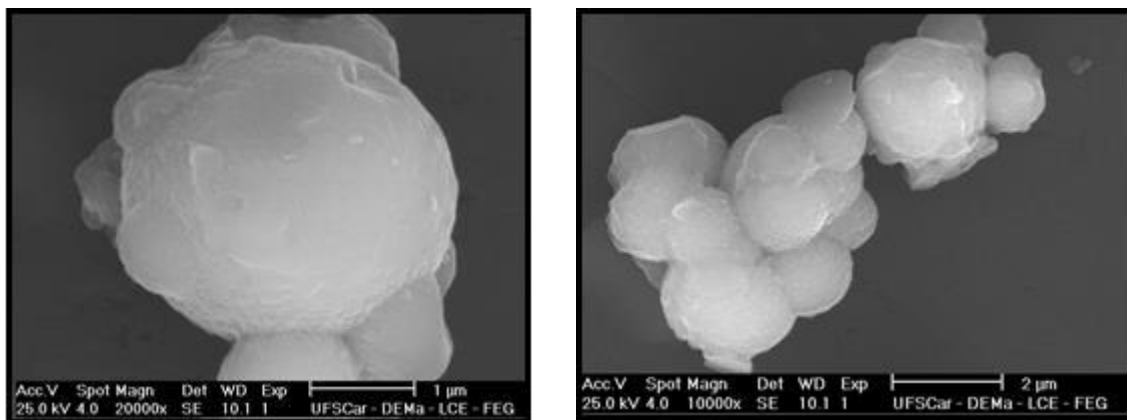


Figura 2.54 Micrografías obtenidas con MEB de sólidos sintetizados, con una concentración 3mM de CTAB y tratada térmicamente a 450 °C.

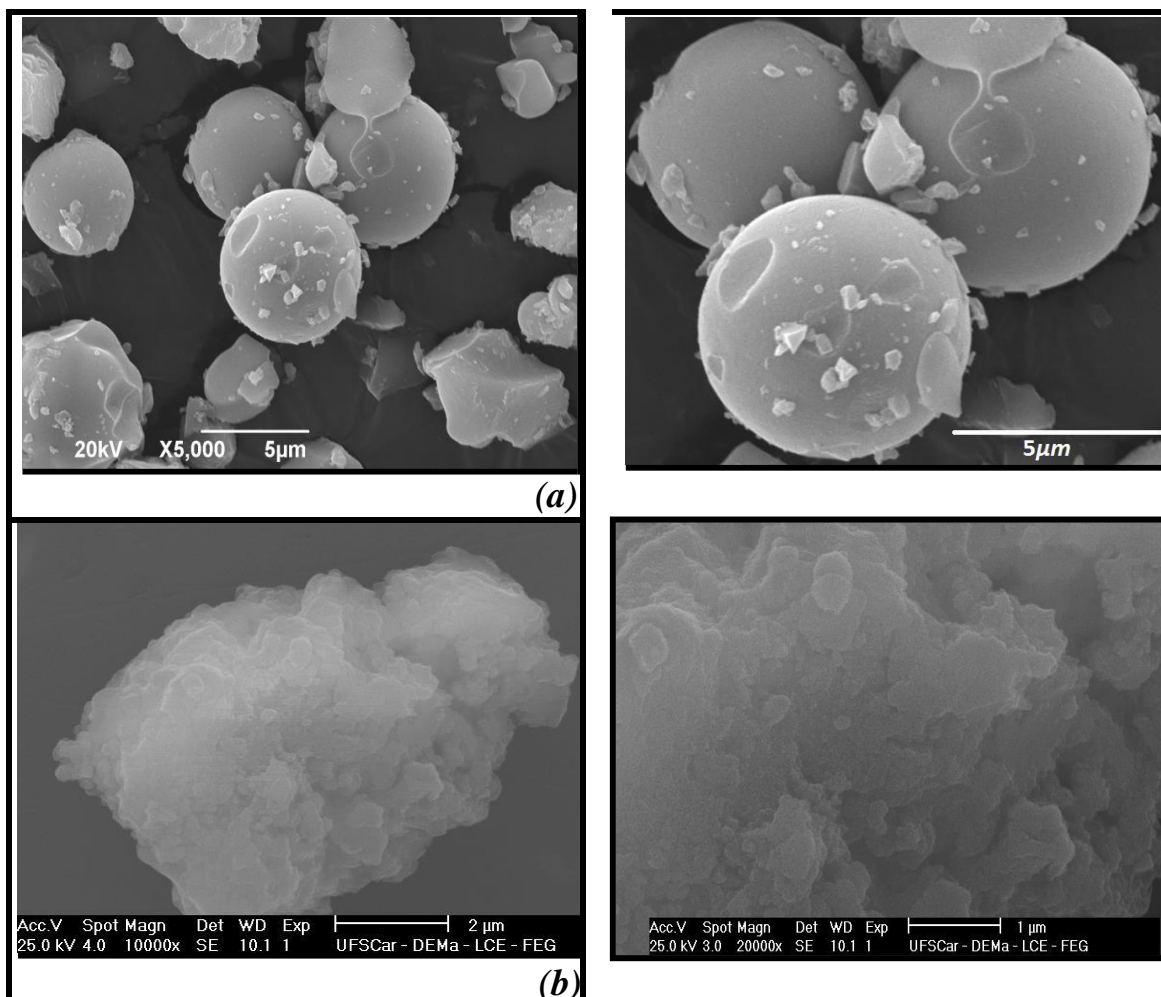


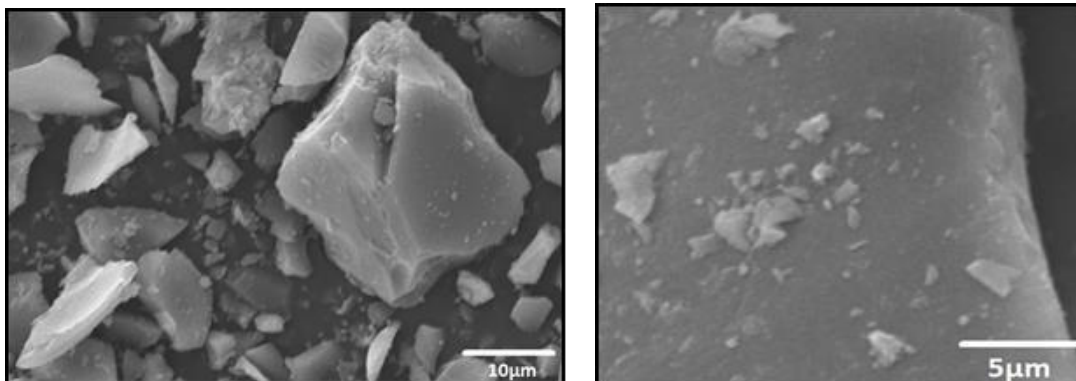
Figura 2.55 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados con una concentración 6mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) (muestra 18.1) y tratada a 450 °C (b) (muestra 18.5).

En las **Figura 2.51** a la **Figura 2.55** se puede observar como la adición de surfactante disminuyó la formación de aglomerados, aunque el tamaño de los que se formaron fue grande (orden de las micras), y afectó la morfología que presentaron las partículas secundarias, dando como resultado pequeñas partículas, presentes en todas las muestras, así partículas de gran tamaño con formas poco definidas.

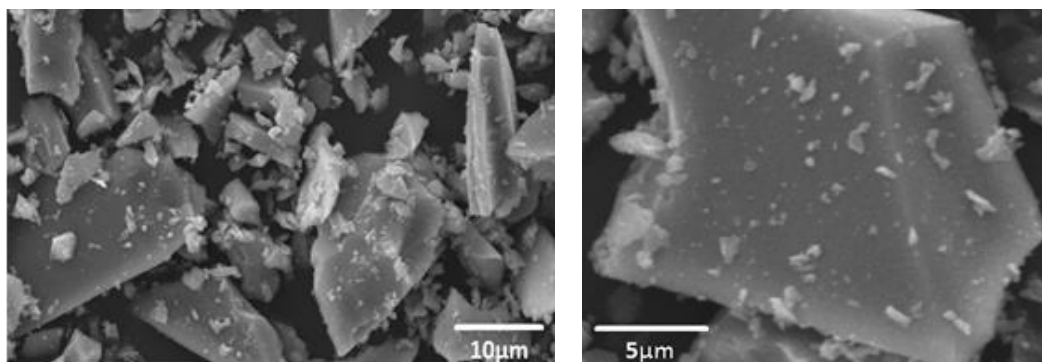
Las partículas muestran formas definidas en casi todas las concentraciones (0mM (sin surfactante), 3mM y 6mM), a excepción de las concentraciones 1mM y 2mM en donde la conformación de aglomerados antes y después del tratamiento es alto, en su mayoría las muestras se vieron afectadas por el tratamiento térmico, en donde las únicas que conservaron su morfología después del proceso de calcinación, fueron las sintetizadas sin la presencia de surfactante y a una concentración 3mM. El incremento en la concentración de CTAB modificó la morfología, aglomeración y tamaño de las partículas favoreciendo la obtención de estructuras mesoporosas a altas concentraciones (6mM)

Las imágenes obtenidas con MEB (Figuras 2.48 a 2.52) son diferentes a las que se observan en MET (Figuras 2.43 -2.47), tanto en morfología y tamaño, debido a la forma como se prepararon las muestras.

- **Muestras sintetizadas en Tolueno**

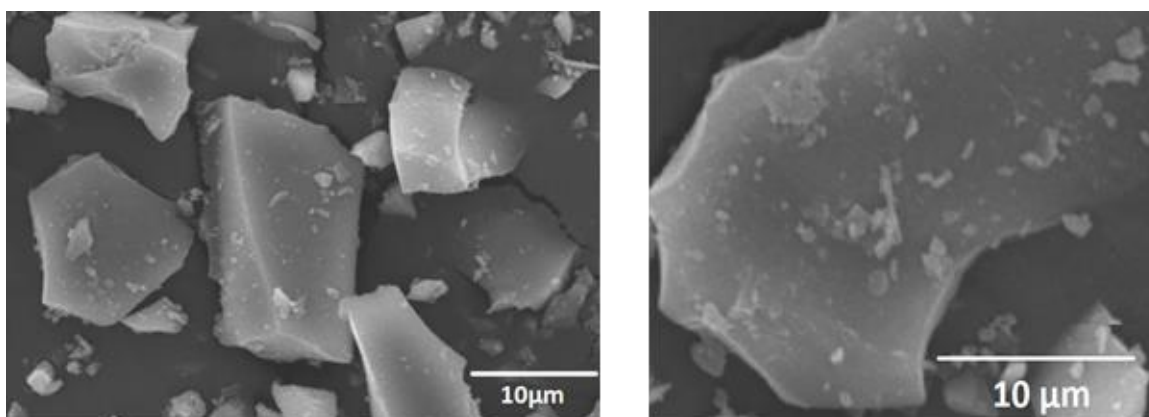


(a)

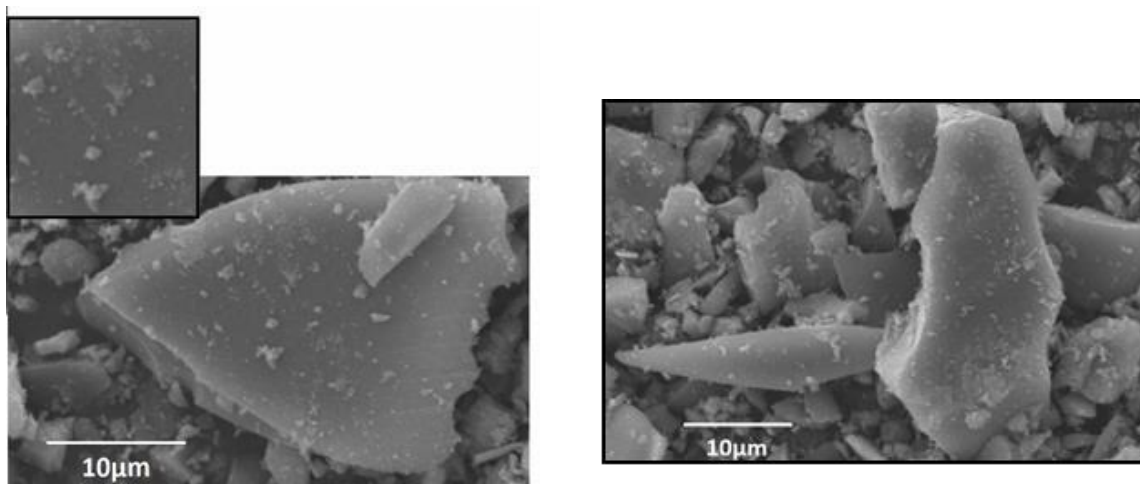


(b)

Figura 2.56 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, sin presencia de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450 °C (b)

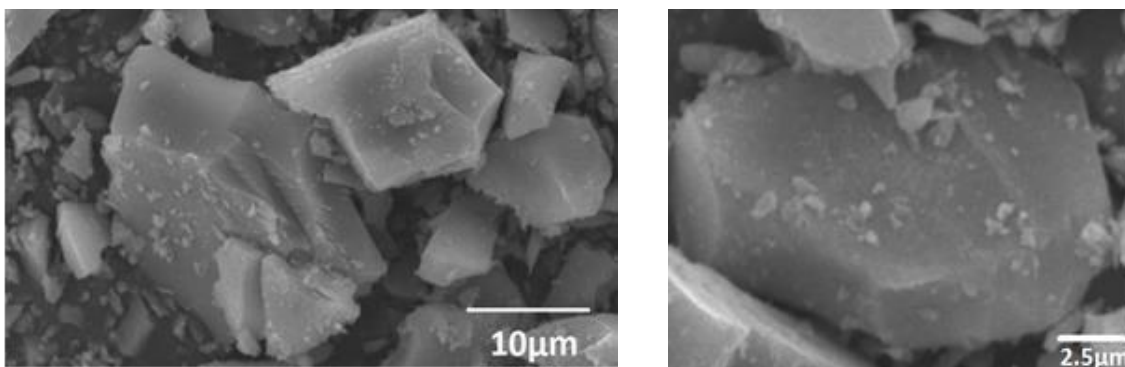


(a)

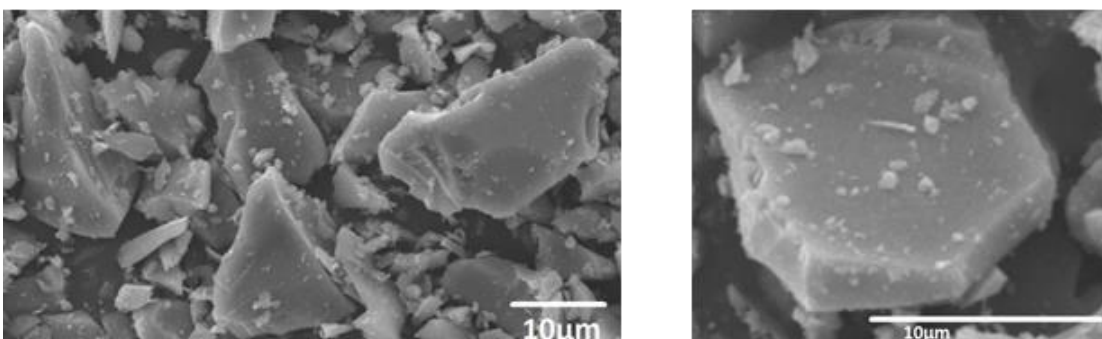


(b)

Figura 2.57 Micrografías obtenidas con MEB de sólidos obtenidos en tolueno, a una concentración 3mM de surfactante, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450°C(b)



(a)



(b)

Figura 2.58 Micrografías obtenidas con MEB correspondientes a sólidos sintetizados en tolueno, a una concentración 6mM de CTAB, sin tratamiento térmico (a) y tratados térmicamente a 450°C(b).

Las micrografías de las *Figura 2.56* a la *Figura 2.58*, muestran un tamaño de partícula secundaria grande (1-10 μ), principalmente aglomerados duros ósea agregados, junto con la presencia de pequeñas partículas primarias (< 100nm): La morfología de estas partículas secundarias es irregular, con bordes agudos. Se observa, además, que al tratarlas térmicamente, se consolidan los aglomerados pero su textura muestra una mejor definición de un graneado fino que daría información de las partículas primarias que las conforman (*Figura 2.57(b)*). Por los resultados obtenidos con MEB, *Figura 2.56* a la *Figura 2.58*, el uso de tolueno como solvente de síntesis favorece la obtención de agregados debido a la gran sinterabilidad de las partículas primarias, dado su pequeño tamaño (< 100 nm).

La adición de surfactante al medio no modifica en gran medida el tamaño de la partícula y la aglomeración de las mismas, pues este se ve influenciado mayormente por el efecto del solvente el cual genera que las reacciones de condensación sean rápidas (ver ítem 2.3.2) favoreciendo la aparición de estructuras de morfología irregular como las mostradas anteriormente.

2.4 CONCLUSIONES

- Se estructuró un método de síntesis vía sol-gel para obtener TiO₂ de manera controlada. Se pudo determinar el efecto, sobre las características finales del producto (polvos de TiO₂), tanto de la presencia de un surfactante, CTAB, como del uso de diferentes solventes, etanol y tolueno.
- Los estudios de espectroscopia IR, deconvolucionados en la región de 100-400cm⁻¹, permitieron evidenciar las diferencias a nivel estructural (enlaces Ti-O-Ti, Ti-OH y Ti-O) de las muestras sintetizadas a diferentes concentraciones, en donde el efecto del solvente etanol contribuyó a la formación de los enlaces Ti-O-Ti y el tolueno a los enlaces Ti-O, la adición de surfactante al medio de reacción (solvente etanol y tolueno) favoreció la aparición de grupos Ti-O superficiales. El efecto de la temperatura denotó cambios en la intensidad y ubicación de las bandas asociadas a los grupos funcionales Ti-O-Ti, Ti-OH y Ti-O, principalmente, con respecto a las muestras sin tratamiento. Así mismo la eliminación del CTAB fue difícil debido a su propiedad de adsorción sobre la superficie de los sólidos, lo cual se evidenció en la constante aparición de los enlaces Ti-C en los espectros deconvolucionados de las muestras tratadas térmicamente.
- El estudio de difracción de rayos X de los sólidos obtenidos mostró que ellos presentaban una estructura completamente amorfa, cuando no se habían tratado térmicamente, y al tratarlos a 450 °C cristalizaban, obteniéndose como fase cristalina principal, y única, la anatasa, independiente del solvente de síntesis utilizado y de la concentración de CTAB empleada. El tamaño de cristalito de las muestras sintetizadas, independientemente del solvente utilizado, fue pequeño (entre 3 y 5 nm) y se redujo levemente al aumentar la concentración de CTAB en el sistema de síntesis.
- Los estudios con microscopía electrónica de transmisión y de barrido mostraron que la presencia del surfactante en el medio de síntesis modificaba la morfología de las partículas y el

estado de agregación de las mismas. En el sistema con etanol, las partículas primarias presentaron una forma esferoidal y de aguja, con un tamaño nanométrico (< 100 nm), y aglomerados, en ocasiones esféricos, del orden de unos micrones (de 1 a 5 μm). Además, la presencia de CTAB favoreció la disminución de su tamaño y la formación de aglomerados, para concentraciones de surfactante menores a 6mM. Al sintetizar en tolueno se obtuvieron agregados con forma irregular, de unos cuantos micrones, entre 10 y 20 μm , conformadas por partículas primarias del orden nanométrico (< 100 nm). La adición de CTAB al sistema de síntesis no contribuyo, de manera apreciable, a modificar los parámetros anteriormente mencionados.

- La velocidad de las reacciones de hidrolisis y condensación se vieron modificadas por el efecto del solvente, en donde en solventes apolares el aumento en la velocidad de los procesos de condensación genero partículas de morfología irregular; mientras que en solventes como el etanol de carácter polar se favoreció la velocidad de hidrolisis propiciando morfología de tipo esférico.

2.5 BIBLIOGRAFIA

1. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:15(1):1–33.
2. Diebold U. The surface science of titanium dioxide. *Surf Sci Rep.* 2003;48(5-8):53–229.
3. AZOMATERIALS. Properties: Titanium Dioxide- Titania (TiO_2) [Internet]. AZO Network. 2015 [citado 2015 Nov 27]. p.1. Disponible de: <http://www.azom.com/properties.aspx?ArticleID=1179>
4. Liu L, Chen X. Titanium Dioxide Nanomaterials: Self-Structural Modifications. *Chem Rev.* 2014;114(19):9890-9918.
5. Dambournet D, Belharouak I, Amine K. Tailored preparation methods of TiO_2 anatase, rutile, brookite: Mechanism of formation and electrochemical properties. *Chem Mater.* 2010;22(3):1173-1179.
6. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res.* 2009;69(22):8784-8789.
7. Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Vitro.* Elsevier Ltd; 2011;25(1):231-241.
8. Riu J, Maroto A, Rius FX. Nanosensors in environmental analysis. *Talanta.* 2006;69(2):288–301.
9. Gázquez M. Tesis “Caracterización y valorización de residuos generados en la producción de TiO_2 .” Universidad de Huelva; 2011.

10. Segal D. Chemical synthesis of ceramic materials. *Materials Chem.* 1997;7(8):1297-1305.
11. Chen X, Mao SS. Titanium Dioxide Nanomaterials : Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem Rev.* 2007;107(7):2891-2959.
12. Ochoa Y, Ortegón Y, Vargas M, Rodríguez-Páez JE. Síntesis de TiO₂, Fase Anatasa, por el metodo PECHINI. *Rev Latinoam Metal y Mater.* 2009;S1(3):931-937.
13. Kiminami RHGA. Combustion and synthesis of nanopowder ceramic powders. *Kona Powder Part.* 2001;19:156-165.
14. Sekar MMA, Patil KC. Combustion synthesis and properties of fine-particle dielectric oxide materials. *J Mater Chem.* 1992;2(7):739-743.
15. McCormick PG, Froes FH. The fundamentals of mechanochemical processing. *JOM.* 1998;50(11):61-65.
16. Ivanov E, Sumiyama K, Yamauchi H, Yanai K, Suzuki K. Mechanically induced valence fluctuation and new f.c.c, phase formation in the immiscible Ce-Yb alloy system. *Alloy compunds.* 1993;198((1-2)):105-109.
17. Brinker CJ, Scherer GW. *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing.* 1st ed. Brinker CJ, Scherer GW, editors. Boston: Academic Press; 1990. 912 p.
18. Ochoa Y, Ortegón Y, Rodríguez Páez JE. Síntesis de TiO₂, fase anatasa, por el método sol-gel: estudio del efecto de la presencia de AcacH en el sistema. *Rev Fac Ing Univ Antioquia.* 2010;52(1):29–40.
19. Arconada Gómez N. Tesis “Recubrimientos mesoporosos y mesoestructurados de TiO₂-anatasa por el método sol-gel para aplicaciones en sistemas fotocatalíticos.” Autonoma de Madrid; 2012.
20. Klein LC. *Sol-Gel Technology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics and Specialty Shapes (Pollution Technology Review).* 1st ed. Klein LC, editor. Noyes Publications; 1988. 428 p.
21. Zhang D, Qi L, Ma J, Cheng H. Formation of crystalline nanosized titania in reverse micelles at room temperature. *Mater Chem.* 2002;12(12):3677-3680.
22. Lee MS, Park SS, Lee G-D, Ju C-S, Hong S-S. Synthesis of TiO₂ particles by reverse microemulsion method using nonionic surfactants with different hydrophilic and hydrophobic group and their photocatalytic activity. *Catal Today.* 2005;101(3-4):283-290.
23. Winsor P a. *Solvent Properties of Amphiphilic Compounds.* 1st ed. Winsor P a., editor. Butterworths Scientific Publications. Londres: Butterworths; 1954. 216 p.
24. Salager jean louis, Fernandez A. *Surfactantes Generalidades y Materias.* Merida venezuela: Ministerio de ciencia y tecnologia; 2004. 1-23 p.

25. Campo MC. Tesis “Síntesis de óxidos de estaño por el método de microemulsión.” [Popayan]: Universidad del Cauca; 2010.
26. Avilán Ayala A. Tesis “Implementación de Surfactantes como método de Tratamiento Para Aguas Subterráneas Contaminadas con DNAPLs.” Universidad de la Salle; 2007.
27. Salager J, Bullón J, Rojas O. Fenómenos Interfaciales y Surfactantes en la Industria Papelera. Mérida Venezuela: Ministerio de ciencia y tecnología; 2007. 1-14 p.
28. Salager JL. Surfactantes en Solución Acuosa. Mérida Venezuela: Ministerio de ciencia y tecnología; 1993. 1-25 p.
29. Carolina H. Tesis “Formación de nanoemulsiones O/W mediante el cambio en la composición formulación por dilución con agua de sistemas próximos a la formulación óptima.” Universidad de los Andes; 2004.
30. Márquez R. Tesis “Obtención de Emulsiones Parenterales Mediante el Método de Transición de Fases.” Universidad de los Andes; 2005.
31. Montenegro Pérez L. Tesis “Influencia de no Electrolitos y Surfactantes no iónicos en la estructura y formación de micelas de SDS: Reactividad de Nitrosocompuesto en estos medios.” Universidad de la Coruña; 1996.
32. Rahman A, Brown CW. Effect of pH on the Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulphate. *J Appl Polym Sci.* 1983;28(4):1331-1334.
33. Adamson AW, Gast AP. *Physical Chemistry Of Surfaces.* 6th ed. New York: Wiley-Interscience Publication; 1997. 190 p.
34. Manojlović JŽ. The Krafft temperature of surfactant solutions. *Therm Sci.* 2012;16(2):s631-s640.
35. Ekwall P, Mandell L, Solyom P. The aqueous cetyl trimethylammonium bromide solutions. *J Colloid Interface Sci.* 1971;35(4):519-528.
36. VWR INTERNATIONAL Eurolabs S.L. Ficha de datos de seguridad CTAB. Barcelona España: VWR International Eurolabs S.L.; 2004. 1-5 p.
37. FeF Chemical A/S. Ficha de Datos de Seguridad CTAB. Rusia: FEF; 2012. 1-5 p.
38. SIGMA-ALDRICH. Hoja técnica de seguridad del material CTAB. 5th ed. Toluca México: SIGMA-ALDRICH; 2012. 1-7 p.
39. SIGMA. Product information CTAB. Missouri USA: SIGMA; 1999. 12-13 p.
40. Jiang L, Li S, Yu W, Wang J, Sun Q, Li Z. Interfacial study on the interaction between hydrophobic nanoparticles and ionic surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* Elsevier B.V.; 2016;488(1):20-27.

41. Wade LG. *Química Organica*. 5th ed. Madrid, España: Pearson prentice hall; 2002. 1296 p.
42. Menger FM. The structure of micelles. *Acc Chem Res*. 1979;12(4):111-117.
43. Su C, Hong BY, Tseng CM. Sol-gel preparation and photocatalysis of titanium dioxide. *Catal Today*. 2004;96(3):119-126.
44. Beacham HH. Properties and Uses of Organic Titanates. *Adv chemmstry*. 1959;23:282-289.
45. Vargas MA, Rodríguez-Páez JE. Amorphous TiO₂ Nanoparticles: Synthesis and Antibacterial Capacity. Universidad del Cauca; 2016.
46. Rojas Cervantes ML. Naturaleza del grupo alcoxido. In: *Diseño y síntesis de materiales “a mediada” mediante el metodo SOL-GEL*. 1st ed. Madrid, España: UNED; 2012. p. 30.
47. Valentin AM. Titanium: Inorganic & Coordination Chemistry. In: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. 1st ed. New york: wiley; 2006. p. 6696.
48. Esumi K. Adsorption and adsolubilization of surfactants on titanium dioxides with functional groups. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2001;176(1):25-34.
49. Eastoe J, Tabor RF. Surfactants and Nanoscience. *Colloidal Foundations of Nanoscience*. Elsevier B.V.; 2014. 135-157 p.
50. Guzman AM, Fernandez AM, Franco Y, Bautista JH, Rodriguez Paez JE. Estudio de las reacciones de Hidrolisis y Condensación del Titanio en Presencia de Acetilacetona. *Rev Colomb Cienc*. 2007;31:530-536.
51. Tellez L, Rubio F, Peña Alonso R, Rubio J. Seguimiento por espectroscopia infrarroja (FT-IR) de la copolimerización de TEOS (tetraetilortosilicato) y PDMS (polidimetilsiloxano) en presencia de tbt (tetrabutiltitanio). *Ceram y Vidr*. 2004;43(5):883-890.
52. Doeuff S, Henry M, Sanchez C, Livage J. Hidrolisys of titanium alkoxides:modification of the molecular precursor by acetic acid. *Non- Cryst Solid*. 1987;89((1-2)):206-216.

3. Estudios preliminares de Toxicidad Aguda del TiO₂ sintetizado por Sol-gel

3.1 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1.1 Aspectos generales de la Toxicidad

El significado literal del término toxicología es “el estudio de los venenos” (1). La raíz de la palabra *toxico* ingreso al idioma ingles alrededor de 1655 del latín *toxicus* (el cual significa venenos), a su vez deriva de *toxikón*, un antiguo término griego usado para designar a los venenos en los cuales se sumergían las flechas. La toxicología ha evolucionado hasta convertirse en la actualidad en una ciencia, ampliándose para considerar todas las formas de efectos adversos, nocivos o letales (1), para la salud propiciadas por las sustancias. A continuación se da la definición de ciertos términos, propios de la toxicología, que reflejan el amplio alcance de esta ciencia.

- **Toxico** :Agente químico o físico que posee ciertas características para producir un efecto indeseable o adverso en un sistema, principalmente biológico, y/o para la salud.
- **Toxicidad**: Se le da esta denominación a cualquier efecto toxico (adverso) que un agente químico o fisico puede producir dentro de un organismo.
- **Toxicología** :Es la ciencia que se ocupa del estudio de los efectos adversos (toxicidad) que agentes químicos o físicos pueden producir en los organismos vivos, bajo condiciones específicas de exposición. Es una ciencia que intenta identificar cualitativamente todos los peligros asociados con una sustancia, así como determinar cuantitativamente las condiciones de exposición en las que estos peligros o toxicidades son inducidos. La toxicología es la ciencia que investiga experimentalmente, tanto *in vitro* como *in vivo*, la existencia, naturaleza, incidencia, el mecanismo y los factores de riesgo de los efectos adversos de las sustancias toxicas.

Como es de esperar, considerando las anteriores definiciones, las respuestas sobre toxicidad, que conforman el estudio de la toxicología, abarcan un amplio espectro biológico y fisiológico. Los efectos de interés, a evaluar, pueden variar desde algo relativamente menor, como una irritación y lagrimeo, a una respuesta más seria como daño hepático o renal, con una discapacidad aún más grave y permanente, como puede ser la cirrosis hepática o cáncer de hígado. Teniendo en cuenta esta amplia gama de efectos, potencialmente adversos que deberían tenerse en cuenta, es necesario considerar algunos términos adicionales.

- **Exposición**: Para causar un efecto adverso, la sustancia toxica debe entrar en contacto con un organismo. El medio por el cual un organismo entra en contacto con la sustancia es a través de una vía de exposición (por ejemplo, en el aire, agua, suelo, alimentos, medicamentos) usado por el agente químico o físico y que, además, puede favorecer su presencia.

- **Dosis:** Es la cantidad total de una sustancia tóxica administrada a un organismo, de manera controlada o casual a intervalos de tiempo específicos y que puede o no propiciar efectos adversos. Esta cantidad se define, comúnmente, en términos de cantidad por unidad de peso corporal o por área de superficie corporal.
- **Exposición Aguda:** Se da esta denominación a la exposición a que se somete un sistema biológico, durante un breve período de tiempo (generalmente menos de 24 horas), a un agente químico o físico tóxico para él. A menudo se considera que es una exposición única (o dosis), pero puede consistir en exposiciones repetidas dentro de un período de tiempo corto.
- **Exposición subaguda:** Se asemeja a la exposición aguda, excepto que la duración de la exposición a agentes tóxicos es mayor, de varios días hasta un mes.
- **Exposición subcrónica:** En este caso, las exposiciones a agentes tóxicos se repiten o se extienden sobre un rango de tiempo intermedio. Para los ensayos con animales, este intervalo de tiempo se considera generalmente entre 1 y 3 meses.
- **Exposición crónica:** Estas son exposiciones repetitivas o continuas a que se someten los sistemas biológicos durante un período de tiempo (más de 3 meses). En la experimentación con animales, esta exposición, a menudo, continúa durante la mayor parte de la vida del ejemplar seleccionado para realizar el ensayo.
- **Toxicidad aguda:** Se denomina de esta manera a un efecto adverso o indeseable que se manifiesta dentro de un intervalo de tiempo relativamente corto, durante la exposición del sistema biológico al agente tóxico, y que se produce casi inmediatamente iniciada la exposición (o la dosis), extendiéndose por varios días. Un ejemplo es la asfixia química que se presenta por la exposición a una alta concentración de monóxido de carbono (CO).
- **Toxicidad crónica:** Se le da este nombre al efecto adverso permanente o duradero que se manifiesta en el sistema biológico después de la exposición a un tóxico. Se puede tomar como ejemplo de este caso, el desarrollo de la silicosis después de una exposición, por un largo período de tiempo, a la sílice, por ejemplo en aquellos lugares de trabajo donde se realiza la fundición de metales.
- **Toxicidad local:** Es aquel efecto adverso o indeseable que se manifiesta específicamente en el sitio donde la sustancia tóxica se encuentra en contacto con el organismo. Los ejemplos incluyen la capacidad de un ácido para causar enrojecimiento de los ojos, irritación de las vías respiratorias superiores, y quemaduras en la piel, entre otros.

- **Toxicidad sistémica:** Se le da esta denominación a aquel efecto adverso o no deseado que puede ser percibido por todo un organismo u órgano, vulnerable a él, aunque la distancia del punto selectivo de entrada de la sustancia tóxica estuviera alejada del mismo, lo que requeriría que el tóxico fuera absorbido, inicialmente, y posteriormente se distribuyera en el organismo para producir el efecto tóxico. Un ejemplo estaría relacionado con los efectos adversos sobre el riñón o el sistema nervioso central ocasionados por la ingesta crónica de mercurio.
- **Toxicidad reversible:** Es aquel efecto adverso o indeseable que puede ser revertido una vez que se detiene la exposición del sistema biológico al agente tóxico. La reversibilidad de la toxicidad depende de una serie de factores que incluye el grado de exposición: tiempo y la cantidad de agente tóxico, y la capacidad del tejido afectado para repararse o regenerarse. Un ejemplo considera la toxicidad hepática de la exposición aguda al acetaminofén y la regeneración del hígado.

3.1.2 Nanotoxicidad

Se da esta denominación al efecto nocivo, adverso o indeseable propiciado en un sistema biológico por su exposición a nanoestructuras, Nanopartículas o mesoporos principalmente inorgánicos, término acuñado en el 2005 por el investigador Günter Oberdörster (2). Las nanopartículas (NPs) son unidades químicas que tienen un diámetro de menos de 100 nm (1 nm = mil millonésima parte de un metro) en una dimensión o inferior a 1000 nm para agregados y aglomerados; las NP son 100-10.000 veces más pequeños que las células de mamíferos (*Figura 3.1*). La Nanotoxicología considera los efectos tóxicos de las NPs en los sistemas vivos (3). De manera general, se han publicado una gran cantidad de artículos y se han realizado recopilaciones muy completas sobre esta temática (4–6). En estos documentos se indican los resultados obtenidos de estudios *In Vivo* o *In Vitro* de la toxicidad de las nanopartículas, estudios que se han realizado de manera controlada para establecer la relación dosis – respuesta que es tan difícil obtener en estudios epidemiológicos (5). El objetivo central de la nanotoxicología es estudiar las interacciones de las nanopartículas con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, acciones que pueden modificar la retención y las propiedades de las nanopartículas en el organismo. Es muy importante entender el mecanismo de acción responsable de las respuestas fisiopatológicas, en los individuos expuestos, considerando la forma de obtención de las nanopartículas y las propiedades específicas que ellas presentan: tamaño, reactividad superficial, composición química, solubilidad, etc. Los seres humanos han estado expuestos a las NP a lo largo de su evolución a través de la inhalación de partículas ultrafinas producidas por los incendios, la acción volcánica y otros fenómenos naturales. La exposición humana, sin embargo, se ha incrementado dramáticamente en los últimos 20 años como resultado del rápido desarrollo del campo de la nanotecnología, lo que ha producido un gran número de partículas de tamaño nanométrico sintéticas. Estas partículas son fácilmente absorbidas por los seres humanos por inhalación, ingestión, absorción dérmica, e inyección. Algunas de estas exposiciones son deliberadas como partes de sistemas de liberación de fármacos (2,7).

Los tipos de exposición a las NP, las fuentes y sus efectos tóxicos en los humanos se indicarán con más detalle a continuación:

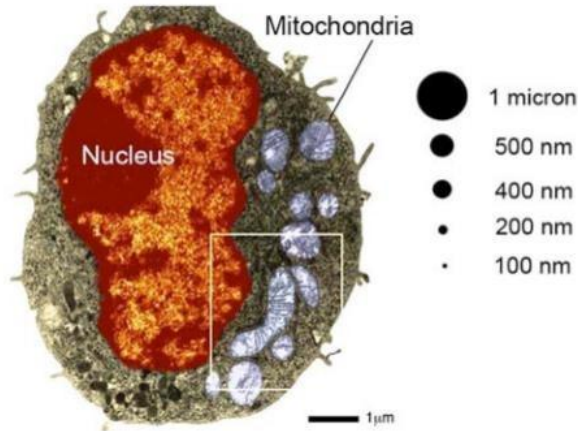


Figura 3.1 comparación de una célula macrófaga de rata con el tamaño de una nanopartícula (a escala). Los macrófagos humanos son hasta dos veces más grandes que los macrófagos de rata (8)

3.1.2.1 Nanopartículas

Las NP se pueden clasificar como naturales, también conocidas como propias o comunes del medio ambiente, y antropogénicas o ingenieriles, aquellas fabricadas por el hombre; estas últimas, a su vez, se pueden clasificar como NP intencionales o involuntarias (7).

a) NP Naturales

Este tipo de Nanopartículas incluyen al: carbón, hidrocarburos, azufre, metales pesados, compuestos inorgánicos y biológicos. Las principales fuentes de estas incluyen: los incendios forestales, los volcanes, la espuma del mar, las partículas de polvo suspendidas en el aire provenientes del suelo y los virus (7).

b) NP antropogénicas no intencionales

Estas incluyen al carbón, hidrocarburos, metales pesados, metales nobles, compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos sintéticos, hidrocarburos, y el asbesto. Las principales fuentes de estas incluyen: las plantas de energía eléctrica, los motores de combustión interna, los motores Jet y los humos de fundición, soldadura, plásticos, producidos en la cocina y por el tabaco, así como los catalizadores, dispositivos de fricción, tales como frenos de vehículos y motores eléctricos, entre otros (7).

c) NP antropogénicas o ingenieriles intencionales

Este tipo de Nanopartículas incluyen metales, óxidos metálicos y nanotubos de carbono, principalmente. Las fuentes de estos consideran: semiconductores, cosméticos, aplicaciones médicas incluyendo los sistemas de liberación de fármacos, pantallas ópticas, aplicaciones electrónicas y sílice de combustión, entre otros (7).

3.1.2.2 Principales rutas de absorción de NP en el cuerpo humano

Las nanopartículas pueden ser absorbidas por el cuerpo humano vía inhalación, ingestión, absorción dérmica e inyección (**Figura 3.2**) (7), estas rutas se consideran con más detalle a continuación:

a) Inhalación

La captación de las NPs inhaladas puede ocurrir a través de las tres principales regiones de las vías respiratorias: la nasofaríngea, la traqueo bronquial, y la alveolar, e independiente de la región de absorción siempre produce inflamación. En consecuencia, las NPs no pueden considerarse como un peligro potencial único debido a que cada NP específica debería ser evaluada, considerando sus efectos tóxicos, ya que se ha encontrado que algunas NPs pueden desencadenar reacciones de tipo asmático mientras que otras han generado lesiones pulmonares (7) .

b) Ingestión

Las NPs pueden ser ingeridas directamente, si están presentes en los alimentos o el agua que se consume, o pueden ser ingeridas por la deglución de NPs contenidas en la mucosa después de que han sido eliminadas de los pulmones. Luego de la ingestión, las NPs podrían pasar a la sangre y ser transportadas a otros órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, el bazo, los riñones, la médula ósea, el cerebro y otros tejidos (7). En este trabajo, éste fue el medio utilizado para propiciar el ingreso de las Nanopartículas al organismo de los ratones utilizados en el correspondiente ensayo.

c) Absorción dérmica

Las NPs pueden ser absorbidos por la piel y también pueden entrar al cuerpo a través de la piel lesionada (3,8). Una vez absorbidas, las NPs se traslocan a los ganglios linfáticos y en última instancia al torrente sanguíneo desde donde se distribuyen por todo el cuerpo (7). Actualmente, este es el medio de ingreso más común de las Nanopartículas al cuerpo humano debido a que ellas son usadas en un amplio rango de productos cosméticos, entre ellos cremas hidratantes para cuerpo y manos, productos para los labios, bases de maquillaje, ungüentos, polvos para la cara y lociones (9).

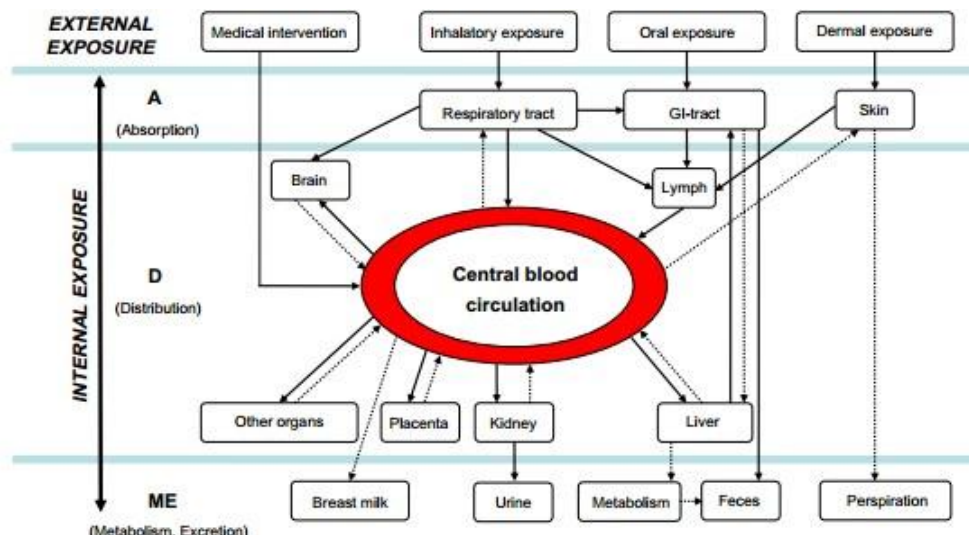


Figura 3.2 Esquema del proceso de ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) donde la exposición interna es la parte de la dosis externa que alcanza la circulación sistémica. Las líneas negras representan rutas confirmadas para las Nanopartículas y las líneas a trazos representan rutas hipotéticas. Las velocidades de transporte y tiempos de retención para los procesos indicados son en gran parte desconocidos.(10)

3.1.3 Nanotoxicidad del TiO₂

El pequeño tamaño de la NP asegura que una gran parte de los átomos que la conforman estará presente en la superficie de la misma. Dado que las características y propiedades de la superficie de las NPs, tales como los niveles de energía, la estructura electrónica y la reactividad son bastante diferentes a las de su interior (“core”), su bioactividad debería diferir de aquellas que presentan un tamaño de cientos de nanómetros y/o micras (partículas finas). Tradicionalmente, las partículas finas (FP, *partículas finas*) de TiO₂ se han considerado como poco solubles y de baja toxicidad. Debido a esta condición se han utilizado, tradicionalmente, como un "control negativo" en muchos estudios toxicológicos, tanto *in Vitro* como *in Vivo*. Sin embargo, este punto de vista fue cuestionado después de que ratas sometidas a altas concentraciones de partículas finas de TiO₂, durante dos años de exposición, desarrollaron tumores de pulmón. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer*), por lo tanto, ha clasificado al TiO₂ en el Grupo 2B: posiblemente carcinógeno para los seres humanos (11). Sin embargo, el efecto cancerígeno del TiO₂ ha sido cuestionado y atribuido a la sobrecarga de los pulmones en lugar de considerar la carcinogenicidad específica de las FP de TiO₂. En los últimos años, las NPs de TiO₂ se han venido empleando ampliamente en la industria y en la obtención de productos de consumo, esto debido a su fuerte actividad catalítica en comparación con las FPs de TiO₂. Este aumento, en su actividad catalítica, se ha atribuido a su pequeño tamaño de partícula, lo que propiciaría un mayor valor de área superficial por unidad de masa. Con base en lo enunciado anteriormente, se han planteado preocupaciones sobre que las NPs de TiO₂ pudieran presentar bioactividad y, por lo tanto, riesgos para la salud humana. El rápido crecimiento en el número de estudios publicados, sobre esta temática, confirma que existe un alto nivel de interés en relación con la seguridad de NP de TiO₂. Diferentes modelos animales, que emplean múltiples vías de exposición de administración (inhalación, exposición dérmica, instalación intratraqueal, sonda oral, intragástrica, intraperitoneal o intravenosa, han sido usados, intensivamente, en estos estudios. Los estudios han puesto de manifiesto que las NP de TiO₂ son más tóxicas que las FPs (12).

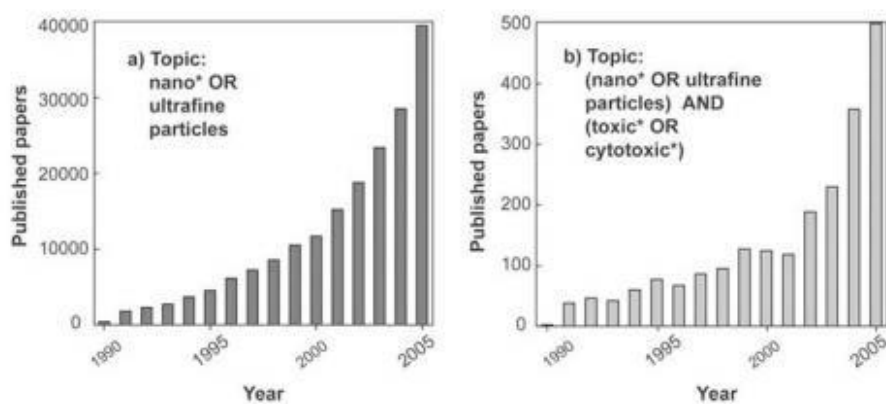


Figura 3.3 Estadística de los artículos científicos publicados sobre: (a) nanomateriales y (b) su toxicidad (ISI web de ciencia) (8)

3.1.3.1 Exposición oral al TiO₂

La ingestión oral es la ruta de mayor exposición para el ingreso de alimentos y sustancias nutritivas en el cuerpo. Con respecto a la ingesta de partículas, algunas rutas son intencionales como es el caso de los productos alimenticios (por ejemplo las partículas de TiO₂ que actúan como blanqueadores y que están presentes en los productos de panadería) y el de los suplementos alimenticios, potenciadores de sabor y pigmentos (13).

Entre los principales aditivos alimenticios, con base en dióxido de titanio, se encuentra el E171, el cual ha sido usado por décadas y su Ingesta Diaria Admisible (IDA) no ha sido establecida por la EFSA (*European Food Safety Authority* – EFSA, dictamen de la EFSA del 2004) (14). Estudios recientes demuestran que hay una cantidad significativa de TiO₂, de tamaño nanométrico, en los alimentos (15,16); Weir y colaboradores (15) encontraron que, en la distribución de tamaño de partícula en un lote de E171, la mayoría de las partículas estaban por debajo de los 200 nm, las TiO₂-NPs eran aproximadamente el 36% (**Figura 3.4**) y que el diámetro medio de partícula era de ~110 nm. Otro grupo, que examinó las gomas de mascar considerando seis marcas diferentes, encontró que la presencia en ellas de TiO₂-NPs era superior al 40% (16). Esto está de acuerdo con lo expresado por Skocaj y colaboradores (17) sobre que “los polvos de tamaño sub-micrónico, entre 0.1 y 1µm, siempre contenían una cierta proporción de partículas de tamaño nanométrico”(14).

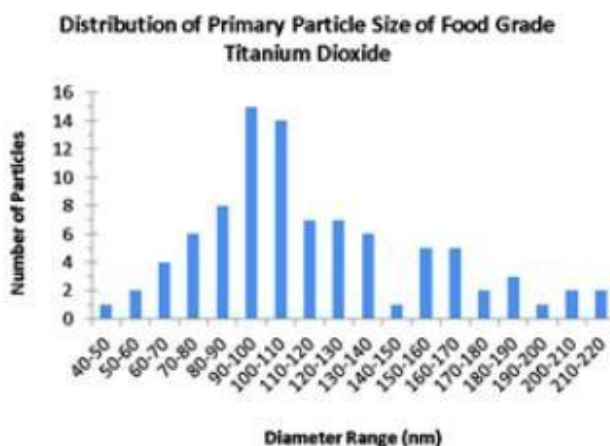


Figura 3.4 Histograma que muestra la distribución de tamaño de partícula del TiO₂ en un lote del aditivo alimenticio E171 (15).

Es interesante observar que Instituciones Internacionales como la FAO y la OMS, en informes internos (2009), hacen referencia al mismo hecho, sobre la aparición de partículas de tamaño nanométrico, pero refiriéndose al material a granel. Sin embargo, lo expuesto anteriormente no es suficiente para cuestionar el uso de E171 en los alimentos o para solicitar información sobre el efecto de la presencia de las nanopartículas de TiO₂ en este aditivo. Por otra parte, aunque el 40% de TiO₂-NPs parece mucho y es sorprendente para algunos, el E171 todavía no se puede clasificar como un nanomaterial, ya que la definición exige que al menos el 50% de las partículas presenten un tamaño nanométrico. Adicionalmente, surge otra preocupación relacionada con el hecho de que la estructura tipo anatasa del TiO₂ se considera 100 veces más tóxica que la tipo rutilo (15); se encontró que la estructura cristalina del TiO₂ nanométrica, presente en las gomas de mascar (16), la

anatasa fue la fase predominante. Esto ha sido confirmado con DRX y TEM de alta resolución (16). La presencia de anatasa en el E171, y por lo tanto en una gran cantidad de alimentos, fue corroborada por Powell y colaboradores (18) quienes detectaron TiO₂, con un tamaño entre 100 y 200 nm, en el intestino humano (14).

Según los datos de exposición al TiO₂, según la EFSA, la ingesta de este óxido dio como resultado una ingesta estimada de 1,28 mg/kg-peso corporal/día, incluyendo medicamentos y suplementos, por lo que una persona de 70 kg consumiría, aproximadamente, 90 mg de TiO₂ diario, lo que para algunos es una sobreestimación (14). Si la cuantificación del contenido de nanopartículas en el E171 es correcta, del 36-40%, la persona de 70 kg que ingiriera el E171 consumiría alrededor de 35 mg de TiO₂-NPs por día. El consumo de TiO₂ ha aumentado considerablemente, en las últimas décadas, y los patrones de consumo varían mucho ya que hay grupos de alimentos con un contenido de TiO₂ alto, destacándose las gomas de mascar, los productos de confitería y los chocolates con cáscara dura (14). En la **Tabla 3.1** se listan algunos artículos y su contenido de dióxido de titanio.

Tabla 3.1 *Ítems de comida y su contenido TiO₂ donde se especifica la cantidad por gramo de alimento (columna central) y el adaptado de acuerdo al tamaño de la porción (columna de la derecha) (15,18,19).*

Alimento	Contenido TiO₂ (mg/g alimento)	Contenido TiO₂ (por porción)
Polvo de donas	2	100 (50g)
Aderezo para ensalada	7.5	225 (30g)
Chocolates M&Ms	1.25	45
Chicle de masticar	1.51-3.88	2.4-7.5 (promedio 5)por chicle
Malvavisco	2	10 (5g)
Crema picante de rábano	2.84	56.8 (20g)
Tomate	7.82	35.199
Glaseado del pastel	1.83	55(30g)
Ensalada cesar baja en grasa	0.93	27.9

La exposición oral involucra los componentes básicos del tracto gastrointestinal (GIT por sus siglas en inglés), incluyendo: boca, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) y el intestino grueso (ciego, colon ascendente, colon transverso, el colon descendente, colon sigmoide y recto). Después de la aprobación y pre-digestión de los alimentos en el estómago, el intestino delgado es el sitio de más nutrientes digeridos y es este el lugar donde la absorción de partículas/Nanopartículas, por el torrente sanguíneo (ver esquema de la **Figura 3.2**), se produciría, particularmente en los segmentos de yeyuno y el íleon (13).

Aunque existen diferencias entre la fisiología del GIT de los humanos y los roedores (modelo animal usado frecuentemente en estudios de toxicidad y empleado en este trabajo), los resultados obtenidos en pruebas con estos últimos son importantes para orientar el estudio en humanos. Algunas diferencias están, por ejemplo, en que el pH gástrico del estómago humano está, normalmente, en el rango de 1,2 a 2,0, en un estado de ayunas y de 5,0 con la presencia del bolo alimenticio, mientras que en ratones el pH gástrico medido ha sido de 3,0 después de la ingesta de

alimentos y 4,0 en estado de ayuno; en el intestino delgado, el pH del duodeno ha sido medido y los valores se encuentran entre 6 y 7, en los seres humanos, y entre 4 y 5 en ratas y ratones (13,20) .

3.3.2 Interacciones de las nanopartículas en el organismo del modelo animal al ser suministradas por vía oral

En este ítem se consideran los procesos de interacción, absorción, distribución y excreción de las nanopartículas por el organismo del animal. Aunque no existe un mecanismo plenamente confirmado y validado que permita explicar la toxicidad de las TiO₂-NPs, existe información importante sobre los posibles efectos que puede generar una nanopartícula al entrar en contacto con la célula.

3.3.2.1 Interacciones celulares con las nanopartículas

Como sucede con los nano organismos (los virus por ejemplo), las nanopartículas podrían entrar en las células e interactuar con las estructuras subcelulares. Inicialmente, tanto la absorción celular, ubicación subcelular de la nanopartícula, como la capacidad de catalizar productos oxidativos dependen de las características fisicoquímicas de las nanopartículas, de su tamaño y forma, principalmente (2,21). El mecanismo por el cual las NPs penetran en las células, sin poseer unos receptores específicos identificados en su superficie, correspondería a una absorción pasiva o a una interacción adhesiva. Esta absorción podría ser propiciada por fuerzas de Van der Waals, presencia de cargas electrostáticas, interacciones estéricas, o fenómenos de tensión interfacial. Después de que ocurriera la captación, las nanopartículas no se ubicarían, necesariamente, dentro de un fagosoma lo que ofrece cierta protección al resto de los orgánulos celulares de la interacción química con la nanopartícula (8).

Este tipo de captación y de movimiento libre, dentro de la célula, hace que las NPs se transformen en agentes muy peligrosas por tener acceso directo a las proteínas del citoplasma y orgánulos. Tras la captación no fagocítica, las nanopartículas se podrían ubicar en varios lugares dentro de la célula, tales como: la membrana celular externa, el citoplasma, la mitocondria, las vesículas lipídicas y a lo largo de la membrana nuclear, o dentro del núcleo; dependiendo de su localización dentro de la célula, las nanopartículas podrían deteriorar orgánulos o ADN, llegando hasta provocar la muerte celular (*Figura 3.5*) (8).

Las nanopartículas se internan no sólo por los fagocitos profesionales, tales como los macrófagos alveolares, sino que su ingreso también puede ser mediado por varios tipos de células, incluyendo las células endoteliales, epitelio pulmonar, epitelio gastrointestinal, glóbulos rojos de la sangre, plaquetas y las células nerviosas (8). En la *Figura 3.5* se indica, de manera general, las posibles interacciones de las NPs con la célula y como se puede generar el estrés oxidativo y la inflamación por varias vías primarias: **(a)** la superficie de la NP por un incremento del calcio intracelular y la activación del gen respectivo, **(b)** si existen metales de transición estos podrían incrementar el calcio intracelular y activar el gen o **(c)** a través de los receptores de la superficie de la célula, que también activaría el gen, o **(d)** que las NPs se distribuyan intracelularmente, en la mitocondria, generando estrés oxidativo (2) .

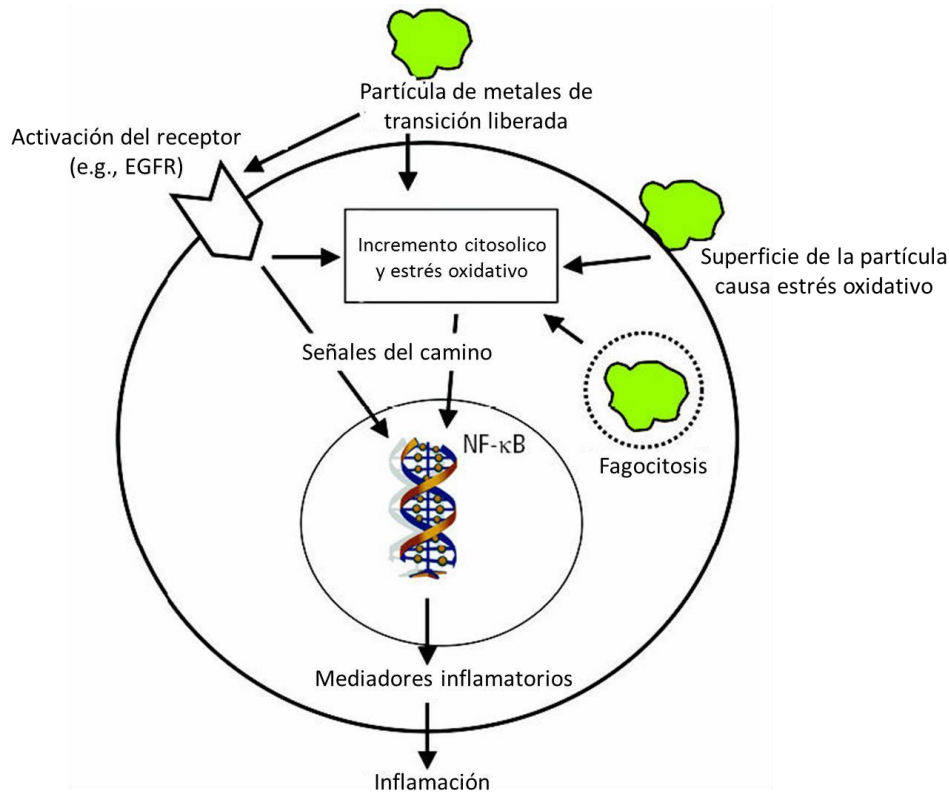


Figura 3.5 Interacciones hipotéticas de las nanopartículas con la célula. EGFR , receptor del factor de crecimiento epidérmico. La inflamación y estrés oxidativo pueden ser generados por diversas vías primarias, tal como se indica en el texto (2)

3.3.2.1.1 Estrés oxidativo, inflamación y genotoxicidad

Aunque el mecanismo exacto por el que las nanopartículas inducen efectos pro-inflamatorios no se conoce, se ha sugerido que estas crean especies reactivas de oxígeno (ROS por su sigla en inglés) que modularían concentraciones de calcio intracelular, activarían factores de transcripción e inducirían la producción de citoquina (8), tal como se indica en la **Figura 3.6** Como se muestra en la figura es importante tanto la composición del material, como su estructura electrónica, las especies enlazadas a su superficie (ejemplo, metal contenido en la estructura), el revestimiento de su superficie (activa o pasiva), y su solubilidad, incluyendo la contribución de la especie de la superficie, el revestimiento y las interacciones con otros factores ambientales (por ejemplo la activación UV) (22).

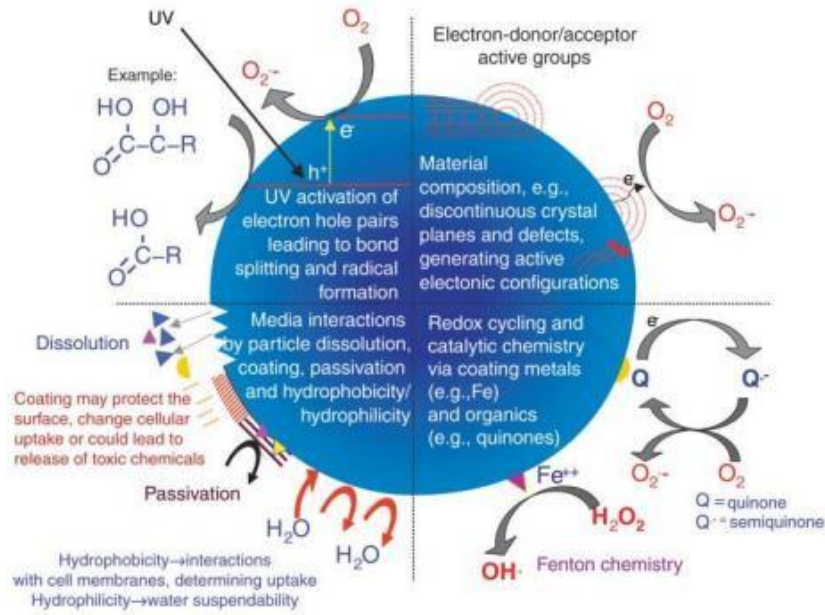


Figura 3.6 Posibles mecanismo por los cuales los nanomateriales interactuarían con tejidos biológicos (22)

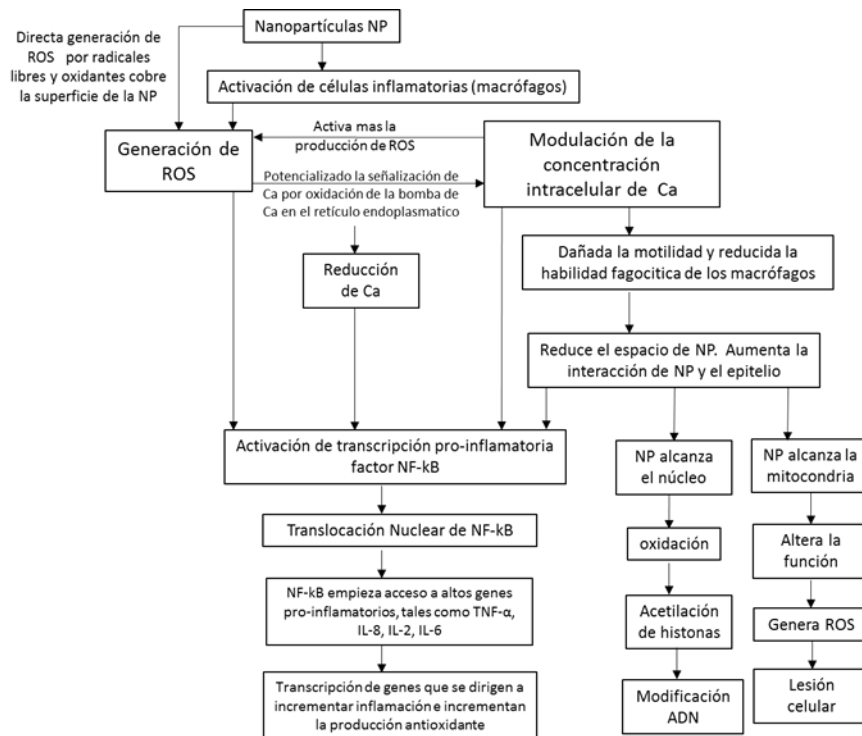


Figura 3.7 Esquema de los eventos moleculares a través de los cuales las nanopartículas generarían efectos tóxicos a nivel celular (8)

En la **Figura 3.7** se indican algunos eventos moleculares a través de los cuales las TiO₂-NPs podrían generar efectos tóxicos a nivel celular (8).

3.3.2.2 Captación de tracto gastrointestinal y depuración de las nanopartículas

Por la forma como se le suministró la dosis de nanopartículas de TiO₂ a los ratones, en el presente estudio, es necesario hacer una breve descripción e indicar las principales características del tracto gastrointestinal, el cual es un complejo sistema de barreras de intercambio y es la vía más importante para que las macromoléculas entren en el cuerpo. El epitelio del intestino delgado y grueso está en estrecho contacto con el material que se ingiere, el cual es absorbido por las vellosidades. El grado de absorción de las partículas, en el tracto gastrointestinal, es afectado por el tamaño, la química de superficie y la carga, la duración de la administración, y la dosis suministrada (23). La absorción de las partículas en el tracto gastrointestinal depende de su tamaño, disminuyendo para partículas de gran dimensión (24). Un estudio realizado con partículas de poliestireno con diferente tamaño, entre 50 nm y 3 micras, mostro que la absorción disminuía con el aumento del tamaño de partícula de 6,6% para las de 50 nm, 5,8% para las de 100 nm, 0,8% para las de 1µm y de 0% para las partículas de 3 micras (8).

El tiempo necesario para que las nanopartículas atraviesen la capa mucosa del colon también depende del tamaño de estas tal que las partículas más pequeñas cruzan más rápido la capa mucosa que las más grandes: nanopartículas de látex de 14 nm de diámetro cruzaron en 2 minutos, 415 nm en 30 minutos y partículas de 1.000 nm no pasaron este barrera (23). Las partículas que penetran en la mucosa pueden alcanzar los enterocitos (células epiteliales de la capa superficial del intestino que ayudan a la absorción de nutrientes) y son capaces de traslocarse rápidamente (23); cuando las nanopartículas se ponen en contacto con el tejido sub-mucoso, ellas pueden entrar en el sistema linfático y capilar y, luego, pueden llegar a diversos órganos (8,23).

La cinética de las partículas en el tracto gastrointestinal depende, en gran medida, de la carga que estas poseen tal que partículas de látex con carga positiva fueron atrapadas en el moco, que tiene carga negativa, mientras las nanopartículas de látex con carga negativa difunden y se encontrarían disponibles para interactuar con las células epiteliales (23), por lo que la carga superficial de las TiO₂-NPs es un parámetro importante para justificar el ingreso de las mismas en los órganos de los ratones (8).

3.3.2.2.1 Translocación

Considerando la variación de las características de las nanopartículas, tales como su tamaño, carga superficial, unión a ciertos ligandos o recubrimiento con agentes tensioactivos, se podría favorecer una orientación específica de las mismas hacia ciertas regiones del tracto gastrointestinal. Por otro lado, el tránsito rápido del material a través del tracto intestinal (del orden de horas), junto con la renovación continua del epitelio, llevo a la formulación de la hipótesis de que los nanomateriales no permanecerían en él por períodos indefinidos (23). La mayoría de los estudios con nanopartículas ingeridas han demostrado que estas se eliminan rápidamente: 98% en las heces dentro de las 48 horas y la mayoría del restante por la orina (2). Sin embargo, otros estudios mostraron que ciertas nanopartículas pueden traslocarse a la sangre, el bazo, el hígado, la médula ósea (24), así como a los ganglios linfáticos, los riñones, los pulmones y el cerebro; también pueden ser encontradas en el estómago y el intestino delgado (8). Lo enunciado anteriormente se debe considerar si se desea

abordar un estudio más cuidadoso sobre el tránsito de las nanopartículas por el tracto gastrointestinal y la posibilidad de translocación de las mismas a órganos importantes del ejemplar animal utilizado en el ensayo, todo esto con el objetivo de determinar la toxicidad de las nanopartículas por ingesta de las mismas.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Reactivos y Solventes

- Glutaraldehido
- Acetato de Plomo, 25%(Fisher)
- Citrato de Uranilo, 25%(Fisher)
- Patron de 1000ppm Ti
- Ácido nítrico, 70% (Merck)
- Ácido Clorhídrico, 34%(Merck)
- Peróxido de hidrogeno, 30% (Fisher)
- Agua desionizada
- Carboximetil celulosa 75% (Fisher)

3.2.2 Materiales y Equipos

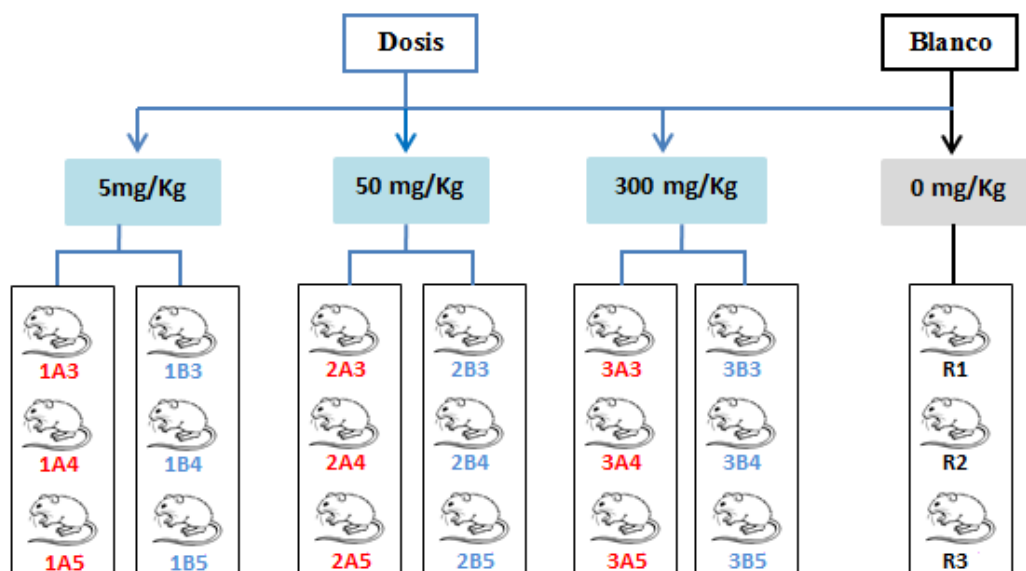
- Balanza analítica, XT 220 (220 g / 0,0001g)
- Plancha de calentamiento con agitación magnética, CORNING PC-620D
- baño ultrasonido calentamiento, HELMA E120H
- Estufa, BINDER ED115-UI
- Mufla
- Mortero de ágata
- Microscopio electrónico de transmisión, JEOL 2400
- Equipo absorción atómica, PERKIN ELMER 100
- Equipo quirúrgico

3.2.3 Estudio de toxicidad aguda oral de TiO₂

La metodología empleada para el desarrollo de los ensayos de toxicidad aguda oral, a dosis fija, se realizó siguiendo lo sugerido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD), considerando la directriz 420 adoptada el 17 de diciembre de 2001 (25). El modelo animal seleccionado, para el desarrollo del estudio, fue el ratón albino suizo el cual presenta un genoma y un sistema inmune similar al de los seres humano, además de requerir un fácil manejo y mínimos cuidados; los ratones utilizados fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad del Valle (Cali – Colombia) y alojados, para su cuidado, en las instalaciones del bioterio de la Universidad del Cauca. Todas las pruebas del ensayo se realizaron en ese lugar, teniendo en cuenta lo descrito en el protocolo OECD-420 (25).

3.2.3.1 Diseño del estudio de toxicidad

El estudio de cada dosis y grupo blanco se realizó por triplicado tal como se ilustra en la *Figura 3.8*



- El código de identificación para cada animal se encuentra asignado con rojo, azul y negro

Significado código Ratón dosificado

Significado color del código (Ratón dosificado)

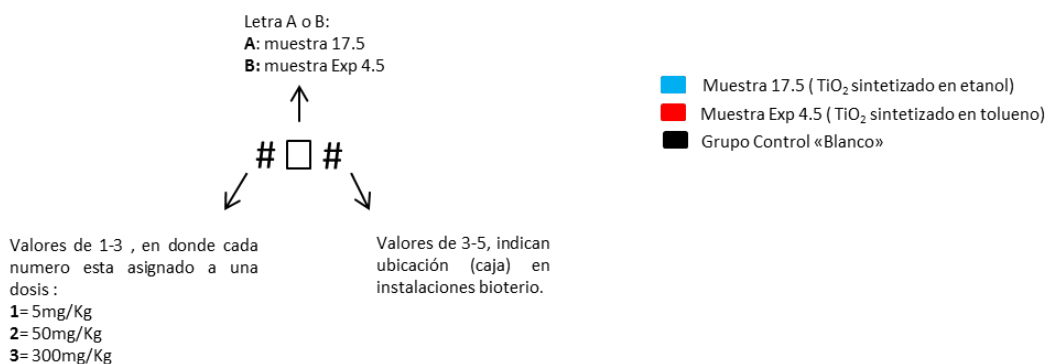


Figura 3.8 Representación esquemática de las dosis empleadas en el estudio y la cantidad de animales usados en cada una de ellas.

Los ratones seleccionados para este estudio fueron machos con una edad comprendida entre 8 y 12 semanas de vida, al inicio de la dosificación.

3.2.3.2 Preparación de las Dosis

Las dosis empleadas para este estudio fueron 3: 5mg/kg, 50mg/kg, 300mg/Kg, y para ello se seleccionaron dos muestras cada una sintetizada a una concentración 3mM de CTAB (muestra 17.5 y Exp 4.5) de TiO₂-NPs para evaluar, en las concentraciones indicadas. Las muestras fueron elegidas considerando la naturaleza del solvente de síntesis (etanol y tolueno), su tamaño de partícula (< 100 nm), morfología y bajo grado de aglomeración.

Las nanopartículas de TiO₂ seleccionadas fueron suspendidas en una solución de carboximetilcelulosa (compuesto orgánico derivado de la celulosa la cual es usada como espesante

y emulsificante en la industria alimenticia y en la medicina) al 3% p/v (solvente agua), en un volumen que no excedió 1 mL/ 100g de peso corporal para cada animal;

3.2.3.3 Administración de las Dosis

Previo a la dosificación, los animales se sometieron a un periodo de ayuno en el cual la comida fue retenida durante 3-4 horas y solo agua fue suministrada durante este periodo de tiempo. Posteriormente se procedió a suministrar una única dosis mediante el uso de jeringas de insulina, vía oral,

3.2.3.4 Estudio de toxicidad pre-morten

Durante el desarrollo del estudio, se realizó un registro del peso de cada animal con una frecuencia de 3 a 4 días, durante 15 días a partir del suministro de las dosis a los ratones

3.2.3.5 Estudio de toxicidad Post-morten

Finalizado el estudio de toxicidad, los animales fueron sacrificados por dislocación de su medula espinal y se les extrajo los órganos de interés, hígado y riñón, a los cuales se les extrajo una biopsia de 50mg que se preservo en glutaraldehido; el órgano restante se marcó y almacenados en el congelador para su posterior análisis por absorción atómica . La metodología aquí planteada se realizó de acuerdo a lo establecido en la directriz OECD 420 (25) por Wang y colaboradores (26).

3.2.3.5.1 Determinación del coeficiente de hígado y riñón

De acuerdo a lo planteado en Wang y colaboradores (26), una vez el animal fue diseccionado se procedió a pesar el hígado y los riñones en húmedo. El coeficiente de hígado y riñón, se encuentra expresado como miligramos (peso del tejido húmedo) / gramos (peso corporal del animal) (26–28).

A los valores del coeficiente de hígado y riñón se les realizo un tratamiento estadístico, empleando para ello el software SPSS 17.0. Estos datos fueron contrastados con los valores del grupo control, a los que previamente se les realizo una prueba de normalidad shapiro wilk.

3.2.3.5.2 Análisis de las biopsias con microscopia electrónica de transmisión

Las muestras se colocaron en una solución de glutaraldehído para su conservación. El proceso para fijar la muestra en la resina se realizó siguiendo el protocolo que se utiliza normalmente con este fin (29) .Luego de tener la muestra fijada a la resina, se le realizaron cortes a la misma, de 60nm de grosor, con la ayuda de un ultra micrótopo. Los cortes se recogieron en las rejillas metálicas y se contrastaron usando citrato de uranilo y acetato de plomo, sumergiendo las muestras en cada solución durante 20min, y fueron estas las que se observaron empleando el microscopio electrónico.

Los análisis de microscopia electrónica de transmisión se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de patología del hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogota.

3.2.3.5.3 Cuantificación del Ti presente en las muestras biológicas usando Espectroscopia de Absorción Atómica

El proceso de digestión se realizó según la metodología planteada en la “ Normativa para metales en tejidos animales y en vegetación” de la referencia (30). Las muestras de los órganos extraídos de los ratones, utilizados en este estudio, fueron secadas previamente, a 60°C/10h. Después del proceso de

secado, éstas se calcinaron a una temperatura de 250°C/2h y a 500°C /2h para eliminar la materia orgánica. Las cenizas recolectadas fueron pesadas y depositadas en un balón de fondo plano para su posterior digestión. El líquido resultante de este proceso fue filtrado y transvasado a un balón aforado de 50 mL para su posterior lectura en el equipo de absorción atómica del laboratorio de análisis industriales adscrito a la universidad del valle, empleando una metodología ya estandarizada; para la preparación de la muestra del blanco se incluyó todo el procedimiento descrito (31).

3.3 ANALISIS DE RESULTADOS

3.3.1 Estudio de toxicidad pre-morten

En este estudio se consideró que la disminución de peso del ratón era una señal de toxicidad en su organismo, generado por la pérdida de apetito o por alguna falla sistémica. Los pesos promedios registrados en el transcurso del ensayo se indican en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2 Registro de los pesos de cada modelo animal empleado, durante el desarrollo del estudio

Dosis	Ratón	Peso (g)				
		Día 1	Día 4	Día 8	Día 11	Día 15
Blanco	R1	39,1	35,96	36,2	36,96	37,3
	R2	39,76	38,9	38,8	39,83	40,3
	R3	39,13	37,83	38,03	38,16	38,8
5mg/Kg	1A3	39	38,53	38,83	41,06	40,1
	1A4	42,83	42,26	41,43	43,1	42,6
	1A5	38,9	37,73	34,9	41,2	39,7
	1B3	40,66	41,3	40,3	40,83	37,9
	1B4	40,7	39,7	39,53	41,3	39,53
	1B5	39,2	41,4	38,3	43,76	43,3
50mg/Kg	2A3	41,96	41,23	41,03	41,46	42,36
	2A4	40,26	39,56	38,73	39,96	39,3
	2A5	44,13	43,43	40,36	45,03	44,8
	2B3	42,33	43,06	41,86	42,63	44,06
	2B4	43,23	42,4	41,66	43,03	41,9
	2B5	44,8	43,06	41,26	46,26	46,2
300mg/Kg	3A3	43,36	43,46	40,93	42,73	43,36
	3A4	39,06	39,5	39,6	41,76	40,7
	3A5	43,53	41,06	39,4	45	45
	3B3	40,56	40,56	40,7	44,56	44,83
	3B4	43,46	41,7	41,06	41,73	42,2
	3B5	45,93	-	-	-	-

- No se registró valores de peso corporal

Las curvas de las **Figura 3.9-Figura 3.12** describen gráficamente el comportamiento del peso de los ratones durante el desarrollo del estudio de toxicidad de las TiO₂-NPs.

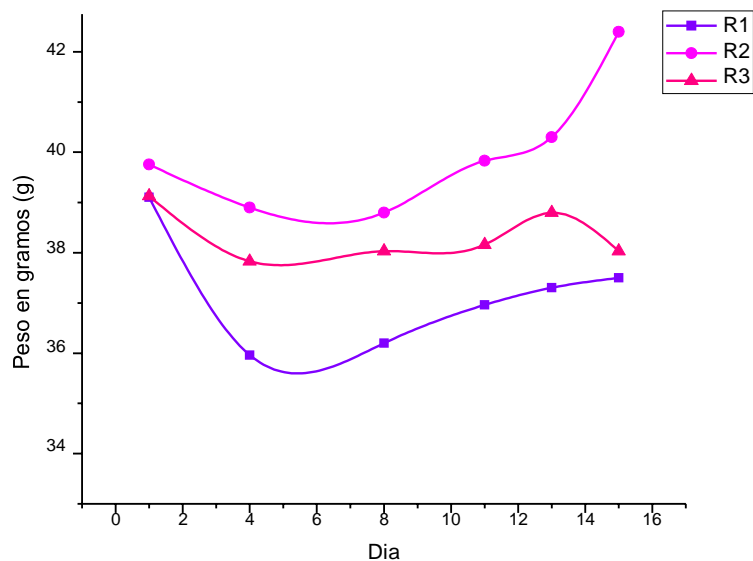


Figura 3.9 Variación del peso de los ratones en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO_2 -NPs, para el grupo denominado “Blanco”.

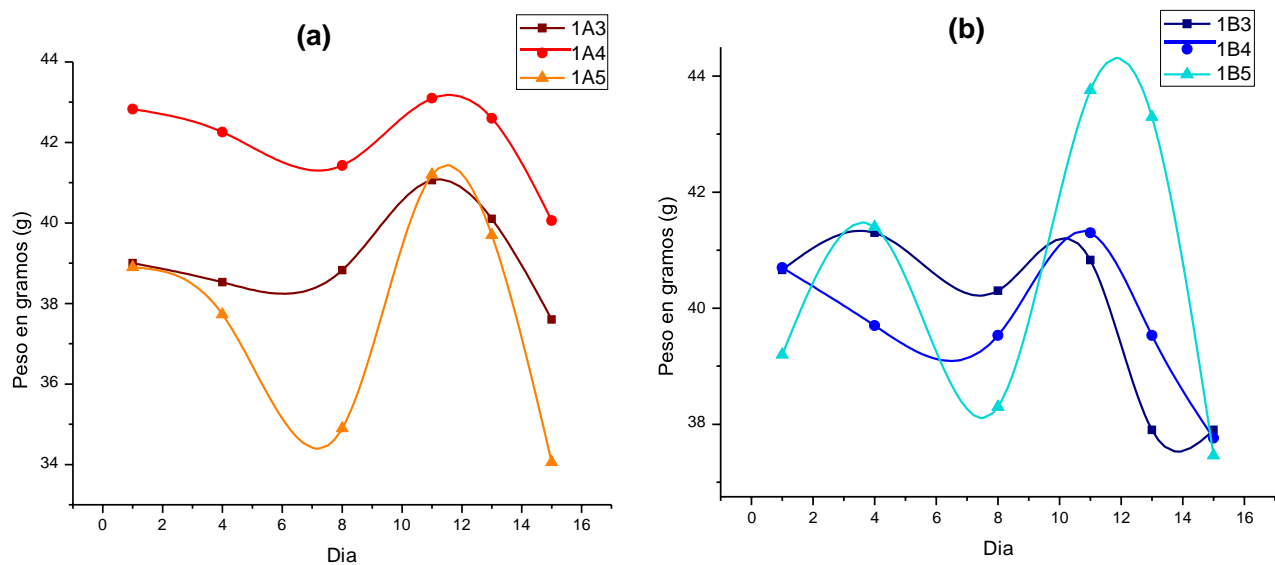


Figura 3.10 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO_2 -NPs con una dosis de 5mg/Kg, de los ratones del grupo 1A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 1B dosificados con TiO_2 sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5).

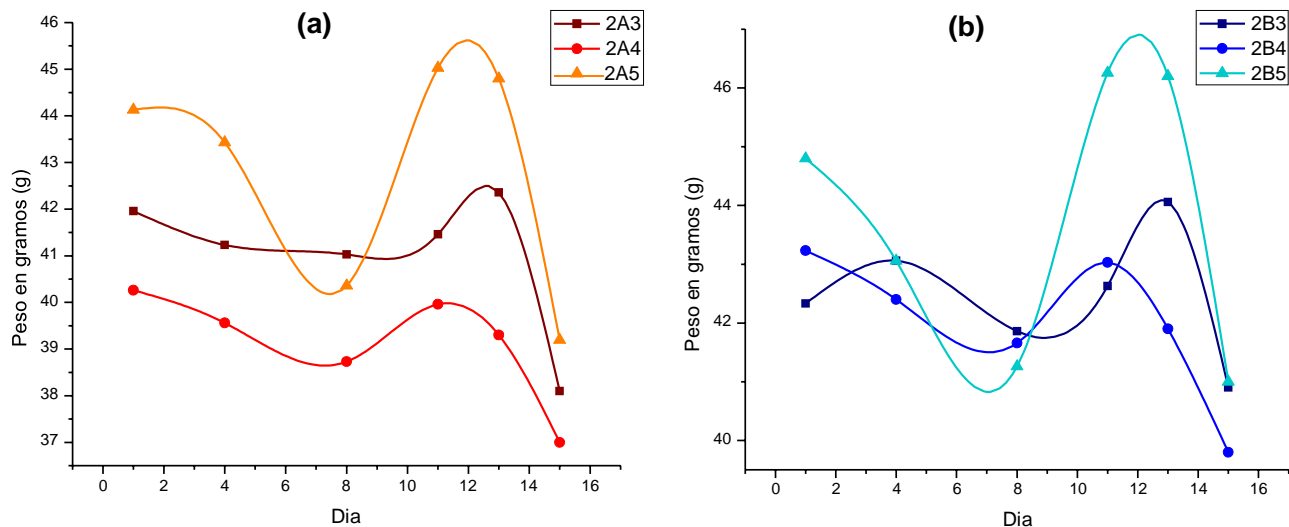


Figura 3.11 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO_2 -NPs con una dosis de 50 mg/Kg, de los ratones del grupo 2A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 2B dosificados con TiO_2 sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5).

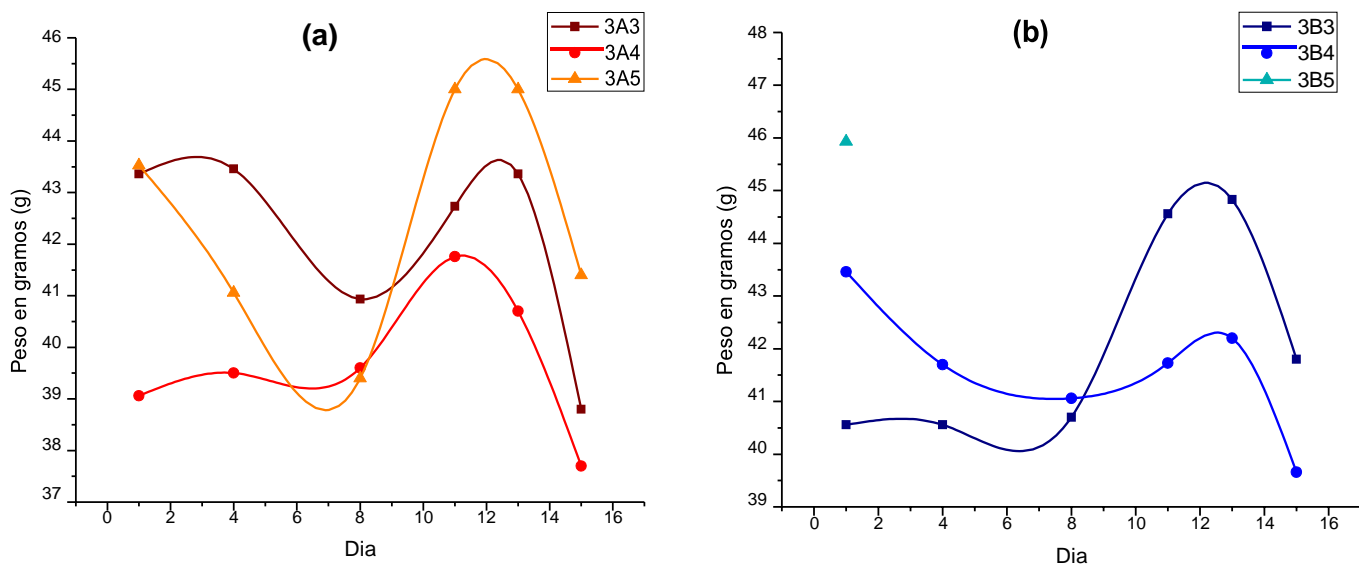


Figura 3.12 Variación del peso en función del tiempo, durante el estudio de toxicidad de las TiO_2 -NPs con una dosis de 300 mg/Kg, de los ratones del grupo 3A dosificados con nanopartículas sintetizadas en etanol (a) (Muestra 17.5) y del grupo 3B dosificados con TiO_2 sintetizado en tolueno(b)(Muestra Exp 4.5).

Las **Figura 3.10**, **Figura 3.11** y **Figura 3.12** presentaron una gran diferencia con relación a la **Figura 3.9** que contenía la información de los ratones que se tomaron como blanco. En la **Figura 3.9** se presentó una tendencia a ganar peso, a pesar de que entre los días 1 al 6 se ve una disminución del mismo, hecho que se podría asociar al estrés generado durante la dosificación y a la asimilación de la carboximetilcelulosa en el organismo (el grupo Blanco se dosifico con una

suspensión al 3% P/V de carboximetilcelulosa con un volumen que no excedió 1mL/100g de peso corporal, sin la presencia de dióxido de titanio). En las **Figura 3.10-Figura 3.12** se observó una tendencia de disminución del peso corporal de los animales, casi desde el día 1 hasta el día 6 u 8 días del ensayo, proceso que se pudo generar por la asimilación de las nanopartículas a su organismo. Pasado este tiempo, se presentó un incremento o ganancia de peso en donde, posiblemente, el organismo del animal intento sobreponerse a la dosis de TiO₂-Nps suministrada. Finalmente, entre los días 13 al 15, el efecto de las nanopartículas se hace nuevamente evidente generando una disminución evidente en el peso de los ratones; en la **Figura 3.12(b)** solo se realizó el seguimiento del peso de dos ratones del grupo 3B debido a que uno de los especímenes murió durante la dosificación.

En la **Tabla 3.3** se muestra una comparación entre la pérdida de peso de los ratones ($\Delta P = P_f - P_i$, donde P_f es el peso registrado al final del estudio (día 15) y P_i es el peso registrado antes de suministrar la dosis en el día 1), el porcentaje de variación de peso (%V) para cada animal y el promedio de los mismos para cada grupo.

Tabla 3.3 Registro de los valores encontrados para ΔP , $\overline{\Delta P}$, %V y $\overline{\%V}$ en el blanco y en cada una de las dosis empleadas para el grupo A y B

Dosis	Ratón	ΔP	$\overline{\Delta P}$	%V	$\overline{\%V}$
Blanco	R1	1,6	0,02	4,09	0,09
	R2	-2,64*		-6,64*	
	R3	1,1		2,81	
5 mg/Kg	1A3	1,4	3,00	3,59	7,50
	1A4	2,77		6,47	
	1A5	4,84		12,44	
	1B3	2,76	2,48	6,78	6,34
	1B4	2,94		7,79	
	1B5	1,74		4,44	
50 mg/Kg	2A3	3,86	4,01	9,20	9,49
	2A4	3,26		8,10	
	2A5	4,93		11,17	
	2B3	1,43	2,88	3,38	6,60
	2B4	3,43		7,93	
	2B5	3,8		8,48	
300 mg/Kg	3A3	4,56	2,68	10,52	6,30
	3A4	1,36		3,48	
	3A5	2,13		4,89	
	3B3	-1,24 *	1,28	-3,06*	2,84
	3B4	3,8		8,74	
	3B5	-		-	

* En estos ejemplares se presentó un aumento de peso en el último día del estudio en relación con su peso inicial

ΔP : Es la diferencia entre el peso inicial (día 1) con el peso final (día 15)

P_i : Peso inicial antes de la dosificación (día 1)

P_f : Peso final (día 15)

$\overline{\Delta P}$: Promedio de ΔP

%V: porcentaje de variación en donde, %V = $((P_f - P_i) / P_i) * 100$

$\overline{\%V}$: Promedio de %V

Considerando los datos de la **Tabla 3.3** se puede concluir que la dosis de 50 mg/Kg de TiO₂-NP genero una mayor disminución del peso corporal de los animales para el grupo A y B. Así mismo se encontró que los valores de $\overline{\Delta P}$ y $\overline{\%V}$ para el grupo A (TiO₂ sintetizado en etanol) fueron mayores que los del grupo B (TiO₂ sintetizado en tolueno) para las tres dosis empleadas, efecto que puede atribuirse a diferencias en las características fisicoquímicas de las TiO₂-NPs atribuibles a las condiciones de síntesis empleadas, diferente solvente de síntesis por ejemplo, ya que las partículas del grupo A presentaron un tamaño pequeño (< 100 nm partículas primarias) y una mezcla de morfología esférica y tipo aguja (ver **Figura 2.49**), mientras que las del grupo B su tamaño fue mayor (90 nm-1µm, partículas primarias) y su morfología era tipo placas con bordes agudos (ver **Figura 2.57**). Dado el pequeño tamaño de las partículas, así como por la forma de las partículas (grupo A), el organismo del animal tendría dificultades para su asimilación, eliminación y/o excreción de las mismas, por órganos como el hígado y el riñón, generando un mayor daño y tiempo de retención en su organismo (26).

Las diferencias en los porcentajes de variación de peso, en los dos grupos de estudio a medida que se incrementa la dosis, es evidente (**Tabla 3.3**). Se observa que para dosis altas el porcentaje de variación de peso disminuyo mientras que para dosis pequeñas el porcentaje se incrementó, efecto que se puede deber a que con dosis bajas las nanopartículas de TiO₂ se metabolizarían con dificultad, impidiendo su excreción, mientras que para cantidades mayores (300 mg/Kg) le resultaría más fácil al organismo detectar y excretar las TiO₂-NPs. Estos resultados reiteran lo enunciado por otros autores como Zook et al (21) quien reporta que a pequeñas dosis de nanopartículas, menor número de estas en la masa y menor aglomeración, lo que les permite penetrar más fácilmente en las células, ocasionando que estos pequeños aglomerados de nanopartículas causen más citotoxicidad hemolítica que los grandes aglomerados. Por otro lado, así como lo indican Pasupuleti et al. en su trabajo sobre ZnO-NPs (32), la toxicidad de las Nanopartículas en dosis bajas es evidente, tal como se observó en el presente trabajo (50 mg/Kg). Esto lleva a considerar, como lo enuncio Oberdorster (33), que los resultados de los estudios toxicológicos realizados con dosis de nanopartículas demasiado altas se deben interpretar con precaución.

3.3.2 Estudios de Toxicidad Post-mortem

3.3.2.1 Determinación del coeficiente de hígado y riñón

De acuerdo a lo planteado en Wang y colaboradores (26), una vez el animal fue diseccionado se procedió a pesar el hígado y los riñones en húmedo. Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 3.4**

A los valores del coeficiente de hígado y riñón se les realizo un tratamiento estadístico. Estos datos fueron contrastados con los valores del grupo control, a los que previamente se les realizo una prueba de normalidad shapiro wilk, encontrándose para la mayoría de los datos un valor de $P > (\alpha=0,05)$ con lo cual se acepta la hipótesis nula **H₀** (H₀: los datos provienen de una distribución normal). El análisis realizado mostro que los datos de interés presentaban una distribución normal, aunque para algunos pocos valores (ver **Tabla 3.4**) los valores referidos se encuentran

representados por el símbolo + , se obtuvo un valor de $P < (\alpha=0,05)$, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alterna H_1 (H_1 : los datos no provienen de una distribución normal). Entre los grupos (coeficiente Riñón) con una distribución NO normal se encontraron los grupos 1B, 2A y el grupo control “Blanco”, siendo la ausencia de normalidad en este último lo que impidió la determinación de diferencias significativas entre su media y la de los grupos dosificados .El tratamiento estadístico se explica con más detalle en el **Anexo 1**.

Tabla 3.4 Pesos y coeficientes del hígado y riñón para cada animal utilizado en el estudio de toxicidad de las TiO_2 -NPs

Dosis	Grupos	Peso Ratón (g)	Peso Hígado (g)	Coefficiente Hígado	Peso Riñón (g)	Coefficiente Riñón
Blanco	R1	40,9	3,2	78,23	0,9	22 ⁺
	R2	31,73	3,2	100,84	0,8	25,21 ⁺
	R3	40,87	2,6	63,62	0,9	22,02 ⁺
5mg/Kg	1A3	43,77	3	68,54	0,6	13,7
	1A4	47,70	2,5	52,41	0,7	14,67
	1A5	42,37	3,1	73,17	0,7	16,52
	1B3	44,40	2,5	53,3	0,7	15,76 ⁺
	1B4	44,40	1,9	42,79	0,6	13,51 ⁺
	1B5	44,40	3,2	72,07	0,7	15,76 ⁺
	2A3	46,40	3	64,65	0,7	15,08
50mg/Kg	2A4	45,30	2,1	46,35	0,6	13,24
	2A5	44,30	2,9	65,46	0,8	18,05
	2B3	48,63	2,8	57,57	0,8	16,44 ⁺
	2B4	45,70	2,1	45,95	0,6	13,12 ⁺
	2B5	48,40	2,5	51,65	0,8	16,52 ⁺
	3A3	47,60	2,8	58,82	0,7	14,7
300mg/Kg	3A4	44,70	2,4	53,69	0,7	15,65
	3A5	42,43	2,3	54,2	0,9	21,2
	3B3	49,30	2,7	54,76	0,8	16,22
	3B4	46,20	2,2	47,61	0,6	12,98
	3B5	43,7	3	68,64	1	22,88

+ Datos con un valor de $P < (\alpha=0,05)$, prueba shapiro wilk

En la **Tabla 3.5** se indican los resultados de significancia, valor P tanto para la prueba de levine como de T student, de los datos con una distribución normal contrastados con los valores del control; los valores empleados para este análisis corresponden a los coeficientes de hígado determinados (ver **Tabla 3.4**).

Para todos grupos se encontró que el valor de P obtenido, en la prueba de levine, era mayor al porcentaje de error de 5% ($\alpha=0,05$), con lo cual se acepta la hipótesis nula H_0 (H_0 : las varianzas son iguales entre el grupo dosificado y el grupo Blanco). Esta prueba nos llevó a determinar el valor de P en la prueba de T student, el cual fue mayor a 0,05, resultado que llevo a aceptar la hipótesis nula H_0 (H_0 : no existen diferencias significativas entre la media del grupo control (datos coeficiente de hígado) y el grupo dosificado (datos coeficiente de hígado)). La determinación de la hipótesis a partir de los valores de P obtenidos y el porcentaje de error α para cada una de las pruebas estadísticas empleadas se explica con mayor detalle en el **Anexo 1** (ver **Tabla 5.7**).

Tabla 3.5 Valores de *P* para la prueba de levine y *T* student

Prueba	Grupo	Valor <i>P</i> obtenido
Levene (Igualdad de Varianzas)	1A	0.436
	1B	0.717
	2A	0.436
	2B	0.175
	3A	0.108
	3B	0.413
T-student (comparación de medias)	1A	0.266
	1B	0.146
	2A	0.152
	2B	0.062
	3A	0.082
	3B	0.128

3.3.2.1 Cuantificación de Titanio en hígado y riñón

En las muestras no se determinó la presencia de titanio, se estima que su valor estaría por debajo de 1.6ppm; este resultado nos indica que la bioacumulación de Ti estaría presente en otros órganos del sistema gastrointestinal.

3.3.2.2 Análisis estructural y ultraestructural de los órganos afectados

La **Figura 3.13** Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado tomada del grupo control exhibe la estructura de un hepatocito, el cual presenta un borde poliédrico que termina en unas vellosidades comunicadas con el espacio de disse, en este espacio se producen los procesos de intercambio. Las principales estructura celulares del hígado no presentan anomalías.

En la **Figura 3.14** se observa una ligera pérdida de las crestas mitocondriales , pero aún conservan su forma redonda .

Al aumentar la dosis puede observarse como en la **Figura 3.15** se genera un aumento del tamaño del espacio de disse, así como del retículo endoplasmico; el mayor daño estructural se genera a nivel de la mitocondria en donde hay un borramiento de su membrana y cambios degenerativos.

El mayor efecto generado por las partículas de TiO₂ se observa en la **Figura 3.16**, en donde hay alteraciones de las mitocondrias consistentes con una distorsión de la estructura normal de las mismas, las cuales lucen fragmentadas, de forma irregular anómala y con borramiento de la membrana externa

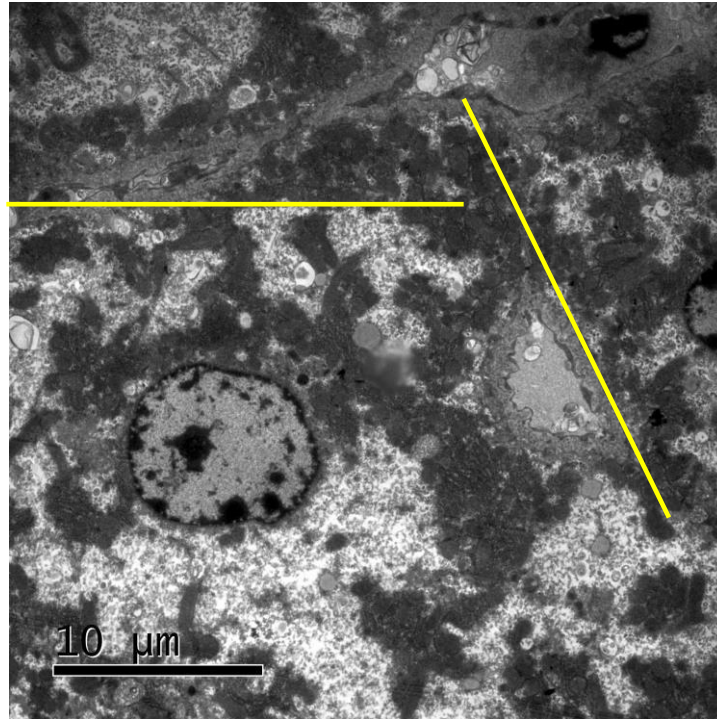


Figura 3.13 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado tomada del grupo control

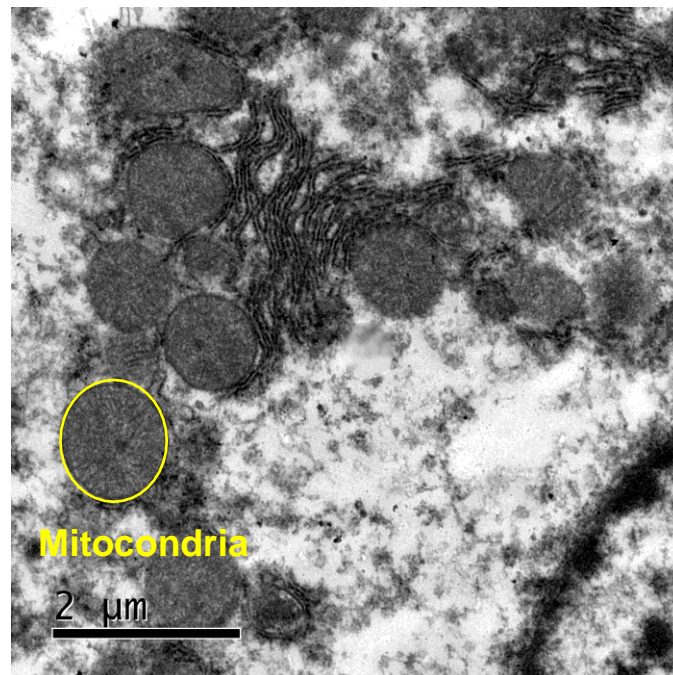


Figura 3.14 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 5mg/Kg de TiO₂ sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5)

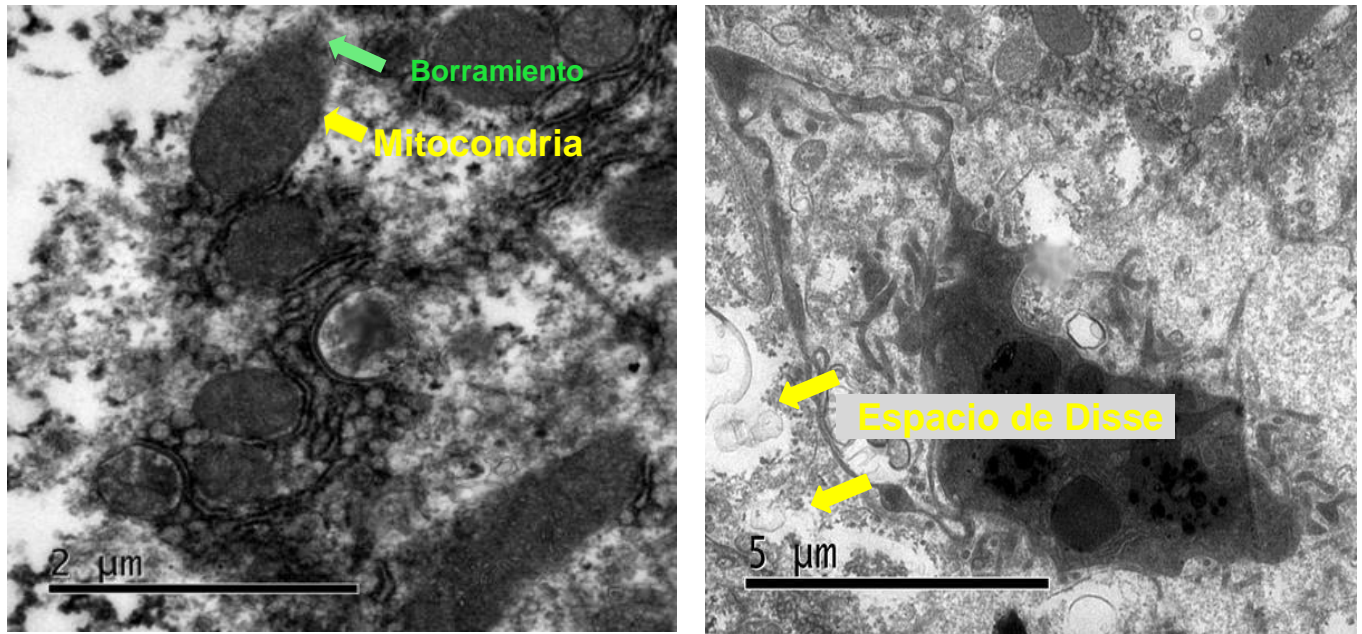


Figura 3.15 Imágenes MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 50mg/Kg de TiO_2 sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5)

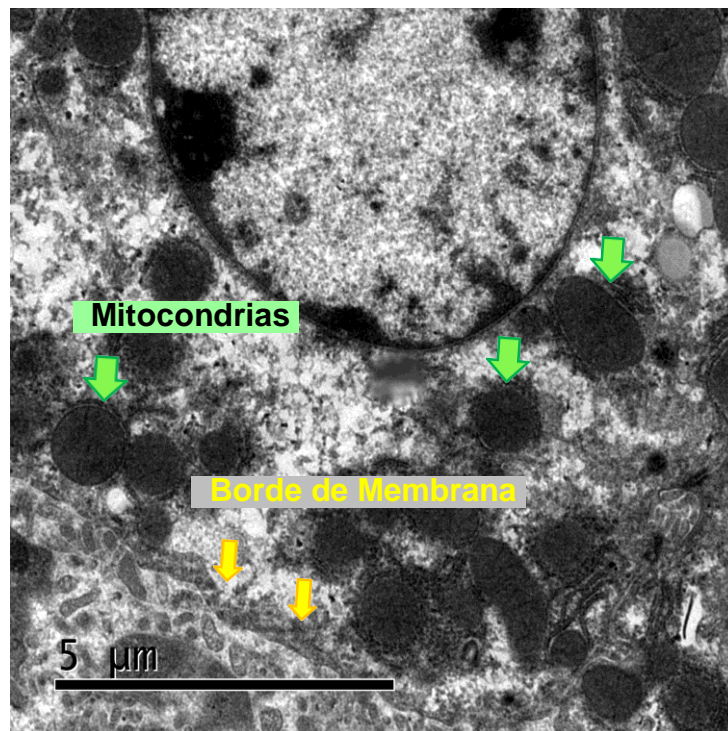


Figura 3.16 Imagen obtenida por MET, de la biopsia de hígado del grupo dosificado con 300mg/Kg de TiO_2 sintetizado en etanol a una concentración 3mM (muestra 17.5)

Aunque el análisis de absorción atómica no mostro una bioacumulación de la partículas en el hígado, los daños a nivel celular del hepatocito y de la mitocondria demuestran que la producción

de partículas reactivas de oxígeno o el daño mecánico ocasionado por estas, contribuyeron a ocasionar efectos tóxicos para el animal dosificado.

En el **Anexo 2** se adjuntan otras micrografías correspondientes para cada una de las dosis suministradas.

3.4 CONCLUSIONES

- El registro de la variación de los pesos de los ratones a los que se les dio la dosis de TiO₂-NPs, en concentraciones pre-definidas en función del tiempo del ensayo, permitió determinar el efecto de las condiciones de síntesis de las NPs (diferente solvente de síntesis etanol o tolueno) y de su concentración en la dosis sobre la condición fisiológica normal de ratones Albinos. Se encontraron variaciones apreciables entre grupos y dosis, con relación al grupo “blanco” (referente al que no se le suministró TiO₂-NPs), siendo más evidentes los correspondientes a ratones a los que se les hizo ingerir dosis de 50mg/Kg de NPs, tanto en el grupo A (sintetizadas en etanol) como en el B (sintetizadas en tolueno). Por otro lado, observando las diferencias entre grupos, los ratones del grupo A presentaron mayor disminución de peso, para todas las dosis, que los del grupo B. Este resultado indica que las características fisicoquímicas de las TiO₂-NPs, inicialmente las más evidentes como morfología y tamaño de partícula, permitirían justificar estas diferencias. Así, mientras las nanopartículas sintetizadas en etanol (grupo A) presentaron una mezcla de morfología esférica y tipo aguja, con tamaños comprendidos entre 10 nm - 100nm, las NPs sintetizadas en tolueno (grupo B) presentaron una morfología tipo plaquetas, con bordes agudos, y tamaño comprendido entre 50 nm - 1µm.
- Aunque la mayor variación de peso se generó en los grupos dosificados con la menor dosis (5mg/Kg), el mayor daño a nivel celular en el hígado se ocasionó a las concentraciones más altas (300mg/Kg); lo que indica que en los animales con mayores efectos de toxicidad no se vio afectada su apetencia.
- Los daños a nivel celular, más específicamente en la mitocondria y el hepatocito, podrían traer graves consecuencias para el desarrollo normal del hígado, ocasionando la falla de otros órganos, para finalmente producir la muerte del animal.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

1. Williams PL, James RC, Roberts SM. Principles of toxicology: Environmental and Industrial Applications. 2nd ed. Williams PL, James RC, Roberts SM, editors. Wiley. United States of America: Wiley-Interscience Publication; 2000. 603 p.
2. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):823 - 839.
3. Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol.* 2009;87:133 - 170.
4. Sahu SC, Casciano DA. Nanotoxicity: From In Vivo and In Vitro Models to Health. 1st ed. Sahu SC, Casciano DA, editors. West Sussex: Wiley; 2009. 630 p.
5. Houdy P, Lahmani M, Marano F. Nanoethics and Nanotoxicology. 1st ed. Houdy P, Lahmani M, Marano F, editors. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. 643 p.
6. Durán N, Guterres SS, Alves OL. Nanotoxicology Materials, Methodologies, and Assessments. 1st ed. Durán N, Guterres SS, Alves OL, editors. New York: Springer-Verlag; 2014. 411 p.
7. Zeliger HI. Human Toxicology of Chemical Mixtures Toxic Consequences Beyond the Impact of One-Component Product and Environmental Exposures. In: Andrew W, editor. Elsevier Inc. 2nd ed. Kidlington, Oxford: Elsevier Inc; 2011. p. 479 - 484.
8. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):17-71.
9. Nohynek GJ, Lademann J, Ribaud C, Roberts MS. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit Rev Toxicol.* 2007;37(3):251-277.
10. Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJAM. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;49(3):217-229.
11. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 93 Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France; 2010.
12. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:15(1):1-33.
13. Warheit DB, Donner EM. Risk assessment strategies for nanoscale and fine-sized titanium dioxide particles: Recognizing hazard and exposure issues. *Food Chem Toxicol.* 2015;85(1):138-147.

14. Rydström Lundin C. Nanoparticles in Food - with a focus on the toxicity of titanium dioxide. Uppsala universitet; 2012.
15. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ Sci Technol.* 2012;46(4):2242-2250.
16. Chen XX, Cheng B, Yang YX, Cao A, Liu JH, Du LJ, et al. Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum. *Small.* 2013;9(9-10):1765-1774.
17. Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol.* 2011;45(4):227-247.
18. Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E, Pele LC. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J226-J233.
19. Burda C, Chen X, Narayanan R, El-Sayed MA. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Rev.* 2005;105(4):1025-1102.
20. Bergin IL, Witzmann FA. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3(1-2):163-210.
21. Zook JM, MacCuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect of their size on hemolytic cytotoxicity. *Nanotoxicology.* 2011;5(4):517-530.
22. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic Potential of Materials at the nanolevel. *Science (80-).* 2006;311(5761):622-627.
23. Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata O V. Nanoparticles – known and unknown health risks. *Nanobiotechnology.* 2004;2:12(1):1-15.
24. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *Pharm Pharmacol.* 1990;42(12):821-826.
25. OECD. OECD guideline (420) for testing of chemicals Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris, Francia; 2001.
26. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett.* 2007;168(1):176-185.
27. Liu R, Yin L, Pu Y, Liang G, Zhang J, Su Y, et al. Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Prog Nat Sci Mater Int.* 2009;19(5):573-579.

28. Gui S, Zhang Z, Zheng L, Cui Y, Liu X, Li N, et al. Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Hazard Mater.* 2011;195:365-370.
29. Bozzola JJ, Russel LD. *Electron Microscopy: Principles and techniques for Biologists.* 2nd ed. McKeian B, editor. Toronto, canada: Jones and Bartlett; 1992. 450 p.
30. Laboratorio (Bceltac). *Metals in Animal Tissue and Vegetation (Biota) - Prescriptive.* BCELTA; 2014. 1-4 p.
31. Harris DC. *Analisis Quimico Cuantitativo.* 3rd ed. Berenguer V, editor. california: Editorial Reverte; 2003. 729 p.
32. Pasupuleti S, Alapati S, Ganapathy S, Anumolu G, Pully NR, Prakhya BM. Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(8):675-686.
33. Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: Concepts of nanotoxicology. *Intern Med.* 2010;267(1):89–105.

Anexo 1

Los valores de los coeficientes para hígado y el riñón se dan a conocer en la **Tabla 3.4** , con estos valores se procedió a realizar un tratamiento estadístico con el software SPSS 17.0 con él que se analizó si los datos de coeficientes de órganos poseen una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk, $n < 30$, (n: número de datos)), para cada grupo de animales; y se realizó una prueba “t Student” para muestras Independientes, con un porcentaje de error de 5% ($\alpha = 0,05$), esta prueba de comparación de medias, nos ayuda a establecer si existe diferencias significativas entre los valores de coeficiente de los grupos dosificados y el grupo control tanto en hígado como en riñón .

En la **Tabla 4.1** se dan a conocer los valores de normalidad encontrados:

Tabla 4.1. Resultados estadísticos del Test de Normalidad (shapiro wilk) obtenidos al utilizar el software SPSS con los datos de coeficiente de hígado y riñón para los grupos dosificados y el control

Tests of Normality^b

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
coeficienteHigado	1A	.304	3	.907	3	.409
	1B	.240	3	.974	3	.692
	2A	.372	3	.782	3	.072
	2B	.176	3	1.000	3	.979
	3A	.353	3	.824	3	.173
	3B	.250	3	.967	3	.651
	Blanc	.223	3	.985	3	.764

a. Lilliefors Significance Correction

b. There are no valid cases for coeficienteHigado when Grupos = ,000. Statistics cannot be computed for this level.

(a)

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CoeficienteRiñon	1A	.248	3	.969	3	.660
	1B	.385	3	.750	3	.000
	2A	.228	3	.982	3	.743
	2B	.378	3	.768	3	.039
	3A	.336	3	.857	3	.259
	3B	.256	3	.962	3	.624
	Blanc	.383	3	.755	3	.010

a. Lilliefors Significance Correction

(b)

Como se observa en la **Tabla 4.1(a)** y **(b)** la mayoría de los datos presentan un nivel de significancia mayor a 0,05 por lo que para estos grupos se acepta la hipótesis nula H_0 (H_0 : el análisis realizado mostro que los datos de interés presentaban una distribución normal). Para los valores que presentan un valor de significancia menor a 0,05 se acepta la hipótesis alterna H_1 (H_1 : los datos No provienen de una distribución normal); debido a que en la **Tabla 4.1 (b)** los valores de significancia para el grupo Blanco no presentan una distribución normal, no puede aplicarse una prueba T student que permita comparar estos datos con los de los grupos dosificados.

Los valores encontrados para el test de levene el cual copara la igualdad en varianzas y los valores de T student (comparación de medias) para los datos que presentaron normalidad en los valores de coeficiente de hígado se dan a conocer en la **Tabla 4.2** a la **4.6**

Tabla 4.2 Resultados estadísticos del test de leven y la T student para los datos del coeficiente de Hígado del grupo 1A y el control “Blanco”

Grupo		N	Media	Desviación Tip.	Error típico de la media
Valor	Blanco	3	80.89667	18.752745	10.826902
	1A	3	64.70667	10.897946	6.291932

		Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	.746	.436	1.293	4	.266	16.190000	12.522389	-18.577725	50.957725
	No se han asumido Varianzas iguales			1.293	3.213	.281	16.190000	12.522389	-22.210715	54.590715

Tabla 4.3 Resultados estadísticos del test de leven y la T student para los datos del coeficiente de Hígado del grupo 1B y el control “Blanco”

Grupo		N	Media	Desviación Tip.	Error típico de la media
Valor	Blanco	3	80.89667	18.752745	10.826902
	1B	3	56.05333	14.832910	8.563785

		Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	.152	.717	1.800	4	.146	24.843333	13.804355	-13.483701	63.170368
	No se han asumido Varianzas iguales			1.800	3.799	.150	24.843333	13.804355	-14.298761	63.985428

Tabla 4.4 Resultados estadísticos del test de leven y la T student para los datos del coeficiente de Hígado del grupo 2A y el control “Blanco”

Estadísticos de Grupo

Grupo	N	Media	Desviación Tip.	Error típico de la media
Valor Blanco	3	80.8967	18.75274	10.82690
2A	3	58.8200	10.80693	6.23938

		Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	.747	.436	1.767	4	.152	22.07667	12.49607	-12.61798	56.77131
	No se han asumido Varianzas iguales			1.767	3.196	.170	22.07667	12.49607	-16.34380	60.49714

Tabla 4.5 Resultados estadísticos del test de leven y la T student para los datos del coeficiente de Hígado del grupo 2B y el control “Blanco”

Grupo		N	N	Media	Desviación Tip.
Valor	Blanco	3	80.89667	18.752745	10.826902
	2B	3	51.72333	5.810347	3.354605

		Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	2.718	.175	2.574	4	.062	29.173333	11.334690	-2.296810	60.643477
	No se han asumido Varianzas iguales			2.574	2.380	.104	29.173333	11.334690	-12.837264	71.183931

Tabla4.6 Resultados estadísticos del test de leven y la T student para los datos del coeficiente de Hígado del grupo 3A y el control “Blanco”

Grupo		N	N	Media	Desviación Tip.
Valor	Blanco	3	80.8967	18.75274	10.82690
	3A	3	55.5700	2.82611	1.63166

		Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	4.249	.108	2.313	4	.082	25.32667	10.94916	-5.07308	55.72641
	No se han asumido Varianzas iguales			2.313	2.091	.141	25.32667	10.94916	-19.87648	70.52981

Tabla 4.7 Resultados estadísticos del test de Levene y la T student para los datos del coeficiente de Higado del grupo 3B y el control "Blanco"

Estadísticos de Grupo

Grupo		N	N	Media	Desviación Tip.
Valor	Blanco	3	80.89667	18.752745	10.826902
	3B	3	57.00333	10.692971	6.173590

		Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	sig	t	df	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. De la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	superior
Valor	Se han asumido varianzas iguales	.832	.413	1.917	4	.128	23.893333	12.463347	-10.710466	58.497133
	No se han asumido Varianzas iguales			1.917	3.176	.146	23.893333	12.463347	-14.554352	62.341019

La determinación de la hipótesis a partir del valor de significancia y el porcentaje de error para cada una de las pruebas estadísticas mencionadas en este texto se dan a conocer a continuación:

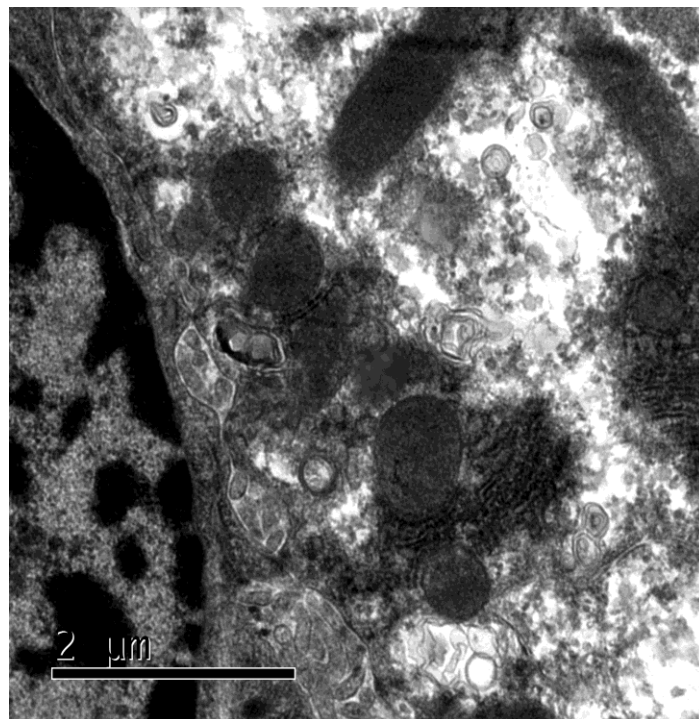
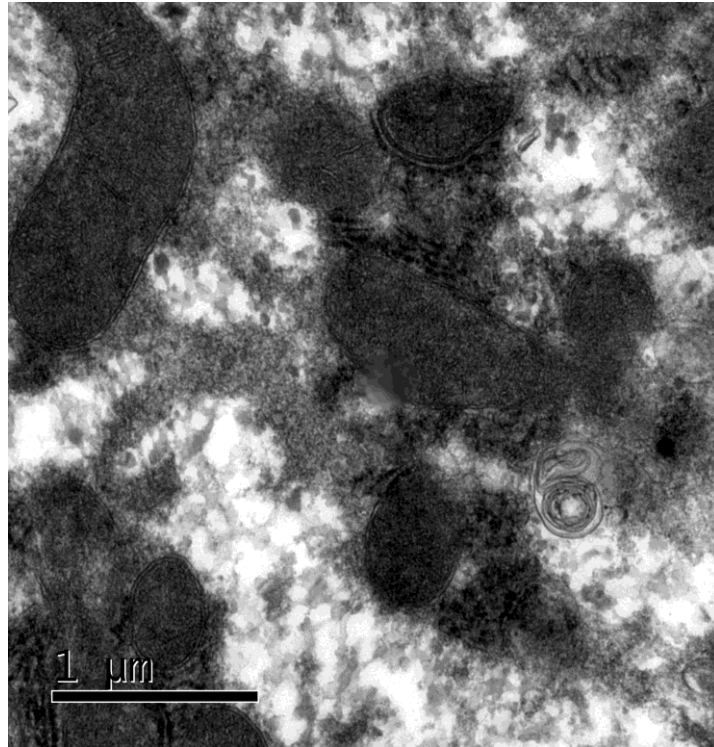
Tabla 4.7 determinación de la Hipótesis a partir de los valores de P y α para cada una de las pruebas estadísticas empleadas.

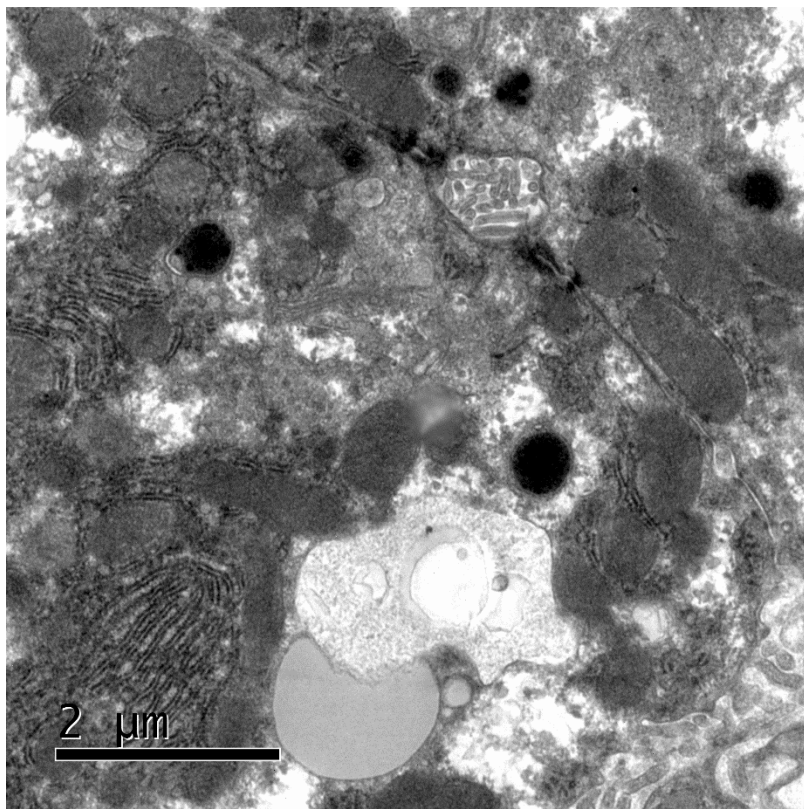
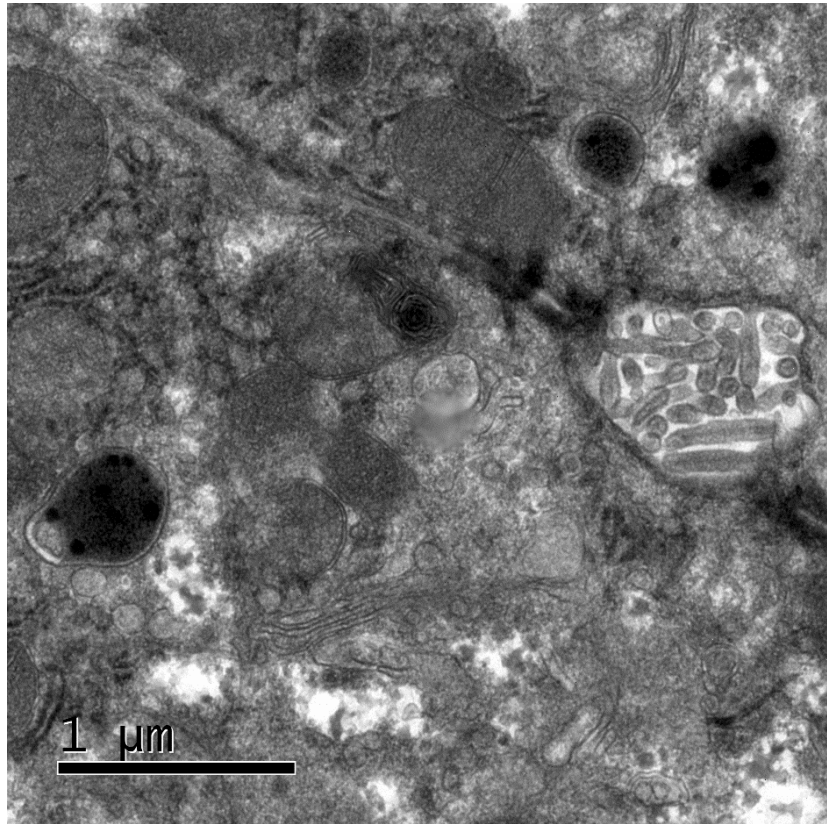
Prueba	P valor obtenido	Desigualdad	Porcentaje de error ($\alpha=5\%$)	Hipótesis
Shapiro Wilk (normalidad)	P	$>$	α	Ho: los datos provienen de una distribución normal
	P	$<$	α	H ₁ : Los datos No provienen de una distribución normal
Levene (igualdad de varianzas)	P	$>$	α	Ho: las varianzas son iguales
	P	$<$	α	H ₁ : Existen diferencias significativas entre las varianzas
T-student	P	$>$	α	Ho: No existe una diferencia significativa entre la media de los grupos a contrastar
	P	\leq	α	H ₁ : Existe una diferencia significativa entre la media de los grupos

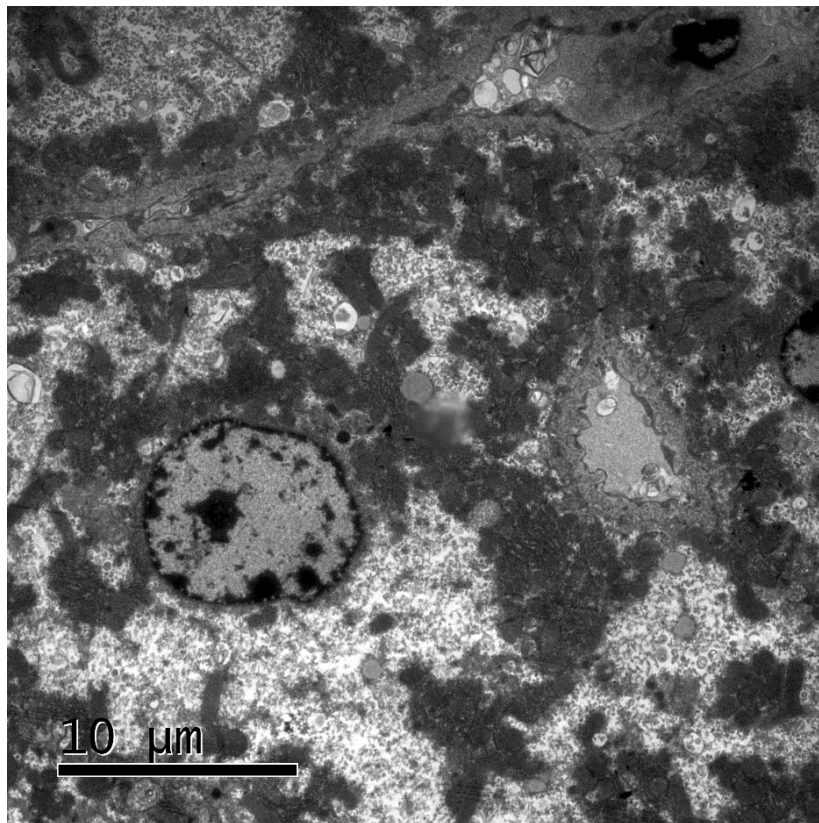
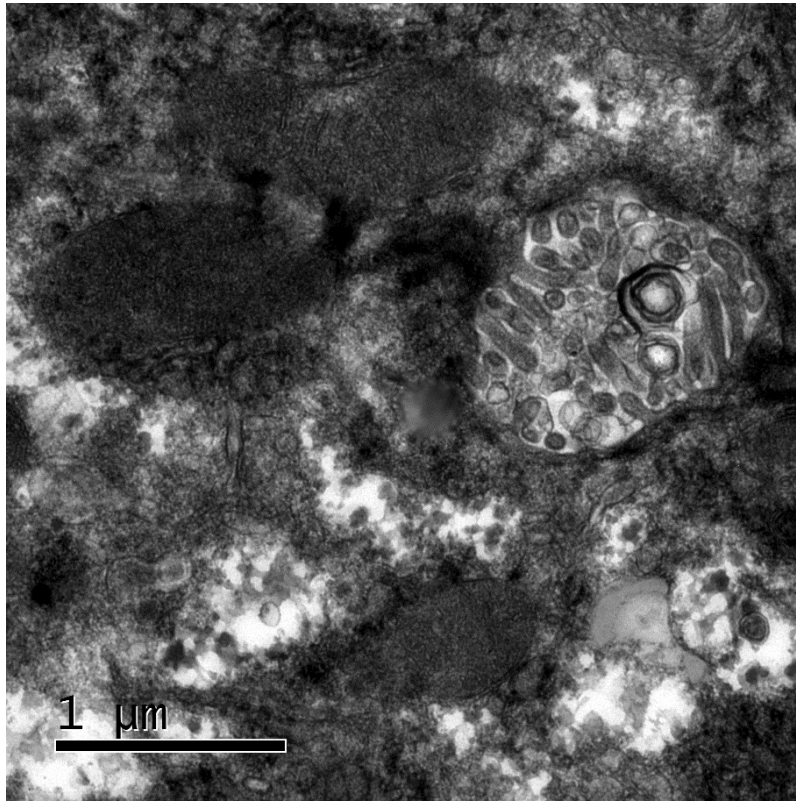
Ho: Hipótesis nula
H₁: Hipótesis alterna

Anexo 2

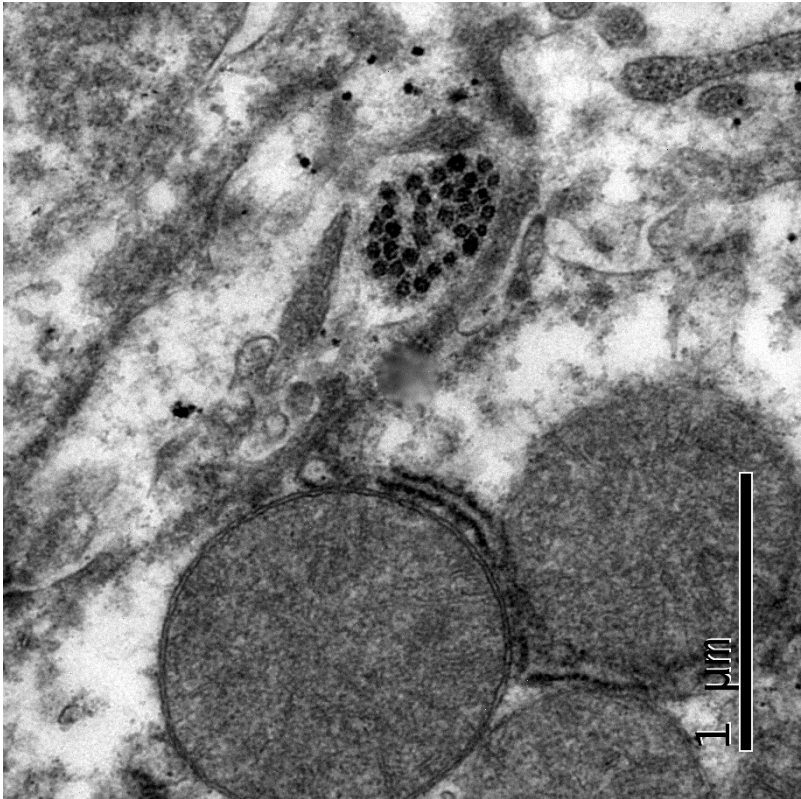
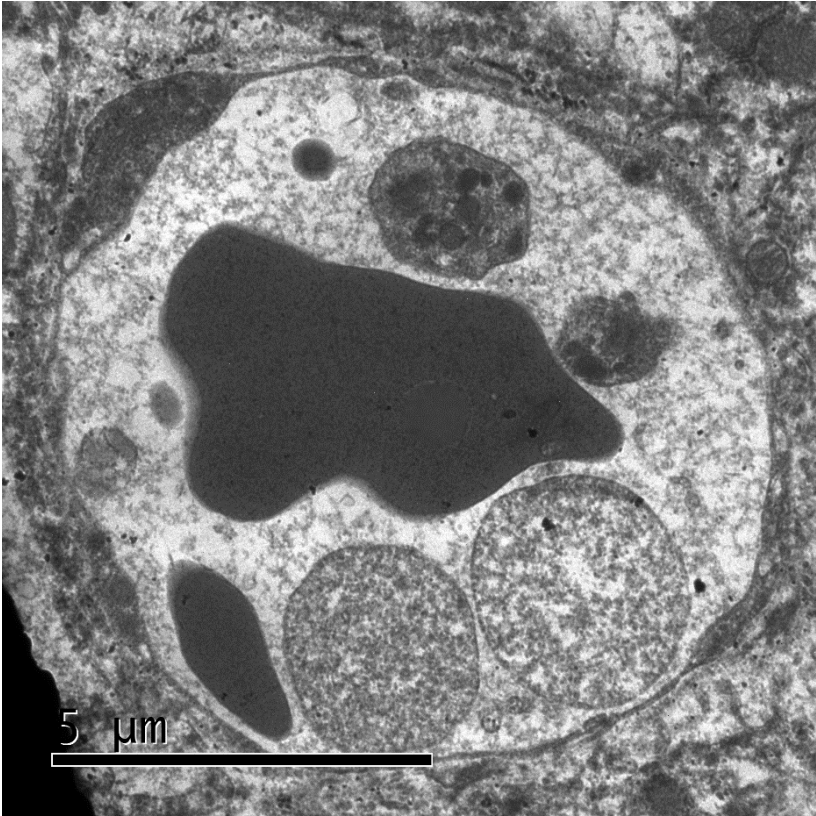
➤ Micrografías grupo Control:

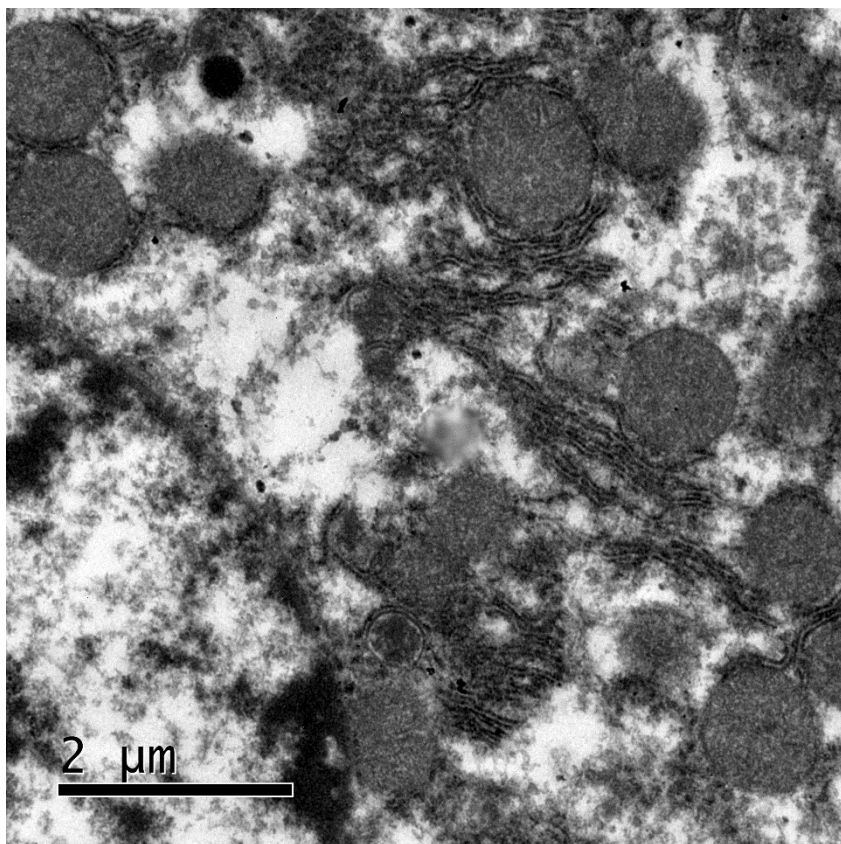
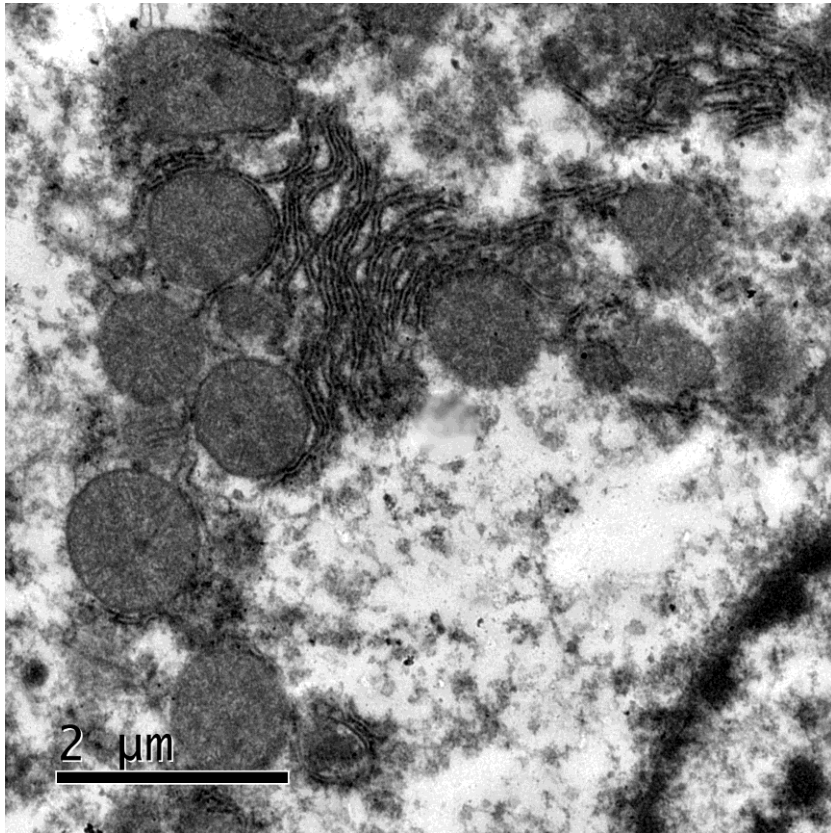


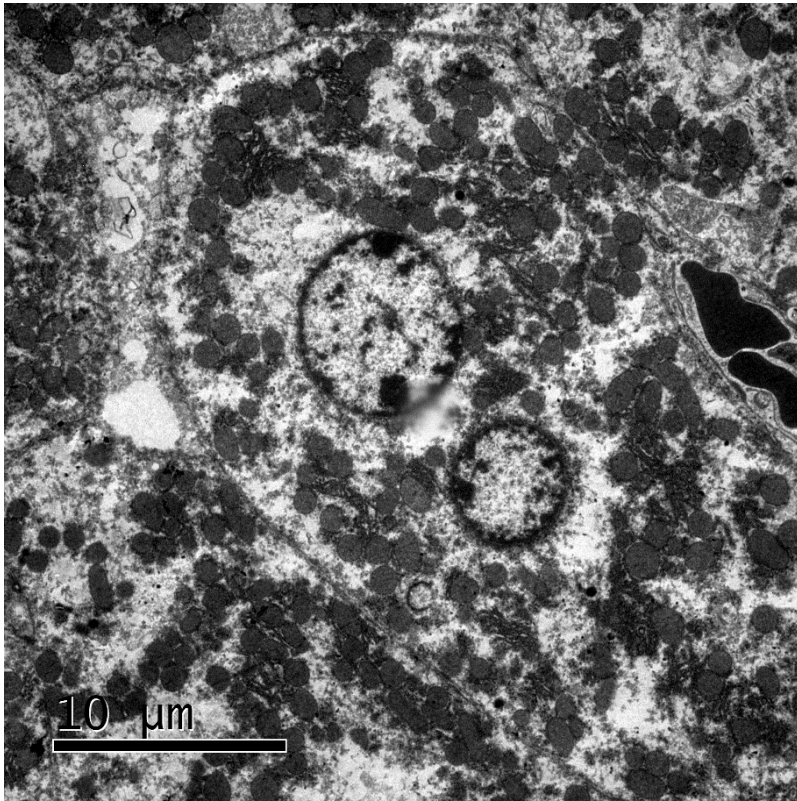




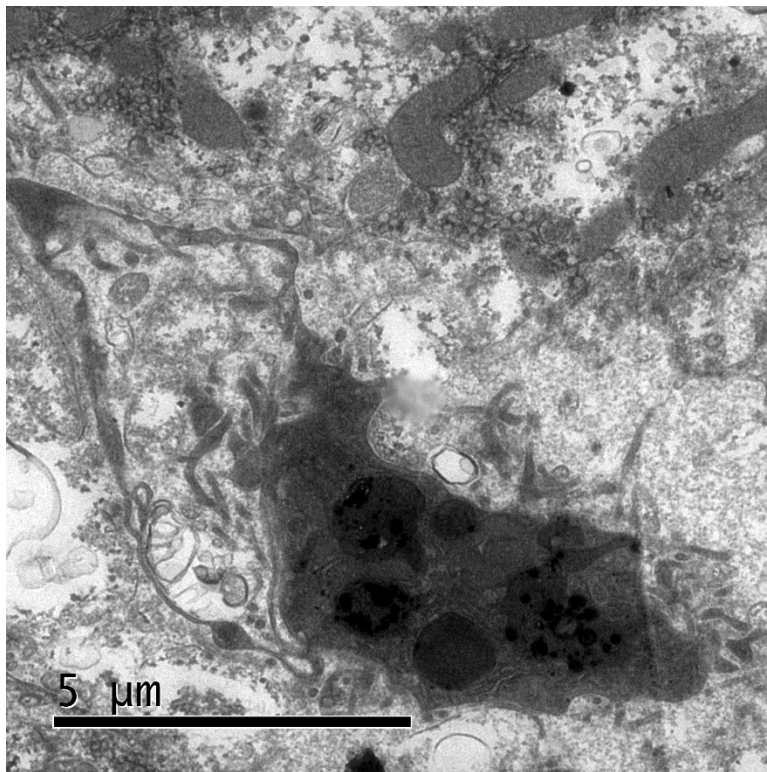
➤ **Micrografías dosis 5mg/Kg**

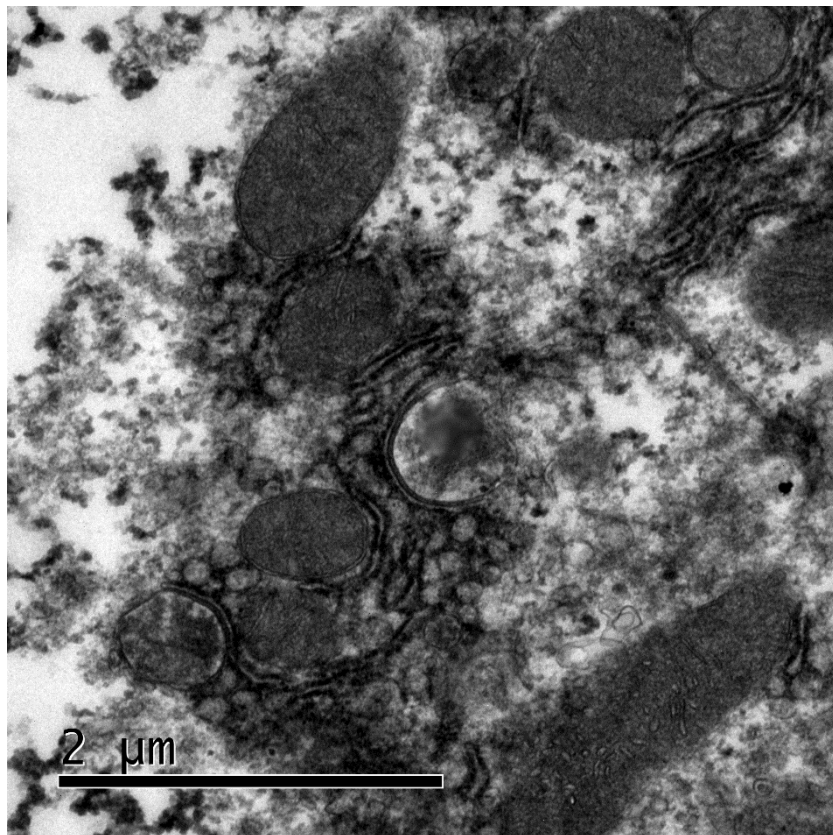
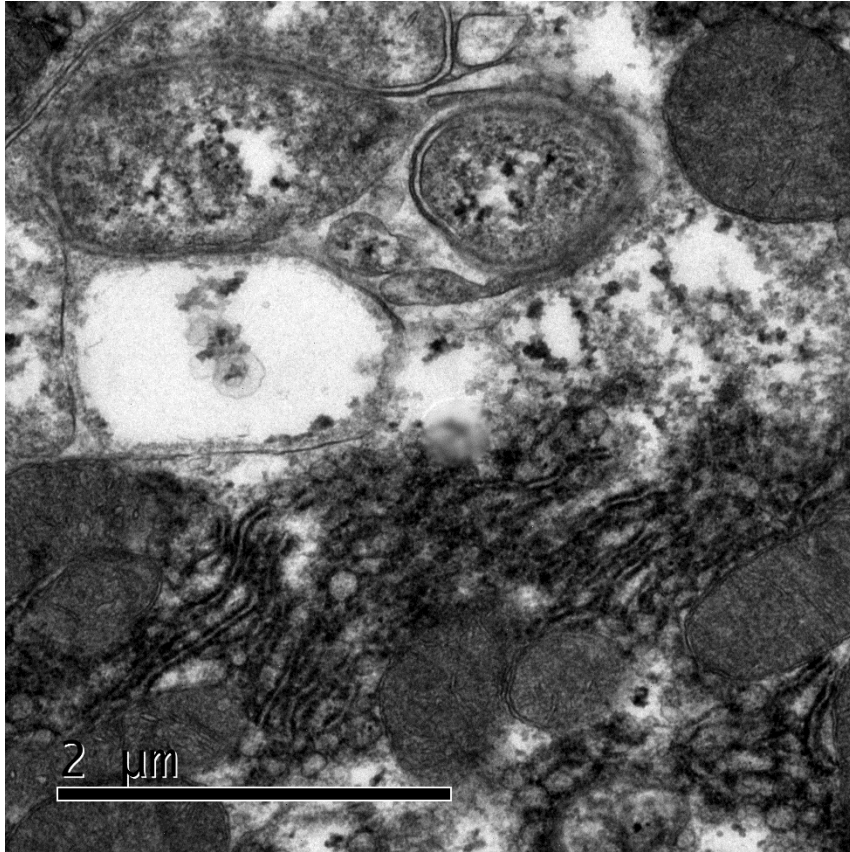


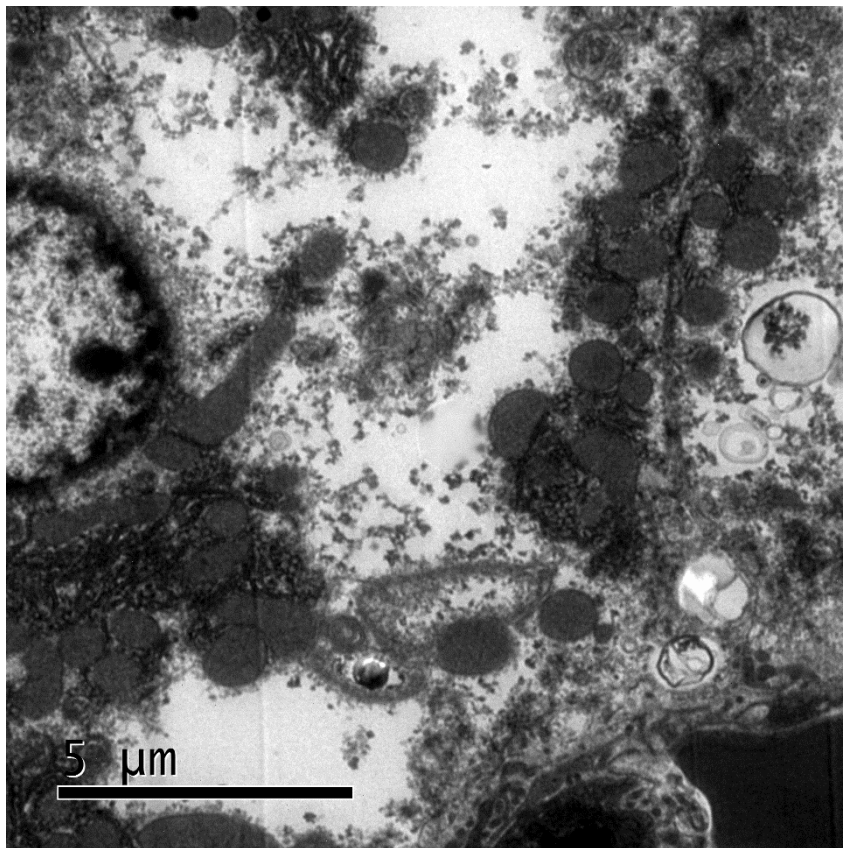
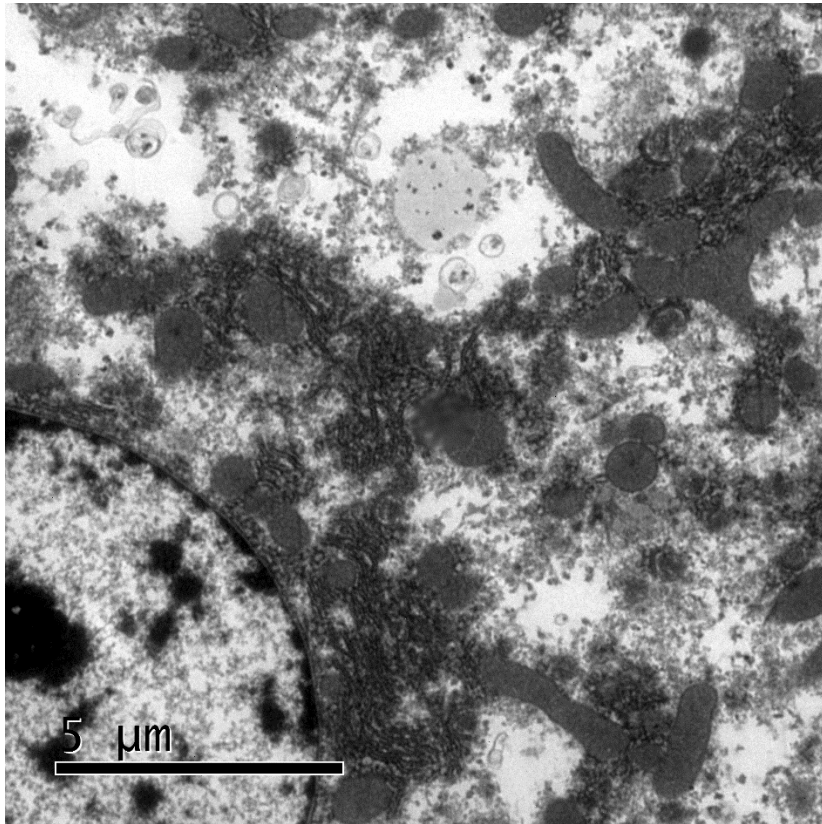


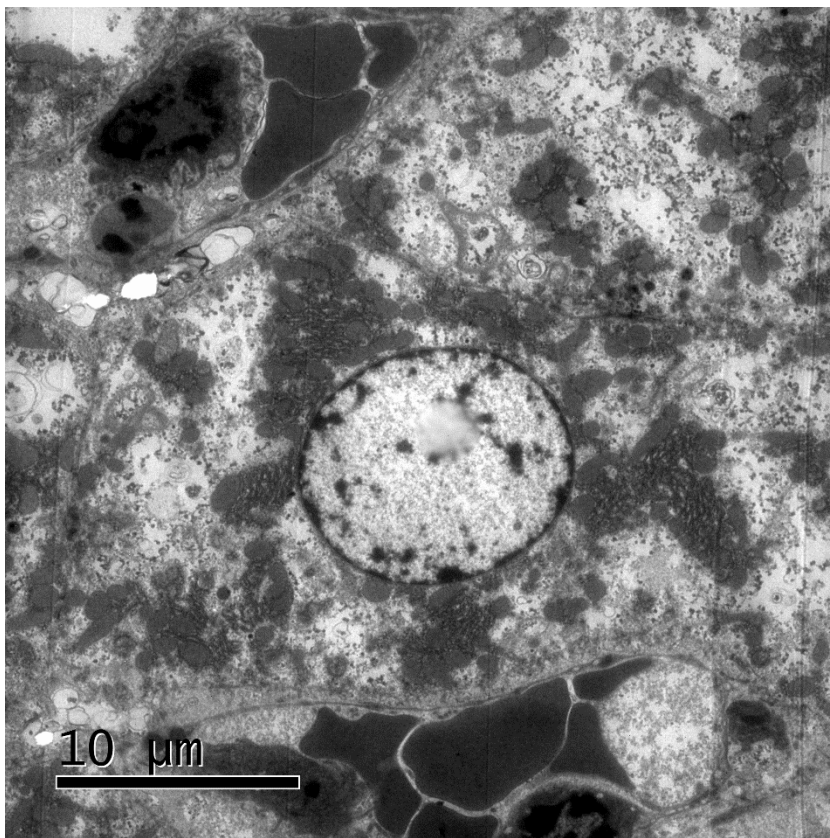
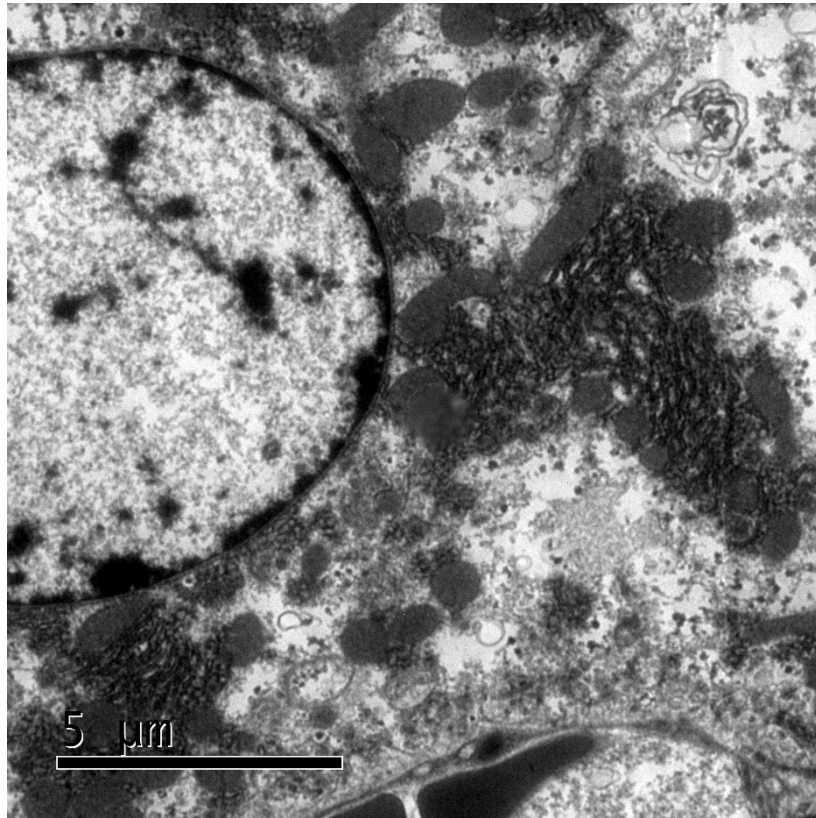


➤ **Micrografías dosis 50mg/Kg**









➤ **Micrografías dosis 300mg/Kg**

